

УДК 616.31:579]:001.8

DOI: 10.14427/jipai.2015.3.56

## Определение образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивости к химическим и биологическим объектам

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

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

## Determination of the periodontal pocket bacteria's to form microbial communities and its chemical and biological objects resistance

N.E. Kolchanova, V.K. Okulich, V.E. Shilin

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

Статья отражает актуальные 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]. На смену концепции планктонных форм микробного возбудителя заболеваний периодонта пришли теории ассоциации микробных сообществ – биоплёнок.

Биопленка – микробное сообщество, характеризующееся тем, что бактерии, 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 до 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, хотя и при более низких увеличениях, дал возможность исследовать биопленки *in situ* без ограничений, с которыми сталкивается электронная микроскопия. 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 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 – разработать методики определения образования микробной биопленки, 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 стоматоло-

гии 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 в течение 24 часов с использованием анаэроба.

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,  $\sigma$  – 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 микро-

организмов, 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 определения способности полученного штамма к образованию биопленки был использован метод с применением 96-луночного пластикового планшета [4]. В дополнение к предшествующей методике, значения оптической плотности (Е<sub>оп</sub>), полученные на спектрофотометре, переводили в вес микробной биопленки из расчета на одну лунку 96-луночного планшета для ИФА. Для вычислений использовалась формула (multiplicative модель):

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

где: X – искомая масса биопленки в лунке  
E<sub>оп</sub> – оптическая плотность лунки

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 от 0,0005 до 0,009 мкг на лунку, 2 штаммов *S.mutans* – от 0,0087 до 0,01 мкг на лунку, из выделенных 2 штаммов *S.sanguinis* способностью к образованию биопленки обладал только один, масса биопленки 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 последняя была обработана гиалуронидазой I типа 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, фиксировали стеклянным грузом и вносили 0,5 мл взвеси *S.*

*oralis* плотностью 0,5 оптических единиц Мак-Фарланда ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл) и 5 мл стерильного раствора хлорида натрия в концентрации 9 г/л. Инкубировали в течение 3 суток при температуре 37°C. Мембрану извлекали, биопленку с мембраны смывали стерильным физиологическим раствором. К полученной суспензии добавляли в избытке 0,5% раствор Конго красного. Суспензию дважды отмывали стерильным раствором хлорида натрия в концентрации 9 г/л для удаления не связанного Конго красного с осаждением матрикса центрифугированием в режиме 1000 оборотов в мин. (200 g) в течение 75 мин. после каждой отмывки. Суспензию замораживали и хранили при – 25°C до использования.

Готовили рабочую суспензию экзополимерного матрикса биопленки. Для этого разводили размороженную суспензию матрикса стерильным раствором хлорида натрия в концентрации 9 г/л до 2,5 E<sub>оп</sub>. Измерение оптической плотности производили на фотометре универсальном Ф300 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 pH 7,4 доводили оптическую плотность суспензии до 2 E<sub>оп</sub>. В 1 мл рабочей суспензии содержалось 12,2 мг сухого матрикса, связанного с 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 матрикса биопленки. Препараты ферментов – лизоцим (Sigma), протеиназа К (Sigma), гиалуронидаза бычьей и стрептококковая, трипсин, пепсин, альфа-амилаза, альфа-ДНК-аза, рибонуклеаза, пероксидаза, папаин – все в концентрации 1 мг/мл. Препараты антисептиков использовались в рабочей концентрации. После инкубации в течение 24 ч при 37°C реакционную смесь центрифугировали в режиме 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 96-луночного планшета для ИФА. Учет результатов реакции производили по увеличению оптической плотности надосадка на фотометре универсальном Ф300 при длине волны 492 нм. В качестве отрицательного контроля вместо раствора исследуемого препарата использовали стерильный раствор хлорида натрия в концентрации 9 г/л. Результат рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб (Е<sub>опп</sub>) и соответствующих им контрольных

(Еопк) [3]. В отличие от предложенной ранее методики для пересчета единиц оптической плотности (Еоп) в мг выделенного Конго-красного использовалась следующая формула (square root-Y модель):

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

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

$E_{\text{опп}} - E_{\text{онк}}$  – 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 сочетанного 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 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), хлоргексидин биглюконат 0,05%, «Белодез» (гипохлорит натрия 3%), фурациллин и йодиксин.

Также была исследована способность аскорбиновой кислоты и ацетилцистеина разрушать матрикс биопленки, активность которых составила  $0,0018 \pm 0,00007$  и  $0,002 \pm 0,0003$  мг соответственно.

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

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

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

№ п/п	Фермент	Активность, (M± σ), мг
1	Альфа-ДНКаза + Гиалуронидаза I (бычья)	0,008±0,0001
2	Протеиназа К + Гиалуронидаза I (бычья)	0,0054±0,000015
3	Протеиназа К + Альфа-ДНКаза	0,0017±0,00006
4	Протеиназа К + Гиалуронидаза I (бычья) + Альфа-ДНКаза	0,001±0,00007

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

При статистическом анализе (табл. 4) установлено, что способность к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. oralis* 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 позволило установить, что со специфичностью 100%, чувстви-

тельностью 95% пациенты с уровнем активности ротовой жидкости выше 0,039 мг относятся к группе пациентов с диагнозом хронический периодонтит. На выздоровление пациентов указывает снижение показателей активности ротовой жидкости ниже 0,082 мг со специфичностью 95% и чувствительностью 90%.

### Выводы

1. Разработаны и апробированы методы: формирования биопленки *S.oralis* в лунках полистиролового 96-луночного планшета для ИФА, индикации биопленки спектрофотометрически, с помощью световой микроскопии, лазерного сканирующего конфокального микроскопа, 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 химиче-

**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	Цетилпиридиния хлорид	0,0037±0,00006
4	«Белсол» (хлоргексидин биглюконат 2%)	0,0005±0,00005

**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**

Сравниваемые группы	Диагностический критерий, мг	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



ских объектов на микробные сообщества обнаружено, что среди антисептиков, широко распространенных в клинической практике, наиболее эффективен в отношении биопленки, образованной *S.oralis*, диметилсульфоксид 25%, активность которого проявляется в первые секунды взаимодействия, при этом его показатель способности разрушать экзополимерный матрикс биопленки составил  $1,33 \pm 0,03$  мг. В меньшей степени оказались эффективны перекись водорода 3% ( $0,0024 \pm 0,0002$  мг), цетилпиридиния хлорид ( $0,0037 \pm 0,00006$  мг), хлоргексидин биглюконат 2% ( $0,0005 \pm 0,00005$  мг). У антисептиков: септомирин (мирамистин), стоматидин (гексетидин), хлоргексидин биглюконат 0,05%, «Белодез» (гипохлорит натрия 3%), фурациллин и йодиксин - не было выявлено способности разрушать биопленку.

3. С помощью предложенной экспериментальной модели биопленки *S.oralis* меченым Конго красным обнаружено, что среди исследованных ферментов наибольшая активность наблюдалась у гиалуронидазы I типа (*bovine testis*) –  $0,2 \pm 0,004$  мг, что, вероятно, связано с расщеплением гиалуронової кислоты матрикса, оптимальное время экспозиции 20 с. Более низкие показатели способности разрушать экзополимерный матрикс биопленки обнаружены нами у ферментов: альфа-

фа-амилаза (*porcine pancreas*) –  $0,001 \pm 0,0005$  мг, альфа-ДНКазы (*human*) –  $0,009 \pm 0,0009$  мг, гиалуронидаза III (*streptococcus*) –  $0,008 \pm 0,0004$  мг, лизоцим (*human*) –  $0,0012 \pm 0,0009$  мг, пепсин (*human*) –  $0,0073 \pm 0,001$  мг, пероксидаза (*horseradish*) –  $0,008 \pm 0,001$  мг, протеиназа К (*trichium album*) –  $0,092 \pm 0,009$  мг, рибонуклеаза (*bovine pancreas*) –  $0,0017 \pm 0,0002$  мг, трипсин (*bovine pancreas*) –  $0,00003 \pm 0,00001$  мг. Папаин (*Carica papaya*) подобной активностью не обладал. При анализе сочетанного действия ферментов (гиалуронидаза I (бычья), альфа-ДНКазы, протеиназа К) на экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* установлено, что происходит взаимное ингибирование активности.

4. При исследовании способности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis* оказалось, что она была достоверно ( $p < 0,001$ ) выше у пациентов с хроническим периодонтитом –  $0,211$  мг, чем у контрольной группы –  $0,025$  мг. Уровень активности ротовой жидкости разрушать экзополимерный матрикс биопленки выше  $0,039$  мг позволяет отнести обследуемого к группе пациентов с диагнозом хронический периодонтит. Снижение показателей активности ротовой жидкости ниже  $0,082$  мг является критерием выздоровления пациентов с этим диагнозом.

## 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 периодонта. *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*: Мат. 67-й науч.- практ. конф студентов и молодых ученых, Витебск, 23-24 апр. 2015 г. ВГМУ. Витебск, 2015: 239-240.
5. Плотников Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микро-

организмов-возбудителей формировать биопленку. *Новости хирургии* 2014; Т. 22, №5: 575-581.

6. Щербак 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. 80293507476.  
 Окулич Виталий Константинович - к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. г. Витебск, ул. Короткевича 20-122. Тел. МТС 80297103489.  
 Шилин Владимир Евгеньевич - к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО ВГМУ. Тел. МТС 80297118429

Поступила 24.08.2015 г.