

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА
ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І. І. МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"**

ХРИСТЯН ГЕННАДІЙ ЄВГЕНОВИЧ

УДК 66.017:615.28:612.089.61-036.018

**ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ КОМПОЗИТНИХ
ПОКРИТТІВ ДЛЯ СТОМАТОЛОГІЧНИХ ІМПЛАНТІВ**

"03.00.07 - мікробіологія"



**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

Дисертація є рукопис.

Роботу виконано у ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України"

Науковий керівник: кандидат медичних наук, старший науковий співробітник **Казмірчук Віктор Володимирович**, ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України", завідувач лабораторії протимікробних засобів;

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Мінухін Валерій Володимирович**, Харківський національний медичний університет МОЗ України, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова;

доктор медичних наук, професор **Сидорчук Ігор Йосипович**, ВДНЗ "Буковинський державний медичний університет" МОЗ України, професор кафедри мікробіології та вірусології.

Захист відбудеться "04" травня 2018 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України" за адресою: 61057, Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України" за адресою: 61057, Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

Автореферат розісланий "3" квітня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01,
кандидат медичних наук



Бруснік С. В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Важливим науковим завданням сучасної медицини є створення високотехнологічних біоматеріалів, які за своїми властивостями максимально наближені до тканин організму людини і здатні їх замінити. Вивчення комплексної взаємодії природних тканин та штучних біоматеріалів висвітлює центральний аспект фундаментальної проблеми біосумісності (Маланчук В. О., Чекман І. С., Рибачук А. В., 2010).

Розробка нанокомпозитних покриттів для стоматологічних імплантів є одним з науково-практичних напрямків, що швидко розвиваються. У всьому світі проводиться багато досліджень для модифікації поверхні імплантів з метою поліпшення їх остеоінтеграції та успішності довгострокового клінічного результату (Zhao L. et al., 2009; Tobin E.J., 2017; Суходуб Л.Ф., 2017).

Для досягнення бажаної біосумісності в живому організмі імпланти виготовляють зі спеціальних матеріалів, що характеризуються певними властивостями. Цим вимогам відповідає гідроксилапатит (ГА) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, що є основним неорганічним компонентом кісткової тканини, тому покриття на основі ГА є ефективними для забезпечення остеоінтеграції металевих імплантів (Mohseni E., 2014).

Незважаючи на досягнення в імплантології відомо, що біля 2 % імплантів не досягають ранньої остеоінтеграції, а загальний рівень їх відторгнення становить у середньому 7,7 % у продовж п'яти років після імплантації (Antoun N. et al., 2017; Jemt T. et al., 2017). Ключову роль у випадках невдач приживлення імплантів відіграють патологічні процеси мікробного генезу, визначені як періімплантні захворювання, що у підсумку призводять до втрати імпланту (Romanos G.E. et al., 2015). Клінічні дослідження підтвердили наявність асоційованого зв'язку між патогенною або умовно патогенною мікрофлорою і періімплантними захворюваннями та пародонтитом (Furst M. M. et al., 2007; Belibasakis G. N., 2015; Aoki M. et al., 2017). Тому, однією із основних вимог при вживленні імплантів є профілактика виникнення періімплантних захворювань шляхом застосування протимікробних засобів - антибіотиків, хіміопрепаратів та антисептиків (Jahoda D. et al., 2006; Chai F. et al., 2007; Hultin M., 2007).

Зважаючи на низьку ефективність традиційної медикаментозної профілактики під час і після імплантації та складність лікування періімплантних захворювань, важливою сучасною стратегією є надання покриттю імпланту крім остеоінтегруючих і бактерицидних властивостей із здатністю запобігати адгезії мікроорганізмів та швидкому формуванню у них резистентності (Le Guéhennec L. et al., 2007; Tran D. T., 2016). Потрібними корисними властивостями володіє ряд речовин природного та синтетичного походження (хітозан, колаген, іони срібла, декаметоксин та ін.), що було продемонстровано попередніми дослідженнями вітчизняних та зарубіжних науковців (Uchida Y., 1998; Гамзазаде А. И., 2006; Палій В. Г. та ін., 2012; Tu J. et al., 2012; Sadava E. E., 2013; Береза Б.М., 2014).

Вищевказане обумовлює актуальність розробки нових нанокомпозитних покриттів для стоматологічних імплантів на основі ГА і допоміжних компонентів з остеоінтегруючими та протимікробними властивостями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи лабораторії протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»: «Теоретичне та експериментальне обґрунтування розробки нанокомпозитних покриттів на основі біополімерів та протимікробних засобів для медичних імплантів» (№ держреєстрації 0111U004731), при виконанні якої дисертантом проведені основні експерименти щодо вивчення протимікробних властивостей зразків нових нанокомпозитних покриттів відносно референтних тест-штамів та клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань.

Мета роботи – мікробіологічне обґрунтування розробки нових композитних покриттів стоматологічних імплантів для підвищення ефективності профілактики періімплантних захворювань.

Виходячи з поставленої мети, визначено основні завдання дослідження.

Завдання дослідження:

1. Розробити серію нових нанокомпозитних покриттів стоматологічних імплантів на основі гідроксилапатиту і допоміжних компонентів із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями та вивчити їх фізико-хімічні характеристики;

2. Вивчити протимікробну активність експериментальних зразків композитних покриттів щодо референтних тест-штамів мікроорганізмів;

3. Визначити спектр і рівень антибактерійної та протигрибкової дії експериментальних зразків композитних покриттів щодо клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань;

4. Вивчити вплив нових композитних покриттів на адгезію мікроорганізмів.

5. Дослідити швидкість формування резистентності у мікроорганізмів до найбільш перспективних зразків розроблених композитних покриттів.

Об'єкт дослідження – нанокомпозитні покриття для стоматологічних імплантів, збудники періімплантних захворювань.

Предмет дослідження – склад, протимікробна та антиадгезивна активність зразків нових нанокомпозитних покриттів стоматологічних імплантів на основі гідроксилапатиту і компонентів із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями (хітозан, декаметоксин, іони срібла, колаген), швидкість формування резистентності до них у штамів збудників періімплантних захворювань.

Методи дослідження: фізико-хімічні (метод термодепозиції з системою охолодження для утримання стабільного градієнту температури для створення експериментальних зразків нових нанокомпозитних покриттів; скануюча електронна мікроскопія при дослідженні особливостей морфології поверхні покриттів та встановлення їх молярного стехіометричного співвідношення Са/Р; рентгенівська дифракція для визначення рівня кристалічності/шорсткості

поверхні покриттів), мікробіологічні (метод дифузії в агар/«колодязів» для вивчення протимікробної дії створених зразків покриттів щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів збудників периімплантних захворювань; метод серійних розведень у рідких поживних середовищах з послідуочим дозованим висівом на відповідні тверді поживні середовища для визначення МІК, МБК та МФК зразків покриттів щодо типових штамів мікроорганізмів; метод дослідження прояву адгезії мікроорганізмів до формалінованих еритроцитів крові людини для оцінки антиадгезивної дії покриттів; метод 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-статистичні (методи дисперсійного аналізу для обробки результатів експериментальних досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. З використанням технології термодепозиції в умовах утримання стабільного градієнту температури розроблено 18 зразків нових нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів на основі ГА та компонентів із протимікробними (хітозан, іони срібла, декаметоксин) та остеоінтегруючими (хітозан, колаген) властивостями.

Експериментальним шляхом вперше доведено високу протимікробну активність зразків на основі ГА № 11 (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хітозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, колаген 0,300 г/л) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників периімплантних захворювань. Значення МІК, МБК та МФК були відносно вищими у зразків покриттів №№ 11 і 12. Для тест-штамів бактерій *S. aureus* ATCC 25923, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277 МІК були у межах від (4,2±0,2) до (25,0±0,2), а МБК - від (12,5±0,0) до (66,7±0,1). Для грибів *C. albicans* ATCC 885-653 значення МІК сягало від (25,0±0,2) до (33,3±0,3) мкг/мл, а МФК - від (41,7±0,2) до (50,0±0,2) мкг/мл.

Вперше встановлено, що найбільшим ефектом пригнічення адгезії штамів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 володіє зразок покриття № 12, що підтверджується зменшенням величин ІАМ у порівнянні з контролем на 39,9 % і 27,4 %, відповідно.

Визначено, що найбільш повільне формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 відбувається до зразку покриття № 12 із збільшенням на 30 пасажі вихідного значення МІК у 26-28 разів.

Результати досліджень обґрунтовують перспективність застосування зразку нового покриття для стоматологічних імплантів № 12 з метою підвищення ефективності профілактики периімплантних захворювань.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено новий спосіб отримання модифікованого протимікробним засобом кальцій-фосфатного покриття для стоматологічних імплантів (патент України на корисну модель № 89955) та створено нову технологію отримання на металевому субстраті кальцій-фосфатного покриття з внесеним до його складу протимікробного

лікарського засобу - 0,025-0,05 мас.% декаметоксину (№ держреєстрації 0615U000087), які впроваджено у практику охорони здоров'я у формі галузевого нововведення (Інформаційний бюлетень НАМН України. Київ, 2016. Вип. 41).

Видано методичні рекомендації "Методи розрахунку інтегральних показників протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів" (Київ, 2015: 79.15/02.16) та інформаційний лист МОЗ України (№ 65 – 2015. Київ, 2015) з описом удосконаленого методу оцінки протимікробної активності препаратів, який також впроваджено у практику охорони здоров'я у формі галузевого нововведення (Інформаційний бюлетень НАМН України. Київ, 2017. Вип. 43).

Отримані результати наукових досліджень щодо антимікробних властивостей нового зразку нанокompозитного покриття на основі гідроксилапатиту із декаметоксином відносно домінуючих різновидів збудників періімплантних захворювань використовуються в навчальних програмах вищих медичних закладів та закладів післядипломної освіти МОЗ України: кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ "Дніпропетровська медична академія" (акт впровадження від 27.01.2018 р.), кафедри мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (акт впровадження від 05.03.2018 р.), кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт впровадження від 04.02.2018 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено інформаційно-патентний пошук, разом з керівником було обрано напрям дослідження, сформульовано тему, мету і завдання роботи, підібрано адекватні методи дослідження.

Автором самостійно виконано основні експерименти щодо вивчення протимікробних властивостей 18 зразків нових нанокompозитних покриттів відносно референтних тест-штамів та клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань. Визначено вплив 3 зразків покриттів з найвищою антибактерійною та протигрибковою активністю на адгезію та швидкість формування резистентності у мікроорганізмів різних таксономічних груп. Дисертантом проведено статистичну обробку та проаналізовано результати досліджень, що дозволило йому визначити найбільш перспективний зразок покриття для стоматологічних імплантів, обґрунтувати основні наукові положення дисертації, сформулювати узагальнюючі висновки та практичні рекомендації.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих із співавторами працях наведено у тексті дисертації та в авторефераті у списку наукових робіт.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень та положення дисертації були представлені і обговорені на: науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 170-й річниці з дня народження І. І. Мечникова "Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями" (Харків, 2015 р.); міжнародній науково-практичній конференції "Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної,

експериментальної та практичної медицини" (м. Харків, 2016 р.); науково-практичної конференції с міжнародним участием "Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике", посвященной 25-летию независимости Республики Казахстан (Алматы, 2016 р.); IV Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю "Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення" (м. Харків, 2017 р.), міжнародній науково-практичній конференції "Медицина XXI століття: перспективні та пріоритетні напрями наукових досліджень" (м. Дніпро, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные проблемы современной медицины: опыт Польши и Украины», (м. Люблин, 2017); Міжнародній науковій конференції «Наука і життя» (м. Карлові Вари, 2017); IV Міжнародній науково-практичній конференції "Актуальні питання прикладної науки" (м. Барселона, 2018 р.); V науково-практичній конференції з міжнародною участю «Україна: Медицина. Освіта» (Бахмут - Харків, 2018).

Публікації. Результати дисертації опубліковано у 28 наукових роботах (2 - одноосібно), серед них 1 монографія, 9 статей (7 – у наукових фахових журналах України, 2 – у міжнародних виданнях, 5 – включено до міжнародних наукометричних баз), 2 патенти України на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 1 інформаційний лист, 3 нововведення, 11 тез доповідей на наукових міжнародних конгресах, з'їздах, конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 149 сторінках і складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, висновків і списку літератури. Робота містить 9 таблиць і 9 рисунків. Список використаної літератури включає 197 джерело, з них 55 кирилицею та 142 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури, який містить три тематичні підрозділи, ґрунтовно висвітлено сучасні аспекти створення і застосування імплантів у стоматології. Проаналізовано асоційовані з імплантацією захворювання та акцентовано увагу на провідну роль у виникненні постімплантних інфекційних ускладнень, таких мікроорганізмів, як *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida spp.* та інших. Продемонстровано, що традиційна тактика використання протимікробних препаратів (антибіотиків, хіміопрепаратів та антисептиків) під час та після імплантації не завжди забезпечує досягнення очікуваного профілактичного та лікувального ефекту внаслідок недостатньої їх антибактерійної та протигрибкової активності, здатності запобігати небажаний адгезії мікроорганізмів та швидкому формуванню резистентності у останніх.

За результатами аналізу літератури зроблено висновок, що виникнення постімплантаційних ускладнень мікробного генезу залишається актуальною медичною проблемою, а перспективним напрямком запобігання виникненню таких ускладнень є розробка нових типів покриттів для імплантів, до складу яких доцільно включати компоненти природного і синтетичного походження із

протимікробними та остеоінтегруючими властивостями (хітозан, декаметоксин, іони срібла, колаген тощо).

Матеріали і методи досліджень. 18 зразків нових нанокомпозитних покриттів розроблено старшим науковим співробітником кафедри біофізики, біохімії, фармакології та біомолекулярної інженерії Сумського державного університету МОН України, к. хім. наук Суходуб Л. Б. Нанокомпозитні ГА покриття на титанових пластинах були отримані за допомогою методу термодепозиції з системою охолодження (Kuroda K. & Okido M., 2002; Суходуб Л.Б., 2004) із водного розчину солей кальцію та фосфору при пропусканні електричного струму силою близько 50 А через пластину і утримання стабільного нагріву останньої до температури близько 40 °С. При виготовленні покриттів були використані водні розчини: колагену виробництва «Sigma – Aldrich Inc.» (США); хітозану виробництва ЗАО «Биопрогресс» (РФ); декаметоксину виробництва ТОВ «Фаргомед» (Україна); колоїдного срібла виробництва «Coral Club Co» (Німеччина).

Дослідження морфології поверхні отриманих покриттів здійснювали за допомогою скануючого електронного мікроскопу РЕММА-102 (ВАТ «SELMI», Суми, Україна). Мікрофотографії поверхні отримані в режимі вторинних електронів (ВЕ) при прискорюючій напрузі 20 кВ. Елементний склад поверхні покриттів визначали за допомогою рентгенівського оже-спектрометра з дисперсією за енергіями РНІ-660 («PerkinElmer Co.», США). Обробка експериментальних даних була виконана за допомогою програмного пакету підтримки експерименту та обробки результатів DIFWIN-1 (ТОО «Эталон ПТЦ»).

При визначенні протимікробної активності зразків нових нанокомпозитних покриттів використовували референтні тест-штами мікроорганізмів - *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 10702, *C. albicans* ATCC 885-653, які були отримані з лабораторії медичної мікробіології з музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» (ДУ «ІМІ НАМН») та клінічні штами мікроорганізмів різних таксономічних груп із колекції лабораторії протимікробних засобів (КЛПЗ) ДУ «ІМІ НАМН»: *S. aureus*, *E. coli*, *P. gingivalis*, *C. albicans* – по 3 штами; *S. haemolyticus*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. perfringens* - по 2 штами; *S. mutans*, *Acinetobacter* spp., *E. faecalis* – по 1 штаму.

Для вирощування мікроорганізмів різних таксономічних груп застосовувались типові рідкі та щільні поживні середовища (Мюллера-Хінтона, сироваткове, тіогліколеве, Сабуро та інші).

Вивчення протимікробної активності створених зразків покриттів проведено у два етапи. На першому етапі методом дифузії в агар (метод «колодязів») визначена протимікробна активність усіх зразків покриттів (№№ 1 - 18) щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів мікроорганізмів збудників периімплантних захворювань (Волянський Ю.Л. та ін., 2004). Мікробне навантаження при відтворенні цих експериментів було 0,5 од. за стандартом McFarland (з використанням приладу Densi-La-Meter виробництва

«PLIVA-Lachema», Чехія), що наближено становило $1,5 \times 10^8$ КУО/мл для бактерій та $5,0 \times 10^6$ КУО/мл для грибів роду *Candida*. Облік результатів досліджень проводили через 18 – 24 годин термостатування висівів (при температурі 35 °C) шляхом вимірювання діаметру зони пригнічення росту з урахуванням діаметру лунок. Порівняння ступеню антибактерійної та протигрибкової дії зразків покриттів №№ 2-18 проведено з відповідними показниками контрольного зразку № 1 (покриття ГА без антимікробних компонентів).

На другому етапі для найбільш перспективних зразків нових покриттів було визначено мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) методом двократних серійних розведень у рідких поживних середовищах, а також мінімальні бактерицидні (МБК) і мінімальні фунгіцидні (МФК) концентрації шляхом дозованого висіву (0,1 мл) суспензій без ознак видимого росту на відповідні для кожного виду бактерій і грибів тверді поживні середовища для контролю виживання мікроорганізмів (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013).

Для вивчення впливу розроблених покриттів на адгезію мікроорганізмів застосовували загальноприйнятну методику (Осолодченко Т. П., 2009) в авторській модифікації, котра передбачає використання в якості клітин-мішеней для оцінки взаємозв'язування з мікроорганізмами формалінованих еритроцитів крові людини групи I(O), Rh (+).

Вивчення швидкості формування резистентності у мікроорганізмів до дії зразків покриттів проводили *in vitro* методом послідовних багаторазових пасажів тест-культур на поживних середовищах в присутності поступово зростаючих субінгібуючих концентрацій досліджуваних зразків. Дослідження здійснювали стандартним методом двократних серійних розведень у бульйоні Мюлер-Хінтона впродовж тридцяти тижнів, що відповідало відтворенню 30 пасажів. Густина мікробної суспензії при оптикометричному контролі відповідала стандарту мутності 0,5 за Мак-Фарландом. Усі мікробіологічні дослідження проводили у п'яти повторах (Гушилик Б. І., 2017).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням Microsoft Excel 2007 і його додаткового компоненту «Пакет аналізу». При оцінюванні значень протимікробної активності досліджуваних зразків покриттів застосовували t-тест. Рівень відмінностей оцінювали як статистично значимий при $p < 0,05$.

Результати власних досліджень та їх обговорення. У *третьому розділі* наведено дані щодо створення 18 зразків нових покриттів для стоматологічних імплантів на основі ГА та різних компонентів із протимікробними та остеointегруючими 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) з використанням методу термодепозиції.

Визначальною фізичною властивістю імплантів є морфологія поверхні покриттів. Представлені мікрофотографії показують пористу структуру покриттів з виразною рельєфністю поверхні, що забезпечує достатню здатність

імобілізувати та утримувати компоненти з протимікробною та біологічною активністю (рис. 1).

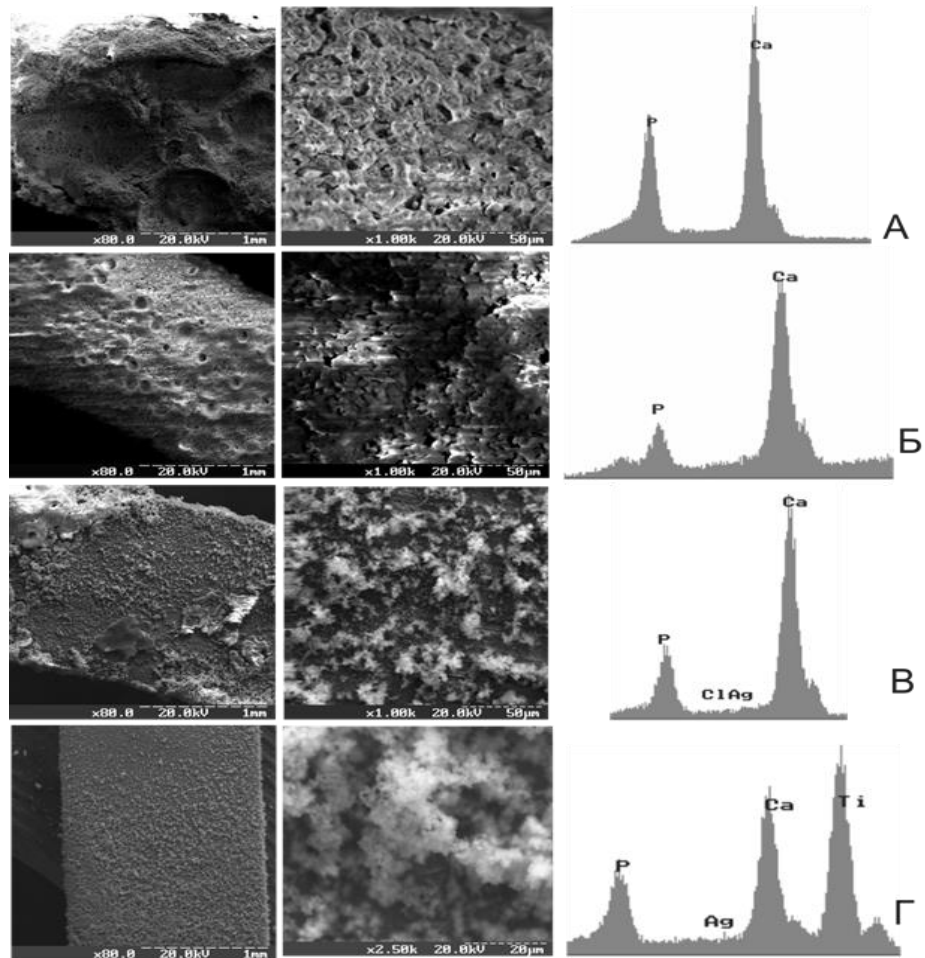


Рис. 1. Морфологія покриттів на основі ГА з додаванням хітозану та срібла, отриманих методом термодепозиції, де
 А – ГА + хітозан, 0,025 г/л; В – ГА + Ag+0,100 г/л;
 Б – ГА + хітозан, 0,100 г/л; Г – ГА.

За характеристиками пористості структури з виразною кристалічною рельєфністю поверхні ($10-15 \times 3-5$ нм) та молярним стехіометричним співвідношенням Ca/P нові покриття відносяться до групи нанокompозитних із потенційно високими остеointегруючими властивостями.

У *четвертому розділі* вивчено протимікробну активність на референтних тест-штамах 18 нових розроблених нанокompозитних покриттів, які відрізнялися за якісним та кількісним складом.

Вивчення протимікробної дії створених зразків покриттів №№ 1-18 проведено у два етапи. На першому етапі методом дифузії в агар (метод «колодязів») визначена протимікробна активність усіх зразків щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів мікроорганізмів збудників перімплантних захворювань.

На другому етапі для найбільш перспективних зразків нових покриттів (відібраних за результатами попередніх експериментів) визначено МІК - методом серійних розведень у рідких поживних середовищах, МБК та МФК - шляхом дозованого висіву на певні тверді поживні середовища із серії суспензій без ознак видимого росту для контролю виживання мікроорганізмів.

Результати дослідження протибактерійної і протигрибкової активності створених зразків покриттів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Протимікробна активність створених зразків покриттів щодо референтних тест-штамів мікроорганізмів

Зразок №	Тест-штами мікроорганізмів, діаметр зон затримки росту ($M \pm m$), мм				
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
1	11,0±0,3	13,0±0,2	11,0±0,2	12,0±0,3	10,0±0,2
2	13,0±0,3	13,0±0,2	13,0±0,3	13,0±0,3	13,0±0,3
3	14,0±0,3	14,0±0,3	14,0±0,3	14,0±0,3	14,0±0,3
4	15,0±0,1	15,0±0,1	15,0±0,1	15,0±0,2	15,0±0,2
5	15,2±0,1	16,1±0,2	15,3±0,1	17,0±0,1	14,0±0,1
6	17,4±0,1	19,4±0,1	17,2±0,1	20,3±0,1 ¹⁾	16,0±0,1
7	18,0±0,1	21,0±0,2 ¹⁾	19,4±0,1 ¹⁾	22,0±0,3 ¹⁾	19,0±0,1 ¹⁾
8	11,0±0,1	11,0±0,2	11,0±0,3	11,0±0,1	11,0±0,2 ¹⁾
9	18,2±0,2	19,0±0,1	18,3±0,1	19,3±0,1	17,0±0,1
10	19,0±0,2 ¹⁾	20,0±0,1	19,0±0,1 ¹⁾	21,0±0,2 ¹⁾	18,0±0,2 ¹⁾
11	25,8±0,1 ¹⁾	26,0±0,2 ¹⁾	25,2±0,1 ¹⁾	27,6±0,3 ¹⁾	23,0±0,2 ¹⁾
12	27,0±0,1 ¹⁾	28,0±0,2 ¹⁾	26,0±0,2 ¹⁾	28,0±0,2 ¹⁾	23,4±0,2 ¹⁾
13	24,0±0,1 ¹⁾	25,0±0,2 ¹⁾	23,0±0,3 ¹⁾	26,0±0,1 ¹⁾	22,0±0,2 ¹⁾
14	25,5±0,2 ¹⁾	25,6±0,1 ¹⁾	25,2±0,1 ¹⁾	26,3±0,1 ¹⁾	22,4±0,1 ¹⁾
15	21,4±0,2 ¹⁾	23,5±0,1 ¹⁾	20,3±0,2 ¹⁾	24,3±0,2 ¹⁾	20,0±0,1 ¹⁾
16	22,0±0,2 ¹⁾	24,0±0,3 ¹⁾	23,4±0,2 ¹⁾	25,2±0,6 ¹⁾	21,7±0,5 ¹⁾
17	25,3±0,1 ¹⁾	27,3±0,1 ¹⁾	24,6±0,1 ¹⁾	27,6±0,1 ¹⁾	23,0±0,1 ¹⁾
18	21,5±0,1 ¹⁾	23,0±0,2 ¹⁾	20,9±0,1 ¹⁾	23,0±0,3 ¹⁾	20,2±0,1 ¹⁾

Примітка: ¹⁾ $p < 0,05$ у порівнянні із контрольним зразком № 1.

Вищим рівнем протимікробної активності (за діаметром зон затримки росту зазначених мікроорганізмів від (23,0±0,2) до (28,0±0,2) 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 остеointегруючими (хітозан та колаген) властивостями. Тому, ці зразки покриттів було відібрано для проведення поглибленого дослідження їх протимікробної активності стосовно клінічних штамів збудників періімплантних захворювань.

Відповідно до зазначених рекомендацій "Європейського комітету з тестування антимікробної чутливості" (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) протимікробну активність визначено за показниками МІК, МБК та МФК. За результатами дослідження антибактерійної та протигрибкової активності відібраних зразків покриттів щодо клінічних штамів збудників периімплантних захворювань встановлено, що нові зразки покриттів №№ 11, 12 та 17 характеризуються широким спектром і достатньо високим рівнем протимікробної активності щодо різновидів грампозитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних бактерій, а також грибів роду *Candida*, які є найбільш клінічно значущими збудниками периімплантних захворювань.

Серед групи досліджених покриттів зразок № 12 володіє відносно вищою ($p < 0,05$) протимікробною активністю 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. Величина МІК зразка № 11 є дещо вищою ($p < 0,05$) 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 нижчою ($p < 0,05$) протимікробною дією за показниками 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.

Зразки нанокомпозитних 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 периімплантних захворювань. 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 *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 нижчими ($p < 0,05$) у зразків покриттів №№ 11 і 12. МІК цих покриттів для бактерій становив від ($6,3 \pm 0,3$) до ($25,0 \pm 0,0$) та від ($4,2 \pm 0,2$) до ($16,7 \pm 0,1$), а для грибів – ($33,3 \pm 0,3$) і ($25,0 \pm 0,0$) 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.

Встановлена нами 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), що також підтверджено результатами чисельних наукових праць як вітчизняних, так і зарубіжних фахівців.

У п'ятому розділі представлено результати вивчення впливу відібраних за ефективністю протимікробної дії нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів №№ 11, 12 та 17 на процес адгезії штамів мікроорганізмів різних таксономічних груп: *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923.

Результати визначення показників адгезії тест-штамів мікроорганізмів під впливом зразків розроблених нанокompозитних покриттів №№ 11, 12 та 17 у порівнянні із контрольним зразком ГА (№ 1) приведено у табл. 2 та 3.

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). Вірогідно, це є результатом дії зразку ГА із оцтовою кислотою, яка входить в якості розчинника (в об'ємній частці 0,5 %) до складу досліджуваної суспензії покриття № 1.

Таблиця 2

Результати визначення показників адгезії *E. coli* ATCC 25922 під впливом зразків розроблених нанокompозитних покриттів №№ 1, 11, 12, 17

Зразок №	СПА, М ± SD ¹⁾	КУЕ, %	ІАМ	Зменшення ІАМ у порівнянні з контролем, %
1	1,82 ± 0,21	52,0	3,48	0
11	1,14 ± 0,18	54,0	2,10 ²⁾	38,3
12	1,31 ± 0,19	62,0	2,11 ²⁾	39,9
17	1,17 ± 0,15	43,0	2,71 ²⁾	22,2

Примітки: ¹⁾ М – середнє арифметичне, SD – стандартне відхилення;

²⁾ p < 0,05 відмінності статистично значимі у порівнянні з контролем.

Зразок покриття № 11, який містить хітозан (0,050 г/л) і декаметоксин (0,025 г/л) забезпечував зниження ІАМ *E. coli* та *S. aureus* на 38,3 і 22,6 % у порівнянні з контролем. Дія зразку № 12, що містить удвічі вищу дозу хітозану (0,100 г/л) та аналогічну дозу декаметоксину (0,025 г/л) знижувала ІАМ обох зазначених штамів мікроорганізмів на 39,9 та 27,4 %, відповідно. Таке зниження рівня адгезії тест-штамів мікроорганізмів демонструє ефективність протиадгезивної дії хітозану. Менш ефективною на адгезію тест-штамів

мікроорганізмів була дія зразку покриття № 17, до складу якого крім декаметоксину (0,025 г/л) входить колаген у концентрації 0,300 г/л. При цьому, значення ІАМ знижувалось для *E. coli* АТСС 25922 на 22,2 %, а для *S. aureus* АТСС 25923 – на 27,1 %.

Таблиця 3

Результати визначення показників адгезії *S. aureus* АТСС 25923 під впливом зразків розроблених нанокompозитних покриттів №№ 1, 11, 12, 17

Зразок №	СПА, М ± SD ¹⁾	КУЕ, %	ІАМ	Зменшення ІАМ у порівнянні з контролем, %
1	2,02 ± 0,32	58,0	3,50	0
11	1,36 ± 0,26	50,0	2,71 ²⁾	22,6
12	1,30 ± 0,14	51,0	2,54 ²⁾	27,4
17	1,31 ± 0,16	51,0	2,55 ²⁾	27,1

Примітки: ¹⁾ М – середнє арифметичне, SD – стандартне відхилення;

²⁾ p < 0,05 відмінності статистично значимі у порівнянні з контролем.

Результати даного дослідження свідчать про те, що ГА (зразок № 1), який є морфологічно-структурною основою розроблених покриттів характеризується низьким рівнем протиадгезивної дії. Введення до складу покриттів певних доз компонентів із протимікробною та остеointегруючою дією (хітозану, декаметоксину і колагену) забезпечило помірний рівень їх протиадгезивної активності. Рівень антиадгезивного впливу залежить від складу покриття. Найбільшим ефектом пригнічення адгезії зазначених мікроорганізмів володіє зразок покриття № 12, до складу якого, крім ГА, входять хітозан (у концентрації 0,100 г/л) та декаметоксин (у концентрації 0,025 г/л), що підтверджується зменшенням величин ІАМ у порівнянні з контролем на 39,9 і 27,4 %, відповідно (p < 0,05).

У шостому розділі представлено дані щодо швидкості формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до дії зразків розроблених нанокompозитних покриттів №№ 11, 12 і 17, що різнились за якісним та кількісним складом компонентів із протимікробними та остеointегруючими властивостями (хітозану, декаметоксину та колагену) і показали відносно вищу рейтингову протимікробну та антиадгезивну активність. Дослідження швидкості формування резистентності до матеріалу покриттів проведено шляхом 30 послідовних пасажів вказаних тест-штамів на живильних середовищах, що містили зростаючі суббактеріостатичні концентрації відповідних зразків покриттів.

Динаміка формування резистентності у *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до зразків покриттів №№ 11, 12 і 17 продемонстровано на рис. 2 – 4, відповідно.

Аналіз даних діаграм 2 і 3 свідчить про повільне та схоже за динамікою формування резистентності у клінічних ізолятів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до зразків покриттів № 11 і № 12, склад кожного з яких містив 0,025 г/л

декаметоксину і відрізнявся концентрацією хітозану (0,050 і 0,100 г/л), відповідно. При цьому, незначне зростання резистентності у тест-штамів після 5 пасажу супроводжувалось збільшенням близько в 4 рази МІК у порівнянні із його вихідним значенням. Закономірність поступового зростання резистентності як у штаму *E. coli* КПЛЗ-22, так і у *S. aureus* КПЛЗ-3 спостерігалась до 25 пасажу з подальшим більш різким підйомом. Загальний рівень набутої резистентності цих мікроорганізмів на 30 пасажі характеризувався кратністю збільшення вихідної МІК у 28 і 32 рази, відповідно.

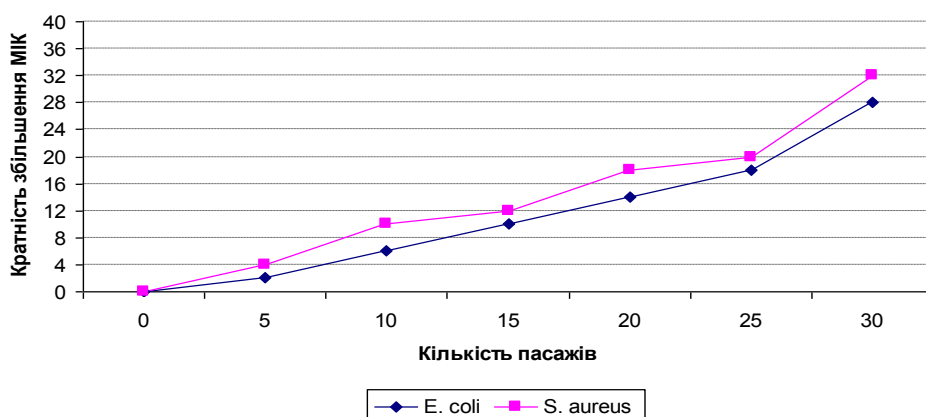


Рис. 2. Динаміка формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до зразку покриття № 11.

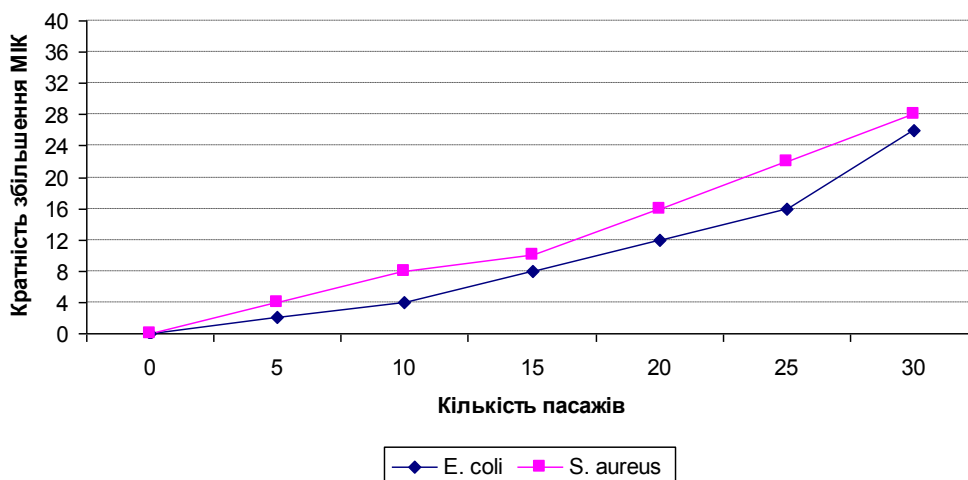


Рис. 3. Динаміка формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до зразку покриття № 12.

Навпроти, під дією зразка покриття № 17 (рис. 4), до складу якого входив декаметоксин (0,025 г/л) та колаген (0,300 г/л) резистентність у обох тест-штамів ешерихій та стафілококів зростала порівняно швидше ($p < 0,05$). Так, уже на 5 пасажі зафіксовано зростання вихідної МІК у 10-12 разів, а до 20 пасажу – у 26-32 рази. Динаміка формування резистентності характеризувалась на 30 пасажі кінцевим рівнем збільшення вихідної МІК у 38 і 40 разів для клінічних ізолятів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3, відповідно.

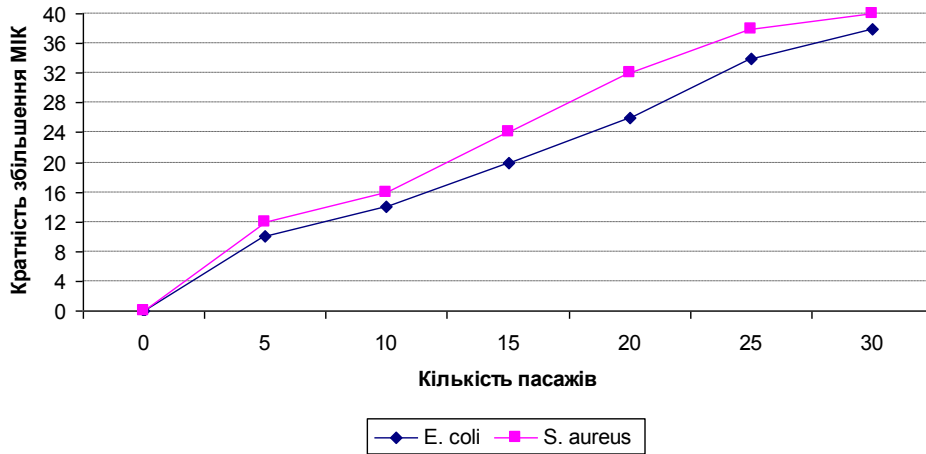


Рис. 4. Динаміка формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 до зразку покриття № 17.

Виявлена відмінність швидкості формування резистентності у ешерихій і стафілококів до дії зразків покриттів №№ 11, 12 і 17, які містили декаметоксин в якості основного протимікробного компонента, пояснюється властивим хітозану (що входить до складу зразків №№ 11 і 12) не лише помірним прямим антибактеріальним ефектом, але і його здатністю утримувати і поступово вивільняти різні інкорпоровані речовини із протимікробними властивостями.

Найбільш повільне формування резистентності *in vitro* у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 встановлено до зразків покриттів №№ 11 і 12, до складу яких, крім ГА, входять хітозан (у концентрації 0,050 і 0,100 г/л відповідно) та декаметоксин (у концентрації 0,025 г/л). Динаміка поступового зростання резистентності, як у *E. coli* КПЛЗ-22, так і у *S. aureus* КПЛЗ-3, спостерігалась з 5 до 25 пасажу із лінійно-подібним збільшенням МІК від 4 до 22 разів, з подальшим більш інтенсивним її формуванням до 30 пасажу. Кінцевий рівень набутої ешерихіями та стафілококами резистентності відзначався збільшенням вихідного значення МІК покриття № 11 у 28 і 32 рази, а № 12 - у 26-28 разів, відповідно.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі результатів експериментальних досліджень та їх теоретичних узагальнень вирішено наукове завдання щодо розробки нового композитного покриття для стоматологічних імплантів з метою підвищення ефективності профілактики періімплантних захворювань. Мікробіологічно обґрунтована медична перспективність покриття, яке характеризується достатньо вираженою антибактерійною та фунгіцидною активністю, пригнічуючою дією на адгезію мікроорганізмів, повільним формуванням резистентності у патогенів, а також відсутністю негативного впливу матеріалу покриття на структурно-функціональний стан зубоальвеолярного апарату та слизової оболонки ясен.

1. Впродовж усіх етапів розвитку стоматологічної імплантології, виникнення постімплантаційних ускладнень мікробного генезу залишається

актуальною медичною проблемою. Одним із пріоритетних напрямків запобігання виникненню таких ускладнень є розробка нових типів покриттів для імплантів, до складу яких включають компоненти із протимікробними та остеointегруючими властивостями (антибіотики, антисептики, хітозан, біоактивні полімерні сполуки тощо).

2. Методом термодепозиції створено серію із 18 зразків нових покриттів для стоматологічних імплантів на основі ГА та компонентів із протимікробними та остеointегруючими властивостями: 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). За характеристиками пористості структури з виразною кристалічною рельєфністю поверхні ($10-15 \times 3-5$ нм) та молярним стехіометричним співвідношенням $Ca/P=1,67$ нові покриття відносяться до групи нанокompозитних із потенційно високими остеointегруючими властивостями.

3. Визначено, що зразки композитних покриттів на основі ГА № 11 (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хітозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, колаген 0,300 г/л) характеризуються найвищою протимікробною активністю ($p < 0,05$) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань, що належать до різних таксономічних груп - грампозитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних бактерій, а також грибів роду *Candida*.

4. Встановлено, що 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 величина показників МІК, МБК та МФК була відносно нижчою ($p < 0,05$) у зразків покриттів №№ 11 та 12 і становила: МІК для бактерій від $(6,3 \pm 0,3)$ до $(25,0 \pm 0,0)$ та від $(4,2 \pm 0,2)$ до $(16,7 \pm 0,1)$, а для грибів - $(33,3 \pm 0,3)$ і $(25,0 \pm 0,0)$ мкг/мл, відповідно; МБК від $(16,7 \pm 0,3)$ до $(66,7 \pm 0,1)$ та від $(12,5 \pm 0,0)$ до $(33,3 \pm 0,1)$ мкг/мл, а МФК становила $(50,0 \pm 0,0)$ і $(41,7 \pm 0,2)$ мкг/мл, відповідно.

5. Композитні покриття №№ 11, 12, 17 проявляють антиадгезивну дію щодо мікроорганізмів різних таксономічних груп (*E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923). Рівень антиадгезивного впливу залежить від складу покриття. Найбільшим ефектом ($p < 0,05$) пригнічення адгезії зазначених мікроорганізмів володіє зразок покриття № 12, що підтверджується зменшенням величин ІАМ у порівнянні з контрольним зразком № 1 на 39,9 % і 27,4 %, відповідно.

6. Найбільш повільне формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 встановлено до зразків покриттів №№ 11 і 12. Динаміка поступового зростання резистентності, як у ешерихій, 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 ешерихіями та стафілококами резистентності відзначався збільшенням вихідного значення МІК зразку покриття № 11 у 28 і 32 рази, а № 12 - у 26-28 разів, відповідно.

Практичні рекомендації

Нова технологія отримання нанокомпозитних кальцій-фосфатних покриттів з протимікробними засобами рекомендується для розробки нових типів покриттів медичних імплантів, використання яких дозволить підвищити ефективність профілактики постімплантних захворювань мікробного генезу.

Найбільш перспективний зразок композитного покриття для стоматологічних імплантів, до складу якого входить хітозан (0,100 г/л) і декаметоксин (0,025 г/л), володіє найвищою протимікробною активністю, вираженим ефектом пригнічення адгезії бактерій та повільним формуванням у них резистентності, рекомендується для подальших досліджень з метою впровадження у виробництво і застосування в медичній практиці.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Нанокомпозитні покриття, їх розроблення та застосування у сучасній стоматології / Христян Г. Є., Мельник А. Л., Торяник І. І., Трофімов М. В., Казмірчук В. В. // *Development and modernization of medical science and practice: experience of Poland and prospects of Ukraine : Collective monograph / Lublin: Izdevnieciba: Baltija Publishing, 2017. Vol. 2. С. 197–212.* (Автором вивчено та проаналізовано будову та властивості існуючих нанокомпозитних покриттів, а також напрямки їх застосування у сучасній стоматології).

2. Христян Г. Є. Нанокомпозитні покриття на основі гідроксилапатиту та хітозану для медичних імплантів // *Експериментальна і клінічна медицина. 2017. № 3 (76). С. 26-34.* (Автором проведено інформаційно-патентний пошук та аналіз сучасних остеопластичних матеріалів, методи їх отримання, проаналізовані їх переваги і недоліки, зроблено висновок про переваги композитних мінералоорганічних матеріалів на основі хітозану та гідроксилапатиту через наявність комбінації біоактивних, остеокондуктивних, остеointegraційних, біодеградаційних та біомеханічних властивостей).

3. Швидкість формування резистентності мікроорганізмів до хітозану / Христян Г. Є., Суходуб Л. Б., Щербак О. М., Шульга Н. М., Казмірчук В. В. // *Світ медицини та біології. 2014. № 4. С. 203-206.* (Здобувачем виконано експерименти щодо вивчення швидкості формування резистентності у клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань до нових ГА нанокомпозитних покриттів з протимікробними компонентами).

4. Composite materials based on zinc sulfide and zinc oxide: structural and biocidal properties [Electronic resource] / L. B. Sukhodub, G. E. Khrystian, L. F. Sukhodub, N. M. Shulga, A. M. Meshkov, V. V. Kazmirchuk, A. V. Martynov // *Annals of Mechnikov Institute. – 2016. № 4. P. 34-39. URL: http://www.irbis-nbu.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbu/* (Здобувачем вивчені структурні та біоцидні властивості композитних матеріалів на основі сульфіду та оксиду цинку).

5. Композитні покриття із протимікробними властивостями для стоматологічних імплантів / Христян Г. Є., Казмірчук В. В., Іваннік В. Ю., Юдін І. П., Возний О. В., Мельник А. Л., Сорокоумова Л. К. //

Експериментальна і клінічна медицина. 2018. № 1 (78). С. 61-69. (Автором самостійно виконані експерименти з визначення протимікробних властивостей композитних покриттів для стоматологічних імплантів щодо референтних та клінічних штамів збудників периімплантних захворювань).

6. Чутливість збудників периімплантних захворювань до нових нанокompозитних покриттів на основі гідроксилапатиту / Казмірчук В. В., Христян Г. Є., Іваннік В. Ю., Возний О. В., Мельник А. Л. // Scientific journal materials. ACADEMY Journal. Chief Editor Germany Susan Belih. – Spain, Barcelona, 2018. 2(4). Р. 91-103. (Дисертантом визначено спектр і ступінь чутливості у збудників периімплантних захворювань до нових нанокompозитних покриттів на основі гідроксилапатиту).

7. Аналіз протимікробних властивостей нанокompозитних покриттів стоматологічних імплантів / Христян Г. Є., Торяник І. І., Казмірчук В. В. // Молодий вчений "Тенденції розвитку медичної науки та практики: досвід країн Східної Європи та перспективи України", Рига. Латвія, 2018. Том 2. С. 207–225. (Автором проведено дослідження 18 зразків нових нанокompозитних покриттів стоматологічних імплантів з визначенням їх протимікробної активності, ефектів пригнічення адгезії та формування резистентності у бактерій).

8. Вплив протимікробних компонентів біокompозитних матеріалів на основі гідроксилапатиту на адгезію мікроорганізмів / Суходуб Л. Б., Осолодченко Т. П., Христян Г. Є., Штикер Л. Г., Козубова Г. М., Шульга Н. М., Невмержицький В. В., Казмірчук В. В. // Запорізький медичний журнал. 2014. № 2. С. 112-114. (Здобувачем проведені основні експерименти щодо впливу розроблених покриттів на адгезію референтних тест-штамів збудників периімплантних захворювань).

9. Інтегральна характеристика інфекційно-запальних захворювань порожнини рота / Мельник А. Л., Довга І. М., Христян Г. Є., Радченко О. О., Поволокіна І. В., Казмірчук В. В. // Клінічна та експериментальна патологія. 2015. Т. IV. № 1(51). С. 215-220. (Автором проаналізовано та узагальнено поширеність і клінічний перебіг домінуючих інфекційно-запальних захворювань порожнини рота і їх взаємозв'язок з асоціаціями мікроорганізмів різних таксономічних груп).

10. Спосіб отримання антисептичного кальцій-фосфатного покриття : патент 89955 (UA). № u201312526 ; заявл. 25.10.2013; опубл. 12.05.2014, Бюл. № 9. 2 с. / Суходуб Л. Б., Христян Г. Є., Казмірчук В. В., Шульга Н. М., Сорокоумов В. П., Поволокіна І. В., Невмержицький В. В., Радченко О. О., Щербак О. М., Юдін І. П., Чумаченко О. О., Чурсін В. В. (Дисертант приймав участь у розробці способу введення до кальцій-фосфатного покриття для імплантів медичного призначення антисептику декаметоксину).

11. Протимікробний засіб для лікування захворювань ротової порожнини : пат. 113906 UA. № u201606491 ; заявл. 13.06.2016. ; опубл. 27.02.2017, Бюл. № 4. 8 с. / Казмірчук В. В., Мельник А. Л., Христян Г. Є., Рудик Р. І., Бойко М. М., Волков Т. О., Волянський Д. Л., Ляшенко М. І., Довга І. М., Поволокіна І. В., Шульга Н. М., Трофимчук Г. І., Сергеев Р. К., Сорокоумов В. П., Макаренко В. Д. (Дисертантом проведені мікробіологічні експерименти з вивчення

антибактерійної та протигрибкової активності нового гелю для лікування захворювань ротової порожнини).

12. Методи розрахунку інтегральних показників протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів : методичні рекомендації / М. М. Бойко, О. І. Зайцев, С. І. Похил, Т. П. Осолодченко, В. В. Казмірчук, Л. В. Нефьодова, Б. І. Гушилик, А. Л. Мельник, В. В. Невмержицький, Г. Є. Христян. Київ, 2015. 29 с. (Дисертант проаналізував існуючі методи розрахунку інтегральних показників та запропонував уніфікований метод порівняння як моно- так і полівидової протимікробної активності препаратів).

13. Спосіб отримання антисептичного кальцій-фосфатного покриття : нововведення / Л. Б. Суходуб, Г. Є. Христян, В. В. Казмірчук, Н. М. Шульга // Інформаційний бюлетень НАМН України (додаток до "Журналу Національної академії медичних наук України". Київ, 2016. Вип. 41. С. 75-76. (Автор приймав участь у розробці галузевого нововведення для впровадження у медичну практику способу отримання антисептичного кальцій фосфатного покриття).

14. Протимікробний засіб для підвищення ефективності лікування та профілактики запальних захворювань ротової порожнини (ЗЗРП) : [нововведення] / Казмірчук В. В., Мельник А. Л., Христян Г. Є., Рудик Р. І., Бойко М. М., Волков Т. О., Волянський Д. Л., Ляшенко М. І., Довга І. М., Поволокіна І. В., Шульга Н. М., Трофимчук Г. І., Сергеев Р. К., Сорокоумов В. П., Макаренко В. Д., Юдін І. П. // Інформаційний бюлетень. Додаток до "Журналу Національної академії медичних наук України". Київ, 2017. Вип. 43. С. 76-77. (Здобувач приймав участь у розробці нового засобу для лікування ЗЗРП у формі гелю з високою антибактерійною, протигрибковою і протизапальною активністю).

15. Інтегральні методи розрахунку показників протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів (ПМААЛЗ) : [нововведення] / Бойко М. М., Зайцев О. І., Похил С. І., Осолодченко Т. П., Казмірчук В. В., Нефьодова Л. В., Гушилик Б. І., Мельник А. Л., Невмержицький В. В., Христян Г. Є. // Інформаційний бюлетень. Журнал Національної академії медичних наук України. Додаток. Київ, 2017. Вип. 43. С. 77. (Автором проведені дослідження з вивчення протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів методом дифузії в агар, визначені зони затримки росту мікроорганізмів, та розраховано інтегральні показника визначення протимікробної активності з використанням векторної теорії).

16. Метод інтегрального оцінювання протимікробної активності препаратів : Інформаційний лист № 65 про нововведення в сфері охорони здоров'я / О. І. Зайцев, Л. В. Яковлева, М. М. Бойко, С. І. Похил, Т. П. Осолодченко, Б. І. Гушилик, А. Л. Мельник, В. В. Невмержицький, Г. Є. Христян, І. П. Юдін, В. Д. Макаренко, В. В. Казмірчук. МОЗУ. Київ, 2015. – 6 с. (Здобувач приймав участь у складанні інформаційного листа, в якому запропонував представляти інтегральний показник протимікробної активності препаратів, як вектор у n-вимірному просторі з координатами у вигляді МІК, МБК, або діаметру зон затримки росту по кожному тест-мікроорганізму).

17. Спосіб отримання антисептичного кальцій-фосфатного покриття : несекретна завершена технологія № 0615U000087 / Суходуб Л. Б., Христян Г.Є, Казмірчук В. В. Шульга Н. М., Сорокоумов В. П., Поволокіна І. В., Невмержицький В. В., Радченко О. О., Щербак О. М., Юдін І. П., Чумаченко О. О., Чурсін В.В. ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» ; опубл. 18.11.2015. (Автор приймав участь у підборі технологічного режиму термодепозиції при 70 – 80 °С кальцій-фосфатного покриття, за якого молярне співвідношення Са/Р в материнському розчині солей Са та Р дорівнює 1,67).

18. Христян Г. Є. Вивчення протимікробної активності композитних покриттів на основі гідроксиапатиту // Медицина ХХІ століття: перспективні та пріоритетні напрями наукових досліджень: Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції (м. Дніпро, 28 29 липня 2017 р.). Дніпро: Організація наукових медичних досліджень "Salutem", 2017. С. 83–85.

19. Христян Г. Є., Торяник І. І., Казмірчук В. В. Вплив декаметоксину на протимікробну активність нанокompозитних покриттів стоматологічних імплантів із вмістом колагену // International research and practice conference «Relevant issues of modern medicine: the experience of Poland and Ukraine» : Conference proceedings, October 20–21, 2017. Lublin: Izdevnieciba «Baltija Publishing». Р. 90-93. (Дисертантом вивчено вплив декаметоксину на протимікробну дію нових нанокompозитних покриттів стоматологічних імплантів).

20. Методы индикации микобактерий туберкулеза в околозубных очагах инфекции / Л. И. Авдонина, Г. Е. Христян, Н. В. Прийма, О. В. Авдонина // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої 170-й річниці з дня народження І. І. Мечникова (14–15 травня 2015 р.). Харків, 2015. С. 115. (Дисертантом оптимізовано спосіб виділення та ідентифікації мікобактерій туберкульозу в навколзубних вогнищах інфекції).

21. Рівень протимікробної активності нових нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів / Христян Г. Є., Юдін І. П., Торяник І. І., Іваннік В. Ю., Казмірчук В. В. // Actual problems of applied sciences : Collection of scientific conference materials. IV International scientific-practical conference. Chief Editor Germany Markus Hemmer. Spain, Barcelona, 2018. – Р. 12-19. (Автором самостійно виконані мікробіологічні експерименти з вивчення протимікробної активності нових нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів).

22. Структурні зміни слизових оболонок органів ротової порожнини за умов застосування стоматологічних імплантів з нанокompозитним покриттям / Попов М. М., Торяник І. І., Христян Г. Є., Мельник А. Л., Казмірчук В. В. // Science and life: Proceedings of articles the international scientific conference. Czech Republic, Karlovy Vary - Ukraine, Kyiv, 22 December 2017. Czech Republic, Karlovy Vary: Skleněný Můstek. ISBN 978-80-7534-079-5. Р. 472-478. (Автором вивчені структурні зміни слизових оболонок ясен за умов застосування стоматологічних імплантів з нанокompозитним покриттям).

23. Ультрамiкроскопiчне дослідження структури нанокомпозитних покриттів стоматологiчних iмплантiв з протимiкробними властивостями / І. І. Торяник, Г. Є. Христян, В. В. Казмирчук, В. П. Сорокоумов, В. Д. Макаренко, І. П. Юдiн, Т. М. Моiсеєнко // Фiзiологiя – медицинi, фармацiї та педагогiцi: актуальнi проблеми та сучаснi досягнення : матерiали IV Всеукраїнської наукової конференцiї студентiв та молодих вчених з фiзiологiї з мiжнародною участю (м. Харкiв, 16 травня 2017 року). Харкiв: ХНМУ, 2017. С. 125–126. (Автором проведенi мiкроскопiчнi дослідження з вивчення структури нових нанокомпозитних покриттів стоматологiчних iмплантiв).

24. Торяник І. І., Казмирчук В. В., Христян Г. Е. Изучение влияния противомикробных компонентов биокompозитных материалов на адгезию микроорганизмов // Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике, посвященной 25-летию независимости Республики Казахстан : сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. – Алматы, 2016. С. 103. (Автором проведенi експерименти з вивчення впливу протимiкробних компонентiв бiокompозитних матерiалiв на адгезiю мiкроорганiзмiв).

25. Швидкiсть формування резистентностi у клiнiчних штамiв *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* до композитних покриттiв стоматологiчних iмплантiв / Христян Г. Є., Юдiн І. П., Казмирчук В. В., Шульга Н. Н., Суходуб Л. Б., Возний О. В., Мельник А. Л. // Сучаснi проблеми антибіотикотерапiї та формування антибіотикорезистентностi : матерiали науково-практичної конференцiї з мiжнародною участю (Чернiвцi, 29 сiчня 2018 року). – Чернiвцi: БДМУ, 2018. С. 100–102. (Автором виконано експерименти з вивчення швидкостi формування резистентностi у клiнiчних штамiв *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* до композитних покриттiв стоматологiчних iмплантiв).

26. Мiкроскопiчна реакцiя слизової та сполучнотканної складових зубоальвеолярних зон на застосування нанокомпозитних покриттiв стоматологiчних iмплантiв / І. І. Торяник, Г. Є. Христян, В. В. Казмирчук, В. П. Сорокоумов // Innovative technology in medicine: experience of Poland and Ukraine : International research and practice conference. Lublin, Republic of Poland, 2017. С. 101–104. (Дисертантом вивчено стан слизової оболонки ясен та сполучної тканини при застосуванні нових нанокомпозитних покриттiв стоматологiчних iмплантiв).

27. Нанокомпозитнi стоматологiчнi iмпланти та фундаментальнi методи визначення протимiкробної дiї їхнiх покриттiв / Христян Г. Є., Торяник І. І., Казмирчук В. В., Іваннiк В. Ю., Макаренко В. Д. // Україна: Медицина. Освiта. V Науково-практична конференцiя з мiжнародною участю. Бахмут, 2018. Т. I. С. 42. (Здобувачем доведена протимiкробна дiя нанокомпозитних покриттiв щодо збудникiв перiiмплантних захворювань).

28. Апробацiя протимiкробної дiї нанокомпозитних зразкiв стоматологiчних iмплантiв на референтнi тест-штами мiкроорганiзмiв / Христян Г. Є., Торяник І. І., Казмирчук В. В., Похил С. І., Юдiн І. П., Макаренко В. Д., Казмирчук В. В. // Україна: Медицина. Освiта. V Науково-практична конференцiя з мiжнародною участю. Бахмут, 2018. Т. I. С. 44. (Дисертант

визначив протимікробну дію нових зразків стоматологічних імплантів щодо референтних тест-штамів мікроорганізмів).

АНОТАЦІЯ

Христян Г. Є. Протимікробні властивості нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів. – На правах рукопису.

Дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків, 2018.

У дисертаційній роботі експериментальним шляхом вирішено наукове завдання розробки нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів з підвищеними протимікробними та остеоінтегруючими властивостями.

Вперше з використанням технології термодепозиції з системою охолодження розроблено 18 зразків нових нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів на основі гідроксиапатиту (ГА) та компонентів із протимікробними (хітозан, іони срібла, декаметоксин) та остеоінтегруючими властивостями (хітозан, колаген).

Експериментальним шляхом вперше доведено високу протимікробну активність зразків покриттів на основі ГА № 11 (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хітозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, колаген 0,300 г/л) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань. Показники МІК, МБК та МФК були відносно нижчими у зразків покриттів №№ 11 і 12. Найбільшим ефектом пригнічення адгезії штамів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 володіє зразок покриття № 12, що підтверджено зменшенням вихідної величин ІАМ на 39,9 і 27,4 %, відповідно.

Вперше встановлено, що найбільш повільно резистентність у клінічних штамів *E. coli* КПЛЗ-22 та *S. aureus* КПЛЗ-3 формується до дії покриттів №№ 11 і 12. Кінцевий рівень (на 30 пасажі) набутої ешерихіями та стафілококами резистентності відзначався збільшенням вихідного значення МІК зразку покриття № 11 у 28 і 32 рази, а № 12 - у 26 і 28 разів, відповідно.

Ключові слова: мікроорганізми, періімплантні захворювання, композитні покриття стоматологічних імплантів, протимікробна активність.

АННОТАЦИЯ

Христян Г. Е. Противомикробные свойства новых композитных покрытий для стоматологических имплантатов. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. - Государственное учреждение «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины», Харьков, 2018.

В диссертационной работе экспериментальным путем решена научная задача разработки новых композитных покрытий с повышенными противомикробными и остероинтегрирующими свойствами.

Впервые с использованием технологии термодепозиции с системой охлаждения получено 18 образцов новых нанокompозитных покрытий для стоматологических имплантатов на основе гидроксилатапата (ГА) и компонентов с противомикробными (хитозан, ионы серебра, декаметоксин) и остероинтегрирующими свойствами (хитозан, коллаген).

На основании экспериментальных данных доказана высокая противомикробная активность образцов покрытий на основе ГА № 11 (хитозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хитозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, коллаген 0,300 г/л) как к референтным тест-штаммам микроорганизмов, так и клиническим изолятам возбудителей переимплантных заболеваний. Показатели МИК, МБК и МФК были относительно ниже у образцов покрытий №№ 11 и 12.

Наиболее высоким эффектом подавления адгезии штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923 обладает образец покрытия № 12, что подтверждено уменьшением исходной величины ИАМ на 39,9 % и 27,4 %, соответственно.

Впервые установлено, что наиболее медленно резистентность у клинических штаммов *E. coli* КПЛЗ-22 и *S. aureus* КПЛЗ-3 формируется к действию покрытий №№ 11 и 12. Конечный уровень (на 30 пассаже) приобретенной эшерихиями и стафилококками резистентности сопровождался увеличением исходного значения МИК образца покрытия № 11 в 28 и 32 раза, а № 12 – в 26 и 28 раз, соответственно.

Ключевые слова: микроорганизмы, переимплантные заболевания, композитные покрытия стоматологических имплантов, противомикробная активность.

ANNOTATION

Khrystian G. E. Antimicrobial properties of new composite coatings for dental implants. - As a manuscript.

Thesis for a scientific degree Candidate of Medical Sciences in speciality 03.00.07. – Microbiology. – State Institution «Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Medical Sciences Academy», Kharkov, 2018.

In the thesis the scientific task of developing new composite coatings with increased antimicrobial and osseointegrating properties was solved experimentally.

18 samples of new nanocomposite coatings for dental implants based on hydroxylapatite (HA) and antimicrobial components (chitosan, silver ions, decametoxinum) and osseointegrating properties (chitosan, collagen) were developed for the first time using thermal deposition technology with a cooling system.

The highest antimicrobial activity ($p < 0,05$) of coatings based on HA № 11 (chitosan 0,050 g/l, decametoxinum 0,025 g/l), № 12 (chitosan 0,100 g/l, decametoxinum 0,025 g/l), № 17 (decametoxinum 0,025 g/l, collagen 0,300 g/l) as to reference test strains of microorganisms, and to clinical isolates causative agents of

re-implant diseases, which belong to different taxonomic groups of gram-positive and gram-negative microorganisms, aerobic and anaerobic bacteria, as well as fungi of the genus *Candida*. For test strains of microorganisms, *S. aureus* ATCC 25923, *S. hamolyticus* ATCC 29970, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277, *C. albicans* ATCC 885-653 MIC, MBC and MFC were below ($p < 0,05$) for coating samples № 11 and 12 respectively were: MIC for bacteria from $(6,3 \pm 0,3)$ to $(25,0 \pm 0,0)$ and from $(4,2 \pm 0,2)$ to $(16,7 \pm 0,1)$ $\mu\text{g/ml}$, and for fungi $(33,3 \pm 0,3)$ i $(25,0 \pm 0,0)$ $\mu\text{g/ml}$, respectively; MBC from $(16,7 \pm 0,3)$ to $(66,7 \pm 0,1)$ and from $(12,5 \pm 0,0)$ to $(33,3 \pm 0,1)$ $\mu\text{g/ml}$, and the MFC $(50,0 \pm 0,0)$ and $(41,7 \pm 0,2)$ $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Composite coatings №№ 1, 11, 12 and 17 respectively have an anti-adhesive effect on microorganisms of different taxonomic groups (*E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923). The level of antiadhesive activity depends on the composition of the coating. The highest effect of inhibiting the adhesion of strains of *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 has a coating sample № 12, which is confirmed by a decrease in the initial value of IAM by 39,9 % and 27,4 %, respectively.

It was determined that the slowest formation of resistance in clinical strains of *E. coli* CLAD-22 and *S. aureus* CLAD-3 occurs to the effect of coating samples № 11 and 12 respectively.

Moreover, the dynamics of the gradual increase in resistance, both in *Escherichia* and in *Staphylococcus aureus*, was determined from 5 to 25 passages with a linearly similar increase in MIC from 4 to 22 times, with further intensification of its formation to 30 passages. The final level of resistance acquired by the *Escherichia* and *Staphylococci* was accompanied by an increase in the initial MIC value of the coating sample № 11 by 28 and 32 times, and № 12 by 26 and 28 times, respectively.

The generalized results of the studies justify the prospects of further research of a new coating for dental implants number 12 for the purpose of its production and use in practical medicine for increasing the effectiveness of prevention of re-implant diseases.

Key words: microorganisms re-implant diseases, composite coatings of dental implants, antimicrobial activity.