

Колчанова Н. Э., Окулич В. К.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ НА МИКРОБНУЮ БИОПЛЕНКУ ПЕРИОДОНТАЛЬНОГО КАРМАНА

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский
университет, Беларусь*

По данным ВОЗ, основанным на статистике 53 стран мира, в различных возрастных группах заболеваемость гингивитом и периодонтитом достигает 80–100 % [1]. К настоящему времени на смену концепции планктонных форм возбудителя заболеваний периодонта пришли теории ассоциации микробных сообществ — биопленок. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина [2].

Несмотря на очевидную актуальность, недостаточно известно о подборе методов эффективного воздействия на бактерии ротовой полости, находящиеся в составе биопленок. Таким образом, профилактика и борьба с колонизацией бактериями, способными вызывать заболевания периодонта, остается чрезвычайно актуальной [3].

Цель исследования — определить действие химиопрепаратов на микробную биопленку периодонтального кармана.

Материалы и методы

С целью изучения периодонтальной микрофлоры нами было обследовано 77 пациентов с хроническим периодонтитом. Все пациенты проходи-

ли лечение на клинической базе кафедры терапевтической стоматологии УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника».

Результаты и обсуждение

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

Для оценки способности химиопрепаратов и ротовой жидкости расщеплять экзополимерный матрикс биопленки применяли разработанный нами метод [4].

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

Таблица 1

Способность ферментов к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

Фермент	Активность ($M \pm \sigma$), мг
Альфа-амилаза (<i>porcine pancreas</i>)	0,001 \pm 0,0005
Альфа-ДНКаза (<i>human</i>)	0,009 \pm 0,0009
Гиалуронидаза I (<i>bovine testis</i>)	0,2 \pm 0,004
Гиалуронидаза III (<i>streptococcus</i>)	0,008 \pm 0,0004
Лизоцим (<i>human</i>)	0,0012 \pm 0,0009
Папаин (<i>Carica papaya</i>)	0
Пепсин (<i>human</i>)	0,0073 \pm 0,001
Пероксидаза (<i>horseradish</i>)	0,008 \pm 0,001
Протеиназа К (<i>tritrachium album</i>)	0,092 \pm 0,009
Рибонуклеаза (<i>bovine pancreas</i>)	0,0017 \pm 0,0002
Трипсин (<i>bovine pancreas</i>)	0,00003 \pm 0,00001

Ферменты, которые показали наибольшие значения при расщеплении биопленки, были исследованы в комбинации для выявления их возможного сочетанного применения (табл. 2).

Таблица 2

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

Фермент	Активность ($M \pm \sigma$), мг
Альфа-ДНКаза + Гиалуронидаза I (бычья)	0,008 \pm 0,0001
Протеиназа К + Гиалуронидаза I (бычья)	0,0054 \pm 0,000015
Протеиназа К + Альфа-ДНКаза	0,0017 \pm 0,00006
Протеиназа К + Гиалуронидаза I (бычья) + Альфа-ДНКаза	0,001 \pm 0,00007

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

Способность антисептиков к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

Антисептик	Активность, (M ± σ), мг
Диметилсульфоксид 25 %	1,33 ± 0,03
Перекись водорода 3 %	0,0024 ± 0,0002
Цетилпиридиния хлорид	0,0037 ± 0,00006
«Белсол» (хлоргексидин биглюконат 2 %)	0,0005 ± 0,00005

Антисептики, у которых не было выявлено активности, в таблицу не включены: септомирин (мирамистин), стоматидин (гексетидин), хлоргексидин биглюконат 0,05 %, «Белодез» (гипохлорит натрия 3 %), фурацилин и йодиксин. Также была исследована способность аскорбиновой кислоты и ацетилцистеина разрушать матрикс биопленки, активность составила $0,0018 \pm 0,00007$ и $0,002 \pm 0,0003$ мг соответственно.

Выводы:

1. Разработаны и апробированы методы формирования биопленки *S. oralis* в лунках полистиролового 96-луночного планшета для ИФА, методы индикации биопленки спектрофотометрически, с помощью световой микроскопии, ЛСК-микроскопии, а также способы количественной оценки биомассы микробной биопленки *S. oralis in vitro*, позволяющие стандартизировать формирование и изучение микробных сообществ. Построена 3D модель биопленки *S. oralis*, установлено, что она имеет сложную трехмерную структуру толщиной от 50 до 60 мкм.

2. С помощью предложенной экспериментальной модели для определения действия химических объектов на микробные сообщества обнаружено, что среди антисептиков, широко распространенных в клинической практике, наиболее эффективен в отношении биопленки *S. oralis* диметилсульфоксид 25 %, активность которого проявляется в первые секунды взаимодействия, его показатель способности разрушать экзополимерный матрикс биопленки составил $1,33 \pm 0,03$ мг. Среди исследованных ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы I типа — $0,2 \pm 0,004$ мг, что, вероятно, связано с расщеплением гиалуроновой кислоты матрикса, оптимальное время экспозиции 20 с.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Periodontal pathogens* : a quantative comparison of anaerobic culture and real-time PCR / K. Voutaga [et al] // J. Immunol. Med. Microbiol. 2005. Vol. 45. P. 191–199.
2. Что такое биопленка / С. В. Мальцев [и др.] // Природная медицина: клинические исследования. 2013. № 1 (13). С. 86–89.
3. Действие антисептиков на бактериальные биопленки у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / Л. Ю. Орехова [и др.] // Пародонтология. 2011. № 4. С. 65–69.
4. Колчанова, Н. Э. Оценка способности ферментов и антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* / Н. Э. Колчанова, В. Е. Шилин // Материа-

лы 67-й науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, г. Витебск, 23–24 апреля 2015 г. / Витеб. гос. мед. Витебск, 2015. С. 462–465.

Kolchanova N. E., Okulich V. K.

**Determination of chemotherapy action on microbial biofilm
of periodontal pocket**

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, enzymes on a microbial biofilms are studied as well.