

УДК 616.31:579]:001.8

DOI: 10.14427/jipai.2015.4.79

Методические аспекты определения образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивость к химическим и биологическим объектам

Н.Э. Колчанова, В.К. Окулич, В.Е. Шилин, Ю.П. Чернявский

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

Methodological aspects determination of the periodontal pocket bacteria's to form microbic communities and its chemical and biological objects resistance

N.E. Kolchanova., V.K. Okulich, V.E. Shilin, Y.P. Cherniavsky

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

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, антисептиков и ротовой жидкости на микробную биопленку *in vitro*.

Ключевые слова

Биопленка ротовой полости, периодонтит, микрофлора, ферменты, антисептики.

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, enzymes and oral fluid on a microbial biofilms are studied as well.

Keywords

Oral cavity biofilm, parodontitis, bacterial flora, enzymes, antiseptic agents

Воспалительные заболевания периодонта являются одной из актуальных проблем стоматологии. По данным ВОЗ, основанным на статистике 53 стран мира, в различных возрастных группах заболеваемость гингивитом и периодонтитом достигает 80-100% [7].

К настоящему времени не вызывает сомнений, что в развитии заболеваний маргинального периодонта важнейшую роль играют воспалительные реакции, спровоцированные микроорганизмами ротовой полости [2]. Однако, на смену концепции планктонных форм микробного возбудителя заболеваний периодонта пришли теории ассоциации микробных сообществ – биопленок.

Биопленка – микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных

полимерных веществ, и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов [1, 8]. В химическом отношении матрикс биопленки неоднороден и различается у разных микроорганизмов. Экстрацеллюлярный слой содержит до 40–95% полисахаридов. Концентрация других химических компонентов очень сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот 1-20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80-90% объема биопленки занимает вода [9].

Применение конфокальной сканирующей лазерной микроскопии для исследования биопленок радикально изменило восприятие их структурных и функциональных особенностей. Этот метод дал возможность исследовать био-

пленки *in situ* без ограничений, с которыми сталкивается электронная микроскопия, хотя и при более низких увеличениях. С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии установлено, что структура биопленок не является гомогенным монослоем микробных клеток, а представляет сложную трехмерную биологическую структуру высшей организации жизнедеятельности микробов, в чем-то напоминающей многоклеточный организм, обладающий очень важной особенностью – успешно противостоять внешним факторам агрессии, в том числе ультрафиолетовому излучению, дегидратации, антибиотикам, дезинфектантам и факторам иммунной защиты человека [6]. Многие аспекты функционирования данной многоуровневой системы до сих пор остаются не изученными. Не полностью определены также факторы, способствующие разрушению биопленок.

На сегодняшний день существует ряд методов, позволяющих выращивать и изучать биопленки. Однако зачастую данные методы требуют дорогостоящей техники и реактивов, в связи с чем разработка доступных и в то же время информативных способов изучения микробных сообществ является перспективной и актуальной задачей [5].

Цель исследования - определить спектр микроорганизмов периодонтального кармана, способных образовывать микробные сообщества, изучить способность химических и биологических объектов разрушать матрикс микробной биопленки *in vitro*.

Материалы и методы

С целью изучения периодонтальной микрофлоры нами было обследовано 77 пациентов на кафедре терапевтической стоматологии УО ВГМУ с хроническим периодонтитом. При постановке диагноза обследуемым пациентам использована классификация заболеваний периодонта Американской академии периодонтологии 1999 года.

Все пациенты проходили лечение на клинической базе кафедры терапевтической стоматологии УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника».

Обследование пациентов с хроническим периодонтитом проводилось по единой схеме. Все пациенты в день обращения получали традиционное лечение в соответствии со степенью тяжести заболевания, включающее профессиональную гигиену полости рта, устранение местных факторов, способствующих скоплению и активации

действия микробного фактора, местную противовоспалительную терапию, закрытый кюретаж периодонтального кармана.

В день обращения перед проведением лечебных мероприятий (проба 1) и в день завершения лечения (проба 2) производился забор ротовой жидкости за час до еды в стерильные пробирки.

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ EXPRESSION® (Биомерье). 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% CO₂) в течение 24 часов с использованием анаэроустатов.

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 10.0», «MS Excel». Показатели активности ферментов и антисептиков имели нормальное распределение (p для критерия Шапиро-Уилка во всех группах $>0,05$), результаты представлены в виде $M \pm \sigma$ (M -среднее значение, σ -стандартное отклонение). Для оценки данных активности ротовой жидкости применены методы непараметрической статистики и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием нижнего 25-й (LQ) и верхнего 75-й квартилей (UQ). В этом случае для анализа различий в двух независимых группах по количественному признаку применялся непараметрический критерий U Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Микробиологические исследования содержимого периодонтальных карманов позволили выделить и идентифицировать 13 видов микроорганизмов, из них 25% составил *Streptococcus oralis*, в то же время 7,5% - *S. mitis*, 5% - *S. mutans*, *S. sanguinis*; количество *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 определения способности полученного штамма к образованию биопленки был исполь-

зован метод с применением 96-луночного планшетного планшета [4]. В дополнение к предшествующей методике, Еоп переводили в вес микробной биопленки из расчета на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА. Для вычислений использовалась формула (multiplicative модель):

$$X = 25,75 * 0,2 * E_{\text{оп}}^{1,275} / 26,0$$

Масса биопленки 10 штаммов *S.oralis*, выделенных от разных пациентов, была в пределах 0,012-0,030 мкг на лунку, 3 штаммов *S.mitis* составила 0,0005-0,009 мкг на лунку, 2 штаммов *S.mutans* - 0,0087-0,01 мкг на лунку, из выделенных 2 штаммов *S.sanguinis* способностью к образованию биопленки обладал только один, масса которого составила 0,004 мкг на лунку. После анализа полученных данных нами для получения биопленки был выбран штамм с наиболее высокой способностью ее продуцирования.

Визуализация биопленки с помощью конфокальной микроскопии и программного обеспечения LAS AF с использованием флуоресцентного 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 она была обработана гиалуронидазой I (бычья) в течение 20 с, ее толщина после обработки уменьшилась и 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. В стерильную чашку Петри с агаром Мюллера – Хинтона помещали стерильную инертную полимерную мембрану, прижимали стеклянным грузом и вносили 0,5 мл взвеси *S.oralis* или в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл и 5 мл 0,9% NaCl. Чашку Петри инкубировали в течение 3 суток при температуре 37°C. Мембрану извлекали из чашки Петри, биопленку с мембраны смывали стерильным физиологическим раствором. К полученной суспензии добавляли в избытке 0,5% раствор Конго красного. Суспензию дважды отмывали 0,9% NaCl для удаления не связанного Конго красного с осаждением матрикса центрифугированием при 1000 оборотов в мин. (200 g) в течение 75 мин. после каждой отмывки. Суспензию замораживали и хранили при -25°C до использования.

Для приготовления рабочей суспензии матрикса биопленки разводили размороженную суспензию матрикса раствором 0,9% NaCl до

оптической плотности $2,5 E_{\text{оп}}$ на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм и 0,15 мл суспензии матрикса в лунке 96-луночного планшета для ИФА. Далее 0,1 М раствором фосфатного буфера с рН 7,4 доводили оптическую плотность суспензии до $2 E_{\text{оп}}$. В 1 мл рабочей суспензии содержалось 12,2 мг сухого матрикса и 0,1 мг Конго красного. В качестве консерванта в суспензию добавляли азид натрия в концентрации 2 мг/мл.

Реакцию ставили в пробирках типа эппендорф. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл исследуемого агента и 0,3 мл рабочей суспензии экзополимерного матрикса биопленки. Препараты ферментов – лизоцим (Sigma), протеиназа К (Sigma), гиалуронидаза бычья и стрептококковая, трипсин, пепсин, альфа-амилаза, ДНК-аза, рибонуклеаза, пероксидаза – все в концентрации 1 мг/мл. Препараты антисептиков использовались в рабочей концентрации. После инкубации в течение 24 ч при 37 °С реакционную смесь центрифугировали 10 мин. при 10 тыс. оборотов в мин. (7930 g) на центрифуге MIKRO 120 (Hettich) для осаждения не разрушенных компонентов матрикса и переносили по 0,15 мл надосадка в лунки планшета для иммуноферментного анализа. Далее производили учет результатов реакции по увеличению оптической плотности надосадка на многоканальном спектрофотометре Ф300 ТП при длине волны 492 нм в сравнении с отрицательными контрольными пробами, где вместо раствора исследуемого препарата использовали 0,9% NaCl. Результат рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных [3]. В отличие от предложенной ранее методики для пересчета Еоп в мг выделенного Конго-красного использовалась следующая формула (square root-Y модель):

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

где X – искомый результат в мг освобожденного Конго-красного;

$E_{\text{оп}}$ – 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 тоже время папаин подобной активностью не обладал.

Ферменты, которые показали наибольшие значения при расщеплении биопленки, были исследованы в комбинации для выявления их

возможного комбинированного применения (табл. 2).

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.

Наиболее активным антисептиком на основании опытных данных является диметилсульфоксид в концентрации 25%, его показатель способности разрушать экзополимерный матрикс биопленки составил $1,33 \pm 0,03$ мг. Антисептики у которых не было выявлено активности в таблицу не включены: септомирин (мирамистин), стоматидин (гексетидин), 0,05% хлоргексидин биглюконат, 3% гипохлорит натрия, фурациллин 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.

Для определения времени экспозиции и концентрации было изучено действие ферментов и антисептиков на протяжении 24 часов. На основании анализа графиков было установлено, что ДНКаза и гиалуронидаза I

(бычья) обладают максимальной активностью при экспозиции 20 с в концентрации 1,5 мг/мл и 0,75 мг/мл соответственно, в то же время активность диметилсульфоксида наибольшая в концентрации 25% и проявляется в первые секунды взаимодействия.

Результаты способности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* представлены в таблице 4.

При статистическом анализе результатов активности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки установлено, что способность к расщеплению матрикса биопленки выше у пациентов с хроническим периодонтитом ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. После проведенного лечения наблюдается достоверное снижение этих показателей практически до уровня контрольной группы ($p < 0,001$).

С целью оценки чувствительности и специфичности метода при использовании его для диагностики хронического периодонтита, был проведен ROC-анализ полученных данных (табл. 5).

Применение ROC-анализа позволяет отнести со специфичностью 100%, чувствительностью 95% пациентов с уровнем активности ротовой жидкости выше 0,039 пкат к группе пациентов

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

№ п/п	Фермент	Активность, ($M \pm \sigma$), мг
1	Альфа-амилаза (porcine pancreas)	$0,001 \pm 0,0005$
2	Альфа-ДНКаза (human)	$0,009 \pm 0,0009$
3	Гиалуронидаза I (bovine testis)	$0,2 \pm 0,004$
4	Гиалуронидаза III (streptococcus)	$0,008 \pm 0,0004$
5	Лизоцим (human)	$0,0012 \pm 0,0009$
6	Папаин (Carica papaya)	0
7	Пепсин (human)	$0,0073 \pm 0,001$
8	Пероксидаза (horseradish)	$0,008 \pm 0,001$
9	Протеиназа К (tritrachium album)	$0,092 \pm 0,009$
10	Рибонуклеаза (bovine pancreas)	$0,0017 \pm 0,0002$
11	Трипсин (bovine pancreas)	$0,00003 \pm 0,00001$

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

№ п/п	Фермент	Активность, ($M \pm \sigma$), мг
1	ДНКаза+ Гиалуронидаза I (бычья)	$0,008 \pm 0,0001$
2	Протеиназа + Гиалуронидаза I (бычья)	$0,0054 \pm 0,000015$
3	Протеиназа + ДНКаза	$0,0017 \pm 0,00006$
4	Протеиназа + Гиалуронидаза I (бычья) + ДНКаза	$0,001 \pm 0,00007$

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

№ п/п	Антисептик	Активность, (M±σ), мг
1	Диметилсульфоксид 25%	1,33±0,03
2	Перекись водорода 3%	0,0024±0,0002
3	Цитилпиридиний хлорид	0,0037±0,00006
4	«Белсол» (2% хлоргексидин биглюконат)	0,0005±0,00005
5	«Белсол»+ «Белодез» (3% гипохлорит натрия)	0,0018±0,00008

Таблица 4. Способность ротовой жидкости к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis*

Группа	Активность, Me, LQ - UQ		p
	до лечения	после лечения	
Контрольная (n=11)	1. 0,025; 0,023-0,03		$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3} = 0,001$
С хроническим периодонтитом (n=20)	2. 0,211; 0,135-0,276	3. 0,039; 0,03-0,066	$P_{2-3} < 0,001$

Таблица 5. ROC-анализ данных, полученных при исследовании способности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки

Сравнимые группы	Диагностический критерий, пкат	Специфичность%	Чувствительность, %	Диагностическая эффективность, %
Хронический периодонтит /Контрольная	>0,039	100	95	75,1-99,2
Хронический периодонтит до/после лечения	>0,082	95	90	68,3-98,5

с диагнозом хронический периодонтит. На выздоровление пациентов указывает снижение показателей активности ротовой жидкости ниже 0,082 пкат со специфичностью 95% и чувствительностью 90%.

Заключение

Разработан метод количественного определения массы биопленки *in vitro* с использованием 96-луночного пластикового планшета.

Разработан метод для количественной оценки способности ферментов и антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки, образованной *S.oralis*.

С использованием лазерной конфокальной микроскопии построена 3D модель биопленки *S.oralis*, установлено, что она имеет сложную трехмерную структуру толщиной от 50 до 60 мкм.

Наибольшая активность из исследованных ферментов наблюдалась у гиалуронидазы I типа, что, вероятно, связано с расщеплением гиалу-

роновой кислоты матрикса, оптимальное время экспозиции 20 с.

Наибольшую активность из антисептиков по отношению к матриксу биопленки *S.oralis* показал препарат диметилсульфоксид в концентрации 25%, активность которого проявляется в первые секунды взаимодействия.

Ротовая жидкость обладает способностью расщеплять экзополимерный матрикс биопленки, при патологии периодонта ее активность повышается до 0,211; 0,135-0,276 пкат, а после лечения снижается до уровня контрольной группы 0,025; 0,023-0,03 пкат.

Уровень активности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки выше 0,039 пкат позволяет отнести обследуемого к группе пациентов с диагнозом хронический периодонтит. Снижение показателей активности ротовой жидкости ниже 0,082 пкат является критерием выздоровления для пациентов с хроническим периодонтитом.

Литература

1. Haffajee A.D., Socransky S.S. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Periodontol.* 2000; Vol. 5, №1: 78-111.
2. Манак Т.Н. Микрофлора полости рта и ее роль в развитии заболеваний пародонта. *Стоматол. журн.* 2012; Т.ХІІІ, №3: 178-181.
3. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка. *Природная медицина: клинические исследования* 2013; № 1(13): 86-89.
4. Оценка способности ферментов и антисептиков разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S.oralis*: материалы 67-й науч.-практ. конф студентов и молодых ученых, Витебск, 23-24 апреля 2015 г. *Вит. гос. мед. ун-т. Витебск*, 2015: 239-240.
5. Плотников Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку. *Новости хирургии* 2014; Т. 22, №5: 575-581.
6. Щербакова Д.С., Левкович Д.В., Орехова Л.Ю. и соавт. Действие антисептиков на бактериальные биопленки у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. *Пародонтология* 2011; №4: 65-69.
7. Chebotar I.V. et al. Antimicrobial Resistance of Bacteria in Biofilms. *Clinical Microbiology and antimicrobial chemotherapy* 2012; Vol. 14, №1: 51-58.
8. Jakobsen T.H. et al. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition in vitro. *Quorum sensing: methods and protocols. Methods in Molecular Biology* 2011; Vol. 692: 253-263.
9. Moons P. Bacterial interactions in biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 2009; Vol. 35, №3: 157-168.

Сведения об авторах:

Колчанова Наталья Эдуардовна - аспирант кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. г. Витебск, пр. Фрунзе 45а-70. Тел. VEL 80293507476. natali.kolchanova777@gmail.com

Окулич Виталий Константинович - к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. г. Витебск, ул. Короткевича 20-122. Тел. MTC 80297103489. vokul@mail.ru

Шилин Владимир Евгеньевич - к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. Тел. MTC 80297118429

Чернявский Юрий Павлович - к.м.н., доцент, зав. кафедрой терапевтической стоматологии УО ВГМУ. Тел. MTC 80297187230

Поступила 08.09.2015 г.