

Інтенсивність утворення біоплівки на титанових та оксид цирконієвих абатментах в експерименті in vitro

The Intensity of Biofilm Formation on Titanium and Zirconium Oxide Abutments: an in vitro Study

Готь С.-Р.Р., асп.,
Угрин М.М., к.мед.н., доц.,
Фаль О.М., магістр,
Бариляк А.Я., к.мед.н., ас.,
Панас М.А., к.мед.н., ас.

Львівський національний медичний
університет ім. Данила Галицького
Got S.-R.R., Ugrin M.M., Fal O.M., Barylyak
A.Ya., Panas M. A.
Danylo Halatskyi Lviv National Medical
University

Адреса для кореспонденції:
Готь Софія-Роксолана Ростиславівна
e-mail: sofiyagot@gmail.com

Мета: Визначити в експерименті інтенсивність утворення біоплівки на титанових та оксид цирконієвих поверхнях. **Методи:** Мікробіологічне дослідження in vitro полягало у приготуванні суспензій з трьох мікроорганізмів (*Str. mitis*, *St. aureus* та *C. albicans*), у які поміщали титанові та цирконієві диски на 24 години та висівали на різні поживні середовища, залежно від штаму бактерій. Для *Str. mitis* та *C. albicans* проводили трансмісійну електронну мікроскопію з метою візуалізації мікроорганізмів під різним збільшенням. Статистичний аналіз результатів мікробіологічного дослідження in vitro проводили з використанням програми GraphPad InStat 3. Оцінювали кількість колоній у КУО/мл на кожній експериментальній поверхні у різних групах. **Результати:** При посіві *Str. mitis* на середовище MSA отримали такі результати: найменше бактерій було на механічно полірованому титані та з невеликим відривом на оксиді цирконію, а найбільше — на поверхні дисків з нітриду титану. Після механічного очищення росту мікроорганізмів не було на жодній поверхні дисків. При посіві *Candida albicans* на середовище Сабуро найменше колоній спостерігали на поверхні з нітриду титану, а найбільше — на піскоструминно обробленій і кислотньо протравленій (ПОКП) поверхні та механічно полірованому титані. Після очищення циточкою відзначали ріст лише на ПОКП-поверхні. При посіві *Staphylococcus aureus* на жовтково-сольовий агар ріст колоній спостерігали лише на ПОКП-поверхні. Після очищення циточкою росту не було на жодній поверхні. **Висновки:** Найменше заселення мікроорганізмами простежується на поверхні оксиду цирконію ($p < 0,05$), саме тому з цього матеріалу рекомендовано виготовляти супраосальні елементи імплантатів. Надмірна кількість умовно-патогенної мікрофлори у вигляді *Str. mitis*, *St. aureus* та *C. albicans* на поверхні імплантатів призводить до коагрегації патогенних бактерій і, як наслідок, може спричинити періімплантит та подальшу втрату імплантату.

Ключові слова: оксид цирконію, титанові диски, дентальні абатменти, біоплівка.

Purpose: To assess the intensity of biofilm formation on titanium and zirconium oxide surfaces in an experimental study. **Methods:** An in vitro microbiological study was performed to identify the biofilm formation of the three bacteria: *Str. mitis*, *St. aureus* and *C. albicans*. Transmission electron microscopy was carried out for microorganism visualization at different magnifications. Statistical evaluation of the results of microbiological study in vitro was done with GraphPad InStat 3. The number of colonies was converted to CFU/ml of each test surface. **Results:** Microbiological studies in vitro. The smallest amount of *Str. mitis* colonies was observed on mechanically polished titanium and zirconium oxide surfaces, and the most of it was on the surface of Titanium Nitride discs. Not many colonies of *Candida albicans* were seen on Titanium Nitride but there were quite many on sandblasted/acid-etched titanium surface. The growth of *Staphylococcus aureus* colonies was only present on sandblasted/acid-etched titanium discs. **Conclusions:** The lowest adhesive properties of microorganisms were observed on the zirconium oxide surface. Therefore, it is recommended to use these materials for dental abutments. Excessive presence of such bacteria as *Str. mitis*, *St. aureus* and *C. albicans* leads to pathogenic bacteria coaggregation, and thus the presence of these bacteria on the surfaces of the implants can cause periodontitis and subsequent loss of the implant.

Key words: zirconium oxide, titanium disks, dental abutments, biofilm.

ВСТУП

Бактеріальний наліт є важливим фактором, який має несприятливий вплив на довготривалий успіх імплантації. Дослідження показали, що втрата рівня кістки до 1,5 мм після першого року і 0,2 мм кожного наступного року одночасно з рецесією м'яких тканин неминучі після імплантації [1]. Abrahamsson та співавт. [2] стверджували, що матеріал, з якого виготовлений абатмент, є одним з основних чинників, які впливають на рівень альвеолярної кістки та м'яких тканин. Титан завжди вважався «золотим стандартом» для виготовлення складових імплантатів, однак, на сьогодні широкого застосування набув і оксид цирконію завдяки біосумісності, міцності, стійкості до зламів, а також високій естетиці.

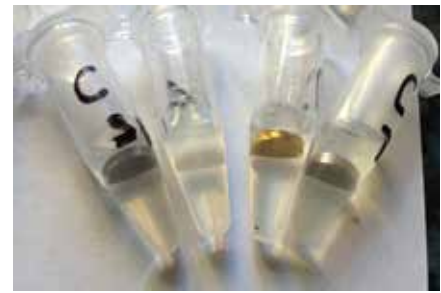
Rimondini та співавт. [3, 4] проводили дослідження *in vivo* та *in vitro*, які порівнювали накопичення бактерій на титані та оксиді цирконію. Бактеріальну адгезію досліджували на титанових та цирконієвих дисках – на цирконії було менше бактерій, ніж на титані.

Результати дослідження Scarano та співавт. [5–7] 2004 року також показали, що цирконій має кращі гігієнічні властивості. У 2006 р. Degidi та співавт. [8] визначали фактори запалення для порівняльної оцінки гігієнічних влас-

тивостей цирконію та титану. У досліді брали участь пацієнти, яким встановлювали імплантати, з них половина абатментів була з цирконію, а друга – з титану. Через 6 місяців проводили біопсію та аналізували тканини на наявність медіаторів запалення. Значно меншу запальну інфільтрацію спостерігали навколо цирконієвих абатментів. Проте, на сьогодні недостатньо вивчене питання застосування оксиду цирконію як матеріалу для опорних елементів імплантатів [9–11]. Основна увага досліджень зосереджена на реакції кісткової тканини на титан та оксид цирконію, а також на їхні біомеханічні властивості [12], і набагато менше інформації стосовно реакції м'яких тканин та накопичення мікроорганізмів на вказаних матеріалах [13–14]. Саме тому метою нашого дослідження було вивчення інтенсивності утворення біоплівки на титанових та оксид цирконієвих поверхнях у досліді *in vitro*.

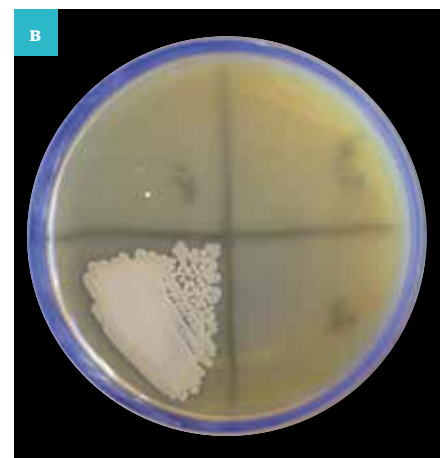
МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Дослід *in vitro* полягав у приготуванні суспензій, у які поміщали титанові та цирконієві диски, та висівали мікроорганізми на поживні середовища, а саме три штами мікроорганізмів: *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Для приготування су-

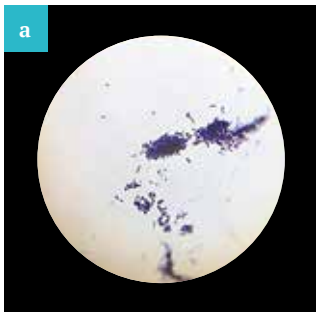


Мал. 1. Диски у пробірках із суспензіями

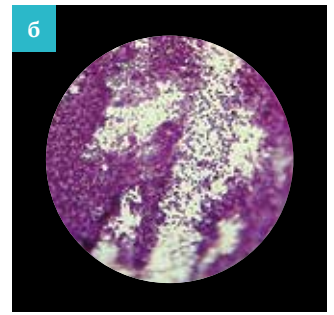
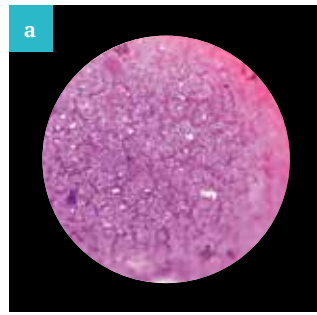
пензій бактеріальних культур і культури *Candida albicans* мікробну масу забирали з поверхні живильного середовища стерильною петлею і переносили у пробірку Еппендорфа із 1,0 мл стерильного фізіологічного розчину. Після цього у кожену пробірку вкладали по одному диску кожного виду (мал. 1). Усі пробірки фіксували у штативі та поміщали у термостат на 24 години при 37 °С. З кожної суспензії мікробної культури відбирали пробу і визначали кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 мл суспензії методом прямого висівання на чашки Петрі на щільні живильні середовища, що використовували для вирощування тест-культур. Для кожного досліджуваного мікроорганізму брали відповідне поживне середовище (мал. 2): *S. mitis* висівали на стрептококовий агар; *St. aureus* – на жовтково-сольовий агар; *C. albicans* – на середовище Сабуро. Кожний зразок із досліджуваною формою інокулювали



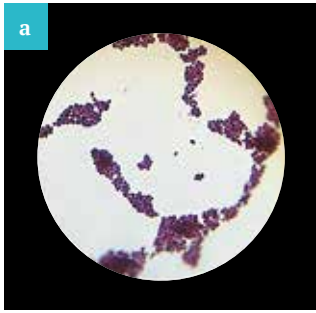
Мал. 2. а – *Streptococcus mitis* на MSA, б – *Staphylococcus aureus* на жовтково-сольовому агарі, в – *Candida albicans* на середовищі Сабуро



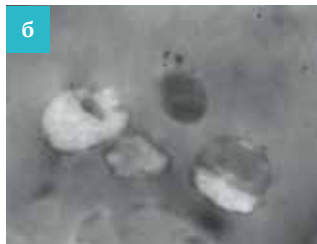
Мал. 3. *Streptococcus mitis* до (а) та після (б) очищення (зб. $\times 150$)



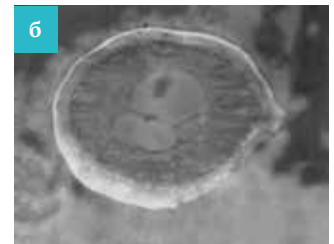
Мал. 4. *Staphylococcus aureus* до (а) та після (б) очищення



Мал. 5. *Candida albicans* до (а) та після (б) очищення



Мал. 6. *Str. mitis* на TEM: зб. $\times 11000$ (а), $\times 19000$ (б)



Мал. 7. *C. albicans* на TEM: зб. $\times 3800$ (а), $\times 9000$ (б)

суспензією, забезпечуючи мікробне навантаження КУО в 1 мл препарату, що відповідало 1 за оптичним стандартом McFarland («bioMérieux», Франція). Кількість життєздатних мікроорганізмів визначали методом прямого висівання

на чашки Петрі зі щільним живильним середовищем (табл. 1).

МІКРОСКОПІЯ

Мікропрепарати виготовляли з трьох досліджуваних мікроорганізмів – *Strep-*

tococcus mitis, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Мазок з культури забирали петлею та наносили на стерильне скельце, потім забарвлювали за Грамом. На готовий мікропрепарат капали вазелінове масло для кращого

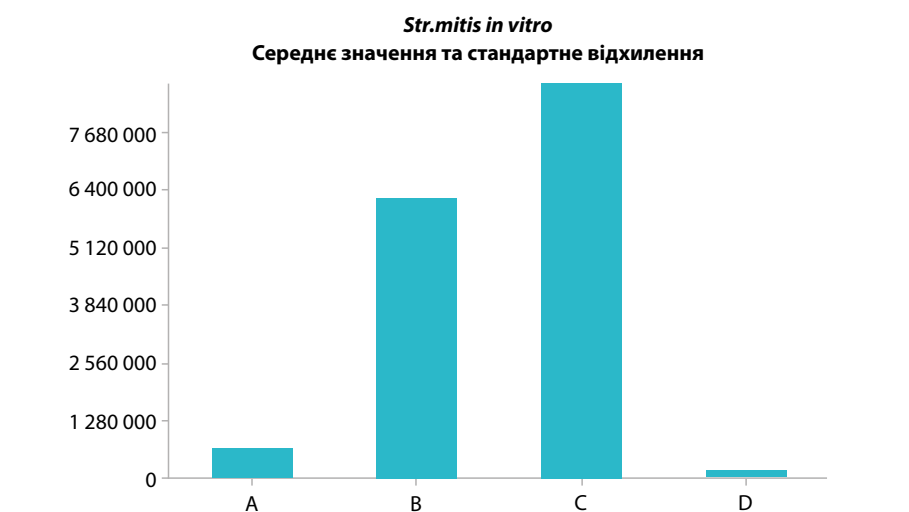
Таблиця 1. Кількість колоній (КУО/мл) на кожній поверхні експериментальних дисків після досліду *in vitro*

| Поживне середовище | Вид матеріалу для експериментальних дисків | | | | | | | | | |
|--------------------|--|--------------------|--------------|-------------|---------|--------------|---------|---------------|------------------|---------------------------|
| | № | Бактерії (КУО/мл) | Ti (мех.об.) | Ti очищення | TiN | TiN очищення | ПОКП | ПОКП очищення | ZrO ₂ | ZrO ₂ очищення |
| MSA | 1 | <i>Str. mitis</i> | 134000 | — | 8730000 | — | 6220000 | — | 585000 | — |
| | 2 | | 131000 | — | 8700000 | — | 6140000 | — | 576000 | — |
| | 3 | | 129000 | — | 8690000 | — | 6200000 | — | 669000 | — |
| ЖСА | 1 | <i>St. aureus</i> | — | — | — | — | 3000000 | — | — | — |
| | 2 | | — | — | — | — | 3000000 | — | — | — |
| | 3 | | — | — | — | — | 3000000 | — | — | — |
| Сабуро | 1 | <i>C. albicans</i> | 3000000 | — | 150000 | — | 3000000 | 110000 | 1500000 | — |
| | 2 | | 3000000 | — | 151000 | — | 2900000 | 90000 | 1500000 | — |
| | 3 | | 3000000 | — | 148000 | — | 3000000 | 80000 | 1480000 | — |

заломлення світла та вносили в світловий мікроскоп (мал. 3–5).

ТРАНСМІСІЙНА ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ (ТЕМ)

ТЕМ проводили для двох мікроорганізмів: *Streptococcus mitis* та *Candida albicans*. Підготовку для мікроскопічного дослідження здійснювали у такій послідовності: зразки мікробіологічної культури *Streptococcus* (мал. 6) фіксували в 1,5% розчині чотириокису осмію в 0,2 М какодилатному буфері (рН – 7,2) на холоді протягом 2 годин, а зразки *Candida* (мал. 7) фіксували 1% розчином перманганату калію. Зафіксовані культури тричі промивали в буфері, а потім центрифугували протягом 10 хвилин. Отримані осади культур зневоднювали у зростаючих концентраціях етилового спирту (25%, 50%, 70%, 90% і 96%), кожен раз по 10 хвилин. Потім матеріал утримували в ацетоні двічі по 30 хвилин. Епоксидні смоли (Fluka) змішували у співвідношенні Epon 812 – 4,5 мл, DDSA – 2,2 мл,



Мал. 8. Рівень колонізації *Str. mitis* на різних поверхнях у досліді in vitro

MNA – 2,2 мл. Матеріал просочували в чотирьох сумішах епоксидної смоли та ацетону у співвідношеннях 1:3, 1:2, 1:1 і 2:1. Останнє просочування тривало 14 годин, після чого матеріал переносили в поліпропіленову капсулу у свіжу суміш епоксидних смол з каталізатором (5 крапель DMP-30 на 10 мл смол) і полімеризували в термостаті послідовно при 37 °C (12

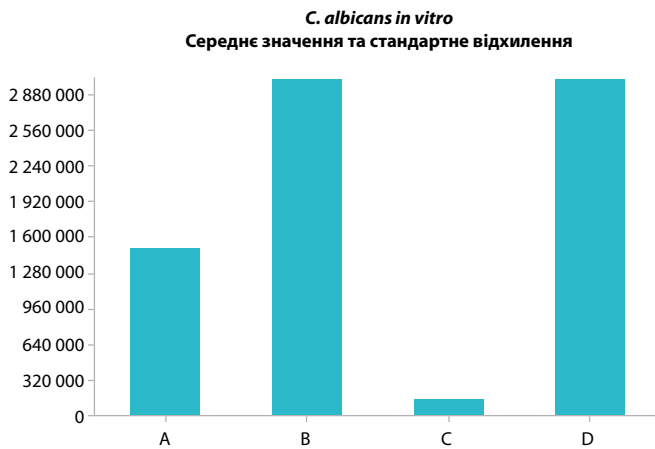
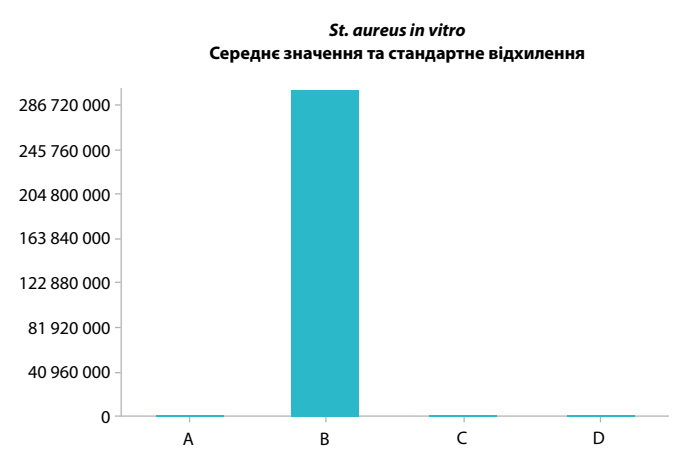
год), а потім при 60 °C (48 год) [4]. Зрізи готували на ультрамікротомі LKB Ultratome III за допомогою скляного ножа, переносячи їх на нікелеві сіточки. Зрізи контрастували послідовно у 2% спиртовому розчині ураніацетату і цитраті свинцю. Переглядали в електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100-01 при напрузі 75 кВ під збільшенням від $\times 1000$ до $\times 30000$.

Таблиця 2. Рівень колонізації *Str. mitis* на різних поверхнях у досліді in vitro

| <i>Str. mitis</i> (КУО/мл) | Досліджувана поверхня дисків | | | |
|----------------------------|------------------------------|-----------|-----------|----------|
| | ZrO ₂ | ПОКП | TiN | Ti |
| Дослід № | | | | |
| 1 | 585000 | 6220000 | 8730000 | 134000 |
| 2 | 576000 | 6140000 | 8700000 | 131000 |
| 3 | 669000 | 6200000 | 8690000 | 129000 |
| Середнє арифметичне | 610000 | 6186666.7 | 8706666.7 | 131333.3 |
| Стандартне відхилення | 5,10% | 4.2% | 2.1% | 2.5% |

Таблиця 3. Рівень колонізації *C. albicans* на різних поверхнях у досліді in vitro

| <i>Candida albicans</i> (КУО/мл) | Досліджувана поверхня дисків | | | |
|----------------------------------|------------------------------|-----------|----------|-----------|
| | ZrO ₂ | ПОКП | TiN | Ti |
| Дослід № | | | | |
| 1 | 1500000 | 3000000 | 150000 | 3000000 |
| 2 | 1500000 | 2900000 | 151000 | 3000000 |
| 3 | 1480000 | 3000000 | 148000 | 3010000 |
| Середнє арифметичне | 1493333.3 | 2966666.7 | 149666.7 | 3003333.3 |
| Стандартне відхилення | 1.2% | 5.8% | 1.5% | 5.8% |

Мал. 9. Рівень колонізації *C. albicans* на різних поверхнях у досліді *in vitro*Мал. 10. Рівень колонізації *St. aureus* на різних поверхнях у досліді *in vitro*

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням програми GraphPad InStat 3. Кількість колоній бактерій переводили в значення КУО/мл. Отримані дані аналізували стосовно характеру поверхні та кількості утворених колоній за допомогою варіаційного аналізу (ANOVA) та тесту Тьюкі-Крамера. Різниця між порівнювальними величинами вважалась вірогідною при $p < 0.05$. У досліді *in vitro*

при посіві *Str. mitis* на середовище MSA отримали такі результати: найменше бактерій виявлено на механічно полірованому титані та з невеликим відривом на оксиді цирконію (мал. 8, к. D та A), а найбільше – на поверхні дисків з нітриду титану (мал. 8, к. C). Після механічного очищення росту мікроорганізмів не відзначали на жодній поверхні дисків. При посіві *Candida albicans* на середовище Сабуро констатували, що найменше колоній було на поверхні з нітриду титану (мал. 9, к. C), а найбільше на ПОКП-поверхні та механічно

полірованому титані (мал. 9, к. B та D). Після очищення щіточкою відзначали ріст лише на ПОКП-поверхні.

При посіві *Staphylococcus aureus* на жовтково-сольовий агар ріст колоній спостерігався лише на ПОКП-поверхні (мал. 10, к. B). Після очищення щіткою росту не було на жодній поверхні. У табл. 4 наведені результати тесту Тьюкі-Крамера для мікробіологічного дослідження *in vitro*, які доводить, що дані є вірогідними при $p < 0.05$.

ВИСНОВКИ

Найменше заселення мікроорганізмами спостерігається на поверхні оксиду цирконію ($p < 0.05$), тому саме з цього матеріалу рекомендовано виготовляти супраосальні елементи імплантатів. Надмірна кількість умовно-патогенної мікрофлори у вигляді *Str. mitis*, *St. aureus* та *C. albicans* на поверхні імплантатів призводить до коагрегації патогенних бактерій і, як наслідок, може спричинити періімплантит та подальшу втрату імплантату. Супраосальні елементи імплантатів рекомендується виготовляти з оксиду цирконію.

Таблиця 4. Результати тесту Тьюкі-Крамера

| Поверхні | Значення P | | | |
|--------------------------|-------------------|----------------|--------------------|----------------|
| | <i>Str. mitis</i> | | <i>C. albicans</i> | |
| | q | до очищення | q | до очищення |
| ZrO ₂ vs ПОКП | 278.72 | *** P<0.001 | 86.241 | *** P<0.001 |
| ZrO ₂ vs TiN | 404.66 | *** P<0.001 | 78.651 | *** P<0.001 |
| ZrO ₂ vs Ti | 23.923 | *** P<0.001 | 88.387 | *** P<0.001 |
| ПОКП vs TiN | 125.95 | *** P<0.001 | 164.89 | *** P<0.001 |
| ПОКП vs Ti | 302.64 | *** P<0.001 | 2.146 | P>0.05 |
| TiN vs Ti | 428.59 | *** P<0.001 | 167.04 | *** P<0.001 |

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson RA. The longterm efficacy of currently used dental implants. A review and proposed criteria for success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1:11–25.
2. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz P-O, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1998; 25:721–727.
3. Rimondini L, Rimondini Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Nov-Dec;17(6):793-8.
4. Rimondini L. The Effect of Surface Roughness on Early In Vivo Plaque Colonization on Titanium. *J Periodontol* June 1997 Volume 68 Number 6.
5. Scarano A., Piattelli M., Caputi S., Favero G., Piattelli A. Mucosal considerations for osseointegrated implants bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *Journal of Periodontology*, 75(2), 292-296.
6. Scarano A., Piattelli M., Vrespa G., Caputi S., Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride coated and uncoated implants: an in vivo human study. *Journal of Oral Implantology* Vol. XXIX/No. Two/2003
7. Scarano A., Piattelli M., Caputi S., Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure Titanium and Zirconium Oxide discs: an in vivo human study. *Periodontology* Volume 75 Number 2.
8. Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol*. 2006 Jan;77(1):73-80.
9. Jung, R.E., Pjetursson, B.E., Glauser, R., Zembic, A., Zwahlen, M. & Lang, N.P. (2008) A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clinical Oral Implants Research* 19: 119–130.
10. Sailer, I., Philipp, A., Zembic, A., Pjetursson, B.E., Hammerle, C.H. & Zwahlen, M. (2009a) A systematic review of the performance of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. *Clinical Oral Implants Research* 20 (Suppl. 4): 4–31.
11. Zembic, A., Sailer, I., Jung, R.E. & Hammerle, C.H. (2009b) Randomized-controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for single-tooth implants in canine and posterior regions: 3-year results. *Clinical Oral Implants Research* 20: 802–808.
12. Wenz, H.J., Bartsch, J., Wolfart, S. & Kern, M. (2008) Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *The International Journal of Prosthodontics* 21: 27–36.
13. Linkevicius, T. & Apse, P. (2008a) Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: a systematic review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 23: 449–456.
14. Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I. & Quirynen, M. (2006a) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* 17 (Suppl. 2): 68–81.

Стаття надійшла в редакцію 13 лютого 2017 року