

# ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ МИКРОФЛОРЫ ПЕРИОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА К ОБРАЗОВАНИЮ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, И ВОЗМОЖНОСТЬ ВЛИЯНИЯ НА МИКРОБНУЮ БИОПЛЕНКУ ФЕРМЕНТАМИ И АНТИСЕПТИКАМИ

Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь

**Реферат.** Статья отражает актуальность проблемы диагностики и лечения воспалительных заболеваний периодонта. Исследована способность микрофлоры периодонтального кармана к образованию биопленки. Разработаны методы визуального и количественного определения биопленок. Также изучено влияние ферментов и антисептиков на микробную биопленку *in vitro*.

**Ключевые слова:** биопленка ротовой полости, пародонтит, микрофлора, ферменты.

**Summary.** The article reflects the current problem of diagnosis and treatment of inflammatory periodontal diseases. Biofilm-producing bacterial flora localized in periodontal pocket is researched. Methods of visual and quantitative assessment of biofilms are developed. Influences of antiseptic agents and enzymes on a microbial biofilms are studied as well.

**Keywords:** oral cavity biofilm, parodontitis, bacterial flora, enzyme.

**Введение.** В современной стоматологии диагностика и лечение заболеваний маргинального периодонта представляет сложную и актуальную проблему, которая приобрела не только медицинскую, но и социальную значимость. Распространенность болезней периодонта в мире составляет 98% [4].

К настоящему времени не вызывает сомнений, что в развитии заболеваний маргинального периодонта важнейшую роль играют воспалительные реакции, спровоцированные микроорганизмами ротовой полости. Однако на смену концепции единственного микробного возбудителя заболеваний периодонта пришли теории ассоциации микробных сообществ — биопленок. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условия воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина. Поэтому одной из главных проблем является лечение инфекций, ассоциированных с биопленками, и она представляет значительные трудности [3].

**Цель** исследования — определение спектра микроорганизмов периодонтального кармана, способных образовывать микробные сообщества, изучение наиболее активных ферментов и антисептиков, способных разрушать матрикс микробной биопленки *in vitro*.

**Материалы и методы.** С целью изучения периодонтальной микрофлоры нами было обследовано 72 пациента на кафедре терапевтической стоматологии УО ВГМУ с диагнозом «хронический генерализованный пародонтит».

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе. Для идентификации использовались системы для экспресс-идентификации микроорганизмов: rapid ID 32 STREP — для стрептококков, ID 32 E — для энтеробактерий. Культивирование стрептококков осуществлялось в капнофильных условиях (5–10% CO<sub>2</sub>) в течение 24 ч с использованием анаэроостатов.

Микроскопические исследования, нацеленные на визуализацию трехмерной структуры биопленок, проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF. Анализ полученных изображений проводился на компьютере с помощью программы LAS F 3.6.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ Statistica 10, Excel. Так как изучаемые показатели имели нормальное распределение во всех группах исследования ( $p$  для критерия Шапиро–Уилка во всех группах  $>0,05$ ), результаты представлены в виде  $M \pm \sigma$  ( $M$  — среднее значение,  $\sigma$  — стандартное отклонение).

**Результаты и их обсуждение.** Микробиологические исследования содержимого периодонтальных карманов позволили выделить и идентифицировать 13 видов микроорганизмов, из них 25% составил *Streptococcus oralis*; *S. mitis* — 7,5%, *Gemella heamolysans*, *G. morbillorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. mutans*, *S. sanguinis* — 5%; *Candida spp* — 10%; *Staphylococcus spp*, *Lactobacillus spp* — 12,5%; *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc spp*, *Lc lactis lactis* — 2,5%.

Для определения способности полученного штамма к образованию биопленки был использован модифицированный нами метод с применением 96-луночного пластикового планшета [2]. В отличие от стандартной методики  $E_{оп}$  переводили в вес микробной биопленки из расчета на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА. Для вычислений использовалась формула:

$$X = 25,75 \times 0,2 \times E_{оп}^{1,275} / 26,0, \quad (1)$$

После анализа полученных данных масса биопленки 10 штаммов *S.oralis*, выделенных от разных пациентов, была в пределах 0,012–0,030 мкг на лунку. Нами для дальнейшего исследования был выбран штамм с наиболее высокой способностью к образованию биопленки.

Визуализация биопленки с помощью конфокальной микроскопии и программного обеспечения LAS AF с использованием флюоресцентного красителя DAPI выявила характерную для биопленок трехмерную организацию. Толщина двухсуточной биопленки *S. oralis* колебалась от 50 до 60 мкм. Для подтверждения способности ферментов разрушать микробную биопленку нами была обработана полученная ранее экспериментальная модель гиалуронидазой I (бычья) в течение 20 с, ее толщина после обработки составила от 30 до 40 мкм, а также заметно снизилась интенсивность окраски.

Для оценки способности антисептиков и ферментов расщеплять экзополимерный матрикс биопленки применяли разработанный нами метод [1]. Однако в отличие от старой методики для пересчета  $E_{оп}$  в мг выделенного Конго-красного использовалась следующая формула:

$$X = (0,0027 + 1,7 \times E_{оп})^2, \quad (2)$$

где  $X$  — искомый результат;

$E_{оп}$  — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Результаты определения способности ферментов разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* представлены в таблице 1.

Из ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы I типа (бычья)  $0,2 \pm 0,004$  мг. В то же время папаин подобной активностью не обладал.

Ферменты, которые имели наибольшие показатели при расщеплении биопленки, были исследованы в комбинации для выявления их возможного сочетанного взаимодействия (таблица 2).

Таблица 1. — Способность ферментов к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

Фермент	Активность, (M± σ), мг
Амилаза	0,001±0,0005
Гиалуронидаза I (бычья)	0,2±0,004
Гиалуронидаза III (стрептококковая)	0,008±0,0004
ДНКаза	0,009±0,0009
Лизоцим	0,0012±0,0009
Папаин	0
Пепсин	0,0073±0,001
Пероксидаза	0,008±0,001
Протеиназа	0,092±0,009
Рибонуклеаза	0,0017±0,0002
Трипсин	0,00003±0,00001

Таблица 2. — Влияние комбинации ферментов на способность расщеплять экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis*

Фермент	Активность, (M± σ), мг
ДНКаза + Гиалуронидаза I (бычья)	0,008±0,0001
Протеиназа + Гиалуронидаза I (бычья)	0,0054±0,000015
Протеиназа + ДНКаза	0,0017±0,00006
Протеиназа + Гиалуронидаза I (бычья) + ДНКаза	0,001±0,00007

Из полученных данных следует, что при комбинации ферментов происходит снижение их активности.

Результаты определения способности антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* представлены в таблице 3.

Таблица 3. — Способность антисептиков к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

Антисептик	Активность, (M± σ), мг
Диметилсульфоксид 30%	1,33±0,03
Перекиси водорода 3%	0,0024±0,0002
Цитилипиридиний хлорид	0,0037±0,00006
«Белсол» (2% хлоргексидин биглюконат)	0,0005±0,00005
«Белсол» + «Белодез» (3% гипохлорит натрия)	0,0018±0,00008

Наиболее активным антисептиком на основании опытных данных является диметилсульфоксид 30% 1,33±0,03 мг. Антисептики, у которых не было выявлено активности (септомирин, стоматидин, 0,05% хлоргексидин биглюконат, 3% гипохлорит натрия, фурациллин и йодиксин), в таблицу не включены.

Также было исследована способность аскорбиновой кислоты разрушать матрикс биопленки, ее активность составила 0,0018±0,00007 мг.

Для определения времени экспозиции в полости рта было изучено действие ферментов и антисептиков на протяжении 24 ч. На основании анализа линейных диаграмм было установлено, что ДНКаза и гиалуронидаза I (бычья) обладают максимальной активностью при экспозиции 20 с, в то же время активность диметилсульфоксида 30% не зависит от времени экспозиции.

**Заключение.** На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Разработан метод количественного определения массы биопленки *in vitro* при использовании 96-луночного пластикового планшета.
2. Разработан метод для количественной оценки способности ферментов и антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки, образованной *S. oralis*
3. Наибольшая активность из исследованных ферментов наблюдалась у гиалуронидазы I типа, что, вероятно, связано с расщеплением полисахаридов матрикса, оптимальное время экспозиции составило 20 с.
4. Наибольшую активность из антисептиков по отношению к матриксу биопленки *S. oralis* показал препарат диметилсульфоксид 30%, активность на зависела от времени экспозиции.
5. С использованием лазерной конфокальной микроскопии построена 3D модель биопленки *S. oralis*, установлено, что она имеет сложную трехмерную структуру толщиной от 50 до 60 мкм.

### **Литература**

1. Колчанова, Н.Э. Оценка способности ферментов и антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* / Н.Э. Колчанова, В.Е. Шилин // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 67-й итог. науч.-практ. конф студентов и молодых ученых, Витебск, 23–24 апр. 2015 г. / Витебск. гос. мед. ун-т. — Витебск, 2015. — 239-240 с.
2. Плотников, Ф.В. Комплексное лечение гнойных ран с учетом способности возбудителей образовывать биопленки: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17; 03.02.03 / Ф.В. Плотников; Витебск. гос. мед. ун-т. — Минск, 2015. — 23 с.
3. Действие антисептиков на бактериальные биопленки у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / Д.С. Щербакова [и др.] // Пародонтология. — 2011. — № 4. — С. 65–69 с.
4. Haffajee, A.D. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations / A.D. Haffajee, S.S. Socransky // Periodontol. — 2000. — Vol. 5, № 1. — P. 78–111.