

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Щипакина Алина Александровна

**РОЛЬ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПОЛОСТИ
РТА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ**

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
и.о. заведующего кафедрой
фундаментальной
и прикладной микробиологии

 Гимранова И.А.

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Условия формирования микробного консорциума ротовой полости	8
1.2 Краткая характеристика основных родов бактерий, грибов и простейших – представителей нормальной микрофлоры полости рта человека	13
1.3 Микробиологические и иммунопатогенетические основы развития пародонтита. Механизм и этапы формирования зубных бляшек	25
1.4 Изменения в составе микрофлоры ротовой полости при пародонтите	28
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1 Объект исследования и условия проведения эксперимента	35
2.2 Идентификация выделенных штаммов лактобактерий методом масс-спектрометрии	36
2.3 Анализ биопленок, формирующихся на инертных поверхностях	37
2.4 Исследование адгезивной способности изолятов лактобацилл к буккальному эпителию	38
2.5 Определение антагонистических свойств <i>Lactobacilluspp.</i> к <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
2.6 Использование методов статистического анализа	40
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	41
3.1 Результаты бактериологического посева содержимого пародонтальных каналов пациентов	41
3.2 Идентификация выделенных штаммов <i>Lactobacilluspp.</i>	42
3.3 Адгезивная способность штаммов <i>Lactobacilluspp.</i> к буккальному эпителию	45
3.4 Антагонистические свойства штаммов <i>Lactobacilluspp.</i>	47

3.5 Способность штаммов <i>Lactobacillus</i> spp. к биопленкообразованию	50
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
ВЫВОДЫ	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	55

Список сокращений

СОПР – слизистая оболочка полости рта

ВВЕДЕНИЕ

Колонизационная резистентность – это совокупность механизмов, обеспечивающих способность микробиоты и макроорганизма в условиях кооперативного взаимодействия защищать определенную экологическую нишу от влияния патогенных микроорганизмов[45]. К таким механизмам относятся: блокировку клеточных рецепторов тканей от посторонних микроорганизмов и конкурирования с ними за пищевые субстраты; стимуляцию подвижности эпителия слизистых оболочек; продукцию биологически активных субстанций (перекиси, бактериоцинов, лизоцима, антибиотикоподобных веществ), детоксикацию ксенобиотиков, активацию иммунного ответа макроорганизма).

Одним из распространенных последствий нарушения колонизационной резистентности слизистой оболочки полости рта (СОПР) является генерализованный пародонтит. Несмотря на огромное количество публикаций, разработок и патентов, проблема лечения заболеваний пародонта продолжает оставаться актуальной и является одной из самых сложных задач современной стоматологии. Ее важность подтверждается еще и тем, что количество лиц, страдающих генерализованным пародонтитом, неуклонно растет и данная патология теряет свои возрастные ограничения [46]. Причиной такой ситуации является ухудшение экологических, демографических, социальных факторов, что приводит к нарушениям иммунной системы организма и вызывает ослабление защитных барьеров слизистой оболочки ротовой полости. Снижение колонизационной резистентности СОПР, дисбаланс резидентной микробиоты экосистемы полости рта способствует развитию хронического генерализованного пародонтита[47].

Говоря о коррекции колонизационной резистентности, необходимо отметить, что одним из наиболее важных направлений является восстановление нормальной микробиоты и поддержание ее

эффективного функционирования. Такое восстановление проводят с помощью применения пробиотиков, пребиотиков и иммуномодуляторов бактериального происхождения.

На сегодня пробиотические препараты рассматриваются как наиболее перспективные средства против антибиотикорезистентных субпопуляций патогенных бактерий. Микробиологические исследования подтверждают положительный эффект от включения пробиотиков в комплекс лечебных мероприятий у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Для коррекции дисбиотических состояний слизистых оболочек организма человека, в том числе и ротовой полости, чаще всего используют пробиотики на основе лактобацилл[29]. Этот факт подтверждает то, что именно молочнокислые бактерии играют первостепенную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек ротовой полости.

В связи с этим, целью работы стало изучение роли штаммов лактобацилл в поддержании колонизационной резистентности слизистой оболочки полости рта у пациентов с заболеваниями пародонта.

Задачи исследования:

- 1) Определить микробиоту содержимого пародонтальных карманов больных с пародонтитом бактериологическим методом. Выделить чистые культуры *Lactobacillus* spp. и провести их видовую идентификацию методом масс-спектрометрии.
- 2) Исследовать адгезивную способность выделенных штаммов *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию;
- 3) Определить антагонистические свойства выделенных штаммов *Lactobacillus* spp. к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*;
- 4) Изучить способность выделенных штаммов *Lactobacillus* spp. к образованию биопленок;

5) Анализ полученных данных, оценка перспективности выделенных штаммов *Lactobacillus* spp. для создания пробиотических препаратов.

Научная новизна и теоретическая ценность.

В работе выделены и исследованы штаммы *Lactobacillus* spp. из содержимого пародонтальных карманов больных с пародонтитом легкой и средней степени тяжести, показана роль в колонизационной резистентности полости рта выделенных штаммов *Lactobacillus* spp.

Научно-практическая значимость.

Полученные штаммы *Lactobacillus* spp. обладают высокой адгезионной способностью и антагонистической активностью и могут быть определены как кандидаты для дальнейших исследований и создания эффективных новых пробиотиков при лечении пародонтита, а также в качестве вспомогательных препаратов для повышения эффективности лекарственной терапии и контроля стоматологических заболеваний, вызываемых условно-патогенными и патогенными микроорганизмами.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Условия формирования микробного консорциума ротовой полости

Микрофлора полости рта – своеобразный биотоп, экологическая ниша организма, в которую входит консорциум представителей разных систематических групп микроорганизмов, населяющих ротовую полость и вступающих во взаимоотношения макроорганизмом и друг с другом[4].

Постоянная микрофлора полости рта человека образовалась в результате установления динамического равновесия во взаимоотношениях макроорганизма и микроорганизмов, и разных видов микробов между собой. В полости рта качественный и количественный состав микрофлоры, может колебаться в широких пределах даже в течение одного дня. Причем, после подобных колебаний экосистема быстро восстанавливается, возвращается к своему прежнему равновесию. Существенные нарушения возможны только в результате воздействий, которые заметно снижают защитные функции организма. Нарушение барьерных функций слизистых оболочек, общей реактивности организма могут приводить к прогрессированию патологических процессов, в том числе и дисбактериоза [8].

Микрофлора полости рта делится на аутохтонную (резидентную, постоянную) и аллохтонную (транзиторную, временную). Резидентная включает постоянные виды бактерий, характерные для данного биотопа и возраста макроорганизма; при ее нарушении способна к быстрому самовосстановлению. Аутохтонная делится на облигатную, постоянно обитающую в полости рта, и факультативную, включающую условно-патогенные бактерии [2].

Факультативные виды наблюдаются реже, они наиболее характерны для отдельных заболеваний зубов, пародонта, слизистой

полости рта и губ. Транзиторная микрофлора представлена непатогенными или условно-патогенными микроорганизмами, заселяющими ротовую полость в течение ограниченного периода времени и не вызывающими заболеваний. Но в случае нарушений или гибели резидентной микрофлоры представители транзиторной могут занимать эту свободную нишу биотопа, что приводит в дальнейшем к развитию патологии [16].

Аллохтонная микрофлора включает микробные виды, которые характерны и для других частей тела (кишечника, носоглотки и др.). Условиями для размножения и длительной задержки микроорганизмов в полости рта являются: достаточная влажность, температурный оптимум, нейтральная среда, анатомия макроорганизма, близкая к нейтральной реакция среды [1].

Нормальная микрофлора полости рта:

- 1) Стимулирует развитие лимфоидной ткани.
- 2) Подавляет развитие и рост патогенов за счет синтеза веществ, обладающих антагонистическими свойствами (лизоцим, ацидофилин, бактериоцины), а также за счет более высокого биологического потенциала (короткая lag-фаза, более высокая скорость размножения), снижения pH, конкуренции за источник питания, синтеза спиртов, перекиси водорода, и др.
- 3) Поддерживает физиологическое воспаление в слизистой и повышает готовность к иммунным реакциям.
- 4) Обеспечивает самоочищение полости рта.
- 5) Обеспечивает организм аминокислотами и витаминами, секретирующимися в процессе микробного метаболизма.
- 6) Секретирует продукты жизнедеятельности, стимулирующие секрецию слюнных и слизистых желез.
- 7) Может выступать главными этиологическими агентами при развитии стоматологических заболеваний [9].

Половина резидентной микрофлоры полости рта состоит из стрептококков, другая – из вейлонелл (около 25 %) и дифтероидов (около 25%). Все остальные микроорганизмы полости рта – стафилококки, спирохеты, лактобактерии, фузобактерии, бактериоиды, актиномицеты, нейссерии, микоплазмы, дрожжеподобные грибы, простейшие относятся к второстепенным представителям резидентной микрофлоры и встречаются в гораздо меньшем количестве.

Эти микробные группы вовлекаются в антагонистические или синергические отношения. Стабилизирующей частью микрофлоры ротовой полости являются стрептококки (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis*), вейлонеллы и дифтероиды, астрептококки (*S. mutans*), лактобациллы, бактериоиды, актиномицеты – агрессивны [12].

Количество микроорганизмов в полости рта меняется в течение суток и регулируется продукцией слюны, повышенной в дневное и резко сниженной в ночное время. Факторами, обуславливающими временное или постоянное изменение содержания отдельных представителей микрофлоры, являются антибиотики, диеты, физиологические воздействия, ликвидация всех кариозных поражений зубов и удаление разрушенных, различные соматические заболевания [3].

Зубной налет или зубная бляшка является наиболее сложным и многокомпонентным биотопом, формирующимся на зубной поверхности. Около 90% всей микрофлоры полости рта сосредоточено именно в зубном налете, в котором определяются практически все микробные виды, обитающие в ротовой полости, с преобладанием стрептококков, актиномицетов, лактобацилл. В формировании данного биотопа большую роль играют индивидуальные особенности макроорганизма (образ жизни, диета, профессиональные вредные факторы и др.). Видовой состав отдельных зон полости рта также зависит от окислительно-восстановительного потенциала (ОВП). Спинка языка и слизистая оболочка полости рта – аэробные среды обитания, поэтому в них лучше

поддерживается рост факультативных анаэробов. Десенные карманы и межзубные промежутки имеют отрицательный ОВП, что обуславливает активное размножение здесь облигатных анаэробов [30].

В целом, формирование микробиоценоза ротовой полости является многоступенчатым процессом, зависящим от многих факторов: адгезивной способности микроорганизмов (способности их взаимодействия с разными поверхностями, например, эпителием и эмалью), а также от взаимосвязи метаболизма разных групп микроорганизмов [1].

Адгезия (прилипание) обеспечивает устойчивость микрофлоры к току слюны и последующую их колонизацию поверхности. Это происходит за счет наличия на поверхности микробных клеток адгезинов, на поверхности эпителиоцитов – рецепторов, а также за счет специфичности структуры зубной эмали. У грамотрицательных бактерий в адгезивных процессах дополнительно участвуют пили или фимбрии, тогда как у грамположительных бактерий – липотейхоевые кислоты. Некоторые бактерии, не имея собственных адгезинов, способны закрепляться на поверхности слизистых. При этом они используют адгезины других микробных видов (явление межмикробной коагрегации) [15].

Стрептококки разных видов коагрегируются с *Actinomycetes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* spp., *Haemophilus parainfluenzae* связывается с *Porphyromonas gingivalis*, *Haemophilus parainfluenzae* и *Treponema* spp. [30].

Коагрегация – это типичный пример комменсализма и синергизма, которые возникают между микроорганизмами разных видов. Она обуславливает процесс косвенной адгезии некоторых бактерий на эпителиоцитах и поверхности зубов, поэтому имеет значение в развитии зубных бляшек, способствуя колонизации бактерий, неспособных прилипнуть к поверхности. Другой пример коагрегаций – синтез *S. mutans* внеклеточных полисахаридов из сахарозы. Эти полисахариды также

являются дополнительным адгезивным фактором. Именно они придают стабильность матриксу бляшки [52].

Взаимоотношения в микробном сообществе полости рта могут быть взаимовыгодными или антагонистическими. И в первом, и во втором случаях они направлены на сохранение режима гомеостаза микрофлоры полости рта. Различные виды бактерий могут вступать в метабиотические отношения, когда они кооперируются в использовании субстратов, которые в одиночку не способны метаболизировать. Например, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* синергически гидролизуют казеин. Развитие сложных пищевых цепей также способствует разнообразию стабильности экосистем. В присутствии сахарозы, поступающей с едой, происходит активный рост *S. mutans* и *S. sanguis*, а также лактобактерии. Синтезированные ими и другими анаэробными бактериями молочная и муравьиная кислоты являются источником энергии для вейлонелл. Кориневые бактерии в процессе жизнедеятельности синтезируют витамин К, являющегося важнейшим фактором роста пептострептококков, бактериоидов, вейлонелл и фузобактерий. Дрожжи и дрожжеподобные грибы способны к синтезу витаминов группы В, стимулирующих рост различных представителей полости рта. Использование кислорода факультативными анаэробами снижает концентрацию O_2 и ОВП до уровней, способствующих колонизации слизистых оболочек строгими анаэробами [13].

Нормальный состав микроорганизмов в данной экологической нише поддерживается во многом, благодаря антагонистическим отношениям между микробами. Так, микроаэрофильные стрептококки являются антагонистами фузо- и кориневых бактерий, благодаря продукции кислых метаболитов, перекиси водорода и бактериоцинов [2].

Вейлонеллы способны к утилизации органических кислот. В результате этого процесса резко повышается рН среды, что является причиной сдерживания развития кариесогенной микрофлоры:

стрептококков и лактобактерий. Лептотрихи, бифидо- и лактобактерии, подкисляя среду, могут выступать антагонистами дрожжеподобных грибов, что является причиной снижения синтеза витаминов и угнетения роста многих видов микроорганизмов [23].

1.2 Краткая характеристика основных представителей нормальной микрофлоры полости рта человека

Доминирующее место как по разнообразию видов, обитающих в полости рта, так и по их количеству, занимают бактерии (табл. 1), также в меньшем количестве присутствуют грибы и простейшие. 250–280 видов бактерий, обнаруженных в полости рта, удалось выделить в чистой культуре и изучить их свойства [6].

Таблица 1

Основные группы бактериальной микрофлоры ротовой полости

Тип дыхания	Морфология	Род
Облигатные анаэробы	Грамотрицательные кокки	<i>Veillonella</i>
	Грамположительные кокки	<i>Peptococcus, Peptostreptococcus</i>
	Грамотрицательные палочковидные бактерии	<i>Leptotrichia, Bacteroides, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella</i>
	Грамположительные палочковидные бактерии	<i>Bifidobacterium, Propionibacterium</i>
	Спирохеты	<i>Treponema, Borrellia</i>
Аэробы и факультативные анаэробы	Грамположительные кокки	<i>Staphylococcus, Streptococcus</i>
	Грамотрицательные кокки	<i>Neisseria</i>
	Грамположительные палочковидные бактерии	<i>Corynebacterium, Lactobacillus</i>
	Грамположительные разветвленные формы	<i>Actinomyces</i>
	Спирохеты	<i>Leptospira</i>

С помощью молекулярно-биологических методов исследований (например, таких, как секвенирование 16S рНК) в ротовой полости обнаружено 600–750 видов микроорганизмов. Считается, что соотношение аэробных и анаэробных форм в данном биотопе составляет 10:1. Бактерии с анаэробным типом дыхания составляют около 75% всей бактериальной микрофлоры [5].

Приблизительно 30–60 % от всей микрофлоры полости рта составляют факультативно и облигатно-анаэробные стрептококки (род *Streptococcus*), принадлежащие к семейству *Streptococcaceae* [44].

Стрептококки – бактерии округлой формы. В мазках клетки располагаются в виде коротких цепочек, реже парами (рис. 1). Некоторые представители синтезируют капсулу, не образуют спор, неподвижны. По Граму клетки окрашиваются положительно. По отношению к кислороду – факультативные анаэробы. Требовательны к составу питательных сред. Растут на сложных средах с добавлением сыворотки крови, витаминов, аминокислот. Устойчивы к факторам внешней среды. Являются основными обитателями полости рта (в 1 мл слюны содержится до 10^8 – 10^{11} стрептококков). В ферментативном отношении активны, способны к сбраживанию углеводов с образованием молочной кислоты, которая угнетает развитие гнилостных бактерий, встречающихся в ротовой полости [9].



Рисунок 1. Микроскопическая картина *Streptococcus mitis* (окраска по Граму)

Снижение pH среды в результате накопления кислот, в ротовой полости способствуют развитию кариозного процесса. Не менее важной в развитии патологий зубов и десен является способность стрептококков к синтезу нерастворимых полисахаридов из сахарозы, что способствует формированию зубной бляшки, адгезии на поверхности эмали зуба других видов микроорганизмов, прогрессированию пародонтита [16].

Стрептококки полости рта – это особая экологическая группа. Они получили название «оральных». К ним относятся следующие виды: *S.*

mutans, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* и другие. Оральные стрептококки отличаются способностью к ферментации углеводов и образованию перекиси водорода. На кровяном агаре они формируют колонии, окруженные зеленой зоной α -гемолиза [43].

S. salivarius и *S. mitis* присутствуют в полости рта в 100% случаев. *S. mutans* и *S. sanguis* обнаруживаются в большом количестве на зубах, а *S. salivarius* – на поверхности языка. *S. mutans* и *S. sanguis* высеваются из ротовой полости только после повреждения зубов [20].

Стафилококки (род *Staphylococcus*) – кокки, располагающиеся в мазках в виде скоплений в форме виноградных гроздьев. (рис. 2). Клетки неподвижны. По Граму окрашиваются положительно. Факультативные анаэробы.

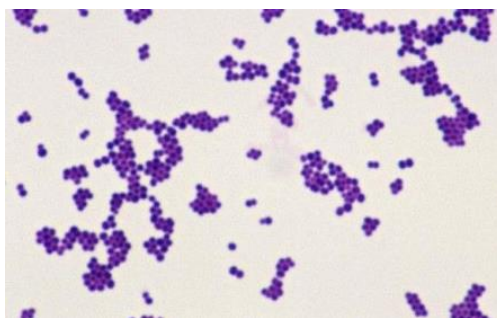


Рисунок 2. Микроскопическая картина бактерий рода *Staphylococcus* (окраска по Граму)

Стафилококки – представители нормальной микрофлоры тела человека. Встречаются в носоглотке, ротоглотке и на коже. Стафилококки в полости рта здорового человека встречаются в среднем в 30 % случаев. В зубном налете и на десне здоровых людей часто встречается *S. epidermidis*, *S. aureus* [18].

Ферментативно активны, поэтому именно играют первостепенную роль в расщеплении остатков пищи в ротовой полости. Патогенные стафилококки (коагулазоположительные) встречаются на слизистой носоглотки и ротовой полости, являясь частой причиной эндогенных инфекций и вызывая различные гнойно-воспалительные процессы полости рта [8].

Пептострептококки (род *Peptostreptococcus*) – кокки, расположенные парами или цепочками. Клетки неподвижны. Являются облигатными анаэробами. Плохо ферментируют углеводы. Растут на сложных питательных средах с добавлением крови. В полости рта встречаются следующие виды: *P. anaerobius*, *P. magnus*, *P. micros*. Пептострептококки вызывают гнойно-воспалительные заболевания различной локализации в ассоциации с другими микробами [31].

Пептококки (род *Peptococcus*) – кокки, расположенные парами, тетрадами, в виде неправильных скоплений или короткими цепочками. Неподвижные. Облигатные анаэробы. Они требовательны к питательным средам, лучше растут в присутствии жирных кислот. Пептококки имеют слабую сахаролитическую активность, расщепляют пептоны и аминокислоты. Чаще всего пептококки встречаются в ассоциациях с фузобактериями и спирохетами при глубоких пульпитах, пародонтите, абсцессах челюстно-лицевого участка. Типичный вид – *Peptococcus niger* [22].

Вейлонеллы (род *Veillonella*) – грамотрицательные кокки, в парах, или реже, поодиночке (рис. 3). Неподвижны. Споры не образуют. Облигатные анаэробы.

Они требовательны к составу питательных сред, лактат в среде заметно улучшает рост. Сбраживают лактат, пируват, ацетат до CO_2 и H_2O , способствуя повышению pH среды. Концентрация вейлонелл, а именно вида *V. parvula*, в слюне примерно такая же, как и зеленящих стрептококков. В полости рта здоровых людей они присутствуют постоянно и в больших количествах (в 1 мл слюны до 10^7 – 10^{11}). Бактерии хорошо ферментируют уксусную, пировиноградную и молочную кислоты до углекислоты и воды и, таким образом, нейтрализуют кислые продукты метаболизма других бактерий, что позволяет их рассматривать как антагонистов кариесогенных бактерий [21].



Рисунок 3. Бактерии рода *Veillonella*

Самостоятельно, как правило, не вызывают развития патологических процессов, но могут входить в состав смешанных групп патогенов. Число их растет при воспалении, при дентогенных абсцессах полости рта [11].

Нейссерии (род *Neisseria*) – грамотрицательные диплококки, расположенные в виде пары кофейных зерен, обращенных вогнутыми поверхностями друг к другу. Неподвижны, спор не образуют. Аэробы. Нейссерии всегда в большом количестве встречаются в полости рта здоровых людей (до 1–3 млн в 1 мл слюны). Они активно редуцируют кислород, снижающий окислительно-восстановительный потенциал среды и создающий условия для развития анаэробной микрофлоры. Различают пигментирующие виды и виды, не образующие пигмент. Последние чаще всего находятся в пульпе и периодонте при остром серозном воспалении и при катаральном воспалении слизистой полости рта [34].

Лактобациллы (род *Lactobacillus*) – грамположительные палочки разной длины. Клетки с закругленными концами, часто собраны в короткие цепочки (рис. 4). Иногда подвижны. Спор и капсулы не образуют. Факультативные анаэробы, микроаэрофилы, реже – облигатные анаэробы [54].

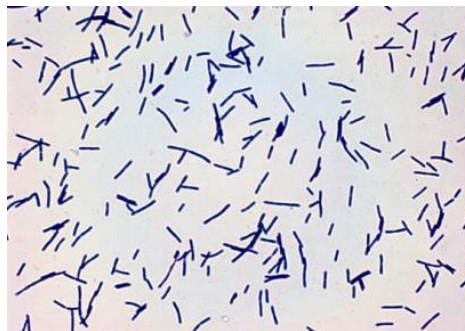


Рисунок 4. Клетки рода *Lactobacillus*(окраска по Граму)

В полости рта чаще всего встречаются *L.acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*. Лактобактерии осуществляют молочнокислое брожение. Учитывая образование большого количества молочной кислоты, они являются антагонистами патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоры, но, с другой стороны, способствуют развитию кариеса. Количество лактобацилл в полости рта при кариесе растет и зависит от величины кариозных поражений. Бактерии способны существовать при низких значениях pH и, синтезируя большое количество кислот, усиливают кариозный процесс. Эти микробы играют решающую роль в деструкции дентина после деформации эмали [1].

Бифидобактерии (род *Bifidobacterium*)– грамположительные полиморфные палочки, обычно немногогнутоугольные или ветвящиеся (часто в форме латинских букв «Y», «X»), нередко с утолщениями на концах (рис. 5). Неподвижные, спор не образуют. Облигатные анаэробы. Сбраживают различные углеводы с образованием органических кислот, а также синтезируют витамины группы B и антимикробные вещества, подавляющие рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Кроме того, они легко связываются с рецепторами эпителиальных клеток и образуют биопленки, тем самым препятствуя колонизации эпителия патогенными бактериями [19].

Пропионибактерии (род *Propionibacterium*) – полиморфные неправильной формы палочки, могут быть кокковидной и немного разветвленной формы. Располагаются в мазках поодиночке, короткими

цепочками или небольшими скоплениями. Грамположительные. Неподвижные. Спор не образуют. Факультативные анаэробы, лучше растут в анаэробных условиях. Бифидо- и пропионибактерии являются активными антагонистами патогенной микрофлоры [49].

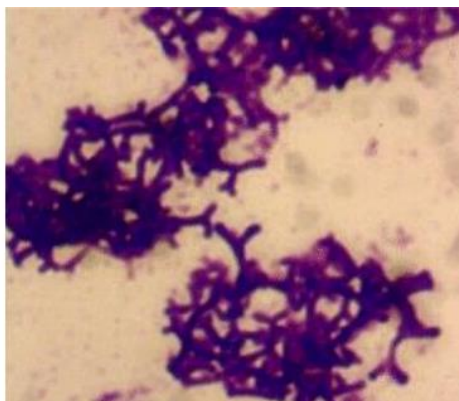


Рисунок 5. Микроскопическая картина рода *Bifidobacterium* (окраска по Граму)

Коринебактерии (род *Corynebacterium*) – прямые или немного изогнутые палочки, иногда с булавовидными концами. Располагаются: поодиночно или в парах, образуя конфигурацию в виде V или стопки из нескольких параллельно расположенных клеток (рис. 6). Грамположительны. Способны к запасанию полифосфатов в виде волютиновых зерен [37].



Рисунок 6. Микроскопическая картина бактерий рода *Corynebacterium*

Коринебактерии почти всегда и в больших количествах встречаются в полости рта здорового человека. Это непатогенные формы.

Их характерной особенностью является способность снижать окислительно-восстановительный потенциал, способствующий росту и размножению анаэробов [7].

Бактероиды (род *Bacteroides*) – палочковидные грамотрицательные полиморфные бактерии, значительно варьируют по размерам. Облигатные анаэробы. Спор не образуют. Возможно образование капсулы. Типичный представитель – *B. fragilis* – встречается в складках слизистой основания зубов, однако более типичен для кишечника. *B. forsythus* – один из пародонтопатогенных видов микробов [3].

Порфиромонады (род *Porphyromonas*) – короткие палочковидные грамотрицательные бактерии. Неподвижны. Облигатные анаэробы, не образующие спор. На кровяном агаре образуют темно-пигментированные колонии. Наиболее часто выделяются *P. asaccharolytica* (типичный вид), *P. endodontalis* и *P. gingivalis*. Их количество увеличивается при разных гнойно-воспалительных процессах полости рта – в зубных гранулемах, при остеомиелите и актиномикозе челюстей [24].

Превотеллы (род *Prevotella*) – грамотрицательные полиморфные палочки. Неподвижные. Строгие анаэробы, не образующие спор. Возможно образование некоторыми штаммами черного пигмента. В полости рта чаще встречаются *P. melaninogenica* (типичный вид), *P. buccae*, *P. denticola*, *P. oralis*, *P. oris*. Превотеллы, как правило, выделяются из десенных карманов. Принимают участие в возникновении одонтогенных инфекций в полости рта и развитии заболеваний пародонта [42].

Фузобактерии (род *Fusobacterium*) – грамотрицательные полиморфные бактерии. Имеют форму тонких веретеновидных палочек или полиморфных палочек разной длины с заостренными концами. Клетки неподвижны. Спор не образуют. Строгие анаэробы. Постоянно присутствуют в полости рта (в 1 мл слюны их несколько десятков тысяч). В смешанных культурах со спирохетами, вибрионами, анаэробными кокками их патогенность резко увеличивается. При

патологических процессах различной локализации количество их резко возрастает.

Фузобактерии присутствуют в кариозном дентине и в десенных карманах при пародонтите. Основные поражения у человека вызывают *F. nucleatum* и *F. necrophorum* [25].

Лептотрихи (род *Leptotrichia*) – имеют вид длинных нитей разной толщины с заостренными или раздутыми концами, дающими густые сплетения. Клетки располагаются попарно в виде зернистых палочек (рис. 7).



Рисунок 7. Клетки *L. buccalis* в фиксированном и окрашенном по Граму мазке

Клетки неподвижны, не способны к образованию спор и капсул. Строгие анаэробы. Утилизируют глюкозу, как единственный источник углерода и энергии, с образованием большого количества молочной кислоты, что приводит к повышению кислотности среды до 4,5.

L. buccalis присутствуют в полости рта постоянно (чаще у шейки зубов) в большом количестве (в 1 мл слюны 10^3 - 10^4). При заболеваниях пародонта их количество в ротовой полости. *L. buccalis* выполняет роль центров формирования зубного налета и зубного камня, а также вместе с лактобактериями участвует в процессах деминерализации тканей зубов [39].

Актиномицеты (род *Actinomyces*) – палочковидные или нитевидные ветвящиеся бактериальные формы. По Граму окрашиваются положительно. Делятся фрагментарно, образуя тонкие прямые, немного изогнутые палочки, часто с утолщениями на концах. В мазках

располагаются поодиночно, парами, в виде букв «V, Y», или скоплений, напоминающих частокол (рис. 8). Неподвижны. Строгие или факультативные анаэробы [13].

Почти всегда они присутствуют в полости рта здорового человека (*A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus*). Могут участвовать в развитии кариеса, заболеваний пародонта. При понижении сопротивляемости макроорганизма возможно развитие актиномикозов – заболеваний, протекающих в виде хронического гнойного воспаления с развитием гранул, абсцессов и свищей [53].

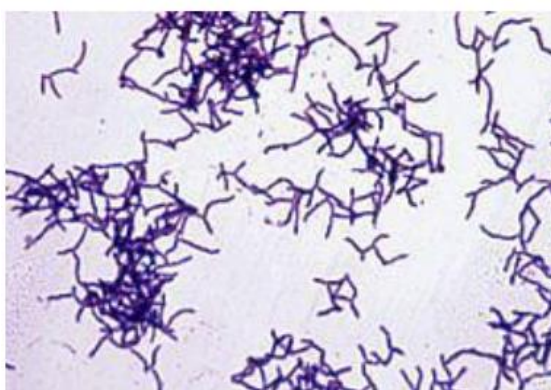


Рисунок 8. Микроскопическая картина *A. israelii* (окраска по Граму)

Спирохеты (семейство *Spirochaetaceae*) – появляются в ротовой полости с момента появления молочных зубов у ребенка. С того момента, полость рта – их естественная среда обитания. Их относят к трем родам: *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*. Клетки всех родов подвижны за счет микрофибрилл, обвивающих клетку. Род *Borrelia* представлен в полости рта следующими видами: *B. buccalis*, *B. vincentii*. Боррелии – толстые извитые короткие нити с 2–6 несимметричными витками (рис. 9).



Рисунок 9. Клетки рода *Borrelia* при темнопольной микроскопии

Неспорообразующие и несинтезирующие капсул формы. По Романовскому-Гимзе окрашиваются в сине-фиолетовый цвет. Облигатные анаэробы. Обнаруживаются в складках слизистой и десенных карманах [6].

Трепонемы (род *Treponema*). Клетки имеют форму тонких нитей, с 8–14 равномерными завитками (рис. 10). По отношению к кислороду являются облигатными анаэробами. По Романовскому-Гимзе окрашиваются в слабо-розовый цвет. Из полости рта выделяются *T. orale*, *T. macrodentium*, *T. denticola* [41].

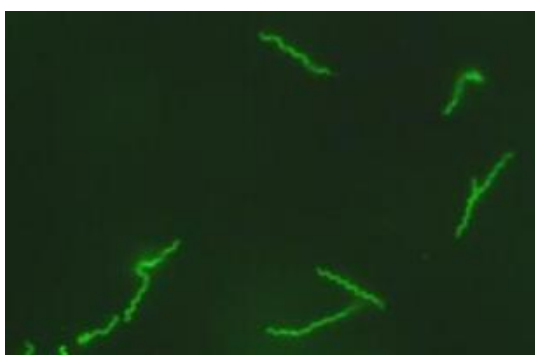


Рисунок 10. Клетки *T. denticola* при иммунофлюоресцентной микроскопии

Лептоспиры (*Leptospiradentium*) представлены извитыми формами, спираль состоит из 15–30 мелких завитков. Концы клеток изогнуты в виде букв С или S (рис. 11). Это бескапсульные неспорообразующие аэробные формы. По Романовскому-Гимзе окрашиваются в розовый цвет [4].

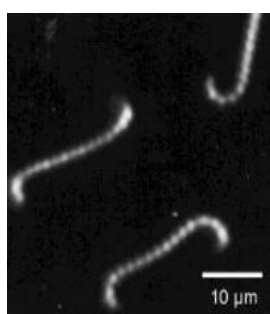


Рисунок 11. Клетки *Leptospiradentium* при темнопольной микроскопии

Размножение спирохет в ротовой полости происходит на фоне активного роста других анаэробов. Развитие спирохет приводит к

интенсификации патологических процессов в полости рта. Спирохеты часто выделяются при язвенно-некротических поражениях слизистой оболочки (при язвенном стоматите, ангине Венсана), в патологических десневых карманах, при тяжелых формах пародонтита [51].

Микоплазмы (род *Mycoplasma*) представлены мелкими бактериями. Они не имеют имеющиеся клеточной стенки. Их клетки окружены цитоплазматической мембраной, которая содержит большое количество стиролов. В связи с этим, клетки могут иметь различную форму: в виде колбочек, нитей, кокков. По отношению к кислороду микоплазмы – факультативные анаэробы. Могут делиться фрагментацией нитей, почкованием, бинарным делением. В полости рта преобладают виды: *Mycoplasma orale* и *Mycoplasma salivarium*. Они играют большую роль в развитии заболеваний пародонта [38].

В полости рта здоровых людей среди грибковой микрофлоры наиболее часто (в 40-50% случаев) встречаются дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Они представлены овальными или удлинёнными клетками, на полюсах которых формируются почки, единичные или множественные (рис. 12).

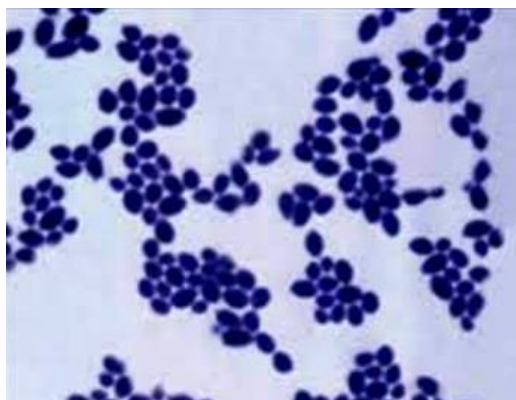


Рисунок 12. Клетки *Candida albicans* при микроскопии (метод простоокраски)

Патогенные свойства наиболее выражены у *C. albicans*. Кроме этого вида часто выделяются и *C. tropicalis*. Оба вида при иммунодефицитных состояниях или на фоне длительного приема антибиотиков, приводящего к дисбактериозу, способны вызвать кандидоз.

Заболевание клинически проявляется в виде местного поражения полости рта или генерализованного кандидоза с множественными поражениями внутренних органов человека [10].

У 50% здоровых людей в полости рта могут вегетировать *Entamoebagingivalis*, *Trichomonaselongata* (*T. tenax*), которые активно размножаются при несоблюдении гигиены полости рта. Выявляются преимущественно в криптах миндалин, зубном налете, в гнойном содержимом пародонтальных карманов. В высоких концентрациях обнаруживаются при гингивите и пародонтите [27].

1.3. Микробиологические и иммунопатогенетические основы развития пародонтита. Механизм и этапы формирования зубных бляшек

По данным ВОЗ, заболевания пародонта наблюдаются практически у каждого взрослого человека и характерны для 80% детей. Наиболее часто встречается пародонтит. Это воспалительное заболевание тканей пародонта, которое характеризуется прогрессивной деструкцией кости и периодонта (рис. 13).



Рисунок 13. Общий вид десен при пародонтите

Главным механизмом в возникновении пародонтита является образование зубной бляшки – скопления бактерий в матриксе органических веществ, преимущественно полисахаридной и белковой природы, на поверхности зубов. По сути, это результат изменений в структуре зубного налета: исчезает его пористость из-за чрезмерного накопления в нем минеральных солей и продуктов микробного

метаболизма. Так, формируется зубная бляшка, которую можно удалить лишь механическим путем [2].

Таким образом, выделяют следующие этапы формирования зубного налета и бляшки: в начале происходят процессы осаждения гликопротеинов слюны, т.е. формирование пелликулы на поверхности зуба, на которой чуть позже специфически адгезируются бактериальные клетки. Формирующиеся микроколонии продуцируют внеклеточные гликаны, которые способствуют еще большей фиксации бактерий на поверхности зубной эмали. Известно, что дополнительными факторами адгезии являются антитела (классов А и G), которые вызывают агглютинацию бактерий [32].

Процесс образования зубных бляшек начинается с формирования пелликулы. Ее главными составляющими являются компоненты слюны и десенной жидкости – альбумины, лизоцим, лактоферрин, липиды, иммуноглобулины. В этот период бактерии с пленкой связаны слабо, поэтому могут быстро десорбироваться с ее поверхности. Этому процессу способствует омывание поверхности зуба потоком слюны. Если первичная колонизация произошла, то прикрепленные бактериальные виды начинают быстро расти и размножаться, формируя микроколонии, проникающие во внеклеточный матрикс. Компоненты слюны еще больше закрепляют бактерии во внеклеточном матриксе. Таким образом, бактерии сначала заполняют всю пористость эмали, а затем фиксируются на гладкой поверхности зуба. Некоторые бактерии не способны прикрепляться непосредственно к эмали, но способны к адгезии на поверхности клеток других, уже ранее адсорбированных микроорганизмов. Это явление носит название коагрегационного процесса. Скорость адгезии на начальном этапе очень высока. Так, уже через 5 мин количество бактерий возрастает с 10^3 до 10^6 кл/см². Затем, после некоторого снижения скорости адгезии, их количество за сутки достигает значения 10^7 - 10^8 [9].

Что касается видового состава, то первыми бактериями,

прикрепившимися к зубной эмали, являются стрептококки – *S. mutans* и *S. sanguis*, а также вейлонеллы, дифтероиды и нейссерии. После этой сформировавшейся «первичной» бляшки, происходит образование динамической (4-5 дней). Соотношение микробных видов сдвигается в сторону преобладания грамотрицательных палочек (фузобактерий, лептотрихий). Через 6-7 дней зубная бляшка уже считается полностью сформированной. Она называется «зрелой». Преобладающее большинство в ней – анаэробные палочки. Таким образом, аэробная микрофлора в формирующейся бляшке сменяется анаэробной [28].

Бляшки могут быть поддесневыми и наддесневыми. Именно формирование поддесневых бляшек лежит в основе развития пародонтальных патологических процессов. Микрофлора бляшек на зубах нижней и верхней челюстей отличается по видовому составу. Если в бляшках на нижнечелюстных зубах преобладают вейлонеллы и извитые бактерии, то верхнечелюстных – лактобациллы и стрептококки. Актиномицеты же в равной степени колонизируют бляшки на зубах обеих челюстей. Такая диспропорция в количественном и качественном соотношении определяется значениями pH среды [40].

В литературе зубную бляшку отождествляют с понятием «био пленки» – организованного микробного сообщества, которое сформировано в условиях жидкой среды. Ее основными свойствами являются: симбиотические взаимоотношения между микроорганизмами; образование микроколоний, окруженных защитным матриксом с каналами, через которые происходит обмен веществами микробной группы с окружающей средой; синтез аутоиндукторов микробными клетками, саморегулирующих образованное сообщество; устойчивость микробных видов к антибиотикам, дезинфектантам, иммунологическим факторам организма хозяина. Считается, что такая устойчивость обусловлена наличием матрикса, служащего защитой всей системы [19].

1.4. Изменения состава микрофлоры ротовой полости при пародонтите

В норме микроорганизмы пародонта образуют слой толщиной от 1 до 20 клеток. Исследование в области десенного желобка показало, что там формируется довольно тонкий слой в 60 нм, который состоит на $\frac{3}{4}$ из кокковой грамположительной микрофлоры. Вместе с палочковидными формами они составляют 90% от всей биопленки. Остальные 10% представлены извитыми бактериями [10].

В десневых желобках бляшки формируют грамположительные факультативные анаэробные кокки (стрептококки, в меньшей степени, стафилококки, пептострептококки) и палочки (актиномицеты: *A. israelii*, *naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus*, а также пропионибактерии) [7].

Патогенез воспалительных заболеваний пародонта обусловлен двумя взаимосвязанными патогенетическими механизмами: развитием анаэробной микрофлоры и иммунологической реактивностью человеческого организма. Пародонтопатогенные виды бактерий отличает от других: высокая степень адгезии, инвазии и токсические свойства в отношении тканей пародонта. К ним относятся:

1) грамотрицательные анаэробные бактерии группы бактероидов (*Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*), реже – спирохеты и фузобактерии.

2) грамположительные анаэробные бактерии группы актиномицетов, реже – пептострептококки [8].

Для пародонтопатогенных микроорганизмов характерен широкий спектр факторов патогенности, что сказывается на течении и длительности воспалительного процесса:

- факторы адгезии, проявляющиеся в способности адсорбироваться на поверхности эпителиальных клеток. Они могут

частично ингибироваться в присутствии сыворотки крови и слюны, но остаются активными в отношении явления коагрегации;

- факторы инвазии – способность к синтезу ферментов: коллагеназы, ДНК-азы, РНК-азы, протеазы, гиалуронидазы;

- токсины: эндотоксины, синтезируемые клетками грамотрицательных бактерий, а также цитотоксины, которые оказывают негативное влияние на ткани пародонта; специфические липополисахариды, приводящие к разрушению костной ткани;

- протективные свойства – способность противостоять защитным силам макроорганизма. Данный фактор патогенности обусловлен наличием полисахаридной капсулы и ферментами, расщепляющими антитела и фракции комплемента [50].

При пародонтите отмечают смещение в сторону извитых и палочковидных форм бактерий (их количество растет до 40%). Соотношение подвижных и неподвижных форм увеличивается до 1:1, тогда как в норме данный показатель составляет 1:49. При этом на поверхности эмали локализованы грамположительные бактерии, тогда как грамотрицательные сосредоточены в неплотных слоях подвесной бляшки, ближе к верхушке кармана [26].

При пародонтите часто отмечают активное развитие грамотрицательных анаэробных палочек: *P.gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *F.nucleatum* др. У некоторых пациентов превалируют актиномицеты [1].

Кроме микробного фактора в патогенезе пародонтита не менее важная роль отводится и иммунопатологическому. В целом же пародонтит начинает активно развиваться при условии комплексного действия этих факторов, а именно:

- 1) присутствия пародонтопатогенных видов бактерий в нужном количестве для запуска патологического процесса;

2) создания условий существования штаммов в данном биотопе (достаточное количество субстрата, ростовых факторов, низкий ОВП);

3) отсутствия микробов-антагонистов пародонтопатогенных микробов.

4) наличия чувствительности организма хозяина к продуктам микробного метаболизма.

5) развития иммунопатологических реакций [26].

Иммунопатогенез при пародонтите условно делят на две фазы: обратимую и необратимую. Первая связана с нормальным иммунным ответом со стороны местных тканей и обусловлена размножением в десенных карманах и зубных бляшках грамотрицательных бактерий. Ферменты, синтезирующиеся бактериями, разрыхляют краевой эпителий десен, в норме непроницаемый для бактерий, и, таким образом, создаются условия для проникновения эндотоксинов в соединительную ткань. Антигены бактериальных клеток, продукты их метаболизма и продукты обмена зубной бляшки способствуют усиленной миграции макрофагов и сегментоядерных лейкоцитов в краевой эпителий. По мере накопления иммуноглобулинов М и G, они образуют иммунные комплексы с персистирующими антигенами микробной природы, что способствует очищению от них ротовой слизи. Захват и деградацию иммунных комплексов и продуктов их распада осуществляют фагоциты, активированные лимфокинами, которые мигрируют в очаг воспаления [50].

Данная фаза сопровождается признаками местного воспаления. Правильное и своевременное лечение на данном этапе предотвращает дальнейшее массивное поступление антигенов и уменьшает воспаление десен. В противном случае, процесс усугубляется, поступление микробных антигенов не прекращается, а активированные защитные механизмы приводят к тканевой деструкции [29].

Хронизация воспалительного процесса приводит к набуханию эпителия, он начинает терять связь с твердой тканью, что приводит к формированию патологического десенного кармана, служащего входными воротами для вторичной гнойной инфекции. Данная фаза уже является необратимой. Она связана с сенсibilизацией Т-лимфоцитов аутоантигенами, которые образуются при деструкции пародонта. Первостепенную роль в этом процессе играют микробные эндотоксины, усиливающие сенсibilизацию Т-лимфоцитов и поликлональную активацию В-лимфоцитов. Дальнейший прогресс приводит к течению пародонтита с атрофией остеоцитов и альвеолярных отростков челюсти [13].

Понимание этиологии и патогенеза пародонтита необходимо не только для установления микробной роли в этом процессе, но и для выяснения условий, способствующих росту бляшки, определения роли местных и системных факторов, влияющих на резистентность или чувствительность тканей пародонта к бактериям, продуктам их жизнедеятельности, и значению индивидуальных особенностей организма хозяина в функционировании деструктивных и защитных механизмов [10].

Колонизационной резистентностью называют комплекс защитных механизмов того или иного биотопа или экологической ниши от условно-патогенной и патогенной микрофлоры, который возникает в результате тесного взаимодействия микроорганизмов-комменсалов и макроорганизма.

Оральная микробиота, являющаяся вторым после кишечной по многочисленности и разнообразию составляющих ее видов колонизирующим организм человека микробным сообществом, формируется в результате мутуалистической эволюции с организмом-хозяином и особыми физиологическими условиями полости рта. В эволюционной компенсации организм-хозяин предоставляет комменсальным бактериям стабильную экологическую нишу, в то время как микробиота полости рта локально поддерживает здоровое

состояние хозяина путем формирования симбиотических биопленок, внутри которых различные виды бактерий связаны между собой физическими и метаболическими взаимоотношениями, дающими устойчивость к внешним изменениям среды и преимущество выживаемости для всего микробного сообщества. Микробные ассоциации полости рта уравнивают уровни кислотности ротовой полости и подавляют рост патогенных микроорганизмов, тем самым систематически обеспечивая поддержание гомеостаза. Однако при переходе микробной биопленки в дисбиотическое состояние, нарушающее гомеостатическое равновесие с организмом хозяина, микробиота полости рта может способствовать развитию патологических процессов воспалительных и деструктивных заболеваний пародонта [32].

Микробиота полости рта формируется набором различных по видовому составу микробных сообществ, отражающих множество разнообразных микроокружений, состав которых, однако, организм селективное давление, реализуемое за счет специализированных метаболических механизмов в полости рта, и регуляции адгезии к определенным субстратам. Состав микробиоты полости рта контролируется также слюнным секреторным иммуноглобулином А (SIgA), способствующим агрегации и последующему уничтожению потенциально патогенных бактерий; SIgA, выстроенным в пелликулы зубов и покрывающие эпителий полости рта муциновые слои и обеспечивающим места прикрепления для полезных микроорганизмов; а также антимикробными пептидами, такими как лизоцим и лактоферрин [23].

Таким образом, система колонизационной резистентности полости рта представлена:

- микроэкологичными нишами (биотопами) – зубной бляшкой (налетом, биофильмом), поверхностями участков слизистой оболочки (языка, губ,

подъязычного участка, неба, миндалин); слюной; биотопами десенных борозд, выводных протоков слюнных желез;

- микрофлорой каждого биотопа, с особенностями качественного и количественного состава;
- механизмами активности бактерий нормальной микрофлоры (симбионтов);
- механизмами неспецифической резистентности СОПР.

На колонизационную резистентность полости рта влияют такие факторы:

- строение СОПР;
- доступ кислорода минимальная (в десенных карманах, максимальная – на слизистой оболочке губ);
- способность эпителия полости рта к десквамации и апоптозу;
- физические свойства (температура, кислотность, баланс про- и антиоксидантных систем);
- экскреторная функция больших и малых слюнных желез, свойства слюны;
- состояние и функциональная активность местного иммунитета;
- характер микроэкологии биотопов, которые контактируют с полостью рта (кожи окolorотового участка, миндалин, ротоглотки);
- наличие очагов хронической инфекции в полости рта (кариозных полостей, пародонтальных карманов, сиалоаденита и др.);
- состав пищи и напитков;
- качество гигиены;
- привычки (в т.ч. и курение);
- состояние общего иммунитета;
- наличие и отсутствие хронических общесоматических заболеваний;
- свойства микроорганизмов (симбиотические, конкурентные, антагонистические, способность к адгезии и колонизации) [29].

К основным направлениям коррекции колонизационной резистентности относятся:

- 1) Контроль за количеством микрофлоры различных биотопов полости рта путем соблюдения правил гигиены: выбор врачом-стоматологом или зубным гигиенистом средств для гигиенического ухода за полостью рта (зубной щетки, ополаскивателя, специальных средств); уход за полостью рта в особых условиях (при врожденных заболеваниях, травмах, оперативных вмешательствах, дентальной имплантации, при использовании ортопедических и ортодонтических конструкций).
- 2) Уменьшение влияния очагов инфекции (стоматогенной, одонтогенной, пародонтогенной, тонзиллогенной и др.).
- 3) Восстановление нормальной микрофлоры и поддержание ее нормального функционирования путем использования антисептиков, пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков, иммуномодуляторов бактериального происхождения.
- 4) Восстановление и поддержание нормальной функции иммунной системы слизистых оболочек: специфическая иммуномодуляция с применением иммуномодуляторов бактериального происхождения; замещение функции путем использования препаратов, которые содержат факторы неспецифического иммунитета; нормализация показателей общего иммунитета путем использования иммуномодуляторов [14].

ГЛАВА II. Материалы и методы исследования

2.1 Объект исследования и условия проведения эксперимента

Для достижения поставленной в работе цели и выполнения соответствующих задач нами было проведено лабораторное обследование 45 пациентов стоматологического профиля с диагнозом пародонтит легкой и средней степени тяжести в возрасте от 18 до 60 лет.

Для проведения бактериологического посева забор содержимого пародонтальных карманов пациентов также производился стерильными бумажными конусными эндодонтическими абсорбентами Absorbent Paper Points фирмы METABIOMED (размер №25 по ISO), вводимым стерильным пинцетом в наиболее глубокие участки пародонтальных карманов на 15 секунд. С обеспечением минимального контакта с атмосферным воздухом, эндодонтические штифты немедленно помещались в стерильные герметичные пластиковые пробирки типа Eppendorf 1,5 мл объема с тиогликолевой средой. Транспортировка биологического материала в бактериологическую лабораторию осуществлялась в термобоксе. Для выделения чистых культур лактобактерий материал высевали на среду MRS агар (HiMedia, India) следующего состава: пептон – 10.0; дрожжевой экстракт – 20.0; глюкоза – 20.0; твин-80 – 1.0; дикалия гидрофосфат – 2.0; натрия ацетат – 5.0; триаммония цитрат – 2.0; магния сульфат – 0.2; марганца сульфат ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) – 0.05; мясная вода – до 1 л; pH 6.2.

В результате бактериоскопического и бактериологического исследования выделено 9 штаммов лактобактерий, которых далее проводили их идентификацию до вида с помощью метода масс-спектрометрии (по принципу MALDI-TOFF), а также изучали их биологические свойства: способность к формированию биопленок, адгезию к буккальному эпителию и антагонистические свойства в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

2.2 Идентификация выделенных штаммов лактобактерий методом масс-спектрометрии

Идентификацию выделенных штаммов лактобактерий осуществляли методом масс-спектрометрии с использованием VITEK® MS – автоматической системы идентификации микроорганизмов, в основе работы которой лежит технология MALDI-TOF (время пролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация).

Метод проводили в два этапа. Первый из них включал подготовку образцов к анализу. С этой целью бактериальную массу, полученную из колонии чистой культуры, помещали на подложку масс-спектрометра и смешивали со специальной матрицей. В качестве матрицы использовалась α -циано-4-гидроксикоричная кислота. После этого переходили ко второму этапу анализа, т. е. непосредственно к идентификации. Подготовленный образец помещали в прибор, который был оснащен модифицированным твердотельным лазером. Образец подвергался действию наносекундных лазерных импульсов. Под этим воздействием молекулы матрицы и образца (белковая фракция) переходили в газовую фазу, при этом протонированные молекулы матрицы взаимодействовали с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки двигались от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивало время пролета частиц и преобразовывало эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Полученный масс-спектр автоматически сравнивался с спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходила идентификация микроорганизмов. Внешняя калибровка проводилась с помощью бактериального тест-стандарта. О достоверности идентификации судили по значению коэффициента совпадения: до вида – 2.000-3.000; до рода – 1.999-1.700; менее 1.699 – идентификация не прошла.

2.3. Анализ биопленок, формируемых на инертных поверхностях

Способность выделенных штаммов лактобацилл к биопленкообразованию изучали в лунках полистиролового 48-луночного планшета («SARSTEDT») (рис. 14).

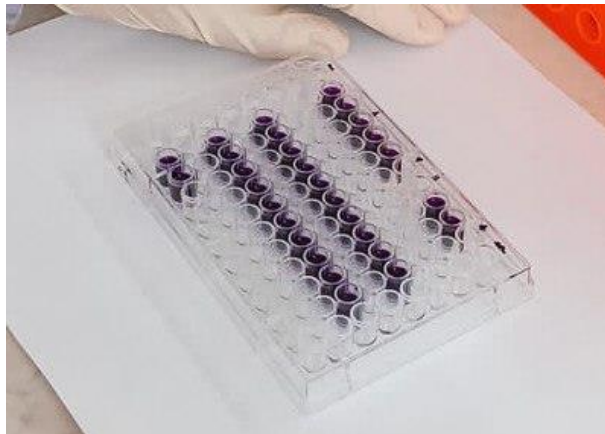


Рисунок 14. Изучение способности лактобацилл к образованию биопленок

Суспензии суточных культур *Lactobacillus* spp., выращенные на MRS, доводили до титра 10^7 КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 300 мкл полученной бактериальной суспензии. Планшет накрывали крышкой, заворачивали плёнкой Parafilm («Amcor», США) и инкубировали 3сут., 1 нед. и 2 нед. при 37°C. После инкубации для количественного определения интенсивности образования биопленок использовался метод окрашивания генцианомфиолетовым (кристаллическим фиолетовым) («Агат-Мед», Россия). После удаления содержимого и промывки всех лунок, адгезированные бактерии фиксировались и окрашивались. Избыток красителя отмывали водопроводной водой. Краситель, связанный с адгезированными клетками, элюировали этанолом. Результаты учитывали спектрофотометрически с использованием прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader («PerkinElmer», США).

2.4. Исследование адгезивной способности штаммов

Lactobacillus spp. к буккальному эпителию

Способность исследуемых штаммов лактобацилл к адгезии изучали на клетках буккального эпителия человека по Бойцову А.Г. и др. (2004). Штаммы выращивали в течение суток на агаризованной MRS-среде, смывали фосфатно-солевым буфером следующего состава (г/100 мл): NaCl – 0,85; Na₂HPO₄ – 1,42 (pH 7,2) и центрифугировали в течение 5 мин при 6000 об./мин. Полученную биомассу ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и получали бактериальную суспензию, которая содержала $1,0 \times 10^9$ клеток/мл.

Забор материала (буккального эпителия) осуществляли путем соскоба эпителия с внутренней стороны щеки пациента. Перед началом исследования эпителиальные клетки отмывали трехкратным центрифугированием в течение 5 мин при 1000 об./мин. Далее после отмывки из осадка готовили контрольные мазки: на поверхность предметного стекла наносили каплю осадка и распределяли по стеклу в диск диаметром около 1,5 см. После приготовления мазков их фиксировали и окрашивали водным раствором метиленового синего. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Полученные взвеси бактериальных и эпителиальных клеток смешивали в равных объемах в микропробирке и инкубировали при 37⁰С в течение 60 мин. После окончания экспозиции клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и осаждали при 6000 об./мин, с целью освобождения эпителиоцитов от неприкрепленных бактериальных клеток.

Из осадка клеток готовили мазки, окрашивали метиленовым синим и подсчитывали количество бактерий, которые адгезировались на поверхности эпителиоцитов. Определяли средний показатель адгезии (СПА), а именно – среднее количество бактерий, прикрепившихся к одной эпителиальной клетке. Подсчет адгезированных бактериальных клеток проводили не менее, чем на 5 эпителиоцитах. Также устанавливали

коэффициент участия эпителиальных клеток в адгезивном процессе: К – процент клеток, которые имеют на своей поверхности адгезированные микроорганизмы, и рассчитывали индекс адгезии микроорганизма по формуле: $ИАМ = (СПА \times 100) / К$. Микроорганизмы считались неадгезивными при $ИАМ \leq 1,75$; низкоадгезивными – при показателях 1,76-2,50; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,00 и высокоадгезивными при $ИАМ \geq 4,00$.

2.5. Определение антагонистических свойств *Lactobacillus* spp. к *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Антагонистическую активность лактобактерий можно определить одним из известных диффузионных методов, к которым относят методы перпендикулярных штрихов, блоков и лунок, которые основаны на диффузии активных метаболитов молочнокислых бактерий, таких как органические кислоты, бактериоцины и антибиотики в толщу агаризованной среды и угнетении роста чувствительных к этим веществам тест-культур. В качестве тест-культур использованы два референсных штамма *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Из литературных данных известно, что оба метода являются взаимозаменяемыми. Но, исходя из того, что лактобактерии не способны расти на МПА, как другие микроорганизмы, а имеют сложные питательные потребности, то в данном случае лучше и удобнее использовать метод агаровых блоков.

При использовании метода блоков испытываемую культуру лактобактерий высевали глубинным способом в среду МРС в чашке Петри и инкубировали в оптимальных, строго соблюдаемых, условиях для образования и накопления в агаре ингибиторных соединений. Затем стерильным пробочным сверлом вырезали агаровый диск (блок) с выросшей культурой лактобактерий и устанавливали его в другой чашке Петри на поверхности агаризованной элективной среды, только что засеянной культурой тест-штамма. В качестве элективных сред

использовали среду Чистовича – для *S. aureus* среду Кинг А – для *P. aeruginosa*. Чашки с посевами выдерживали в течение определенного времени в холодильнике для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара с тест-штаммом, а затем инкубировали в определенных условиях, оптимальных для тест-штамма. О степени антагонистической активности испытуемой лактобактерии судили по величине зоны ингибирования роста тест-штамма вокруг агарового блока.

Преимуществом метода блоков является то, что он позволяет использовать разные по составу питательные среды: одну (блок) – для испытуемого штамма лактобактерий, другую – для использования данного тест-штамма.

2.6 Использование методов статистического анализа

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из n чисел повторностей (где $n \geq 10$) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения t -критерия находили для 95% уровня значимости.

Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Результаты бактериологического посева содержимого пародонтальных карманов пациентов

По результатам бактериологического исследования на колумбийским агаре с 5% бараньей кровью, желточно-солевым агаре Чистовича, среде Сабуро и дифференциально-диагностической среде Эндо на третьи сутки культивирования из содержимого пародонтальных карманов обследуемых пациентов были выделены представители нормальной микрофлоры слизистой оболочки ротовой полости человека *Candidaalbicansi* непатогенные виды *N.mucosa*, *N.flava*, *N.perflava* в количестве, не превышающем нормальных показателей (10^2 - 10^3 КОЕ/мл). Тем не менее, следует отметить, что выделение *Neisseriaspp.* из содержимого пародонтальных карманов свидетельствует об остром серозном воспалении, протекающим с вовлечением тканей периодонта.

В количестве 10^2 - 10^5 КОЕ/мл были выделены *Streptococcusspp.* видов *S.mitis*, *S.oralis*, *S.sanguinis* и *S.gordonii*, относящиеся к «желтому» комплексу пародонтальных микроорганизмов и обладающие наименьшим патогенным потенциалом. Имея высокое сродство к молекулам находящейся на поверхности зубов слюнной пленки, данные виды микроорганизмов способны быстро колонизировать чистые поверхности зубов, выступая первичными колонизаторами пародонтальной среды и в совокупности составляя высокий процент (до 70%) бактериальной биопленки поверхности зубов (зубной налет). Данное сочетание микроорганизмов образует субстрат прикрепления для более поздних колонизаторов поверхности зубов и способно модулировать патогенность основных возбудителей заболеваний пародонта через механизмы межвидовой коммуникации.

Среди представителей непостоянной микрофлоры полости рта, встречающихся довольно редко и не у всех обследуемых (3 пациента),

были обнаружены виды энтеробактерий *Escherichiacoli* и *Serratia liquefaciens* в количестве 10^3 КОЕ/мл, которых в нормальном состоянии в составе микрофлоры ротовой полости быть не должно, что, предположительно, обусловлено нарушением физиологического состояния полости рта, так как представители непостоянной (транзиторной) флоры задерживаются в ней, размножаясь и вызывая патологические процессы.

Из образцов биологического материала трех пациентов с пародонтитом средней степени тяжести в количестве 10^2 КОЕ/мл были выделены такие условно-патогенные микроорганизмы как *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus parainfluenzae*. В литературных источниках отмечена способность гемофильной палочки к коагрегации с представителями рода *Treponema* spp., что обуславливает непрямую адгезию данных бактерий, не имеющих собственных факторов прикрепления, на эпителиоцитах и зубных поверхностях и обеспечивает колонизацию пелликулы, способствуя тем самым развитию зубной бляшки. В 9 образцах на MRS агаре были получены колонии *Lactobacillus* spp.

3.2. Идентификация выделенных штаммов *Lactobacillus* spp.

Выделенные штаммы лактобактерий при микроскопии были представлены двумя морфологическими типами: первый (изоляты 1, 4, 6, 7) был представлен прямыми полиморфными короткими палочками, которые в мазках располагались преимущественно в скоплениях неправильной формы (рис. 15а), второй (изоляты 2, 3, 5, 8, 9) – длинными прямыми палочками, располагающимися в мазках одиночно, парами или с тенденцией к образованию коротких цепочек (рис. 15б). По Граму окрашивались положительно. Культуры не образовывали спор и капсул, были каталазоотрицательными. У них отсутствовала способность к восстановлению нитратов.

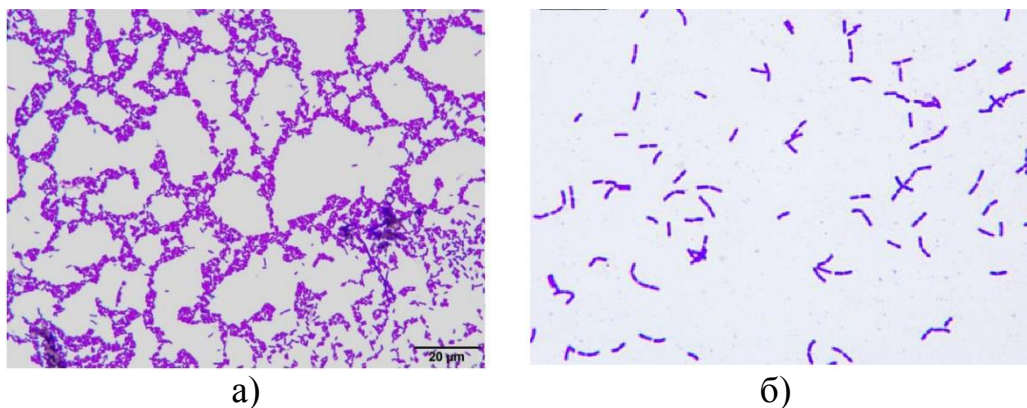


Рисунок 15. Особенности морфологии и тинкториальные свойства выделенных изолятов молочнокислых бактерий: а) и б) – два морфологических типа культур лактобактерий

При росте на MRS-среде исследуемые изоляты первого морфологического типа формировали мелкие сероватые звездчатые плоские колонии диаметром до 5 мм, а второго – слегка выпуклые непрозрачные колонии молочного цвета с глянцевой гладкой поверхностью и ровным краем, в диаметре 2-3 мм (рис. 16).

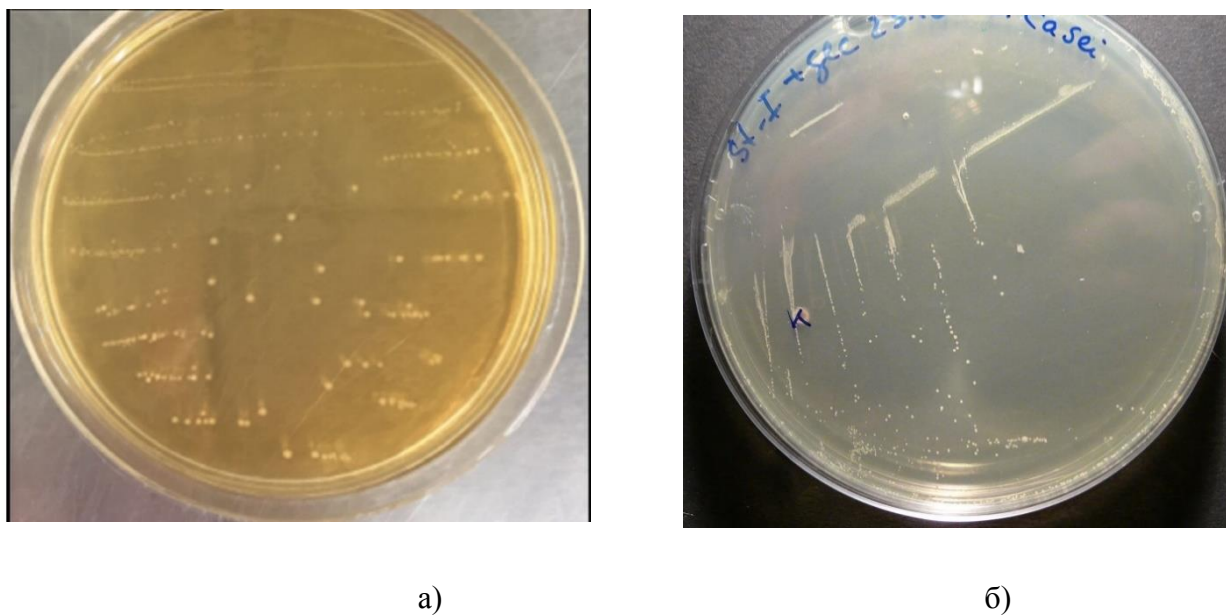


Рисунок 16. Вид колоний выделенных изолятов молочнокислых бактерий на среде MRS: а) колонии изолятов первого морфологического типа; б) колонии изолятов второго морфологического типа

При изучении биохимических свойств было установлено, что выделенные изоляты первого морфологического типа характеризовались способностью к ферментации целого спектра углеводов и спиртов с образованием газа: D-рибозы, D-галактозы, D-глюкозы, D-фруктозы, D-маннозы, D-мальтозы, D-сахарозы, N-ацетилглюкозамина, но не D-маннита, D-сорбитола и эскулина. А выделенные изоляты второго морфологического типа ферментировали без образования газа D-рибозу, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-маннит, D-сорбитол, D-мальтозу, D-сахарозу, D-лактозу, эскулин.

На основании комплекса морфологических, культуральных и биохимических свойств выделенные изоляты первого морфологического типа (1, 4, 6, 7) были отнесены к виду *Lactobacillus fermentum*, а второго (2, 3, 5, 8, 9) – к *Lactobacillus casei*.

Для окончательной идентификации штаммов использовали метод MALDI-TOF. В результате нами установлено, что изоляты, образующие звездчатые колонии сероватого цвета, относятся к виду *L. fermentum*, а белые блестящие слегка выпуклые колонии – к *L. casei* (рис. 17).

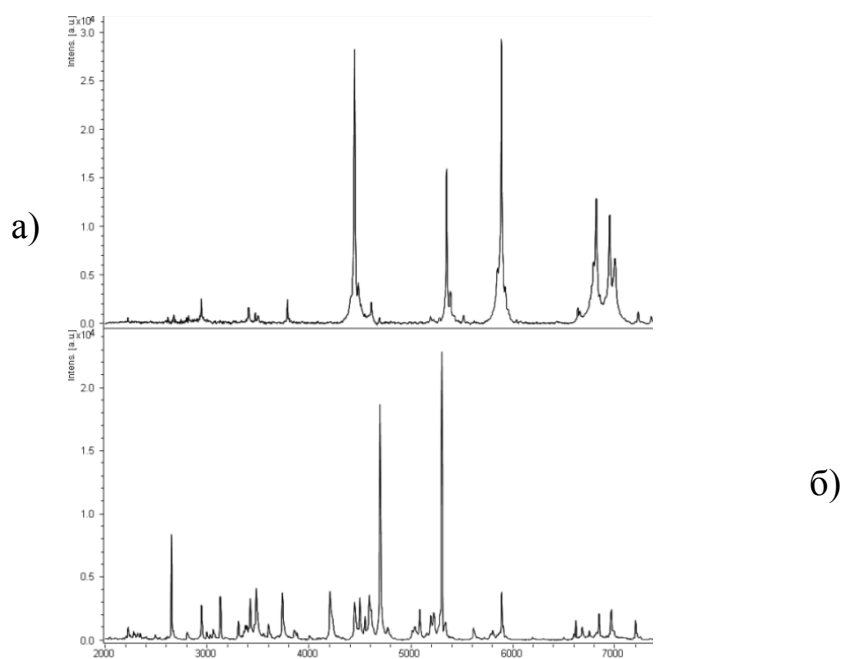


Рисунок 17. Результат масс-спектрометрии чистых культур *Lactobacillus* spp.: а)

Lactobacillus fermentum; б) *Lactobacillus casei*

По результатам определены высокими значениями Score values (выше 2.000, категория А) и сопоставлением полученных спектров с референсными из базы.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что 44,4% от всех выделенных штаммов лактобацилл составили изоляты вида *L. fermentum*, а 66,6% – *L. casei*.

3.3 Адгезивная способность штаммов *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию

Известно, что *Lactobacillus* spp. с высокой адгезивной способностью могут ингибировать активность патогенных бактерий, которые колонизируют ротовую полость, а также могут уменьшать взаимодействие между патогенными бактериями и слизистой оболочкой рта, конкурируя за рецепторы для адгезии эпителиальных клеток, и ингибировать образование биопленок патогенными бактериями [16].

В связи с тем, что способность к биопленкообразованию микробных культур напрямую связана с их адгезивными способностями, на следующем этапе работы нами были исследованы адгезивные свойства выделенных изолятов лактобацилл к буккальному эпителию (табл. 2).

Таблица 2

Показатели индекса адгезии выделенных штаммов лактобацилл к буккальному эпителию

Категория микроорганизмов по степени адгезии	Индекс адгезии микроорганизмов	Изоляты лактобацилл
<i>Низкоадгезивные</i>	1,9±0,01	<i>L. casei</i> 9
	2,14±0,02	<i>L. fermentum</i> 6
	2,31±0,04	<i>L. casei</i> 8
<i>Среднеадгезивные</i>	3,52±0,1	<i>L. casei</i> 5

	3,7±0,08	<i>L. fermentum</i> 4
Высокоадгезивные	4,13±0,02	<i>L. casei</i> 3
	4,4±0,18	<i>L. casei</i> 2
	4,6±0,16	<i>L. fermentum</i> 1
	5,18±0,03	<i>L. fermentum</i> 7

В результате проведенного исследования установлено, что все выделенные штаммы молочнокислых бактерий были способны к адгезии на поверхности эпителиоцитов. Однако, индекс микробной адгезии находился в достаточно широком диапазоне: от $1,9 \pm 0,01$, как, например, у *L. casei*9, до $5,18 \pm 0,03$ – как у *L. fermentum*7 (рис. 18). Значения индексов микробной адгезии позволило разделить все исследуемые культуры на 3 категории. К категории низкоадгезивных были отнесены три бактериальных штамма – *L. casei*9, *L. fermentum*6, *L. casei*8, для которых индекс адгезии не превышал значения $2,31 \pm 0,04$. В процентном соотношении число микробных культур с низкой адгезивной способностью к буккальному эпителию составило 33,3% от общего количества выделенных изолятов (рис. 19).

Среднеадгезивными оказались всего два изолята ($22,3\%$ от общего количества выделенных культур): *L. casei*5 и *L. fermentum*4, для них индексы адгезии соответственно были равны $3,52 \pm 0,1$ и $3,7 \pm 0,08$.

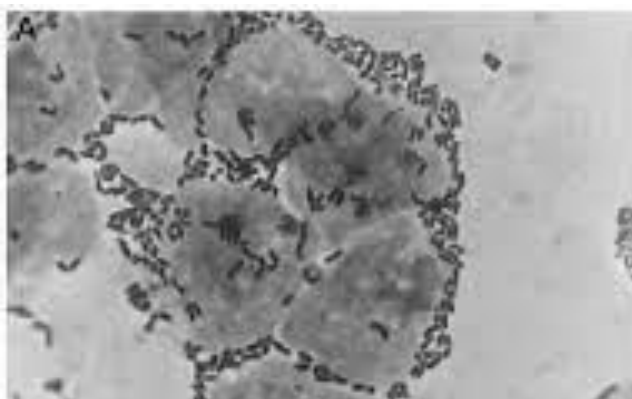


Рисунок 18. Адгезия *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию

Высокой степенью адгезии характеризовались 4 бактериальных культуры: *L. Casei* 3 и 2, *L. fermentum* 1 и 7. Так как для них индекс адгезии превышал 4,00, а максимальное его значение для штамма *L. Fermentum* 7 достигало отметки $5,18 \pm 0,03$, все они были отнесены к категории высоко адгезивных. Число микробных культур внутри этой группы было наибольшим, что в процентном отношении составило 44,4%.

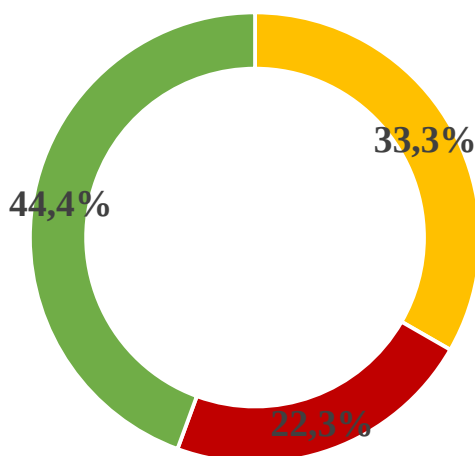


Рисунок 19. Процентное соотношение числа штаммов по категориям в отношении адгезивной способности к буккальному эпителию

■ низкоадгезивные ■ среднеадгезивные ■ высокоадгезивные

Исходя из полученных результатов видно, что, действительно, те изоляты лактобацилл, которые имели высокую способность к биопленкообразованию, а именно: *L. fermentum* 1, *L. fermentum* 7, *L. casei* 3 и *L. casei* 2, одновременно характеризовались и высокой адгезивной способностью к буккальному эпителию.

3.4. Антагонистические свойства штаммов *Lactobacillus* spp.

Антагонистические свойства выделенных штаммов лактобацилл определяли в отношении микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 20А) и *Staphylococcus aureus* (рис. 20Б). С этой целью использовали метод блоков.

В таблице 3 приведены значения диаметра зон задержки роста индикаторных условно-патогенных микроорганизмов, мм (с учетом диаметра блока, 10 мм). Из всех тестируемых штаммов молочнокислых бактерий наибольшую активность в отношении индикаторных штаммов синегнойной палочки и золотистого стафилококка проявили *L. casei* 3 и *L. fermentum* 4.

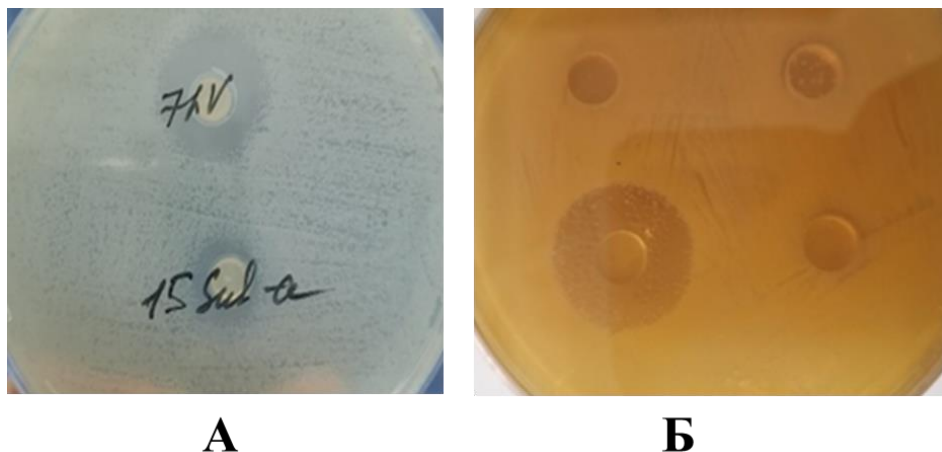


Рисунок 20. Антагонистические свойства лактобацилл в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (А) и *Staphylococcus aureus* (Б)

Для *L. casei* 3 диаметры задержки зон роста индикаторных штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* составили $26,2 \pm 1,4$ и $21,8 \pm 1,3$ мм, для *L. fermentum* 4 – соответственно $21,2 \pm 1,6$ и $25,2 \pm 1,5$ мм. Наименьшей антагонистической активностью характеризовались культуры *L. casei* 2 и *L. fermentum* 1. Для *L. casei* 2 диаметры задержки зон роста индикаторных штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* составили $14,8 \pm 0,8$ и $19,0 \pm 1,1$ мм, для *L. fermentum* 1 – соответственно $15,3 \pm 1,2$ и $18,3 \pm 1,4$ мм.

Исходя из полученных данных необходимо отметить, что более, чем 50% изолятов лактобацилл не проявляли высокой степени антагонизма в отношении условно-патогенных тест-культур, т. к. для 55,6% штаммов молочнокислых бактерий диаметр зоны угнетения роста золотистого стафилококка и синегнойной палочки был не более 20 мм (рис. 21). Если при этом учитывать и диаметр самого блока (10 мм), то диаметр зоны

ингибирования роста условно-патогенных микроорганизмов не превышал 10 мм.

Таблица 3

Антагонизм изолятов молочнокислых бактерий в отношении синегнойной палочки и золотистого стафилококка

Штаммы лактобацилл	Диаметр зон задержки роста индикаторных условно-патогенных микроорганизмов, мм (с учетом диаметра блока, 10 мм)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. fermentum</i> 1	15,3±1,2	18,3±1,4
<i>L. fermentum</i> 4	21,2±1,6	25,2±1,5
<i>L. fermentum</i> 6	23,2±1,1	19,7±1,2
<i>L. fermentum</i> 7	19,7±1,2	22,2±0,7
<i>L. casei</i> 2	14,8±0,8	19,0±1,1
<i>L. casei</i> 3	26,2±1,4	21,8±1,3
<i>L. casei</i> 5	20,4±1,0	19,4±0,8
<i>L. casei</i> 8	16,7±1,1	20,1±1,2
<i>L. casei</i> 9	19,3±1,5	24,4±1,0

Антагонистические свойства *Lactobacillus* spp. обусловлены не только продукцией органических кислот (молочной, уксусной), но также молекулами пероксида водорода и образованием субстанций – бактериоцинов, схожих по своему действию с антибиотиками. Бактериоцины, угнетая рост и развитие условно-патогенной микрофлоры, препятствуют колонизации ими слизистой оболочки ротовой полости [40].

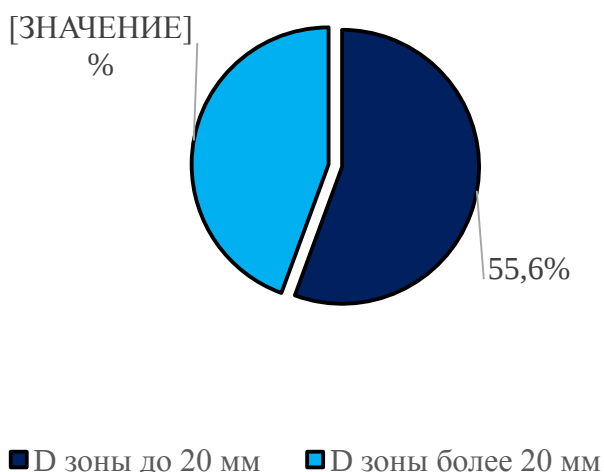


Рисунок 21. Соотношение количества штаммов *Lactobacillus* spp. со средней и низкой степенью антагонистической активности в отношении *P. aeruginosa* и *S. aureus*

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что полученные штаммы лактобактерий, выделенные от пациентов с пародонтитом, характеризуются недостаточным уровнем синтеза противомикробных веществ, о чем свидетельствует средняя и низкая степени антагонизма в отношении тестируемых штаммов условно-патогенных бактерий. Этим можно объяснить и то, что при пародонтите штаммы *Lactobacillus* spp. выделяются от пациентов в очень низких титрах, в отличие от условно-патогенной микрофлоры, титры которой при данной патологии достаточно высоки.

3.5. Способность штаммов *Lactobacillus* spp. к биопленкообразованию

Биопленки – это структурированные группировки бактериальных культур, которые отграничены от окружающей среды защитной полимерной мембраной и прикреплены к инертной поверхности. По сути, это защитные образования, в которых бактерии могут размножаться и выживать в различных неблагоприятных условиях. Известно, что многие патогенные и условно-патогенные виды используют свойство биопленкообразования в качестве защиты от иммунной системы хозяина и действия антимикробных веществ. С другой стороны, образование биопленок микроорганизмами не всегда связано с протеканием инфекционного процесса. Эта способность у молочнокислых бактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры ротовой полости человека, свидетельствует о формировании симбиотического микробного консорциума, угнетающего развитие патогенов за счет усиления синтеза веществ, обладающих антагонистическим действием.

При исследовании способности к биопленкообразованию у выделенных штаммов лактобацилл установлено, что изоляты значительно отличались как по динамике изменений, так и по самим значениям оптической плотности сформированных биопленок на протяжении всего времени культивирования (табл. 4).

Таблица 4

Динамика изменений в значениях оптической плотности формирующихся биопленок изолятов *Lactobacillus* spp.

Изоляты лактобацилл	3 сут., ед. опт. пл.	1 нед., ед. опт. пл.	2 нед., ед. опт. пл.
<i>L. fermentum</i> 1	0,219±0,008	0,416±0,02	0,488±0,027
<i>L. fermentum</i> 4	0,223±0,001	0,308±0,004	0,359±0,01
<i>L. fermentum</i> 6	0,141±0,017	0,172±0,003	0,216±0,05
<i>L. fermentum</i> 7	0,320±0,014	0,418±0,02	0,619±0,03
<i>L. casei</i> 2	0,357±0,022	0,513±0,016	0,586±0,03
<i>L. casei</i> 3	0,305±0,01	0,482±0,024	0,515±0,005
<i>L. casei</i> 5	0,226±0,032	0,244±0,007	0,347±0,016
<i>L. casei</i> 8	0,164±0,01	0,236±0,002	0,258±0,011
<i>L. casei</i> 9	0,08±0,005	0,1±0,001	0,212±0,01

Из данных, приведенных в таблице 4 и на рисунке 22 видно, что наилучшей биопленкообразующей способностью характеризовался штамм *L. fermentum*7, для которого значение оптической плотности формирования биопленки уже на третьи сутки культивирования составило 0,320±0,014 ед.опт. пл. и, по истечению сроков инкубации, достигло наибольшего среди других изолятов значения – 0,619±0,03 ед.опт. пл.

Достаточно высокие показатели биопленкообразования отмечались и у изолятов *L. casei* 2, *L. casei* 3, *L. fermentum*1. К концу культивирования показатели оптической плотности для этих культур соответственно составили: 0,586±0,03; 0,515±0,005 и 0,488±0,027 ед.опт. пл. Относительно слабой способностью к формированию биопленок характеризовались штаммы *L. fermentum* 6 и *L. casei* 9, для которых исследуемые показатели за

весь период выращивания не превышали значения $0,216 \pm 0,05$ ед. опт. пл.

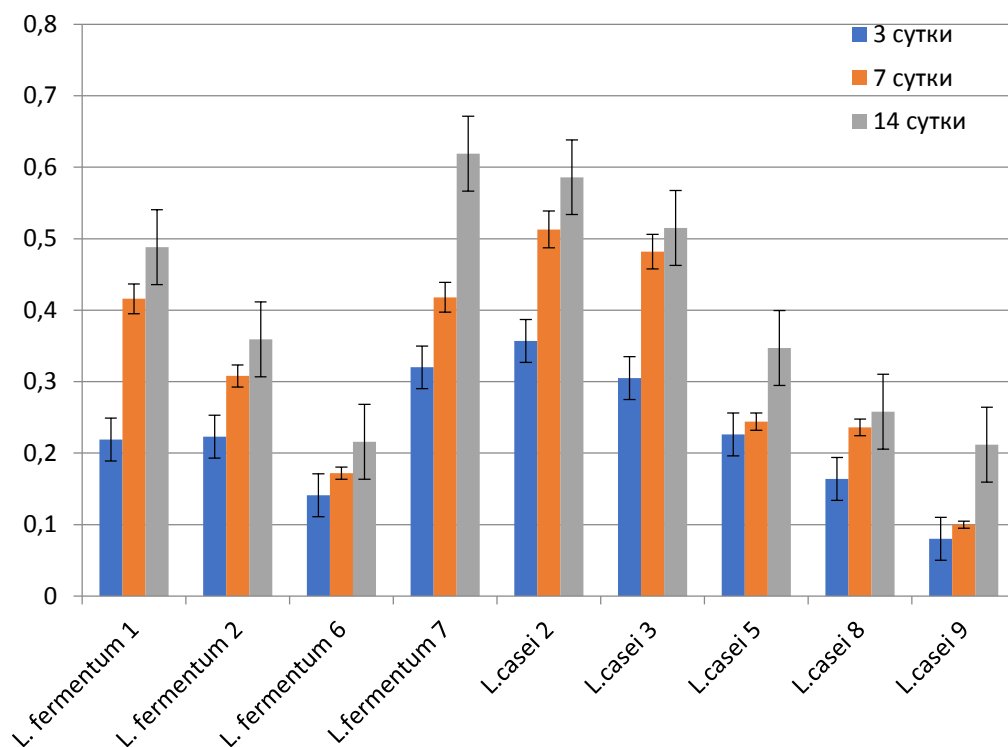


Рисунок 22. Процесс биопленкообразования у штаммов *Lactobacillus* spp.

Такие результаты, возможно, связаны с недавним или систематическим применением антисептических и антибиотических средств пациентами на момент проведения нашего исследования. Остальные же культуры имели среднюю способность к формированию биопленки.

Заключение

Характер колонизационной резистентности слизистой оболочки ротовой полости является одним из ведущих физиологических и патогенетически значимых факторов формирования и прогрессирования стоматологических заболеваний. При нарушениях в системе местного иммунитета полости рта и чрезмерном обсеменении условно-патогенными микроорганизмами, на фоне подавления роста и процессов жизнедеятельности резидентной микрофлоры, возникает риск поражений твердых тканей зубов, пародонта, СОПР.С целью назначения правильного лечения стоматологических больных и коррекции возникших дисбиотических состояний ротовой полости, очень важно понимать причины появления и развития дисбаланса, а также разобраться в механизмах его возникновения. Для этого же, в свою очередь, необходимо детально изучить те биологические свойства резидентной микрофлоры, которые имеют первостепенное значение в поддержании колонизационной резистентности.

По результатам исследования была изучена роль штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных из пародонтальных карманов пациентов с пародонтитом, в поддержании колонизационной резистентности слизистой оболочки полости рта у данной группы стоматологических больных. Исследование позволило оценить способность 9 выделенных штаммов *Lactobacillus* spp., а именно видов *L.casei* и *L.fermentum* проявлять антимикробную активность по отношению к условно-патогенным культурам *P. aeruginosa* и *S. aureus*, адгезивную способность к буккальным эпителиоцитам человека и способность к образованию биопленок, что определяет колонизационную резистентность слизистой оболочки ротовой полости.

ВЫВОДЫ

1. По результатам бактериологического исследования на третьи сутки культивирования содержимого пародонтальных карманов больных с пародонтитом выделены: *Candida albicans* и непатогенные виды *N.mucosa*, *N.flava*, *N.perflava* (10^2 - 10^3 КОЕ/мл); *Streptococcus* spp. видов *S.mitis*, *S.oralis*, *S.sanguinis* и *S.gordonii* в количестве 10^2 - 10^5 КОЕ/мл; у 3 пациентов обнаружены *Escherichia coli* и *Serratia liquefaciens* в титре 10^3 КОЕ/мл; еще у 3 пациентов с пародонтитом средней степени тяжести – *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus parainfluenzae* в количестве 10^2 КОЕ/мл. По результатам бактериологического исследования и на основании результатов метода масс-спектрометрии по принципу VALDI-TOFF выделены 9 штаммов *Lactobacillus* spp.: *L. fermentum* (4 штамма) и *L. casei* (5 штаммов).

2. Выделенные штаммы *Lactobacillus* spp. имели высокую способность к адгезии на поверхности клеток буккального эпителия.

3. 62,3% изолятов лактобацилл проявляли высокую степень антагонизма в отношении *S. aureus* и 43,4% в отношении *P. aeruginosa*.

4. Высокой биопленкообразующей способностью характеризовался штамм *L. fermentum* 7, для которого значение оптической плотности формирования биопленки по истечению сроков инкубации достигло наибольшего среди других изолятов значения – $0,619 \pm 0,03$ ед. опт. пл.

5. Выделенные штаммы *Lactobacillus* spp. обладают хорошей колонизационной резистентностью и могут быть использованы, как кандидаты для дальнейшего их изучения и разработки пробиотиков для лечения пародонтита, и других стоматологических заболеваний, вызываемых условно-патогенными и патогенными микроорганизмами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г. А., Воронов И. А., Лебеденко И. Ю. Стафилококки в ротовой полости и их роль в биодеструкции съемных неметаллических протезов // Российский стоматологический журнал. – 2015. – №1. – С. 14-20.
2. Балмасова И. П., Царев В. Н., Янушевич О. О., Маев И. В., Мкртумян А. М., Арутюнов С. Д. Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов. – М.: Практическая медицина. – 2020. – 148 с.
3. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов. – 5-е изд., испр. – Москва : ООО «Мед.информ. аг-во», 2016. – 792 с.
4. Давыдова М. М., Плахтий Л. Я., Царев В. Н. Методы микробиологического анализа, применяемые в стоматологии // Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: учебник / под ред. В. Н. Царева. – М.: Гэотар-Медиа. – 2013. – С. 223-268.
5. Зверев В. В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / В. В. Зверев, А. С. Быков. – Москва : Мед. информ. аг-во, 2018. – 416 с.
6. Зеленова Е. Г., Заславская М. И., Салина Е. В., Рассанов С. П. Микрофлора полости рта: норма и патология: учебное пособие. – Н.Н.: НГМА, 2014. – 158 с.
7. Ипполитов Е. В., Николаева Е. Н., Царев В. Н. Биопленка полости рта – индукторы сигнальных систем врожденного иммунитета. // Стоматология. – 2017. – Т. 96, №4. – С. 58–62.

8. Назарчук О. А., Фаустова М. О. Биопленкообразующие свойства клинических штаммов грамположительных микроорганизмов //BiomedicalandBiosocialAnthropology. – 2017. – №29. – Р. 6–9.

9. Правосудова Н. А. Микробиологияполостирта : учеб.-метод. пособие для студ. мед. вузов / Н. А. Правосудова, В. Л. Мельников. – Пенза :ПГУ, 2011. – 89 с.

10. Рисованная О. Н., Лалиева З. В. Изучение микробного пейзажа десневой борозды в зависимости от клинического состояния тканей пародонта и уровня эмоционального напряжения // Проблемы стоматологии. – 2019. – Т.15, №2. – С. 135-140.

11. Романова Р. О., Кашлевская М. Е., Левенков Д. С., Исянов Р. В., Каторгин М. С. Особенности формирования микробной биопленки при воспалительных заболеваниях пародонта // Медицина и здравоохранение. – 2022. – №1. – С. 19-22.

12. Слажнева Е. С. Елизова Л. А., Лобода Е. С., Орехова Л. Ю. АтрушкевичВ. Г. Новые возможности в визуализации поддесневой микробной биопленки с помощью сканирующей электронной микроскопии // медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – 15 (4). – С. 544-548.

13. Янковский Д. С. Интегральная роль симбиотическоймикрофлоры в физиологиичеловека / Д.С. Янковский, В.П. Ширококов,Г.С. Дымент. – К. : ТОВ «Рута-Турс», 2011. – 169 с.

14. Alimbekov N. S., Digel I., Yerezhepov A. Y., Shardarbek R. S., Wu X., Zha J. Nutritional fctors influencing microbiota-mediated colonization resistance of the oral cavity: A literature review // Front Nutr. – 2022. – Vol. 20 (9).

15. Ananthanarayan. TextbookofMicrobiology. – 9th ed. / Ananthanarayan, Paniker. – OrientBlackswan, 2013. – 657 p.

16. Arweiler N. B., Netuschil L. The oral microflora // AdvExpMedBiol. – 2016. – Vol. 902. – P. 45-60.

17. Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S. M. H., Sharifi S., Memar Y. M., Zununi S. V. The battle of probiotics and their derivatives against biofilms // *Infect Drug Resist*, 2020. – Vol. 26(13). – P. 659-672.
18. Berger D., Rakhamimova A., Pollack A., Loewy Z. Oral biofilms: development, control, and analysis // *High Throughput*. – 2018. – P. 7-24.
19. Bruno J. S., Al-Qadami G. H., Laheij A. M. G. A., Bossi P., Fregnani E. R., Wardill H. R. From pathogenesis to intervention: the importance of the microbiome in oral mucositis // *Int J Mol Sci*. – 2023. – Vol. 5/24(9). – P. 8274.
20. Buffie C. G., Pamer E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens // *Nat Rev Immunol*. – 2013. – Vol. 13. – P. 790-801.
21. Choi S., Jo Y. H., Luke Yeo I. S., Yoon H. I., Lee J. H., Han J. S. The effect of surface material, roughness and wettability on the adhesion and proliferation of *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* // *J Dent Sci*. – 2023. – Vol. 18(2). – P. 517-525.
22. Deo P. N., Deshmukh R. Oral microbiome: unveiling the fundamentals // *J Oral Maxillofac Pathol*. – 2019. – Vol. 23. – P. 122.
23. Dewhirst F. E. The oral microbiome: critical for understanding oral health and disease // *J Calif Dent Assoc*. – 2016. – Vol. 44(7). – P. 409-410.
24. Eick S. Biofilms // *Monogr Oral Sci*. – 2021. – Vol. 29. – P. 1-11.
25. Gao L., Xu T., Huang G., Jiang S., Gu Y., Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body // *Protein Cell*. – 2018. – Vol. 9. – P. 488-500.
26. Greenwood D. *Medical Microbiology*, 18th ed. with student consult online access / D. Greenwood, R.C.B. Slake, M. Barer, L. Irving. – Churchill Livingstone, 2012. – 794 p.

27. Gueimonde M., Sánchez B., Los Reyes-Gavilán C. G., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria // *Front Microbiol.* – 2013. – Vol. 18(4). – P. 202-211.
28. Hyvärinen E., Kashyap B., Kullaa A. M. Oral sources of salivary metabolites // *Metabolites.* – 2023. – Vol. 29;13(4). – P. 498.
29. Invernici M. M, Salvador S. L, Silva P. H. F. Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A clinical trial // *J Clin Periodontol.* – 2018. – Vol. 45(10). – P. 1198-1210.
30. Jakubovics N. S. Intermicrobial Interactions as a driver for community composition and stratification of oral biofilms // *J Mol Biol.* – 2015. – Vol. 20;427(23). – P. 3662-3675.
31. Jakubovics N. S., Goodman S. D., Mashburn-Warren L., Stafford G. P., Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix // *Periodontol 2000.* – 2021. – Vol. 86(1). – P. 32-56.
32. Jia G., Zhi A., Lai P. F. H., Wang G., Xia Y., Xiong Z. The oral microbiota—a mechanistic role for systemic diseases // *Br Dent J.* – 2018. – Vol. 224. – P. 447-455.
33. Khelaifia S., Virginie P., Belkacemi S., Tassery H., Terrer E., Aboudharam G. Culturing the Human Oral Microbiota, Updating Methodologies and Cultivation Techniques // *Microorganisms.* – 2023. – Vol. 24;11(4). – P. 836.
34. Koo H., Allan R. N., Howlin R. P., Stoodley P., Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies // *Nat Rev Microbiol.* – 2017. – Vol. 15(12). – P. 740-755.
35. Kuang X., Chen V., Xu X. Novel approaches to the control of oral microbial biofilms // *Biomed Res Int.* – 2018. – Vol. 31. – e:6498932.

36. Lasserre J. F., Brex M. C., Toma S. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases // *Materials*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1802.
37. Leshem A., Liwinski T., Elinav E. Immune-microbiota interplay and colonization resistance in infection // *Mol Cell*. – 2020. – Vol. 4. – P. 597-613.
38. Lu M., Xuan S., Wang Z. Oral microbiota: a new view of body health // *Food Sci Hum Wellness*. – 2019. – Vol. 8. – P. 8-15.
39. Marsh P. D., Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. // *J Clin Periodontol*. – 2017. – Vol. 44 (18). – P. 12-22.
40. Mathipa M. G., Thantsha M. S. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens // *Gut Pathog*. – 2017. – Vol. 9. – P. 28-34.
41. Mohajeri M. H., Brummer R. J. M., Rastall R. A., Weersma R. K., Harmsen H. J. M., Faas M. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications // *Eur J Nutr*. – 2018. – Vol. 57. – P. 1-14.
42. Mosaddad S. A., Tahmasebi E., Yazdanian A., Rezvani M. B., Seifalian A., Yazdanian M., Tebyanian H. Oral microbial biofilms: an update // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 2019. – Vol. 8(11). – P. 2005-2019.
43. Moshynets O.V., Spiers A.J. Viewing biofilms within the larger context of bacterial aggregations / in D. Dhanasekaran & N. Thajuddin (Eds.). *Microbial biofilms: importance and applications*. – 2016. – P. 3-22.
44. Murray P.R. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed / P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller. – Washington : ASM Press, 2015. – 848 p.

45. Petrushanko T. A., Chereda V. V., Loban' G. A. The role of oral cavity colonization resistance in dental caries development // *Stomatologiya*. 2013. – Vol. 92(1). – P. 43-45.
46. Petrushanko T. A., Chereda V. V., Loban' G. A. The relationship between colonization resistance of the oral cavity and individual-typological characteristics of personality: dental aspects // *Wiadomosci Lekarskie*. – 2017. – Vol. 4 (70). – P. 754-757.
47. Petrushanko T. A., Tchereda V. V., Loban G. A. The screening diagnostic of microecological disorders of oral cavity // *Actual problems of modern medicine*. – 2020. – Vol. 23 (81). – P. 8387.
48. Petrushanko T. O., Loban G. A., Moshel T. N., Hanchko O. V. Therapeutic potential of lactobacilli-based drug in the treatment of generalized periodontitis // *World of Medicine and Biology*. – 2020. – Vol. 4 (74). – P. 121-125.
49. Sampaio-Maia B., Caldas I. M., Pereira M. L., Pérez-Mongiovi D., Araujo R. The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases // *Adv Appl Microbiol*. – 2016. – Vol. 97. – P. 171-210.
50. Savichuk N. O., Trubka I. A., Marchenko O. A. The correction of microecological components of therapeutic and preventive measures in children with chronic generalized catarrhal gingivitis // *Stomatologiya. Estetika. Innovatsii*. – 2017. – Vol. 1. – P. 87-95.
51. Sharma N., Bhatia S., Sodhi A. S., Batra N. Oral microbiome and health // *AIMS Microbiol*. – 2018. – Vol. 4. – P. 42.
52. Sivamaruthi B. S., Kesika P., Chaiyasut C. A Review of the role of probiotics supplementation in dental caries // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. – 2020. – Vol. 12. – P. 1300–1309.
53. Verma D., Garg P. K., Dubey A. K. Insights into the human oral microbiome // *Arch Microbiol*. – 2018. – Vol. 200. – P. 525–540.

54. Zhang Y., Wang X., Li H., Ni C., Du Z., Yan F.
Humanoralmicrobiotaanditsmodulationfororalhealth // BiomedPharmacother. –
2018. – Vol. 99. – P. 883-893.