

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *ESCHERICHIA COLI* С НАНОРАЗМЕРНЫМИ МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ ЧАСТИЦАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ С ПОВЕРХНОСТИ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Лабис В. В.¹, Базикян Э. А.¹, Козлов И. Г.², Сизова С. В.³,
Хайдуков С. В.³, Немцева Н. В.⁴, Гриценко В. А.^{4,5}

¹Московский государственный медико-стоматологический Университет им. А. И. Евдокимова, Москва; ²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва; ³Институт биоорганической химии им. Акад. М. М. Шемакина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

⁴Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург;

⁵Оренбургский научный центр УрО РАН, Оренбург, Россия

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимодействия наноразмерных металлических частиц, полученных в лабораторных условиях с поверхности дентальных имплантатов Nobel Biocare, с *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в присутствии нативной и инактивированной нагреванием сыворотки крови человека. В экспериментах *in vitro* установлено, что при добавлении в опытные пробы нативной сыворотки наночастицы обеспечивали повышенное накопление в бульонной культуре биомассы *S. aureus* и *E. coli* на 8,1-8,3%, а *P. aeruginosa* – на 42,9% в сравнении контролем, что указывало на ингибирование ими бактерицидного эффекта системы комплемента. Кроме того, зафиксировано потенцирующее действие нативной сыворотки на биоленкообразование бактерий на поверхности наночастиц. Обсуждаются возможные иммунологические последствия взаимодействия в системе «наночастица-сывороточные белки-бактерии» в процессе остеоинтеграции.

Ключевые слова: наноразмерные металлические частицы, периимплантит, мукозит, микробиологические аспекты

Введение. Образование бактериальной биопленки на поверхности дентальных имплантатов считается одной из основных причин развития мукозита и периимплантита. Современные методы секвенирования делают возможным адекватно оценить состав всего микробиома ротовой полости с выявлением наиболее этиологически значимых возбудителей данной патологии. Периимплантит представляет собой гетерогенную смешанную инфекцию, которая ассоциирована с пародонтопатогенной микрофлорой, включающей, в том числе, анаэробные микроорганизмы и оппортунистические бактерии, такие как эшерихии, стафилококки и др. [1]. На сегодняшний день бактериальный фактор рассматривается как первопричина

периимплантита, хотя, с нашей точки зрения, следует учитывать исходную воспалительную реакцию, возникающую в периимплантатных тканях с момента непосредственного внедрения дентального имплантата и связанную, прежде всего, с функционированием клеточно-гуморальных механизмов врожденного иммунитета. Эту реакцию могут потенцировать наноразмерные металлические частицы, эмиссия которых может происходить с поверхности дентального имплантата как на этапе его установки, так и в процессе его эксплуатации, поскольку имеются данные о нестабильности структуры сплава на основе TiO₂, используемого при изготовлении медицинских металлических изделий [2-4].

В то же время на характер воспалительной реакции существенное влияние могут оказывать белки сыворотки крови, попадающие в периимплантатные ткани при экссудации, и микрофлора, неминуемо контактирующая с дентальным имплантатом и металлическими наночастицами. Однако эти аспекты пока остаются практически не изученными.

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимодействия наноразмерных металлических частиц, полученных в лабораторных условиях с поверхности дентальных имплантатов Nobel Biocare, с *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в присутствии нативной и инактивированной нагреванием сыворотки крови человека.

Материалы и методы. В экспериментах использовали стерильные взвеси наноразмерных металлических частиц (НрМЧ), полученных с поверхности дентальных имплантатов фирмы Nobel Biocare путем их обработки ультразвуком частотой 35 кГц в течение 20 минут [3], и взвеси суточных агаровых культур трех музейных штаммов бактерий: *P. aeruginosa* ATCC № 27853, *S. aureus* ATCC № 25923 и *E. coli* ATCC № 25922. В опытах *in vitro* в 100 мкл взвесей НрМЧ последовательно инокулировали 50 мкл нативной или инактивированной нагреванием (56°C, 30 мин) сыворотки человек (из пула сывороток венозной крови от 20 здоровых доноров) и 20 мкл взвесей бактерий ($5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл); смеси выдерживали 30 мин при 37°C, после чего к ним добавляли 100 мкл мясопептонного бульона (МПБ) и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Влияние НрМЧ и сыворотки (нативной/гретой) на прирост биомассы бактерий в МПБ оценивали по оптической плотности (ОД) суточных бактериальных культур; контролем служили бульонные культуры бактерий без наличия в пробах НрМЧ. Выраженность биопленок на поверхности НрМЧ при добавлении нативной и гретой сывороток регистрировали при помощи светового микроскопа Axiostar plus (K. Zeiss, Германия) с фазово-контрастной иммерсией на при увеличении $\times 1000$ с их фиксацией фотокамерой Cannon PowerShot G5.

Результаты. Экспериментально установлено, что сочетанное влияние НрМЧ и сыворотки крови человека на рост бактерий в МПБ зависит от их видовой принадлежности и состояния системы комплемента (нативная/гретая сыворотка).

Так, присутствие в «культуральной системе» НрМЧ практически не влияло на ОД суточных бульонных культур *P. aeruginosa* и *S. aureus* и лишь на 9 % снижало биомассу *E. coli* (относительно контроля), если в экспериментах использовалась прогретая сыворотка с инактивированной системой комплемента. В то же время при добавлении в опытные пробы нативной сыворотки с интактной системой комплемента НрМЧ обеспечивало повышенное накопление биомассы *S. aureus* и *E. coli* на 8,1-8,3 %, а *P. aeruginosa* – на 42,9 %.

При этом в контроле (без НрМЧ) нативная сыворотка крови человека оказывала бактерицидное действие только в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* (27,1 и 16,5 % соответственно), тогда как *S. aureus* был к ней устойчив и более интенсивно накапливал свою биомассу в ее присутствии (32,2 % в сравнении с гретой сывороткой). С другой стороны, добавление в «культуральную систему» с нативной сывороткой НрМЧ существенно изменяло ситуацию: вдвое снижалось ингибирующее действие системы комплемента на *E. coli* (с 27,1 до 13,4 %); бактерицидный эффект интактной сыворотки крови человека в отношении *P. aeruginosa* полностью нивелировался, что проявлялось стимуляцией накопления биомассы этих бактерий на 13,0 % (в сравнении с гретой сывороткой); рост *S. aureus* в таких условиях был еще более интенсивным (40,1 %).

Следует отметить, что нативная и гретые сыворотки крови человека по-разному влияли на образование «биопленок» изученными штаммами *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* на наноразмерных металлических частицах – в целом, первая в сравнении со второй обеспечивала более эффективную адгезию бактерий на их поверхности.

Обсуждение. В последнее время появились данные о нестабильности структуры сплава на основе TiO_2 , используемого при изготовлении медицинских металлических изделий [2], в том числе в процессе их функционирования в организме человека. Ранее нами экспериментально показана возможность эмиссии наноразмерных металлических частиц с поверхности дентальных имплантатов разных систем и обсуждена их роль в процессе остеоинтеграции с момента проведения операции и на последующих этапах функционирования металлических изделий в полости рта [3, 4]. Очевидно, в утилизации наноразмерных ме-

таллических частиц активное участие принимают фагоцитирующие клетки иммунной системы, способные их распознавать из-за возможного образования комплекса «белок-наночастица». Изменение конформации белков сыворотки крови, сорбированных на поверхности наночастиц, в процессе образования так называемой «белковой короны» обеспечивает информационную составляющую на клеточно-молекулярном уровне и указывает на характер внедренного антигена-гаптена.

В то же время результаты наших экспериментов свидетельствуют о возможности адгезии потенциально пародонтопатогенных бактерий на поверхности наноразмерных металлических частиц, полученных с дентальных имплантатов и обработанных сывороткой, с последующим достаточно быстрым формированием биопленки. В этом плане металлическая наночастица, «нагруженная» не только сывороточными белками, но и бактериальной биопленкой, может служить, с одной стороны, плацдармом и эндогенным источником этиологических агентов мукозита и периимплантита, с другой стороны, комплексным триггером для реакций врожденного и адаптивного иммунитета, направленных на распознавание свойств и качеств внедренного в организм металла и определяющих, в конечном итоге, характер течения остеоинтеграции.

Таким образом, в процессе остеоинтеграции дентальных имплантатов наноразмерные металлические частицы могут выступать «точкой активации» и участниками иммунопатологических реакций, исходно начинающихся с асептического воспаления. Локальное накопление наночастиц металлов в тканях, их контакт с сывороточными белками и, возможно, секретруемыми пептидами фагоцитиру-

ющих клеток, адгезия на них бактерий и образование биопленок способны существенно изменить характер ответной реакции иммунной системы и, очевидно, в ряде случаев приводить к срыву толерантности иммунной системы при свершившейся остеоинтеграции, возникновению патологического воспаления, что приводит к таким клиническим проявлениям как убыль костной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lafaurie G. I., Sabogal M. A., Castillo D. M., Rincón M. V., Gómez L. A., Lesmes Y. A., Chambrone L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review // *J Periodontol*. 2017. 19: 1-26. doi: 10.1902/jop.2017.170123.
2. Shah R., Penmetsa D. S. L., Thomas R., Mehta D. S. Titanium Corrosion: Implications For Dental Implants // *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2016. 24(4): 171-180. doi: 10.1922/EJPRD_1531Shah10.
3. Лабис В. В., Базикян Э. А., Козлов И. Г., Сизова С. В., Хайдуков С. В. Наноразмерные частицы – участники остеоинтеграции // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 1: 1-18. [Labis V. V. Bazikyan E. A., Kozlov I. G., Sizova S. V., Hajdukov S. V. Nanosized particles – participants of osseointegration. *Bulletin of Orenburg scientific center of UrB RAS*, 2016. 1: 1-18. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-1/Articles/LVV-2016-1.pdf>)].
4. Лабис В. В., Базикян Э. А., Сизова С. В., Хайдуков С. В., Козлов И. Г. Исследование наноразмерных частиц, полученных в супернатантах с дентальных имплантатов двух систем А и В // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 2: 16с. [Labis V. V. Bazikyan E. A., Sizova S. V., Hajdukov S. V., Kozlov I. G. Nanosized particles obtained in supernatanes from dental implants of systems A and B // *Bulletin of Orenburg scientific center of UrB RAS*, 2016. 1: 1-18. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/VVL-2016-2.pdf>)]/

MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF THE INTERACTION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *ESCHERICHIA COLI* WITH NANOSCALE METAL PARTICLES, RECEIVED FROM THE SURFACE OF DENTAL IMPLANTS

Labis V. V.¹, Bazikyan E. A.¹, Kozlov I. G.², Sizova S. V.³,
Khaidukov S. V.³, Nemtseva N. V.⁴, Gritsenko A. V.^{4,5}

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A. I. Evdokimov, Moscow; ²Russian National Research Medical University named by N. I. Pirogov, Moscow; ³Institute of Bioorganic Chemistry named by Academicians M. M. Shemyakin and Y. A. Ovchinnikov, RAS, Moscow; ⁴Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg; ⁵Orenburg Scientific Centre UrB RAS, Orenburg, Russia

The purpose of this study was to investigate the interaction of nanosized metal particles obtained in the laboratory from the surface of Nobel Biocare dental implants with *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in the presence of native and heat inactivated human serum. *In vitro* experiments it was established that when nanoparticles were added to test samples of native sera, the accumulated biomass of *S. aureus* and *E. coli* was increased by 8.1-8.3% in broth culture and *P. aeruginosa* by 42.9% in Comparison of control, indicating that they inhibited the bactericidal effect of the complement system. In addition, the potentiating effect of native serum on biofilm formation of bacteria on the surface of nanoparticles was recorded. Possible immunological consequences of interaction in the system “nanoparticle-whey protein-bacteria in the process of osseointegration” are discussed.

Key words: nanosized metal particles, peri-implantitis, mucositis, microbiological aspects

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА И КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ПЕРИОДА У ПАЦИЕНТОВ С ПРОНИКАЮЩИМИ РАНЕНИЯМИ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА БЕСТИМ

Марачева Н. М.¹, Марачев С. И.²

¹Областная клиническая больница ОКБ № 3; ²ФГБОУ ВО ЮУГМУ
Минздрава России, Челябинск, Россия

Проведено исследование показателей системного иммунитета и клинического течения посттравматического периода у 38 пациентов с проникающими ранениями глазного яблока тяжелой степени. В первой группе 20 больных получали патогенетическое базовое лечение, во второй – 18 пациентам в состав базового лечения включали внутримышечные инъекции иммуномодулятора Бестим 100 мкг ежедневно в течение 5 суток, начиная с 3-х суток после ранения. Изучали субпопуляционный состав лимфоцитов в сыворотке крови на 2-3 и 10 сутки после ранения, сроки купирования воспалительных симптомов, клиническое течение посттравматического периода на 14 и 30-е сутки после ранения. Установлено, что включение иммуномодулятора Бестим в базовое лечение ПРГ приводило к увеличению абсолютного числа В2- и суммы В-лимфоцитов, абсолютного числа CD4⁺CD127⁺CD25⁻ и Т- активированных лимфоцитов, снижению относительного количества В1-лимфоцитов и отсутствию падения уровня Т-регуляторных клеток, что положительным образом влияло на клиническое течение посттравматического периода у пациентов 2-й группы: к 14 и 30 суткам увеличивалась частота купирования воспалительных симптомов как в группе в целом, так и на одного пациента и выздоровления к 1 месяцу после ранения.

Ключевые слова: проникающее ранение глаза, Бестим, проточная цитофлюориметрия, субпопуляционный состав лимфоцитов, клиническое течение посттравматического периода