

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-24

УДК: 615.28:616.314:546.57

## ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ДЛЯ СТВОРЕННЯ КОМПОЗИТНИХ СТОМАТОЛОГІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ З АНТИМІКРОБНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Перешивайло О.І., Голубнича В.М., Корнієнко В.В.

Сумський державний університет (вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, Україна, 40000)

Відповідальний за листування:  
e-mail: apereshyvailo@gmail.com

Статтю отримано 14 листопада 2019 р.; прийнято до друку 13 грудня 2019 р.

**Анотація.** Унаслідок неконтрольованого використання антибіотиків, гостро постало питання антибіотикорезистентності. Тому актуальним питанням є пошук альтернативних антимікробних засобів. Незважаючи на значні досягнення в стоматології, питання якісного ендодонтичного лікування кореневих каналів зубів залишається актуальним. Одним із найчастіших збудників внутрішньоканального карієсу є *Enterococcus faecalis*, який входить до складу групи полірезистентних бактерій ESKAPE. Наночастинки срібла показали високу ефективність проти багатьох полірезистентних штамів. Тому метою нашого дослідження було оцінити перспективи використання наночастинок срібла для створення композитних стоматологічних матеріалів. Антибактеріальну дію наночастинок срібла оцінювали щодо клінічного штаму *E. faecalis* шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації (метод серійних розведень) та мінімальної бактерицидної концентрації (прямий висів мікроорганізму з рідких середовищ на щільні поживні). Досліджували вплив наночастинок срібла на темпи росту бактеріальної популяції та на процеси біоплівкоутворення. Статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням пакету програмного забезпечення для статистичної обробки даних Graph Pad Prism 8 із визначенням критерію Ст'юдента. Було встановлено, що МІК та МБК становили 2,5 мкг/мл. Дані про динаміку відмирання штаму *E. faecalis* свідчать про необхідність тривалого контакту мікроорганізмів з препаратом наносрібла та відображають поступове зниження кількості бактерій у досліджуваному зразку. Наночастинки срібла пригнічують формування біоплівки вже на ранніх етапах та ефективно впливають на вже сформовані біоплівки. Дія наночастинок срібла в стадії ініціації призводила до зниження загального об'єму несформованої біоплівки в 2 рази за концентрації 10 та 20 МІК. Інгібуюча дія срібла на сформовану 3-х добову біоплівку була дозозалежною та зростала зі збільшенням концентрації. Отримані результати свідчать, що наночастинки срібла інгібують ріст і розмноження планктонних і пліткових форм *E. faecalis* та можуть бути використаними для створення стоматологічних композитних засобів з антимікробною активністю.

**Ключові слова:** антибіотикорезистентність, наночастинки срібла, *E. faecalis*, часова крива, біоплівка.

### Вступ

В останнє десятиліття унаслідок неконтрольованого використання антибіотиків перед медичною спільнотою всього світу гостро постало питання антибіотикорезистентності. ВООЗ у 2015 р. запропонувала план для подолання можливих наслідків антибіотикорезистентності та заходи для профілактики розповсюдження стійкості до антибіотиків [4]. Одним із напрямків боротьби з антибіотикорезистентністю є пошук нових речовин із антимікробною активністю. Антибактеріальні властивості срібла відомо людству майже 2500 років. Однак, його використання може супроводжуватись токсичним впливом на організм людини [2] і тому, з моменту виходу антибіотиків, срібло втратило свою популярність, як антимікробний засіб. Активний розвиток нанотехнологій призвів до зростання кількості досліджень, спрямованих на вивчення можливості використанні наночастинок срібла як потенційного антимікробного засобу [1].

Незважаючи на технологічний прорив у стоматології, актуальність якісного ендодонтичного лікування кореневих каналів зубів є незаперечною. Складність вирішення даного питання зумовлена як індивідуальними особливостями анатомічних структур зуба, так і технологічними складнощами, з якими стикається лікар при

пломбуванні зубного каналу [5]. Одним із збудників внутрішньоканального карієсу є *Enterococcus faecalis*. Окрім цього, мікроорганізм входить до складу групи полірезистентних бактерій ESKAPE, які вважаються найбільш медично-важливими патогенами [7].

З огляду на все перелічене, метою нашого дослідження було оцінити перспективи використання наночастинок срібла для створення композитних стоматологічних матеріалів.

### Матеріали та методи

Для дослідження нами були використанні наночастинки срібла синтезовані в Гданському медичному університеті із застосуванням методів "зеленої хімії". Штам *Enterococcus faecalis* було виділено в мікробіологічній лабораторії Сумського державного університету із матеріалу від хворого. Ідентифікацію мікроорганізму проводили шляхом вивчення морфологічних, культуральних, біохімічних та антигенних властивостей. Визначення чутливості мікроорганізму до наночастинок срібла проводили із застосуванням методу серійних розведень у бульйоні Мюллера-Хінтона. Спочатку з 1-добової культури готували інокулят, оптична густина якого відповідає 0,5 одиницями Мак-Фарланда. Густина робочої суспензії

пензії бактерій становила  $10^6$  КУО/мл. Із основного розчину наночастинок срібла (3 г/л) готували послідовні двократні розведення (кінцева концентрація срібла коливалась від 80 мкг/мл до 0,63 мкг/мл). До 180 мкл розчину наносрібла додавали 20 мкл робочої суспензії бактерій та інкубували при температурі 37 °С протягом 24 год. Лунки, в яких було відсутнє срібло, слугували у якості позитивного контролю, а ті, в яких були відсутні бактерії - у якості негативного контролю. Усі дослідження були проведені двічі. Антибактеріальну дію наночастинок срібла оцінювали шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) та мінімальної бактерицидної концентрації (МБК). Наявність та відсутність росту в лунках полістиролового планшета після інкубації визначали візуально. Висів мікроорганізмів із лунок на агар Мюллера-Хінтона проводили з використанням методу Коха, з подальшим підрахунком колоній, що вирости. Для дослідження впливу наночастинок срібла на темпи росту бактеріальної популяції *E. faecalis* мікроорганізми культивували у присутності наночастинок у концентрації еквівалентній 1 МІК упродовж 30 хв., 1, 2, 4, 6, 12, 24 год. Після цього 10 мкл суспензії бактерій висівали на ентерокок агар з подальшою інкубацією у термостаті при температурі 37°C та підрахунком кількості КУО через 24 години.

Вплив наночастинок срібла на процеси біоплівкоутворення оцінювали шляхом визначення коефіцієнту редукції загального об'єму біоплівки, яка формується, та сформованої упродовж 3-х діб біоплівки. На 0 та на 3-тю добу інкубації до інокуляту *E. faecalis* додавали наночастинки срібла у концентрації 2,5, 5, 10, 20 МІК та інкубували при температурі 37°C протягом 24 годин. Після цього проводили фарбування утвореної плівки 0,1% генціанвіолетом (30 хвилини), лунки промивали та знебарвлювали 80% розчином етанолу [6]. Оптичну щільність спиртового розчину вимірювали на фотометрі мікропланшетного типу Thermo Scientific Multiscan FC версія ESW 1.01.16 (довжина хвилі 595 нм). Коефіцієнт редукції мікробної біомаси розраховували, як відношення оптичної щільності зразка до оптичної щільності контролю у відсотковому еквіваленті.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили із використанням пакету програмного забезпечення для статистичної обробки даних Graph Pad Prism 8 із визначенням критерію Ст'юдента.

### Результати. Обговорення

Обов'язковою властивістю протимікробного засобу є наявність у нього бактеріостатичної чи бактерицидної активності. Під час дослідження нами було встановлено, що наночастинки срібла демонстрували виразну антибактеріальну активність відносно *E. faecalis*. Показник МІК був тотожним МБК та становив 2,5 мкг/мл.

Одним із важливих елементів дії антимікробного засобу є його вплив на кінетику росту популяції *E. faecalis* упродовж 24 год. сумісного інкубування. Отримані результати (рис. 1), свідчать про необхідність тривалого контак-

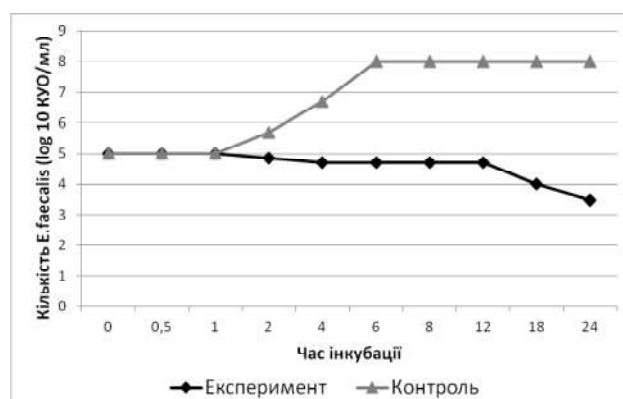


Рис. 1. Динаміка відмирання *E. faecalis* під впливом наночастинок срібла у кількості еквівалентній 1 МІК.

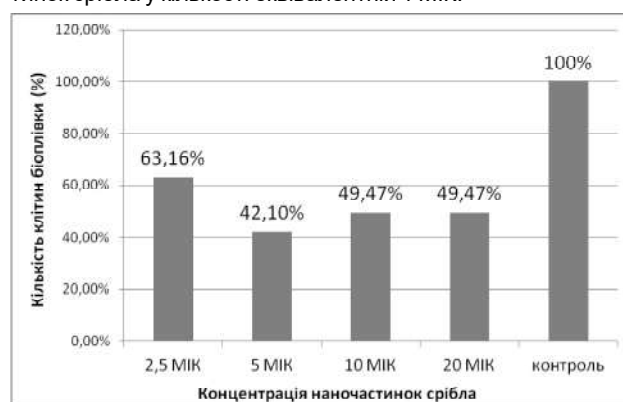


Рис. 2. Вплив різних концентрацій наночастинок срібла на об'єм біоплівки, яка формується.

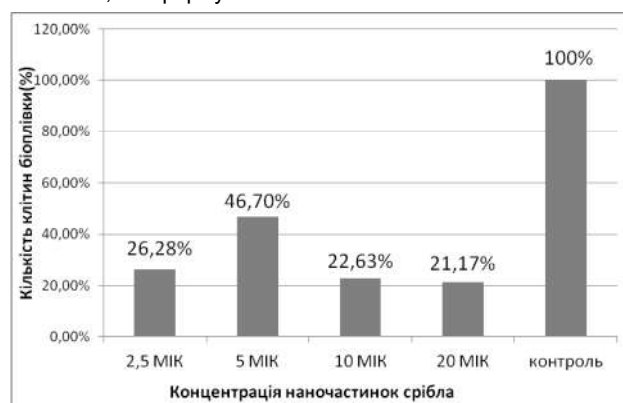


Рис. 3. Вплив різних концентрацій наночастинок срібла на об'єм сформованої біоплівки (3 доби).

ту мікроорганізмів з препаратом наносрібла та відображають поступове зниження кількості мікроорганізмів під впливом наночастинок срібла в досліджуваному зразку. Кількість *E. faecalis* (КУО/мл) в експериментальному зразку була достовірно нижчою, порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ).

Основною формою існування мікроорганізмів у природному середовищі та в організмі людини є біоплівка. Встановлено, що мікроорганізми в біоплівці більш стійкі до антибіотиків та антимікробних засобів [3]. Отже по-

казник МІК щодо планктонних мікроорганізмів не повною мірою відображає антимікробний потенціал досліджуваних речовин. Тому на наступному етапі ми досліджували здатність наносрібла попереджувати утворення та руйнувати вже сформовані біоплівки *E. faecalis*.

Отримані дані (рис. 2) свідчать, що наночастинки срібла пригнічують формування біоплівки на ранніх етапах, а зниження загального об'єму сформованої біоплівки в 2 рази відбувалося за концентрації 10 та 20 МІК.

Наночастинки срібла також ефективно впливали на сформовану 3-х добову біоплівку (рис. 3). При цьому інгібує дія була дозозалежною та зростала зі збільшенням концентрації ( $p \leq 0,05$ ).

### Висновки та перспективи подальших розробок

Отримані результати свідчать, що наночастинки

срібла ефективно пригнічують ріст та розмноження *E. faecalis* та можуть бути використаними для створення композитних стоматологічних матеріалів з антимікробними властивостями.

Це свідчить про необхідність подальших досліджень механізмів дії наночастинок срібла на *E. faecalis* та соматичні клітини.

### Подяки

Проведені дослідження були профінансовані за рахунок НДР "Ефективність протимікробної дії нанокompозитних комплексів (хітозан-нанометали) відносно полірезистентних клінічних ізолятів", 0118U003577.

Висловлюємо свою щирю подяку Рафалу Банасюку (Гданський медичний університет, Польща) за надані для досліджень наночастинки срібла.

### Список посилань

1. Білоус, С. Б. (2019). *Теоретичне та експериментальне обґрунтування складу, технології і дослідження лікарських засобів антимікробної дії на основі наноматеріалів*. (Дис. канд. фарм. наук). Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів.
2. Горобець, С. В., Горобець, О. Ю., Горбик, П. П., & Уварова, І. В. (2018). *Функціональні біо- та наноматеріали медичного призначення: монографія*. Київ: Видавничий дім "Кондор".
3. Дронова, М. Л. (2016). *Фармакологічні особливості антибактеріальної дії нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів*. (Дис. канд. фарм. наук). Інститут фармакології та токсикології НАМН України. Київ.
4. Салманов, А. Г. (2017). План дій України з антимікробної резистентності. *Міжнародний журнал антибіотики та пробіотики*, 1 (1), 10-28. DOI: 10.31405.
5. Сидорак, Х. Т. (2019). *Профілактика ускладнень ендодонтичного лікування кореневих каналів зубів*. (Дис канд. мед. наук). Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ.
6. Bulacio, M. L., Galvin, L. R., Gaudio, C., Cangemi, R., & Erimbaue, M. I. (2015). Enterococcus faecalis biofilm formation and development in vitro observed by scanning electron microscopy. *Acta Odontol Latinoam*, 28, 3, 210-214. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095620/>.
7. Kouidhi, B., Zmantar, T., Mahdouani, K., Hentati, H., & Bakhrouf, A. (2011). Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiology*, 11, 155. doi: 10.1186/1471-2180-11-155.

### References

1. Bilous S.B. (2019). *Teoretychne ta eksperymentalne obgruntuvannia skladu, tekhnologii i doslidzhennia likarskykh zasobiv antymikrobnoi dii na osnovi nanomaterialiv [Theoretical and experimental substantiation*

- of composition, technology and study of drugs with antimicrobial action based on nanomaterials] (Dys. kand. farm. nauk). Lvivskiy natsionalnyi medychnyi universytet imeni Danyla Halyskoho, Lviv.
2. Horobets, S. V., Horobets, O. I., Horbyk, P. P., & Uvarova, I. V. (2018). *Funktsionalni bio- ta nanomaterialy medychnoho pryznachennia: monohrafiia [Functional bio- and nanomaterials for medical purposes: monograph]*. Kyiv: Vydavnychi dim "Kondor".
3. Dronova, M. L. (2016). *Farmakolohichni osoblyvosti antybakterialnoi dii novykh pokhidnykh arylalifatychnykh aminospirtiv [Pharmacological features of antibacterial action of new derivatives of arylaliphatic amino alcohols]*. (Dys. kand. farm. nauk). Instytut farmakolohii ta toksykolohii NAMN Ukrainy. Kyiv.
4. Salmanov, A. H. (2017). Plan dii Ukrainy z antymikrobnou rezystentnosti [Ukrainian Action Plan on antimicrobial resistance]. *Mizhnarodnyi zhurnal antybiotyky ta probiotyky - International Journal of Antibiotics and Probiotics*, 1 (1), 10-28. DOI: 10.31405.
5. Sydorak, H. T. (2019). *Profilaktyka uskladnen endodontychnoho likuvannia korenevyykh kanaliv zubiv [Prevention of root canal treatment complications]*. (Dys. kand. med. nauk). Natsionalna medychna akademiia pisladyplomnoi osvity imeni P.L. Shchupyka, Kyiv.
6. Bulacio, M. L., Galvin, L. R., Gaudio, C., Cangemi, R., & Erimbaue, M. I. (2015). Enterococcus faecalis biofilm formation and development in vitro observed by scanning electron microscopy. *Acta Odontol Latinoam*, 28, 3, 210-214. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27095620/>.
7. Kouidhi, B., Zmantar, T., Mahdouani, K., Hentati, H., & Bakhrouf, A. (2011). Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiology*, 11, 155. doi: 10.1186/1471-2180-11-155.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОМПОЗИТНЫХ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С АНТИМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Перешивайло О.И., Голубничая В.М., Корниенко В.В.

**Аннотация.** Вследствие неконтролируемого использования антибиотиков, остро встал вопрос антибиотикорезистентности. Поэтому, актуальным вопросом является поиск альтернативных антимикробных средств. Несмотря на значительные достижения в стоматологии, вопрос качественного эндодонтического лечения корневых каналов зубов остается актуальным. Одним из наиболее частых возбудителей внутриканального кариеса является *Enterococcus faecalis*, который входит в состав группы полирезистентных бактерий ESKAPE. Наночастицы серебра показали высокую эффективность

ність проти многих полирезистентным штаммов. Поэтому целью нашего исследования было оценить перспективы использования наночастиц серебра для создания композитных стоматологических материалов. Антибактериальное действие наночастиц серебра оценивали относительно клинического штамма *E. faecalis* путем определения минимальной ингибирующей концентрации (метод серийных разведений) и минимальной бактерицидной концентрации (прямой висев микроорганизма из жидких сред на плотные питательные). Исследовали влияние наночастиц серебра на темпы роста бактериальной популяции и на процессы биопленкообразования. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программного обеспечения для статистической обработки данных Graph Pad Prism 8 с определением критерия Стьюдента. Было установлено, что МИК и МБК составляли 2,5 мкг / мл. Данные о динамике отмирания штамма *E. faecalis* свидетельствуют о необходимости длительного контакта микроорганизмов с препаратом наносеребра и отражают постепенное снижение количества бактерий в исследуемом образце. Наночастицы серебра подавляют формирование биопленки уже на ранних этапах и эффективно влияют на уже сформированные биопленки. Действие наночастиц серебра в стадии инициации приводила к снижению общего объема несформированной биопленки в 2 раза при концентрации 10 и 20 МИК. Ингибирующее действие серебра на сформированную 3-х суточную биопленку было дозозависимым и возрастало с увеличением концентрации. Полученные результаты свидетельствуют, что наночастицы серебра ингибируют рост и размножение планктонных и пленочных форм *E. faecalis* и могут быть использованы для создания стоматологических композитных средств с антимикробной активностью.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, наночастицы серебра, *E. faecalis*, временная кривая, биопленка.

#### PROSPECTS FOR THE USE OF SILVER NANOPARTICLES FOR THE CREATION OF COMPOSITE DENTAL MATERIALS WITH ANTIMICROBIAL PROPERTIES

*Pereshyvailo O., Holubnycha V., Korniienko V.*

**Annotation.** Due to the uncontrolled use of antibiotics, the issue of antibiotic resistance has become vitally important. Search the alternative antimicrobials preparation is urgent question. Despite significant achievements in dentistry, the quality of root canals endodontic treatment remains relevant issue. *Enterococcus faecalis* is one of the ESKAPE group pathogen as well as one of the most common causative agents of intracanal caries. Ag nanoparticles (AgNPs) have shown high efficacy against several polyresistant strains. Therefore, the purpose of our study was to evaluate the possibility of AgNPs using to create composite dental materials with antimicrobial activity. Statistical processing of the obtained results was performed using the software package for statistical data processing Graph Pad Prism 8 with the definition of the Student's criterion. The antibacterial effect of Ag NPs was evaluated against the clinical strain of *E. faecalis* by determining the minimum inhibitory concentration (serial dilution method) and the minimum bactericidal concentration (direct inoculation of the microorganism from liquid onto solid media). The influence of AgNPs on the multiplication of the bacterial population and on the processes of biofilm formation were investigated. The MIC and MBC were 2.5 µg / ml. Time-kill curve of *E. faecalis* strain indicates the need for prolonged contact of microorganisms with the nanosilver preparation and reflect a gradual decrease in the number of bacteria in the sample. AgNPs inhibit the formation of biofilms in the early stages and effectively affect 3-days biofilms. The action of the silver nanoparticles at the initiation stage reduced the total volume of the unformed biofilm by 2 times at concentrations of 10 and 20 MICs. The inhibitory effect of silver on the formed 3-day biofilm was dose-dependent and increased with increasing concentration. The obtained results show AgNPs inhibit the growth and reproduction of planktonic and film forms of *E. faecalis* and can be used to create dental composite with antimicrobial activity.

**Keywords:** antibiotic resistance, Ag nanoparticles, *E. faecalis*, time curve, biofilm.