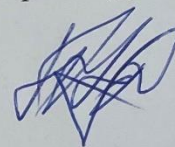


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Институт развития образования
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

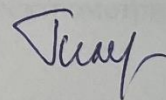
На правах рукописи



Ненно Полина Вадимовна

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ,
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ У БОЛЬНЫХ
ПАРОДОНТИТОМ

Научный руководитель:
Заведующий кафедрой фундаментальной
и прикладной микробиологии, к.м.н.



И. А. Гимранова

Уфа – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Микробиота ротовой полости	7
1.2. Гингивит	18
1.2.1. Микробиота при гингивите	18
1.3. Периодонтит	19
1.4. Пародонтит	20
1.4.1. Пародонтопатогены	21
1.4.2. Формы пародонтита	26
1.4.3. Стадии развития пародонтита	26
1.5. Реакция иммунной системы	27
1.6. Лечение и профилактика	29
1.7. Антагонистическая активность микроорганизмов	30
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Объекты исследования	32
2.2. Подготовка лабораторной посуды	32
2.3. Приготовление питательных сред для культивирования бактерий	33
2.4. Метод культурального посева на питательные среды	36
2.5. Метод идентификации бактерий. Масс-спектрометрия	42
2.6. Метод накопления биомассы бактерий	43
2.7. Метод выявления антибактериальной активности. Система двойных репортеров Dualrep2	44
2.8. Выявление антагонистической активности бактерий методом перпендикулярных штрихов	46
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	
3.1. Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов	47

3.2. Антибактериальные свойства идентифицированных бактерий	56
3.3. Антагонистическая активность микроорганизмов	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
ВЫВОДЫ	64
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	65

Список сокращений и условных обозначений

АГ – антиген

ГКС – глюкокортикостероид

ЖСА – желточно-солевой агар

КА – кровяной агар

КС – клеточная стенка

ЛПС – липополисахарид

МСА – молочно-солевой агар

ОВП – окислительно-восстановительный потенциал

ПГ – пептидоглюкан

ПС – полисахарид

УФ – ультрафиолет

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

IL – интерлейкин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. В настоящее время заболевания пародонта являются довольно распространенными среди всех стоматологических патологий. Так, известно, что 95% взрослых и 80% детей страдают теми или иными заболеваниями пародонта. Данные заболевания представляют собой воспалительные процессы комплекса тканей, окружающих и удерживающих зуб, что может приводить к возникновению гнойно-воспалительных очагов, деструкции окружающих тканей и хронической интоксикации организма. Основной причиной заболеваний являются бактерии, содержащиеся в зубном налете, который образуется при отсутствии эффективных и регулярных гигиенических процедур полости рта. При отсутствии лечения происходит нарушение жевательной функции, формирование патологических зубодесневых карманов и потеря зубов, что влияет на общее состояние организма.

Применяемые в стоматологической практике методы терапии заболеваний пародонта малоэффективны и не приводят к полному выздоровлению.

Так, применяя в лечении антибактериальные препараты, к которым относятся: тетрациклин, азитромицин, левомицетин и т.д., высока вероятность появления резистентных штаммов бактерий, что, в свою очередь, сказывается на эффективности лечения и приводит к прогрессированию воспаления. Также у антибиотиков имеются побочные эффекты, которые могут проявляться в виде нарушений со стороны различных систем макроорганизма (пищеварительная, сердечно-сосудистая, нервная).

Рассматривая антисептические средства (хлоргексидин, мирамистин, хлорамин, перекись водорода), можно отметить, что они пригодны лишь для профилактики патологий пародонта.

Цель исследования. Изучить особенности антибактериальных свойств бактерий, полученных из пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом различной степени тяжести.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие задачи:

1. Проведение бактериологического исследования содержимого пародонтальных карманов.
2. Идентификация до вида полученных чистых культур бактерий методом масс-спектрометрии.
3. Выявление наличия/отсутствия антибактериальных свойств выделенных штаммов бактерий.
4. Определение антагонистических свойств выделенных штаммов бактерий.

Ожидаемая научная новизна. В работе впервые изучены антибактериальные свойства бактерий, полученных из пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом.

Ожидаемое научно-практическое значение. Практическая значимость заключается в применении результатов данного исследования для корректировки терапии заболеваний пародонта.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микробиота ротовой полости

Микроорганизмы ротовой полости подразделяется на постоянную (аутохтонную, резидентную) и временную (транзиторную, аллохтонную).

К первой категории группе относятся бактерии, постоянно присутствующие в ротовой полости. Данные микроорганизмы также подразделяются на облигатных, постоянно обитающих в ротовой полости и факультативных, среди которых присутствует условно-патогенная микрофлора, способная вызывать некоторые заболевания во рту.

Ко второй категории относят бактерий, длительно не задерживающихся в макроорганизме [37].

Микрофлора полости рта выполняет следующие функции: инактивирует размножение пародонтопатогенов (синтез лизоцима/бактериоцинов/ацидофиллина, высокая скорость размножения, изменение водородного показателя, конкуренция за питание, продукция перекисей и спиртов, жирных кислот), побуждает к развитию лимфоидной ткани, повышает иммунную реактивность, снабжает макроорганизм витаминами и аминокислотами, стимулирует секреции слизистых и слюнных желез, является причиной заболеваний полости рта [23].

Среди микроорганизмов полости рта, первое место занимают бактерии, а затем грибы, вирусы и простейшие.

Видовое разнообразие флоры полости рта напрямую зависит от следующих факторов: температура, ОВП, pH; состояние зубов и слизистой оболочки; уровень гигиены; секреция и состав слюны; пища, попадающая в полость рта; качество функций глотания и жевания; состояние иммунной системы [36].

С поверхности слизистой оболочки ротовой полости регулярно отделяются клетки эпителия вместе с адгезированными на них бактериями. Движения губами и языком ускоряет течение слюны, влияя на перемещение микроорганизмов. Язык снабжен сосочками, на которых также прикреплены

бактерии. Микроорганизмы обитают и в зубодесневых карманах на тканях, и на зубной эмали [90].

Температура человека 36°C и нейтральный водородный показатель создают хорошие условия для развития бактерий. Слюна помогает сохранению нейтральной среды, ее буферные свойства нейтрализуют кислотность еды, а также ее течение вымывает углеводы и производимые микроорганизмами кислоты. Злоупотребление сладкой пищи приводит к снижению pH до 5, что способствует развитию кислотопродуцирующих микробов, и как следствие – к образованию кариеса. В щелях десны щелочной водородный показатель, при котором могут размножаться пародонтопатогены, там свойства слюны не действуют, так как область под десной омывается десневой жидкостью [6].

Нарушения в функциях жевания, слюноотделения и глотания являются причиной возрастания числа бактерий во рту. Кариозные аномалии, патологические пародонтальные карманы, металлические коронки с такой же силой способствуют повышению количества бактерий. Потребление твердой пищи вызывает уменьшение числа микроорганизмов.

Все вышеперечисленные факторы непосредственно влияют на процветание микроорганизмов в ротовой полости, а также являются ключевыми в поддержании равновесия между сообществами бактерий.

Чтобы нормально существовать в полости рта, микроорганизмам необходимо прикрепиться к поверхности слизистой посредством адгезии. У грамотрицательных бактерий в этом прикреплении участвуют пили, а у грамположительных – липотейхоевые кислоты. Также в процессе адгезии участвуют гликозилтрансферазы и гликозилированные белки. Существуют бактерии, которые не способны к адгезии, тогда они вступают в контакт с другими бактериями, создавая зубные бляшки [30].

Нормальная флора макроорганизма формируется при рождении: лактобактерии, непатогенные стафилококки и стрептококки, не обладающие

гемолитической активностью. Через шесть-семь дней данные бактерии меняются на микроорганизмы, характерные для микробиоты взрослых людей [60].

Во рту могут проживать 600-750 видов бактерий. Большую часть из них составляют анаэробные бактерии, остальные – факультативные анаэробы.

К облигатным анаэробам относятся роды:

- 1) Грам(-) кокки – *Veillonella*.
- 2) Грам(+) кокки – *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*.
- 3) Грам(-) палочки – *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*.
- 4) Грам(+) палочки – *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*.
- 5) Спирохеты – *Treponema*, *Borrelia* [48, 49].

Семейство Spirochaetaceae. Грам(-), подвижны. постоянно обитают в ротовой полости. Их сложно культивировать, необходимы среды, содержащие сыворотку, цистеин и глутаминовую кислоту, асцитическую жидкость, свежие куски органов. Ферментируют только глюкозу, разжижают желатину, свернутую сыворотку, белок яйца. Индол+, сероводород+, аммиак+.

Численность спирохет повышается с увеличением количества облигатных анаэробов. Спирохеты приводят к возникновению заболеваний только в сообществах с иными микроорганизмами, чистокультурные изоляты не патогенны [64].

Во рту обитают 3 рода спирохет: *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*. *B. buccalis* выглядит как толстая извитая коротенькая ниточка с двумя-шестью витками и тупыми концами.

B. Vincentii снабжена пятью витками с острыми концами. Ее местообитания – это околозубные карманы и складки слизистой. Приводит к развитию патологий только в ассоциации с *F.nucleatum* и *P.melaninogenica*

T.microdentium выглядит в виде тоненькой извитой нити с 8-14 витками. *T.macrodentium* более грубая по морфологии, имеет 8-12 завитков. *L.dentium* не отличается от других лептоспир по морфологии [58].

Род Veillonella. Вейллонеллы – маленькие грам(-) кокки, располагаются беспорядочными скоплениями, парами или небольшими цепями. Анаэробы.

Требовательны к питательным средам, однако их рост возрастает при добавлении лактата, являющимся энергетическим источником. Разлагают низкомолекулярные продукты обмена углеводов – лактат, ацетат, пируват с образованием углекислого газа и H_2 , стимулируя повышение рН среды, в следствии чего инактивируется рост иных бактерий.

У здорового человека они обитают в большой концентрации: в 1 мл слюны до 10^7 - 10^{11} . Вейллонеллы не являются причиной возникновения патологических процессов, однако могут встречаться в ассоциациях с другими патогенами [85, 89].

Род Bacteroides. Грам(-) анаэробные палочковидные бактерии, располагаются парами или одиночно. Неподвижны (кроме 2х видов). Спор не образуют, некоторые образуют капсулу.

Требовательны к условиям культивирования, необходим углекислый газ 10%, витамин К. Вырастают на средах с желчью. Инкубация посевов пять суток. На КА формируют средние выпуклые прозрачные колонии (некоторые черные). В бульонных средах образуют помутнение и осадок.

Углеводы не ферментируют. Имеют эндотоксин. Капсула защищает от фагоцитоза. Синтезируют фибринолизин, гепариназу, нейраминидазу, ДНКазу. Не особо устойчивы при попадании во внешнюю среду, чувствительны к антисептическим средствам.

Bacteroides fragilis обитает в слизистой около основания зубов, *Bacteroides forsythus* – патоген [22].

Род Porphyromonas. Грам(-) короткие палочки, неподвижные, спор не образуют. Анаэробы. Индол(+), разрушает фибриноген, образует коллагеназу (разрушение дентина), способна к агглютинации эритроцитов.

Требовательны к питательным средам, нуждаются в витамине К и гемине. Во время роста на кровяном агаре на шестые-четырнадцатые сутки образуют коричнево-черный пигмент. Гнилостный запах. Их рост ингибируется 20% желчными солями.

Porphyromonas присутствуют в составе нормальной флоры ротовой полости. Наиболее часто находят *P.asaccharolytica*, *P.gingivalis*, *P.endodontalis*. Интенсивно размножаются при гнойно-воспалительных патологиях. Эндогенный характер заболеваний, в сообществах с другими микробами [16].

Род *Prevotella*. Грам(-) многоформные неподвижные палочки, капсулу образуют. Ферментируют либо слабо ферментируют углеводы. Имеют эндотоксин и образуют фосфолипазу А (разрушение мембран эпителия).

Образуют пигмент черного цвета в КА на 5-14 день. Их рост ингибируется 20% желчными солями.

Превотеллы обитают в карманах слизистой оболочки и десневом желобке. Вызывают развитие патологий пародонта и одонтогенных инфекций. *P.melaninogenica* [54, 56].

Род *Fusobacterium*. Грам(-) многоформные веретенообразные палочки, не образующие спор и капсул, неподвижные. Неоднородные. По расположению это короткие цепочки бактерий либо одиночные палочки. У них отмечено неравномерное окрашивание по методу Грама.

Характеризуются хорошим развитием на питательных средах с добавлением асцитической жидкости либо сыворотки. На КА вырастают маленькие желтоватые колонии выпуклые, имеющие α-гемолиз. В бульонных

средах образуют помутнение и осадок, газ, сырный запах. Ингибирование роста 20% желчными солями.

Ферментируют углеводы слабо, пептон. Индол (+) – гнилостный запах. Образуют фосфолипазу А (проникновение микроорганизмов глубоко в ткани), лейкоцидин (цитотоксический эффект на клетки). Продуцируют масляную кислоту.

Местообитание фузобактерий – это околозубные карманы и дентин кариеса. Эти бактерии хорошо развиваются в сообществе с *Spirochaetaceae*, кокками анаэробами и вибрионами. Патогенны – *F.nucleatum* и *F.necrophorum* [40].

Род *Leptotrichia* включает только 1 вид – *Leptotrichia buccalis*. Этот микроорганизм является постоянным обитателем полости рта, в 1 мл слюны 10^3 - 10^4 бактерий. Это грам(-) анаэробные длинные нити, могут быть обильные сплетения нитей, концы их заостренные или вздутые (схожи по морфологии с фузобактериями). В молодых культурах могут быть как грам(+), так как содержат гранулы. Неподвижные, не образуют ни спор, ни капсул.

Трудно культивируются. Сбраживают глюкозу с образованием молочной кислоты, понижая при этом рН среды до 4,5. Имеют тропность к лимфоидной ткани. В состав органической основы зубного камня в основном входят лептотрихии. При пародонтопатологиях их число возрастает [71].

К аэробам и факультативным анаэробам относят роды:

- 1) Грам(+) кокки – *Streptococcus*, *Staphylococcus*.
- 2) Грам(-) кокки – *Neisseria*.
- 3) Грам(+) палочки – *Lactobacillus*, *Corynebacterium*.
- 4) Грам(+) ветвистые – *Actinomyces*.
- 5) Спирохеты – *Leptospira*.

Род *Staphylococcus*. Встречаются в 30% случаев. Представляют собой кокки диаметром 0,5-1,5 мкм, грамположительные, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, при рассмотрении в микроскоп располагаются в форме гроздьев винограда. Неподвижны. Спор и капсул (в основном) не образуют. Компоненты КС – ПГ и глицеринтейхоевая либо рибитейхоевая кислота.

Для их культивирования в аэробных условиях необходимы витамины и аминокислоты, а в анаэробных – ферментируемые источники углерода и урацил. Способны расти при 6,5 – 46°C. Элективные среды, содержащие высокое содержание соли: ЖСА или МСА. Рост на ЖСА: круглые мутные желтовато-кремовые колонии, окруженные венчиком (продукция лецитовилазы). На КА – зона гемолиза. В бульонах образуют помутнение среды и осадок тягучий.

Стафилококки обладают высокой ферментативной активностью по отношению к углеводам (до уксусной кислоты без газа), поэтому способствуют утилизации остатков еды в ротовой полости. Золотистый стафилококк ферментирует маннит, глюкозу, лактозу, сахарозу. Разжижают желатину, индол отрицательный. Способны к продукции плазмокоагулазы и фибринолизина. Каталаза(+), оксидаза(-), синтез ДНКазы (+).

У стафилококков есть энтеротоксины, токсин синдрома токсического шока, токсины эксфолиативные. Цитолитические токсины (цитолизины – альфа, бетта и гамма, лейкоцидин Пантона-Валентайна).

Устойчивы к высушиванию, нагреванию до 80°C (20-30 мин), 150°C (10 мин), сухожар (120 мин); антисептическим средствам. Не устойчивы в течение десяти-двенадцати часов к солнечному свету и к этанолу.

У здорового человека в налете на зубах обитают в основном *Staphylococcus epidermidis*. Может встречаться *Staphylococcus aureus*.

Возможно бактерионосительство. Коагулазо(+) патогенные стафилококки могут вызывать гнойно-воспалительные патологии [2].

Под Streptococcus. В 1 мл слюны их содержится до 10^8 - 10^{11} . Стрептококки под микроскопом располагаются в форме цепочек, грам (+). Большинство – факультативные анаэробы, но есть и микроаэрофилы, и анаэробы (пептострептококки). Некоторые синтезируют капсулу, спор не образуют, не обладают подвижностью. Требовательны к питательным средам, необходима сыворотка крови, аминокислоты и витамины.

Стрептококки сворачивают молоко, вариабельно – маннит, растворяют фибрин; сбраживают углеводы и производят молочную кислоту. Кислоты подавляют рост гнилостных бактерий, но и снижают pH, способствуя образованию кариеса. Способны к синтезу нерастворимых ПС из сахарозы, отчего образуется зубной налет, адгезия других бактерий на поверхности зуба и дальнейшее развитие пародонтита.

Имеют экзотоксины: гемолизин (разрушение эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и макрофагов), лейкоцидин (разрушение лейкоцитов), летальный токсин (некроз), эритрогенный (воспалительная реакция кожи). А также – эндотоксины термостабильные. Способны к адгезии благодаря АГ [3].

Оральные стрептококки – *S.mutans* и *S.sanguis*, *S.salivarius*, *S. mitis*, *S. oralis*. Они способны ферментировать углеводы с образованием пероксида водорода. На агаре с добавлением крови эти бактерии образуют точечные колонии, которые окружены зеленой зоной α -гемолиза. *S. mitis*, *S. salivarius* всегда находятся в ротовой полости. *S.mutans* и *S.sanguis* обитают на зубах, *S.salivarius* находится на поверхности языка.

S.anginosus может продуцировать хондроитинсульфатазу, из-за которой происходит деструкция связок, хрящей и соединительной ткани. *S.salivarius* и *S.vestibularis* выделяют бактериоцины, препятствующие колонизации других

микроорганизмов. *S. mutans* и *S. sobrinus* способствуют развитию кариеса, так как выделяют ПС (глюканы), способствующие адгезии на зубах, вызывая деминерализацию эмали. *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S. infantis* – антагонисты пародонтопатогенов [17].

Род *Peptococcus*. Грам(+). Неподвижные. Располагаются поодиночке либо парами. Анаэробы. Для роста нужны жирные кислоты. Расщепляют аминокислоты и пептоны. Являются причиной гнойно-воспалительных патологий вместе с другими бактериями (фузобактерии, спирохеты). Встречается в полости рта *Peptococcus niger*.

Род *Peptostreptococcus*. Анаэробы. Располагаются в форме коротких цепочек. Не обладают подвижностью. Продуцируют водород, превращающийся в кишечнике в пероксид водорода. Ферментируют углеводы, не имеют гемолитической активности. Требуют питательных сред с кровью. Во рту обитают *P. anaerobius*, *P. micros*, *P. magnus*. Являются причиной гнойных воспалений с иными микроорганизмами [18].

Род *Neisseria*. Грам(-) диплококки 0,6-10 мкм, аэробы. Не обладают подвижностью, не формируют спор, некоторые имеют капсулу и микроворсинки.

Патогенные виды требовательны к питательным средам – необходима кровь, сыворотка и другие факторы роста, также нужен углекислый газ. Колонии круглые выпуклые, могут быть с желтым пигментом.

Каталаза и цитохромоксидаза положительны; ферментируют углеводы с продукцией кислоты. Редуцируют нитриты и иногда восстанавливают нитраты. Во внешней среде данные бактерии не выживают, являются чувствительными к антисептическим средствам.

В больших концентрациях обитают во рту у здоровых людей. Нейссерии создают условия для развития анаэробов, путем снижения окислительно-восстановительного потенциала среды. Могут обитать в

пульпе и периодонте при серозных воспалениях, а также при катаральных воспалениях слизистой оболочки ротовой полости [46].

Род Lactobacillus. Грам(+) палочки различной морфологии. Неподвижны (некоторые подвижны), капсулы и споры не формируют. Факультативные анаэробы. Продуцируют молочную кислоту, поэтому инактивируют рост других микроорганизмов (обладают антагонистическими свойствами): *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Shigella*.

Гомоферментативные лактобактерии (*L.casei*) способны к гомоферментативному брожению, продуктом разложения углеводов является одна лишь молочная кислота. Гетероферментативное молочнокислородное брожение вызывают *L.fermentum*, *L.brevis*, при этом производится молочная кислота (40-50%), спирт, уксусная кислота, углекислота (40-50%).

Чаще обнаруживаются в ротовой полости: *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L. brevis*. При кариесе численность лактобактерий повышается [45].

Род Bifidobacterium . Грам(+), изогнутые либо ветвящиеся. Не обладают подвижностью и не образуют спор. Анаэробы. Ферментируют углеводы, образуя органические кислоты. Способны к синтезу противомикробных веществ и витаминов группы В. Формируют биопленки на эпителиальных клетках, не давая адгезироваться пародонтопатогенам на поверхности эпителия. Бифидобактерии – это антагонисты пародонтопатогенов.

Род Propionibacterium. Грам(+) палочки неправильной формы, могут ветвиться. Располагаются по одиночке либо мелкими скоплениями или же недлинными цепочками. Спор не формируют. Факультативные анаэробы. Также являются антагонистами пародонтопатогенов [27].

Род Corynebacterium. Грам(+) неподвижные палочки с булабовидными утолщениями на концах (там находятся зерна волютина). Иногда формируют капсулу. Неподвижны, спор не образуют. Факультативные анаэробы.

Ферментируют мальтозу, галактозу, глюкозу до кислоты. Лактоза, маннит и сахароза, мочеви́на, желатин, индол – отрицательно. Образуют фермент цистиназу, наблюдаемый в среде Пизу (черный цвет по уколу).

Для культивирования применяю среду Леффлера. На КА и сывороточном агаре вырастают очень мелкие кремовые колонии. На среде Тинсдаля – коричневые колонии. На среде Клауберга – серые колонии. В бульоне – помутнение среды либо пленка на поверхности, дающая осадок в виде хлопьев.

Имеют фимбрии, благодаря которым адгезируются к эпителиальным клеткам. Экзотоксин – некроз клеток. У некоторых есть гемолизин. Корд-фактор – нарушение фосфорилирования.

Устойчивы к пониженным температурам, в воде и молоке живут до 20 дней. Не устойчивы к нагреванию, антисептическим средствам.

Присутствуют во рту здорового человека. Коринебактерии могут снижать окислительно-восстановительный потенциал, тем самым способствуя процветанию патогенной флоры. Синтезируют бактериоцины, т.е. являются антагонистами [38].

Семейство *Actinomycetaceae*. Грам(+) ветвящиеся, фрагментированные цепи, могут быть изогнутые. Нитевидные клетки. Они способны формировать мицелий, на концах которого располагаются конидии. Микроаэрофилы или анаэробы. Некоторые образуют капсулу. Размножаются бесполо – поперечным делением, спорами, почкованием, фрагментами мицелия). Хорошо живут в щелочной среде.

Всегда обитают в ротовой полости человека, увеличивают численность при пародонтопатологиях и кариесе. *A.israelii* проживают на десневых поверхностях и в налете зубов, в околозубных карманах при пародонтите, а также в корневых каналах зубов с некротизированной пульпой [50].

Микоплазмы. Маленькие микроорганизмы разной формы (так как их ЦПМ содержит стиролы) без КС. Факультативные анаэробы. Делятся почкованием, делением бинарным и фрагментацией. *Mycoplasma orale* и *M. salivarium* выявляются при патологиях пародонта [28].

Непостоянная микрофлора полости рта. Данные бактерии иногда находятся в ротовой полости в малых количествах: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*. При нарушениях физиологического состояния ротовой полости эти представители способны интенсивно размножаться и вызывать патологии [5].

Среди грибов в полости рта встречаются: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*. Овальные или слегка удлинённые по морфологии 2-5 мкм, с почками на концах, имеют псевдомицелий. Для культивирования применяется среда Сабуро с хлорамфениколом для подавления сопутствующей флоры либо хромогенные среды. Образуют выпуклые гладкие колонии разных цветов.

Кандиды могут расщеплять иммуноглобулин А, фосфолипаза (+), плазмокоагулаза (+), лизоцим (+), обладают способностью к адгезии на клетки эпителия сразу после попадания в организм хозяина! Они являются причиной возникновения кандидозов (появляется белый налет/пятна) в случае чрезмерного применения антибиотиков, ГКС, цитостатиков. Степень токсичности адгезии повышается при ассоциации с грамотрицательными микроорганизмами. Они выживают на внешних объектах до 15 дней, на ладонях до 2х часов [37].

1.2. Гингивит

Гингивит представляет собой воспаление поверхностных тканей десны. Для этого заболевания характерно скопление мягкого бактериального налета на зубах, интенсивное размножение патогенных микроорганизмов. При отсутствии адекватной гигиены происходит воспалительный процесс десны.

Из симптомов наблюдается кровоточивость и отечность десен, их болезненность. Патологические зубодесневые карманы и признаки разрушения костной ткани отсутствуют.

Гингивит различают локализованный (при поражении десны в области одного-трех зубов) и генерализованный (при поражении всех зубов) [47].

1.2.1. Микробиота при гингивите

Существует так называемая классификация патогенных бактерий ротовой полости, являющихся причиной возникновения гингивита. Она подразделяется на «красную», «оранжевую», «желтую», «зеленую» и «пурпурную» категории:

К красной категории относятся: *P.gingivalis*, *Tannerella forsythia*; к оранжевой: *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Peptostr.micros*, *Campylobacter gracilis/rectus/showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium periodonticum/nucleatum*, *St.constellatus*; к желтой: *Streptococcus mitis/oralis/sanguis/gordonii/intermedius*; к зеленой: *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis/sputigena/ochracea*, *Campylobacter concisus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; к пурпурной: *Veillonella parvula* и *Actinomyces odontolyticus* [10, 51].

Также бактерий ротовой полости можно разделить на 2 группы. В первую группу входят микроорганизмы, которые очень вирулентны и обладают повышенной адгезивностью к околозубным тканям. Они очень агрессивно действуют на ткани пародонта и вызывают их деструкцию: *P.gingivalis*, *T.forsythia* и *A. actinomycetemcomitans*. Во вторую группу входят бактерии, которые колонизируются с изолятами из первой группы, однако они менее вирулентны: *P.intermedia* и *T.denticola* [4].

1.3. Пародонтит

Пародонтит представляет собой заболевание, характеризующееся воспалением соединительной ткани – пародонта, расположенной между

зубной альвеолой (лунка) и зубным цементом. Периодонтит может быть инфекционным, травматическим, токсическим и аллергическим [42].

Инфекция начинается с верхних тканей зуба и перемещается к периапикальной кости. Этиологическими агентами развития периодонтита являются различные бактерии: стафилококки, стрептококки, спирохеты и фузобактерии, а также грибы. Они продуцируют эндотоксины, вследствие чего происходит дегрануляция лейкоцитов (которые выделяют гепарин и гистамин), накапливаются макрофаги, выделяющие лизосомальные ферменты, которые активируют деятельность остеокластов. Периодонт и находящиеся рядом ткани разрушаются [25].

Этиологическими агентами заболевания являются: *P.gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *P.intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces viscosus/odontolyticus/actinomycetemcomitans/israeli*. В очагах максимального разрушения периодонта: *P.gingivalis*, *T.denticola*, *B.forsythus* [19].

1.4. Пародонтит

Пародонтит – следующая стадия воспаления после гингивита, при которой воспаляются уже подлежащие ткани пародонта. Патология является воспалительным заболеванием инфекционной природы, которое достаточно быстро развивается. При пародонтите почти всегда присутствует кровоточивость и отек десен. Ключевую роль в патогенезе играет наличие микробной пленки, которая представляет собой неминерализованное скопление бактерий, находящееся на поверхности зуба [39].

Взаимодействие разных видов бактерий может замедлять или ускорять развитие пародонтита. На начальной стадии образования зубной бляшки преобладают грамположительные кокковые формы, далее возрастает число грамположительных палочек, и затем увеличивается количество грамотрицательных анаэробных бактерий [11, 33].

Более тридцати видов облигатных грам(-) бактерий проживают в налёте под деснами, в основном это патогены: *P.gingivalis*, *A.actinomycetemcomitans*, *B.forsutus*, *P.intermedia*, *T.denticola* [34].

В глубоких околозубных карманах выделяются *F.nucleatum* и *P.intermedia*. В зоне высокой зубной подвижности – *P.micros* и *C.rectus*. У больных с тяжелыми формами заболевания в слюне обитают – *P.intermedia*, *P.micros* и *C.rectus* [8].

Эндотоксины, выделяемые бактериями, взаимодействуют, с иммуноглобулинами А, М и G, а также с компонентами комплемента, и вызывают деструкцию околозубных тканей. Протеазы микроорганизмов также вызывают повреждение тканей и компонентов иммунной системы человека. Бактериальные токсины являются причиной нарушения клеточного обмена, вызывают альтерацию тканей пародонта, что способствует развитию воспаления [15, 53].

В норме в полости рта у здорового человека высокий уровень колонизации непатогенными микроорганизмами и отсутствие патогенных. При заболевании уровень патогенных бактерий значительно повышается. Следует отметить, что на развитие заболевания также влияет генетическая предрасположенность, нарушение иммунных защитных факторов и условия внешней среды, заболевания ЖКТ, сердечно-сосудистой системы и т.д. [12, 21].

1.4.1. Пародонтопатогены

Главную роль в развитии воспалительных процессов в ротовой полости играют облигатные анаэробы и микроаэрофильные факультативные анаэробы. В особенности к таким бактериям относятся в первую очередь – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, и во вторую – *Prevotella intermedia*, *Parvimonas miera*, *Wollinella recta* (*Campylobacter rectus*), *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum* [52, 70].

Пародонтопатогены делятся на комплексы:

1. «красный» комплекс: *P.gingivalis*, *T.denticola* и *T.forsythia* (раньше *B.forsythus*). Эти бактерии агрессивны, имеют повышенную метаболическую активность к тканям пародонта. Впоследствии это приводит к хронизации инфекции и дальнейшему разрушению костной ткани с выпадением зубов.
2. «оранжевый» комплекс: *Campylobacter* spp., *E.nodatum*, *S.constellatus*, *F.nucleatum*, *P.intermedia/nigrescens*, *P.micros*. Данные микроорганизмы являются патогенами, провоцирующими быстротечное прогрессирование пародонтита. Однако, в норме они могут присутствовать в полости рта в небольшом количестве.
3. «зеленый» комплекс: *A.actinomycetemcomitans* (серотип А), *Capnocytophaga* spp, *E.corrodens*, *C.conciscus*. Эти патогены разрушают околозубные ткани и вызывают воспаление слизистой.
4. «желтый» комплекс: *S. sanguis*, *S.gordonii*, *S.mitis*, *S.intermedius*.
5. «пурпурный» комплекс: *A.actinomycetemcomitans* (серотип В), *V.parvula*, *S.noxia*, *A.naeslundii*, *A.odontolyticus*.

Последние два комплекса содержат бактерии, являющиеся антагонистами по отношению к патогенам, но некоторые из них все же участвуют в развитии пародонтита [17].

Следует помнить, что бактерии из всех комплексов так или иначе способны образовывать налет на зубах (биопленку), в первую очередь это желтый и пурпурный комплексы, в частности роды *Actinomyces*, *Streptococcus*. С формированием биопленки уменьшается концентрация кислорода, вследствие этого начинают активизироваться факультативные анаэробы, и в последствие – анаэробы.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans – грам(-), факультативные анаэробы, спор не образуют, неподвижны, имеют форму коккобацилл.

Штаммы серотипа b образуют много лейкотоксина, являющимся фактором вирулентности, непосредственно связанным с пародонтитом. Данный токсин вызывает киллинг гранулоцитов-лейкоцитов и моноцитов, а также способствует лизису моноцитов, запускает апоптоз иммунных клеток. Поэтому эта бактерия нечувствительна к врожденному иммунитету, так как атакует его [76].

Лизис клеток происходит с выделением ферментов, разрушающих ткани, и пептидов дефензинов, вызывающих гибель микробов и привлекающих иные клетки в воспалительный процесс. Эндотоксин индуцирует разрушение тканей. Липополисахарид активирует образование окиси азота макрофагами, интерлейкинов фибробластами десен, которые влияют на резорбцию костей [69].

Трипсиноподобные протеазы расщепляют фибронектин и коллаген, иммуноглобулин G и сывороточный иммуноглобулин A, IgM in vitro.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans выживают при удалении зубных бляшек механическим путем, они перемещаются в ткани десен, в частности – в клетки эндотелия. Они имеют фимбрии, влияющие на колонизацию и инвазию пародонтальных тканей [51].

Aggregatibacter actinomycetemcomitans выделяется до 26% у здоровых детей и в 40-100% у людей с тяжелой степенью пародонтита.

Данный патоген считается инициатором тяжелых агрессивных форм пародонтита, но не прогрессирующим. При этом немалую роль играют ответные реакции макроорганизма, провоцирующие воспалительный процесс [84].

Tannerella forsythia – трудно культивируемый микроорганизм. Чаще выявляется при генерализованном пародонтите с хроническим течением. Он продуцирует протеолитические и гликолитические ферменты, помогающие связываться с эритроцитами, гранулоцитами, фибробластами. Образование провоспалительных цитокинов у Т-хелперов иницируется поверхностный антигеном BspA (O'Brien-Simpson et al, 2004).

Tannerella forsythia обитает совместно с *Porphyromonas gingivalis*, поэтому имеет способность к проникновению в клетки эпителия. Бактерия может активировать апоптоз клеток, вызывать нарушения целостности мембран митохондрий. *Tannerella forsythia* является маркером начальной стадии пародонтита [85, 86].

Porphyromonas gingivalis имеет 3 фактора вирулентности: липополисахариды, гингипаины, фимбрии.

Они являются облигатными анаэробами и живут лишь при нейтральных значениях pH. Не утилизируют сахара. Штаммы, не имеющие капсул, могут аутоагрегировать и имеют повышенную способность к адгезии на клетки эпителия и другие микроорганизмы. Адгезия к специфическим рецепторам клеток макроорганизма обеспечивается фимбриями, они также способствуют образованию провоспалительных цитокинов и опсонинов, последние усиливают активность фагоцитов и гранулоцитов. В то же время, бактерии инактивируют взаимодействия между интегринами и внеклеточными белками, апоптоз и секрецию интерлейкина 8 (Heitz-Mayfield, 2005; Feng, Weinberg, 2006).

Гингипаины являются протеазами, расщепляющими протеины до пептидов. Они разрушают опсонины, при этом образуются масштабные абсцессы (Amano et al, 2010).

Цистеиновые протеазы гидролизуют пептидные связи, отсоединяют CD14 с моноцитов, имеют коллагеназную способность. Гингипаин R способен изменять степень проницаемости сосудов, при этом активируя продукцию брадикинина; также вызывает разрушение белков системы комплимента; повышает адгезивную способность бактерий к фибробластам и способствует выделению интерлейкина 8.

Липополисахарид является компонентом наружной мембраны. Он активирует продукцию провоспалительных хемокинов и цитокинов макрофагами и моноцитами. Способствует выделению IL4, IL5, IL10, IL13 (Whng, Ohura, 2002).

P.gingivalis выживает внутри клеток эпителия, где вирулентная активность и воспалительный ответ усиливаются.

У людей с тяжелой степенью пародонтита, а также с хроническим пародонтитом находят большое количество *T.forsythia*, *P.gingivalis*, их наличие уменьшает вероятность достижения положительной динамики при терапии. В воспалительных участках обитают много *T.denticola*, *P.gingivalis* и *T.forsythia*, в сравнении с нормальными участками.

Пародонтопатогены 2 типа обитают в биопленке, которая примыкает к эпителию десны, это пигментообразующие микроорганизмы - *T.denticola*, *P.intermedia*, *P.nigrescens* [35, 87, 89].

Prevotella intermedia – грам(-) палочки, неподвижны, облигатные анаэробы, могут жить в щелочной среде. Имеет сахаролитическую способность. Они появляются в полости рта в самом начале воспалительного процесса, сцепливаясь с другими микроорганизмами и прикрепляясь к эпителию.

Из факторов вирулентности у превотелл имеются: ЛПС, протеиназы и цитотоксические продукты обмена. Они способствуют деструкции тканей. Снижают продукцию интерлейкина 8 на макрофагоподобных клетках. Штамм *P.intermedia* 17 имеет в качестве фактора вирулентности фимбрии. У превотелл также имеются гены устойчивости к антибиотикам, и они могут продуцировать В-лактамазы [75].

P.intermedia, *P.nigrescens* проживают в неглубоких патологических и не патологических околозубных карманах и тканях. *P.gingivalis* – в глубоких околозубных карманах. *P.intermedia* чаще обитает в очагах прогрессирующего воспаления.

При наличии глюкозы в среде, патогенность *P.nigrescens*, *P.intermedia* уменьшается, так как в этом случае они продуцируют меньшее количество цитотоксических продуктов (сукцинат, аммоний, изобутират, изовалериат) [83, 92].

Treponema denticola – грам(-), анаэробы, подвижны, обладают сахаролитическими свойствами, имеют спиралевидный вид. Обитают в десневой жидкости, адгезируясь на фибробластах десны. Способны проникать в клетки эпителия. При тяжелых формах гингивита и хроническом пародонтите их численность составляет до 50% [81, 91].

Пориноподобный белок наружной мембраны Msp нарушает обмен кальция и образование цитоскелета у фибробластов, участвует в процессе адгезии к клеткам макроорганизма, обладает цитопатической активностью по отношению к клеткам эпителия, лимфоцитам, фибробластам, эритроцитам, а также ускоряет воспалительную реакцию [65].

У *Treponema denticola* есть белковые АГ — протеолитические ферменты — протеаза, которая гидролизует трансферрин, ламинин, желатин, фибриноген, сывороточный альбумин, коллаген.

Происходит разрушение белков и пептидов, которые отвечают за воспаление и, как следствие, разрушение околозубных тканей [74, 80].

По данным литературы, обнаружение 1 или 2х видов бактерий: *P.gingivalis*, *T.forsythia*, *A.actinomycetemcomitans* (1 тип) или ассоциация одного из них вместе с *Treponema denticola*, говорит о наличии ХГП. *T.denticola* и *P.intermedia* (2 тип) свидетельствуют о риске развития ХГП. Маркером кровоточивости десен является *T.forsythia*, *P.gingivalis* или группы бактерий: *T.forsythia* с *Treponema denticola*; *P.intermedia*, *P.gingivalis*, *T.forsythia*; *P.intermedia*, *P.gingivalis*, *T.forsythia*. *T.denticola*; *P.gingivalis*, *T.forsythia*, *A.actinomycetemcomitans*, *T.denticola* [51].

1.4.2. Формы пародонтита

Степень проявления пародонтита может быть острой (с ярким проявлением симптомов) и хронической (вялотекущий процесс разрушения тканей).

Обратимая начальная форма пародонтита характеризуется поверхностным течением, легкой болезненностью при приеме пищи и

гигиене зубов, присутствуют неглубокие десневые карманы. На данном этапе заболевание легко поддается лечению.

Необратимая форма пародонтита развивается при отсутствии лечения и переходит в хронический процесс. Появляется ноющая боль, кровоточивость десен, подвижность зубов.

Пародонтит может быть локализованным (с поражением 1 или 2 зубов) или генерализованным (поражать все зубы) [1, 2].

1.4.3. Стадии развития пародонтита

Первая стадия пародонтита легкая, ей предшествует гингивит, при котором происходит поверхностное воспаление десен. Появляется небольшая кровоточивость и отек десен, глубина зубодесневого кармана до 3,5 мм. Смещения зубов не наблюдается, общее состояние пациента не нарушено.

Вторая стадия – средняя, растет количество зубных отложений, попадающих вглубь десны и формирующих более глубокие пародонтальные карманы до 5,5 мм. Происходит медленное разрушение костной ткани и появляется подвижность зубов 1-2 степени.

Третья стадия – тяжелая, характеризуется увеличением глубины зубодесневых карманов более 6 мм, присоединением бактериальной инфекции и образованием гнойных очагов. Возрастает подвижность зубов до 2-3 степени и происходит разрушение костной ткани.

Фаза ремиссии: бледно-розовая десна, плотно прилегающая к поверхности зуба; глубина зубодесневого кармана сохраняется, но при некоторых видах хирургической терапии может уменьшаться до одного-двух мм или отсутствовать; улучшается жевательная функция [47].

1.5. Реакция иммунной системы

Инфекция в ротовой полости развивается, когда происходит нарушение местных или системных защитных факторов [39]. При пародонтите изменяются показатели неспецифической реактивности, у пациентов могут

снижаться: количество сывороточного пропердина и титр комплемента, уровень лизоцима сыворотки крови, фагоцитарная активность лейкоцитов [73].

Защитный механизм от бактериальных инфекций во рту – это фагоцитоз, его осуществляют нейтрофилы (моноциты). Сюда же относится механизм защиты в виде комплемента (плазматические белки), которые активно взаимодействуют между собой, и далее с мембранными белками клеток, благодаря чему защищают макроорганизм от пародонтопатологий. Исходя из вышесказанного, фагоцитоз, образование антител и компонентов комплемента (интерлейкин 1) способствуют формированию первичной защиты тканей пародонта от патогенов [3, 34].

Общеизвестно, что специфическая иммунная реакция человека работает через Т- и В-лимфоциты. Макрофаги презентируют Т-лимфоцитам АГ. Т-хелперы 1 типа производят интерлейкин-2 (клеточный иммунитет), 2 типа – интерлейкины 4, 5, 10 (гуморальный иммунитет). В-лимфоциты продуцируют антитела.

Гуморальные факторы местной защиты:

1. Иммуноглобулины А противостоят адгезии микробов к клеткам эпителия.
2. Фермент лизоцим содержится в слюне. Источник – моноциты и нейтрофилы. Действует на грам(+) кокки, иногда на грам(-) представителей. Лизоцим деполимеризует ПС, находящиеся в КС патогенов. Он также усиливает фагоцитоз, а объединяясь с иммуноглобулином А – обеспечивает лизис микроорганизмов.
3. Белок лактоферрин. Имеет бактериостатическое действие, связывает железо, благодаря чему его не могут получить бактерии для своих нужд. Место накопления – десневая борозда, источник – нейтрофилы.
4. Слюна – очищение слизистой от патогенов. Бактерицидные свойства, присутствие ферментов, IG, лейкоцитов.

5. Десневая жидкость – содержит компоненты комплемента, АТ, лейкоциты [4, 23].

Макрофаги производят большое количество противовоспалительных цитокинов посредством разрушения тканей пародонта. Воспаление околозубных тканей представлено плазматическими клетками, которые производят антитела в количестве приблизительно 50% от общей численности В-клеток. Происходит повышенная продукция IgG, и, как следствие, разрушение пародонтальных тканей. Такой же высокий уровень IL-1, IL-6 и TNF-альфа приводит к тому же исходу. При этом десна выглядят воспаленными и покрасневшими, кровоточат [73, 88].

1.6. Лечение и профилактика

По мере накопления зубного налета меняется микробный состав ротовой полости, со временем он изменяется в сторону доминирования патогенных облигатных анаэробов. Воспалительная реакция все больше прогрессирует, лейкоциты и иные клетки производят медиаторы воспаления (протеазы, простаноиды, цитокины). В конечном итоге околозубные ткани разрушаются [5, 9].

Именно поэтому лечение пародонтита должно быть основано на снижении бактериальной нагрузки и усилении защитных функций макроорганизма. Перед лечением обязательно необходимо обеспечить хорошую гигиену ротовой полости пациента. Регулярно должна проводиться эффективная чистка зубов щеткой и зубной нитью, во избежание накопления поддесневого налета и размножения патогенных бактерий соответственно.

Зубной камень удаляется специальными инструментами, что препятствует размножению патогенов и активизирует рост полезных бактерий [49].

При наличии у пациента глубоких зубных карманов, терапия проводится в два этапа: сначала это правильная гигиена ротовой полости, удаление зубного налета, сглаживание корней, полировка зубной эмали,

бактериальный контроль ротовой полости. Затем – лечение антибиотическими препаратами, еще более интенсивное сглаживание корней и хирургические манипуляции [32].

При пародонтите тяжелой степени проводят бактериологическое исследование содержимого из областей с наибольшим поражением с целью определения специфических патогенных бактерий и их чувствительность к антибактериальным препаратам. Зубы, которые не поддаются лечению удаляются, корни ампутируются [29].

1.7. Антагонистическая активность микроорганизмов

Антагонистическая активность бактерий возникает в результате взаимодействия бактерий, при этом более активный штамм образует антибактериальные соединения, которые ингибируют жизнедеятельность других микроорганизмов.

Возникновение антагонистических свойств у бактерий происходит после их взаимодействия с чувствительным тест-штаммом микроорганизма. Клеточные метаболиты, а также компоненты клеточной стенки чувствительных штаммов способствуют образованию антибактериальных продуктов у бактерий-антагонистов.

Известно, что молочнокислые бактерии способны продуцировать антибиотические вещества (антибиотики, литические ферменты, бактериоцины, токсины), ингибируя рост патогенной микрофлоры [24].

В микроаэрофильной среде с содержанием кислорода 3-5% антагонистическая активность у молочнокислых бактерий проявляется лучше, чем в анаэробных условиях [6, 26].

Существуют препараты, содержащие смесь бактерий, например *L.plantarum* и *L.fermentum*, которые вместе усиливают антагонистические свойства друг друга [43, 61].

L.reuteri 1063 способна к биосинтезу бактериоцина рейтерина, действующего на *E.coli* [66].

Штаммы *Enterococcus faecium* B-3490, *Lactococcus lactis* B-2014, *Lactobacillus buchneri* B-5812, *Lactobacillus buchneri* B-1599, *Lactobacillus brevis* B-572, *Lactobacillus buchneri* B-7641 способны ингибировать рост *P.mirabilis*, *E.coli* (Ковалевская и др, 2016). *E.faecalis* обладает антагонистической активностью по отношению к *M.luteus* [7, 41].

Коринебактерии имеют ингибиторы каталазы, тем самым подавляя антиоксидантную систему защиты транзитных бактерий, продуцируют бактериоцины и подобные вещества, лизоцим и органические кислоты. В частности, в литературе есть данные о подавлении *C.amycolatum*, *C.minutissimum*, *C.urealyticum* роста *S.aureus* [13, 59, 72].

Бифидобактерии способны образовывать биологически активные вещества против условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, например – *E.coli*, *S.aureus* [44].

Род *Bacillus*. Производят вторичные метаболиты, дипептиды с низким молекулярным весом [63, 78, 79].

Streptococcus salivarius продуцирует молочную кислоту, образует сливарцины, отрицательно действующие на рост *Streptococcus spp.*, *Aggregatibacter spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Actinomyces spp.* Способен образовывать декстраназу (фермент, оказывающий влияние на деструкцию налета на зубах), а также уреазу (нейтрализует кислотность во рту) [7, 14, 20, 24, 55].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве материала для исследования послужили: ротовая жидкость и жидкость с пародонтальных карманов от 102 пациентов с заболеваниями пародонта в возрасте от 32 до 68 лет. Клинический материал был получен из стоматологической поликлиники №2 и стоматологической клиники «Примадент» г. Уфа.

Практическая часть эксперимента была выполнена на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского Государственного Медицинского университета.

2.2. Подготовка лабораторной посуды

Лабораторная посуда должна быть чисто вымыта, для этой цели используют нейтральные моющие средства, дополнительно для чистки могут использоваться специальные ершики и щетки. Вымытую в водопроводной воде посуду ополаскивают дистиллированной водой, после чего высушивают на лабораторных подносах при комнатной температуре.

После этого посуду упаковывают в крафт бумагу или фольгу и ставят в сухожаровые шкафы на некотором расстоянии друг от друга и от стенок прибор. Режим стерилизации устанавливают на 90 минут при 180°C (для чашек) и 60 минут при 160°C (для флаконов и пробирок). По завершению стерилизации сухожаровой шкаф не открывают до тех пор, пока температура в нем не снизится до комнатной. После чего посуда может быть использована по необходимости.

Стерильные флаконы с питательной средой стерилизуют насыщенным паром под давлением (автоклавирование) при 1,1 атм (121°C) в течение 15 минут. По завершению стерилизации автоклав отключают, флакон со средой удаляют из автоклава, после чего производят разлив среды в необходимую посуду.

2.3. Приготовление питательных сред для культивирования бактерий

Кровяной агар – питательная среда на основе ГМФ-агара (НИЦФ, Россия) с добавлением 5% животной крови, благодаря чему происходит улучшение роста многих микроорганизмов, при этом можно наблюдать гемолиз, что способствует идентификации бактерий.

Состав среды, г/л: пептон мясной – 15, натрий хлористый – 8, агар бактериологический – 10.

Приготовление: 36 г агара размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стеклянные флаконы и автоклавируют при температуре 121 °С в течение 15 минут. Среду охлаждают до температуры 50°С, добавляют 5% животной крови, перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри по 25 мл. После застывания агара в стерильных условиях чашки подсушивают при температуре 37°С в течение 40-60 минут. Готовую среду можно использовать в течение 7 суток при хранении в холодильнике.

Шоколадный агар - пригоден для выращивания прихотливых бактерий (*Neisseria*, *Haemophilus* и *Streptococcus*). Среда на основе ГМФ-агара (НИЦФ, Россия), обогащена кровью, лизированной высокой температурой.

Приготовление: 36 г агара размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стеклянные флаконы и автоклавируют при температуре 121 °С в течение 15 минут. Среду охлаждают до температуры 75°С, вливают 5% животной крови, перемешивают, затем, помешивая, греют на водяной бане 4-5 минут. Разливают в стерильные чашки Петри по 25 мл. После застывания агара в стерильных условиях чашки подсушивают при температуре 37°С в течение 40-60 минут. Готовую среду можно использовать в течение 12 суток при хранении в холодильнике.

Желточно-солевой агар – селективная среда на основе солевого агара (НИЦФ, Россия) с добавлением желтка куриного яйца (для обнаружения

лецитиназного венчика) и высокой концентрации хлорида натрия, предназначенная для выращивания стафилококков.

Состав среды, г/л: натрия хлорид – 75, натрий углекислый – 0,15, динатрия фосфат обезвоженный – 0,5, агар – 35.

Приготовление: 110 г сухой питательной среды размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные флаконы и автоклавируют при температуре 121°C, 15 мин. Среду охлаждают до температуры 50°C, добавляют желток куриного яйца, размешивают, разливают в стерильные чашки Петри по 25 мл. После застывания среды, соблюдая правила асептики, чашки подсушивают при температуре 37°C в течение 40-60 мин. Готовая среда в чашках Петри прозрачная, желтого цвета.

Готовый электролитно-солевой агар допускается использовать в течение 15 сут, при температуре хранения от 2 до 8 °C.

Среда Эндо (Оболенск, Россия) – используется для культивирования энтеробактерий. При росте лактозоположительные бактерии дают красно-розовую окраску, а лактозоотрицательные – прозрачную.

Состав среды, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 12, дрожжевой экстракт – 1, натрия хлорид – 3,4, Д(+)лактоза – 10, натрия сульфит безводный – 0,8, натрия фосфат 2-зам. 12-водный – 0,5, фуксин основной – 0,2, агар – 10.

Приготовление: растворить 41,5 г среды в 1 л дистиллированной воды. Довести до кипения, чтобы среда полностью растворилась. Тщательно перемешать и разлить в стерильные чашки Петри. Среда чувствительна к свету!

Энтерококк агар (Оболенск, Россия) – питательная среда для культивирования энтерококков.

Состав среды, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки с твином сухой – 10,5, дрожжевой экстракт – 5, Д-глюкоза – 2,0, калия фосфорнокислый однозамещенный – 2, натрия углекислый – 1,5 ± 0,5, натрия

азид – 0,5; 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид – 0,1, кристаллический фиолетовый – 0,001, агар микробиологический – 10 ± 2 .

Приготовление производится также, как и с другими средами, автоклавирования не происходит. Готовую среду можно использовать в течение 10 дней при хранении при температуре холодильника и в течение 3 дней при комнатной температуре (компоненты среды разрушаются на свету).

MRS агар (HIMEDIA, Индия) – среда для выращивания лактобактерий. Компоненты среды подавляют рост *P.aeruginosa* и *E.coli*.

Состав среды, г/л: Пептон из казеина – 10, мясной экстракт – 8, дрожжевой экстракт – 4, глюкоза – 20, фосфат калия двузамещенный – 2, твин-80 – 1, аммоний лимоннокислый двузамещенный – 2, ацетат натрия – 5, сульфат магния – 0,2, сульфат марганца – 0,04, агар – 14. Приготовление аналогично другим средам.

Готовая питательная среда коричневого цвета. Ею можно пользоваться в течение 10 дней после приготовления, держа в холодильнике и 5 дней при комнатной температуре.

Агар Сабуро (Оболенск, Россия) – питательная среда для выращивания дрожжеподобных и плесневых грибов. Для ингибирования роста сопутствующих микроорганизмов используется антибиотик Левомецитин.

Состав среды, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 10, панкреатический гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 2, натрия фосфат однозамещенный – 2, Д-глюкоза – 40, агар – 10.

Приготовление: Среду в нужном количестве (указанном на этикетке) размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в емкости, перед стерилизацией добавляют левомицитин (или хлорамфеникол) из расчета 100 мг на 1 л среды и автоклавируют при температуре 121 °С в течение 15 мин. Среду охлаждают до температуры 50 °С, разливают в

стерильные чашки Петри по 25 мл и после застывания подсушивают при 37 градусах.

Готовая питательная среда прозрачная, желто-коричневого цвета. Допускается легкая опалесценция. Агар можно использовать в течение семи дней при хранении в условиях температуры холодильника.

Тиогликолевая среда (Оболенск, Россия) – среда для контроля стерильности, а также для культивирования различных аэробов и анаэробов.

Состав среды, г/л: панкреатический гидролизат казеина – 15, дрожжевой экстракт – 5, натрия хлорид – 2,5, Д-глюкоза – 5, натрия тиогликолят – 0,5, натрий углекислый – 0,8, цистеина гидрохлорид – 0,75, агар – 10.

Приготовление: 30г питательной среды, размешивают в 1 л дистиллированной воды, кипятят 2 мин до полного расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 5 мл в стерильные пробирки и автоклавируют при температуре 121 °С в течение 15 минут.

После культивирования в бульоне, учет результатов проводят визуально (степень помутнения среды, наличие пленки или осадка).

Агар Мюллера Хинтона (HIMEDIA, Индия) - среда для определения чувствительности бактерий к антибиотикам.

Состав среды, г/л: мясной экстракт сухой - 3, гидролизат казеина кислотный сухой - 17,5, крахмал растворимый - 0,5, агар микробиологический - 17. Приготовление аналогично другим средам.

Готовую среду можно использовать в течение 7 дней, храня в холодильнике.

2.4. Метод культурального посева на питательные среды

Перед посевом берут сосуд с расплавленной и остуженной до 45°С питательной средой и разливают в стерильные стеклянные чашки Петри по 25мл (в стеклянные) либо 20 мл (в пластиковые). После застывания среды

чашки Петри сушат при 37°C около часа. Далее используют по необходимости либо помещают в холодильник на хранение.

Первичный посев биологических жидкостей производился в первый же день получения материала. Биоматериал тщательно растирали петлей в первом секторе чашки Петри, после чего петлю прожигали, затем от 1 сектора проводили штрихи во 2 секторе, после чего проделывали те же действия со 3 и 4 секторами. Инкубация проводилась в термостате при 37°C на протяжении суток, энтерококк агар и желточно-солевой агар – двое суток; MRS-агар – два дня при 37°C в термостате с подачей CO₂. Первичный посев на среду Сабуро производился 3мя проколами в толщу агара с последующей инкубацией в течение четверо суток при 28°C.

После чего проводили вторичные пересевы выросших бактерий для получения чистых культур с целью их идентификации: отдельные культуры микроорганизмов тщательно растирали петлей в первом секторе чашки Петри, после чего петлю прожигали и снова проводили петлей по 1 сектору, делая при этом 4 линии, перенося материал на 2 сектор, далее проделывали те же действия со 3 и 4 секторами. Либо производили посев методом истощающего штриха в модификациях. Инкубация проводилась по той же схеме, что и при первичных посевах.

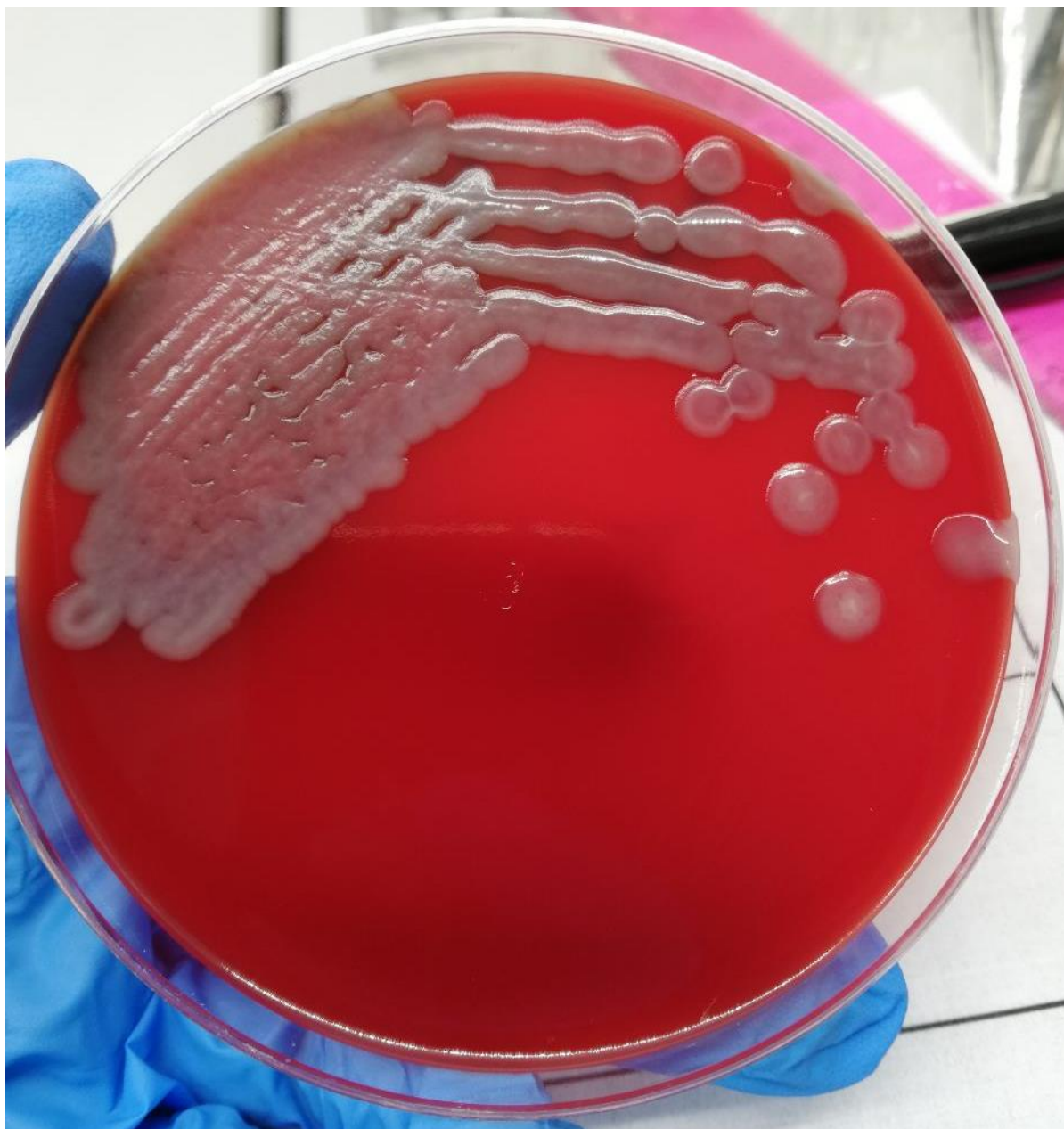


Рисунок 1. Чистая культура *Bacillus megaterium*



Рисунок 2. Чистая культура *M.luteus*



Рисунок 3. Чистая культура *S.epidermidis*



Рисунок 4. Чистая культура *E.coli*



Рисунок 5. Чистая культура *Candida tropicalis*



Рисунок 6. Чистая культура *S.aureus*

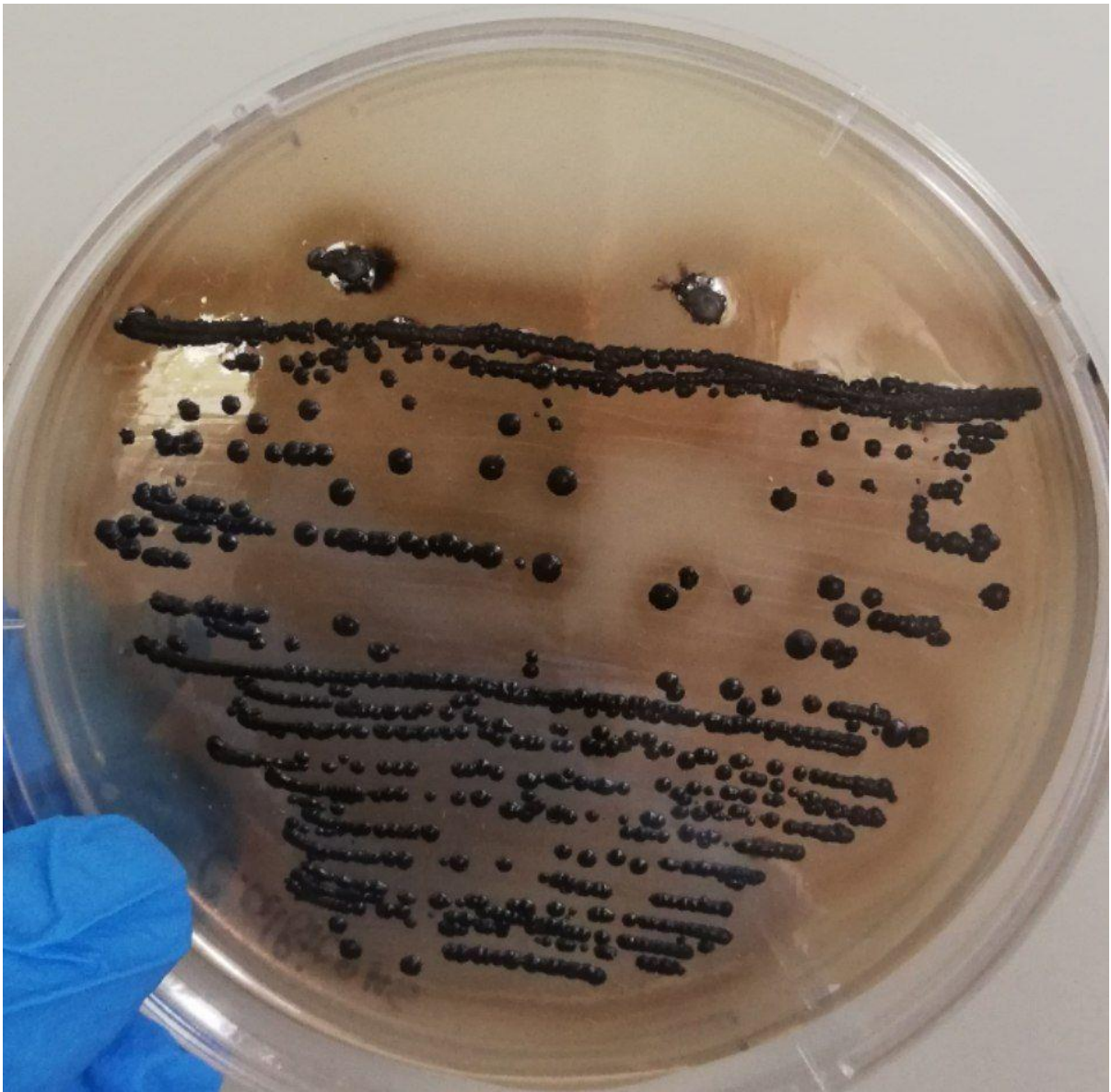


Рисунок 7. Чистая культура *C.albicans*

2.5. Метод идентификации бактерий. Масс-спектрометрия

Идентификация микроорганизмов проводилась при помощи автоматизированного масс-спектрометра AUTOF MS2600.

Устройство масс-спектрометра:

1. Система ввода исследуемого образца.
2. Источник ионизации с ускорителем для ионов.
3. Анализатор масс (для разделения ионов m/z)
4. Детектор

5. Устройство для регистрации.

Во избежание столкновения ионов с другими атомами или молекулами, анализ происходит в вакууме.

Принцип работы масс-спектрометра. Для идентификации бралась чистая культура микроорганизма и наносилась на многоразовую металлическую пластину из нержавеющей стали, после подсыхания колонии туда же капали матрицу в объеме 0,11 мкл, ждали высыхания матрицы. Затем пластина помещалась непосредственно в прибор, там на матрицу с неизвестным микроорганизмом начинают действовать импульсы лазера. Матрица превращает энергию лазера в энергию возбуждения и помогает в ионизации белков бактерий (рибосомальных). Происходит ионизация, после чего ионы в электромагнитном поле с разной скоростью поднимаются по пролетной трубе до масс-анализатора, где разделяются по соотношению масса/заряд. Чем меньше масса иона, тем медленнее скорость его пролета. Нейтральные ионы удаляются вакуумом. Затем разделенные ионы перемещаются в зону детектора. Вычисляется скорость перемещения ионов до детектора и отношение массы к заряду для ионов. В результате строятся спектры масс анализируемых образцов, которые сравниваются с уже известными спектрами, находящимися в базе [67, 68, 77].

2.6. Метод накопления биомассы бактерий

Для последующего выявления антибактериальной активности идентифицированные культуры с помощью петли помещали в эппендорфы с тиогликолевой средой в объеме 1 мл, в таком виде инкубировали в термощейкере при 37°C двое суток (рис. 8), после чего откручивали эппендорфы в центрифуге на 15.000 оборотов в течение 1 минуты, далее работали непосредственно с надосадочной жидкостью.

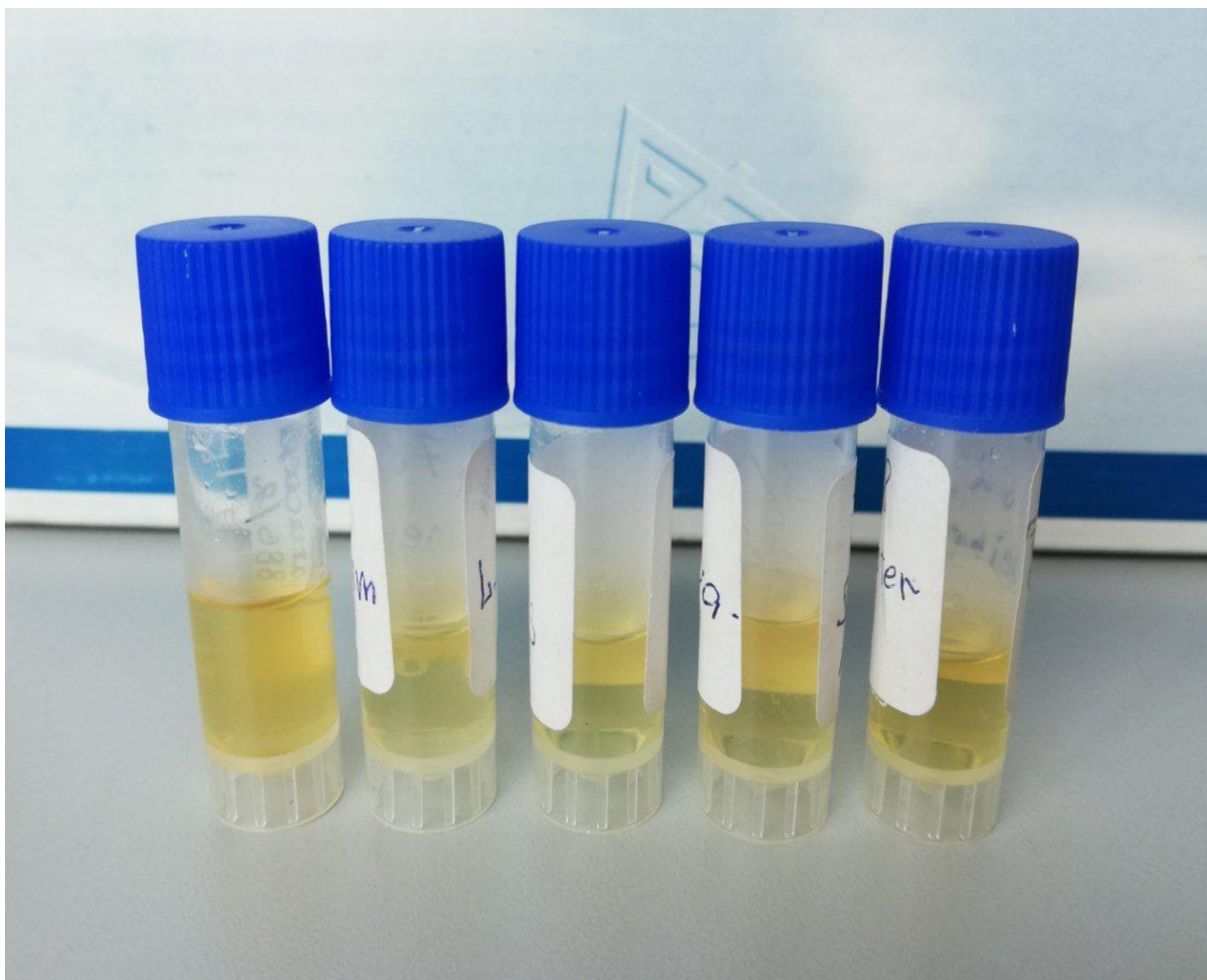


Рисунок 8. культуры микроорганизмов в тиогликолевой среде

2.7. Метод выявления антибактериальной активности. Система двойных репортеров Dualrep2

В настоящее время весьма актуальна проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам, система двойных репортеров Dualrep2 позволяет производить поиск новых антибиотиков и узнавать механизм их действия.

Для определения антибактериальных свойств использовали генномодифицированный штамм *E.coli* BW25113 дельта *tolC*. Данный штамм кишечной палочки имеет высокую чувствительность к антибактериальным метаболитам, потому что у него вырезан ген *tolC*. Благодаря *tolC* – порину клетка способна удалять разные компоненты через внешнюю мембрану.

Также штамм содержит в себе встроенную генетическую конструкцию – плазмидный вектор pDualrep2 с двумя генами флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм). При действии антибактериального вещества на процесс синтеза белка, увеличивается экспрессия дальнего красного белка Katushka2S и вокруг зоны ингибирования роста образуется флуоресцентное свечение красного цвета. Экспрессия красного белка RFP возрастает при нарушении в процессах репликации ДНК или транскрипции – появляется свечение зеленого цвета. Флуорофор образуется из аминокислотных остатков самого белка под действием кислорода (An, Tolliday, 2010; Osterman, 2016; Шуленина и др, 2018; Лукьянов и др, 2023). [31, 57, 62, 82].

Посев *E.coli* BW25113 производили в чашки Петри газонным методом (суспензию микроорганизмов набирали электронным дозатором и вливали на поверхность агара, при это чашку слегка покачивали для равномерного распределения бактерий по поверхности среды, затем слегка подсушивали с приоткрытой крышкой при комнатной температуре) на среду LB (состав: дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, триптон – 10 г/л). Далее с помощью электронного дозатора на чашку капали по 5 мкл суспензии от центрифугированных микроорганизмов. Для контроля эксперимента использовали антибиотики: эритромицин, служащий маркером нарушения синтеза белка в клетке и левофлоксацин, являющийся маркером включения в клетке SOS-ответа (рис. 20). Затем посеы инкубировали в термостате на 37°C в течение 24ч.

Полученные результаты анализировали благодаря прибору Bio RAD ChemiDoc MP Imaging System. Данный прибор представляет собой темновую камеру с возможностью нижней (УФ) и верхней (видимого спектра) подсветки, и их совмещения. Система позволяет работать с мультиплексной флуоресценцией в диапазоне 400-900 нм в пределах от синего до ближнего

инфракрасного света. Максимальный размер анализируемого образца: 18,8*22 см.

2.8. Выявление антагонистической активности бактерий методом перпендикулярных штрихов

Идентифицированные бактерии (*Lactobacillus fermentum*, *L.plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus salivarius*, *S.epidermidis*, *K.pneumoniae*) по отдельности засеивали на агар мюллера хинтона вертикальным штрихом по центру чашки Петри. Затем инкубировали *Lactobacillus fermentum*, *L.plantarum* в термостате на 37°C с подачей углекислого газа двое суток, *Enterococcus faecium* в обычном термостате на 37°C также двое суток, остальные бактерии – в течение 24 ч. После инкубации на чашки перпендикулярными штрихами от края чашки к центру засеивали *S.aureus*, *Ps.aeruginosa* и *E.coli*. Инкубировали сутки при 37°C с последующим измерением (в мм) зон ингибиции роста.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов

Благодаря масс-спектрометру было идентифицировано 53 вида бактерий и 10 видов грибов (6 дрожжеподобных видов и 4 плесневых), обитающих в ротовой полости: *Staphylococcus equorum*, *S.capitis*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.haemolyticus*, *Streptococcus oralis*, *St.lutetiensis*, *St.infantis*, *St.constellatus*, *St.viridans*, *St.koreensis*, *St.gallolyticus*, *St.salivarius*, *St.mitis*, *St.vestibularis*, *St.anginosus*, *St.gordonii*, *St.mutans*, *St.parasanguinis*, *Lactobacillus fermentum*, *L.paracasei*, *L.salivarius*, *L.paraplantarum*, *L.zeae*, *Leuconostoc citreum*, *Cor.afermentas*, *Cor.amycolatum*, *Enterobacter kobei*, *E.coli*, *Pr.mirabilis*, *K.pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Ent.faecium*, *Ps.aeruginosa*, *Bac.megaterium*, *Bac.pseudomycooides*, *Mycobacterium interjectum*, *M.sherrisii*, *M.murale*, *Neisseria macacae* *Acinetobacter lwoffii*, *A.junii*, *A.baumannii*, *A.pittii*, *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rothia mucilaginosa*, *Mobiluncus mulieris*, *Weissella cibaria*, *Kocuria rhizophila* и грибы: *C.albicans*, *C.crusei*, *C.tropicalis*, *C.kefyr*, *C.dublinskiensis*, *C.lusitaniae*, *Alternaria alternata*, *Penicillium urticae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus chevalieri*.

Ниже представлены примеры масс-спектров бактерий (рис. 9-12):

Identification Result: *Streptococcus oralis* 6.248

Mass Spectrum

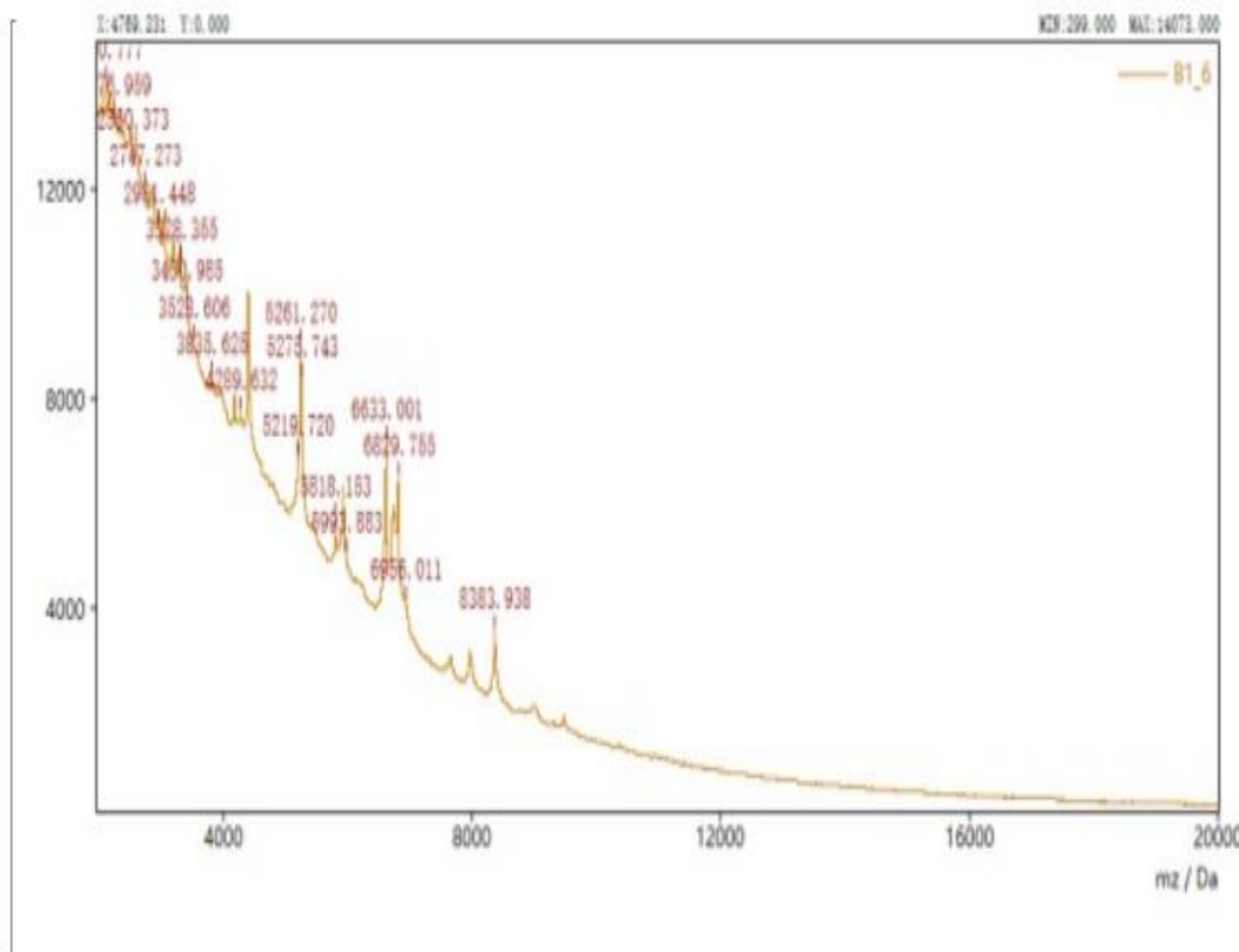


Рисунок 9. Масс-спектр *Streptococcus oralis*

Identification Result: *Staphylococcus epidermidis* 9.131

Mass Spectrum

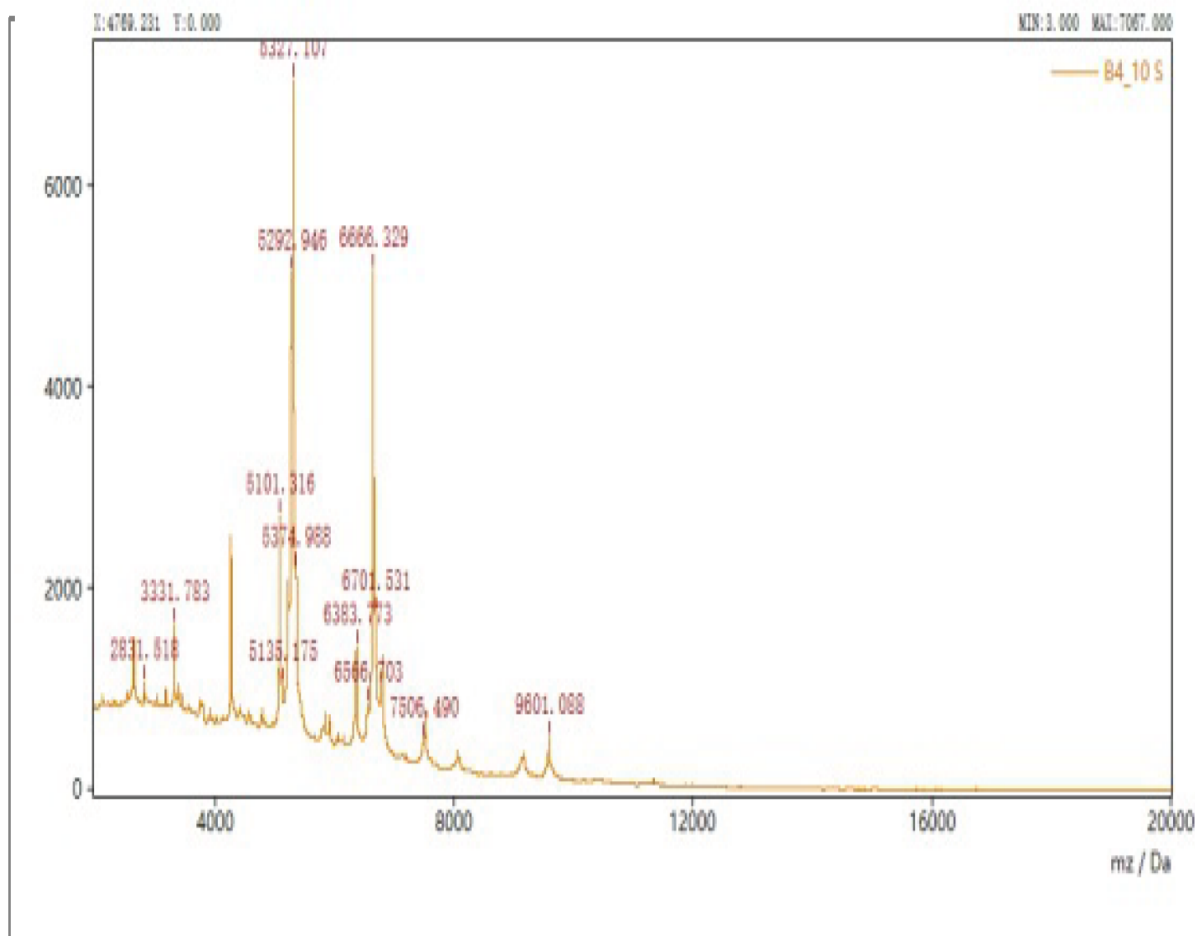


Рисунок 10. Масс-спектр *Staphylococcus epidermidis*

Identification Result: *Enterococcus faecalis* 7.108

Mass Spectrum

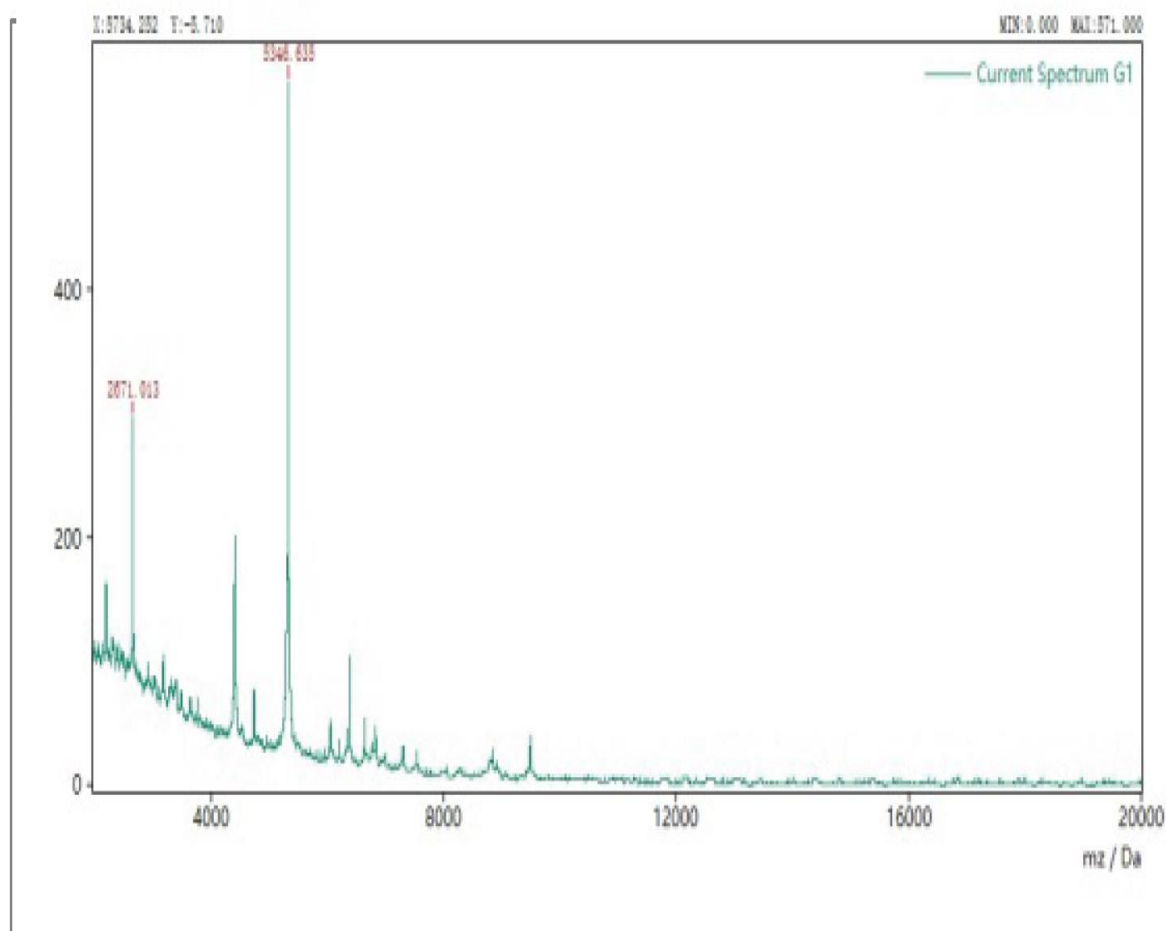


Рисунок 11. Масс-спектр *Enterococcus faecalis*

Identification Result: *Lactobacillus salivarius* 6.329

Mass Spectrum

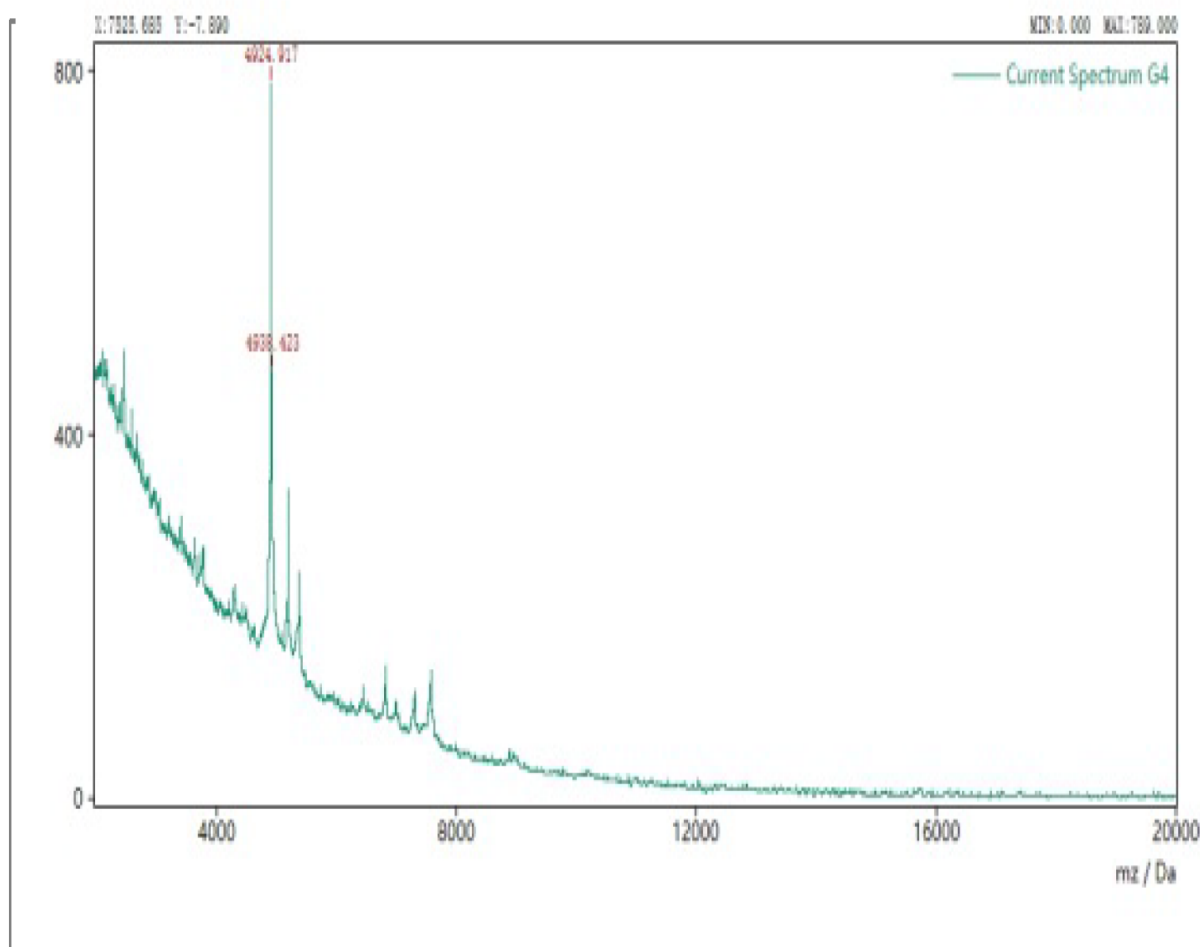


Рисунок 12. Масс-спектр *Lactobacillus salivarius*

Среди облигатно-аэробных бактерий было выявлено 10 видов, относящихся к 7 родам: *Neisseria macacae*, *Ps.aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Kocuria rhizophila*, *Arthrobacter sulfonivorans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Ac.baumannii*, *Ac.junii*, *Ac.pittii*. Частота встречаемости данных бактерий у пациентов представлена на рисунке 13.

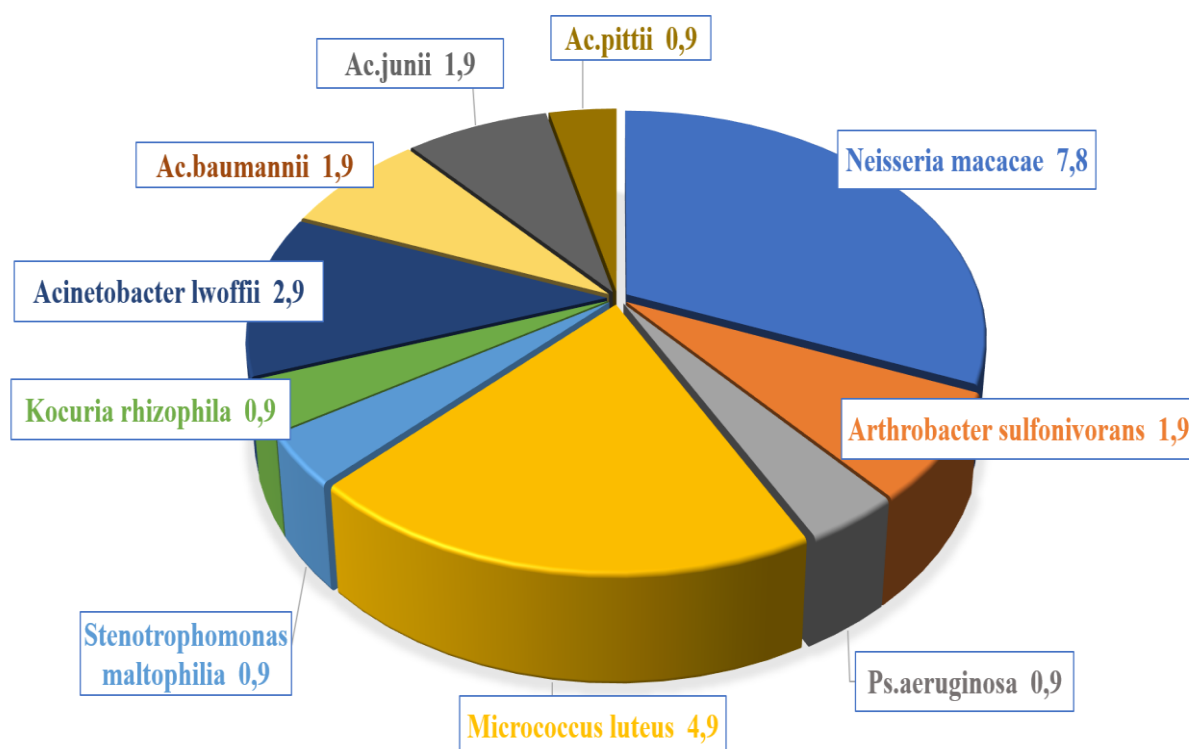


Рисунок 13. Аэробные микроорганизмы, % встречаемости у пациентов

Среди факультативно-анаэробных микроорганизмов было выявлено 42 вида, относящихся к 15 родам (рис. 15). Преимущественно это – стрептококки, стафилококки, энтеробактерии, лактобактерии и др. Из них – 14 видов стрептококков (*Streptococcus oralis*, *St.lutetiensis*, *St.infantis*, *St.constellatus*, *St.viridans*, *St.koreensis*, *St.gallolyticus*, *St.salivarius*, *St.mitis*, *St.vestibularis*, *St.anginosus*, *St.gordonii*, *St.mutans*, *St.parasanguinis*), 7 видов стафилококков (*S.equorum*, *S.capitis*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *St.haemolyticus*, *S.hominis*), 5 видов лактобактерий (*Lactobacillus fermentum*, *L.paracasei*, *L.salivarius*, *L.paraplantarum*, *L.zae*) и др.: *Enterococcus faecalis*, *Ent.faecium*, *Cor.afermentas*, *Cor.amycolatum*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bac.megaterium*, *Mycobacterium interjectum*, *Myc.sherrisii*, *Enterobacter kobei*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *E.coli*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Rothia mucilaginosa*, *Microbacterium murale*.

Из стрептококков наиболее часто встречался *St.viridans* (у 15 пациентов), *St.salivarius* (у 14 пациентов), *St.oralis* (12 пациентов) и *St.anginosus* (10 пациентов). Среди стафилококков – *S.epidermidis* (21 пациент) и *S.haemolyticus* (8 пациентов) (рис. 14).

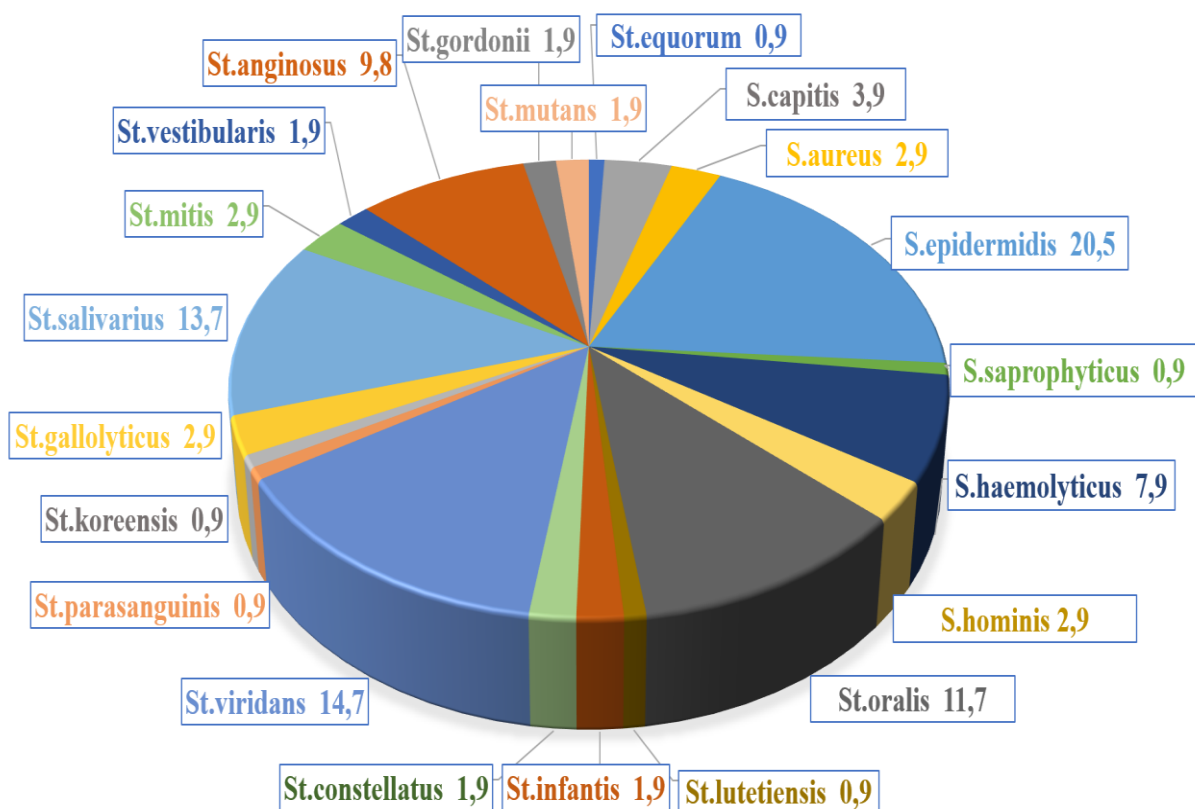


Рисунок 14. Факультативно-анаэробные микроорганизмы. *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, % встречаемости у пациентов

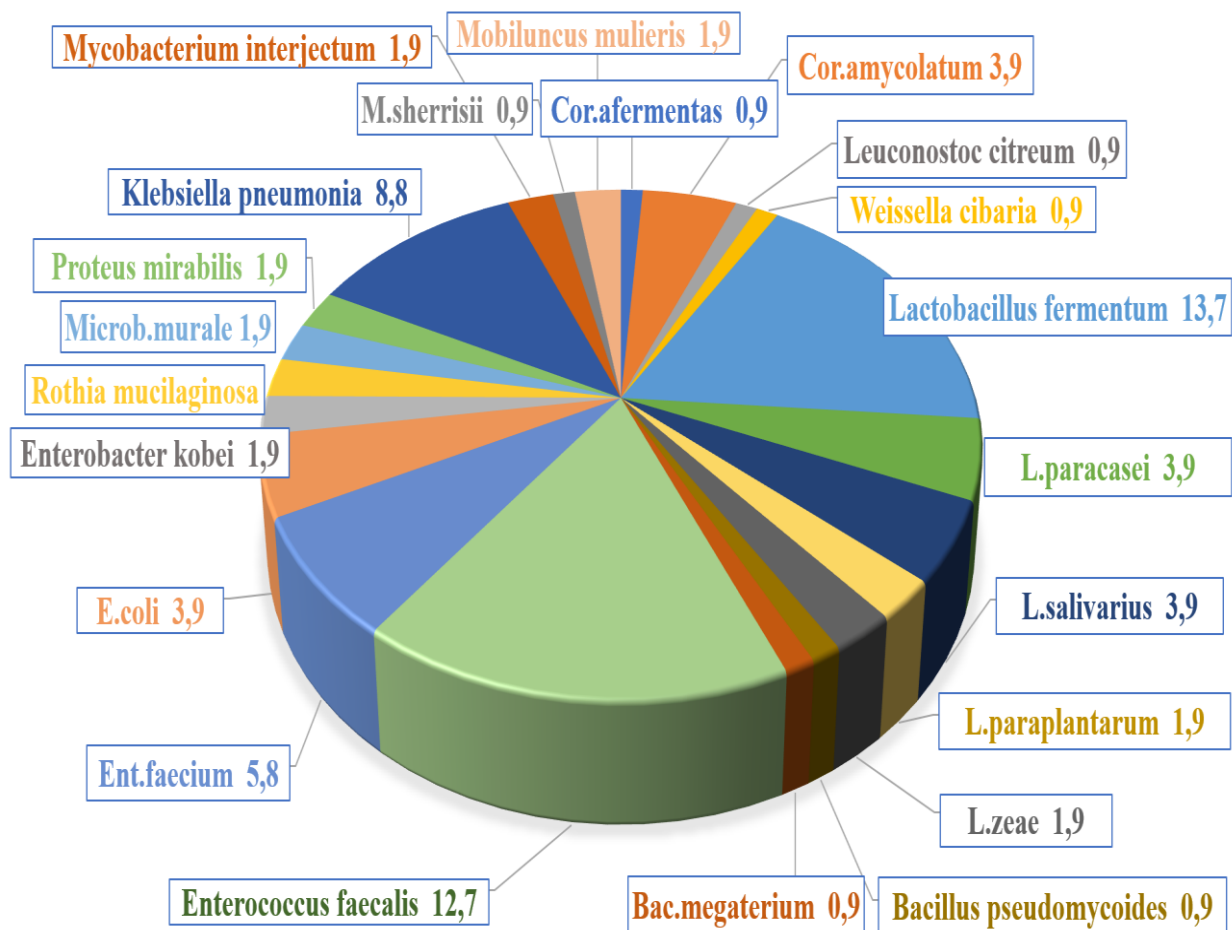


Рисунок 15. Факультативно-анаэробные микроорганизмы, % встречаемости у пациентов

Также было идентифицировано 10 видов грибов: 6 дрожжеподобных видов рода *Candida* (*C.albicans*, *C.crusei*, *C.tropicalis*, *C.kefyr*, *C.dublinskiensis*, *C.lusitaniae*) и 4 вида плесневых грибов (*Alternaria alternata*, *Penicillium urticae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus chevalieri*) (рис. 16).

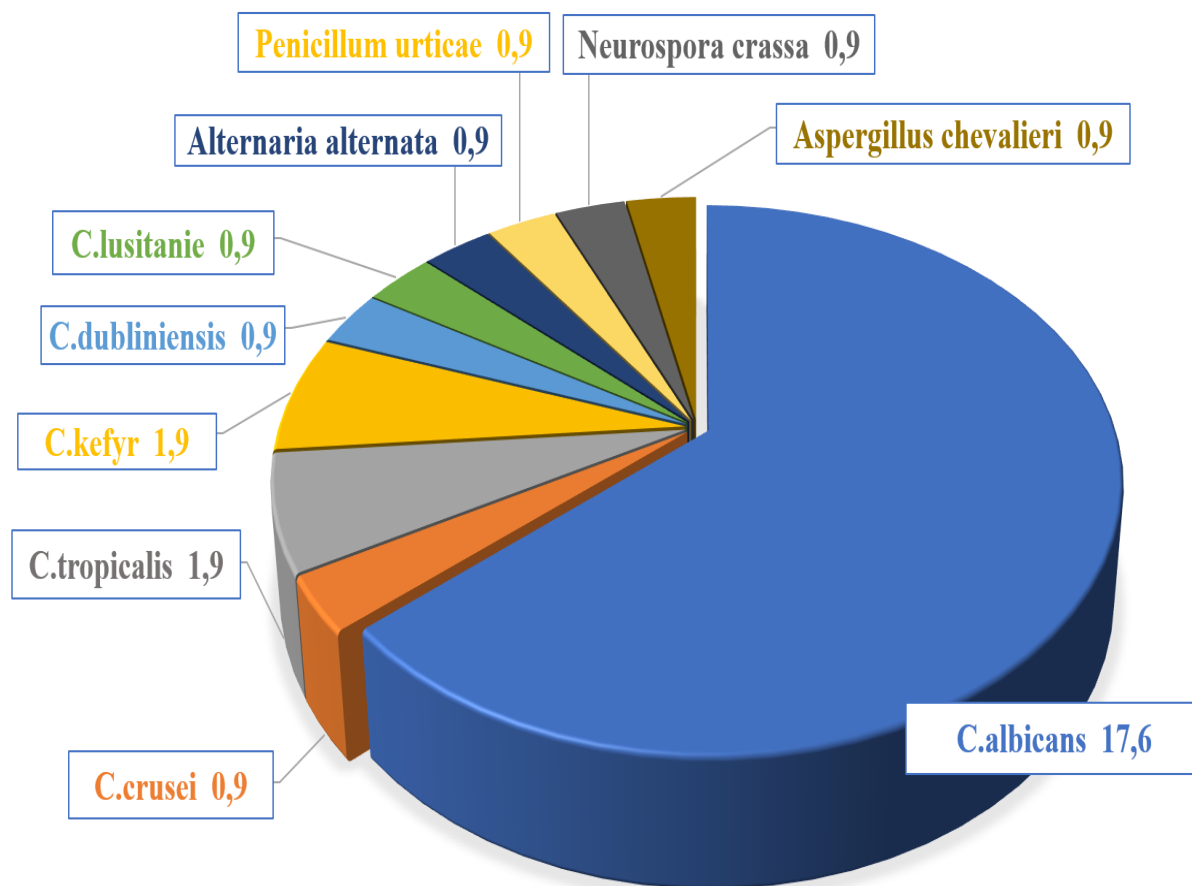


Рисунок 16 . Грибы, % встречаемости у пациентов

Общий анализ частоты встречаемости микроорганизмов, населяющих пародонтальные карманы, показал, что наиболее часто встречающимися являются бактерии из семейств: *Streptococcaceae* (60,7%), *Staphylococcaceae* (35,2%), *Enterobacteriaceae* (35,2%), *Lactobacillaceae* (25,4%) и грибы рода *Candida* (24,5%) (рис. 17).

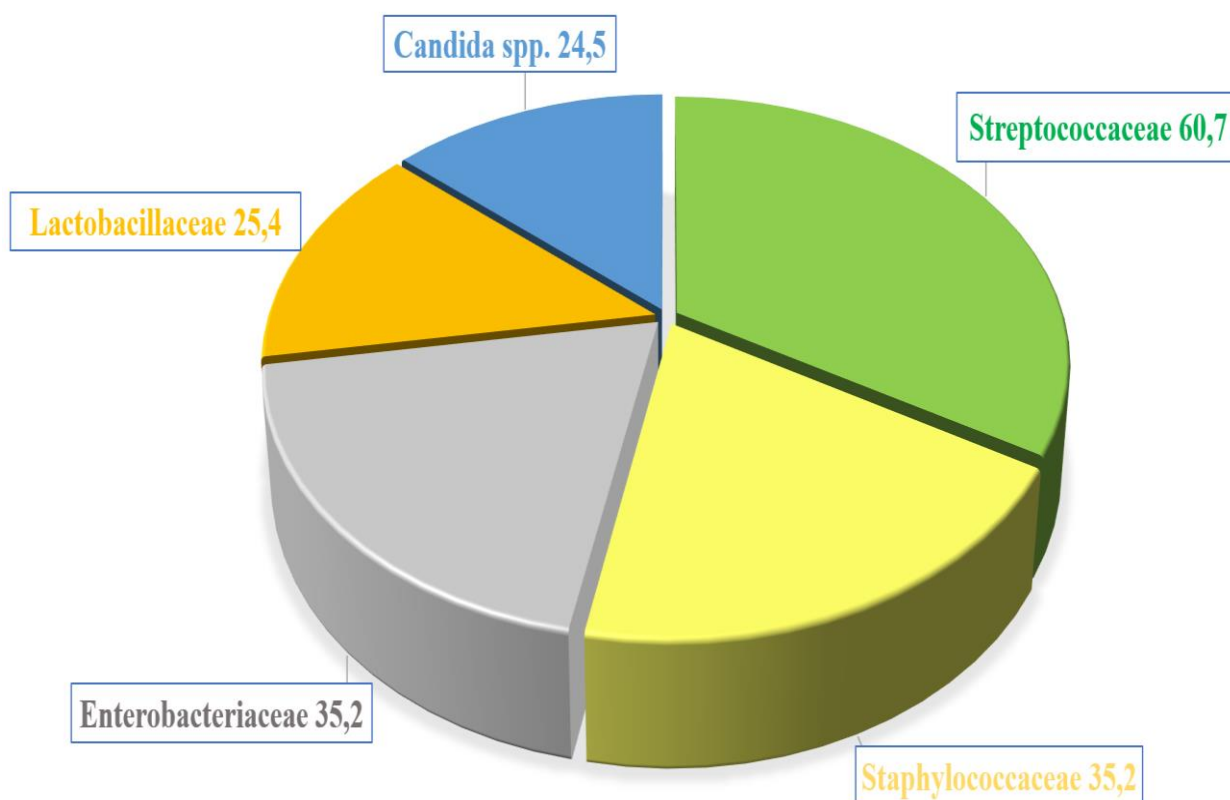


Рисунок 17. Наиболее часто выявляемые семейства микроорганизмов у пациентов, в %

3.2. Антибактериальные свойства идентифицированных бактерий

Антибактериальные свойства были выявлены у 5,66% видов бактерий. Способность подавлять рост иных микроорганизмов обнаружена у 3х штаммов *K.pneumoniae* (71,42% от общего количества случаев) (рис.18) и *P.aeruginosa* 1 штамм (14,28%) с механизмом действия – нарушение синтеза белка, а также у *S.epidermidis* 1 штамм (14,28%) с механизмом действия – нарушение транскрипции/репликации ДНК (рис.19). У других видов микроорганизмов антибактериальная активность не выявились (рис. 20).

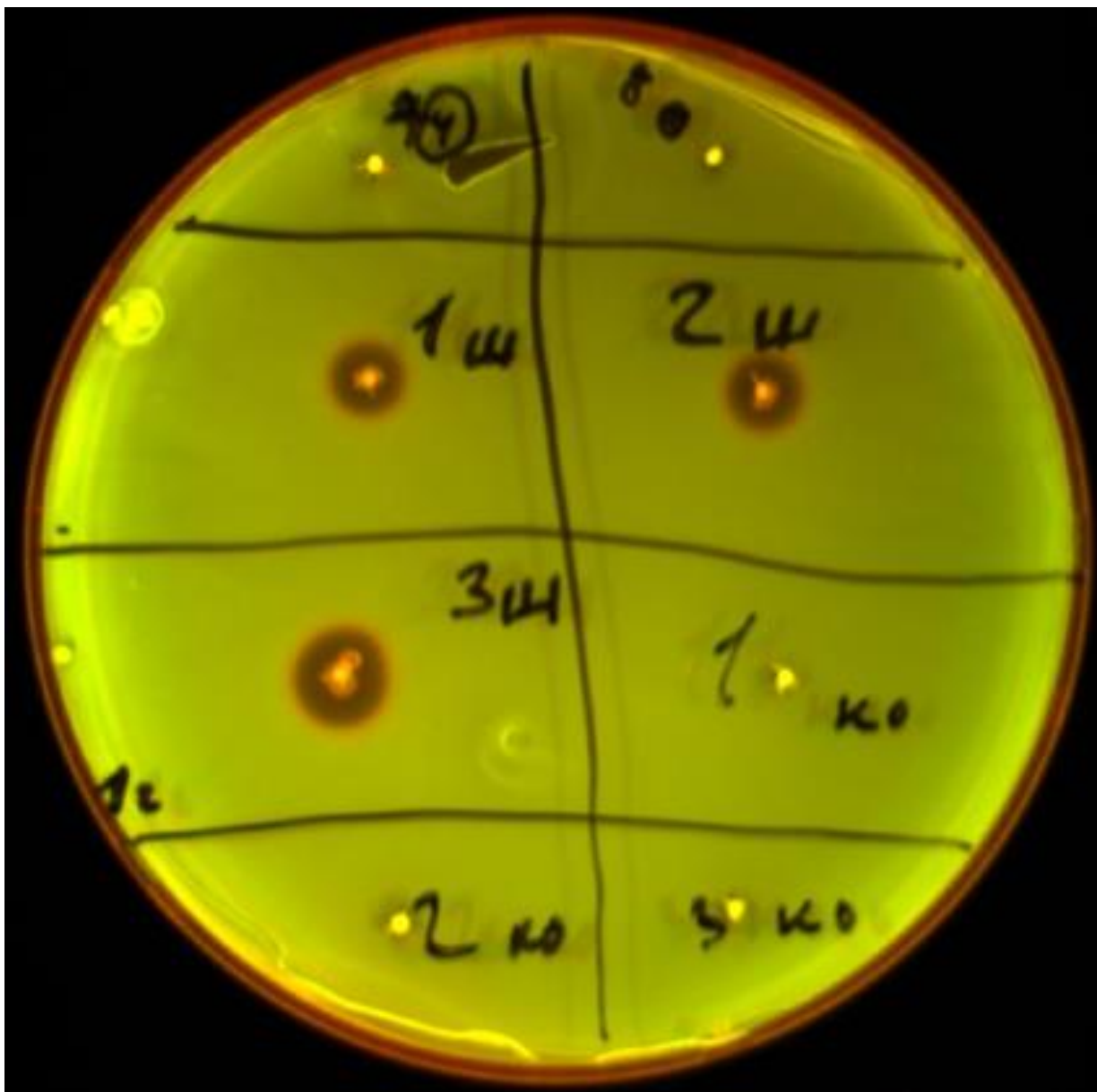


Рисунок 18. Антибактериальные свойства у *K.pneumoniae*. Механизм действия – нарушение синтеза белка.

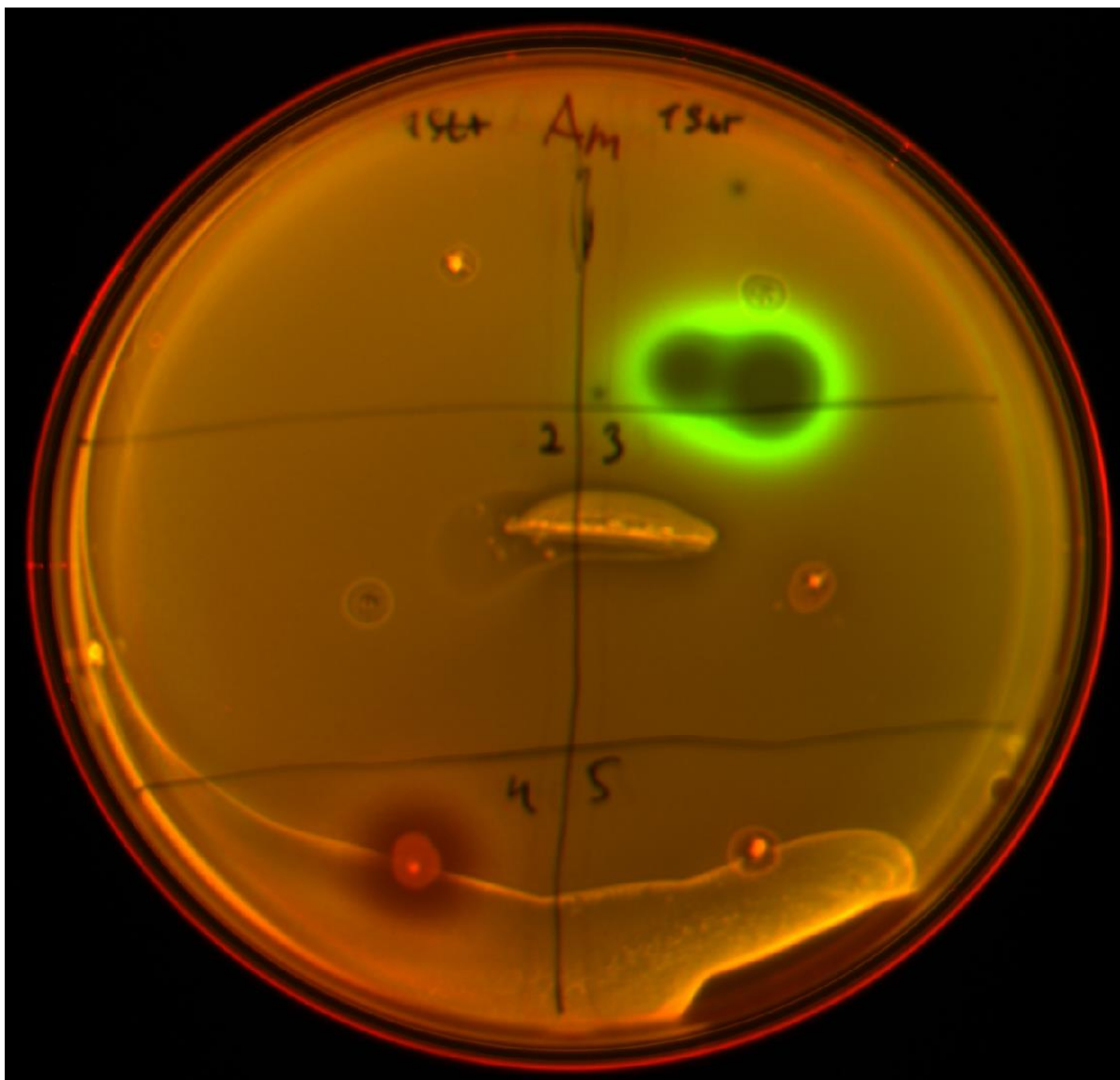


Рисунок 19. Антибактериальные свойства у *P.aeruginosa* (нарушение синтеза белка) и *S.epidermidis* (нарушение транскрипции/репликации ДНК).

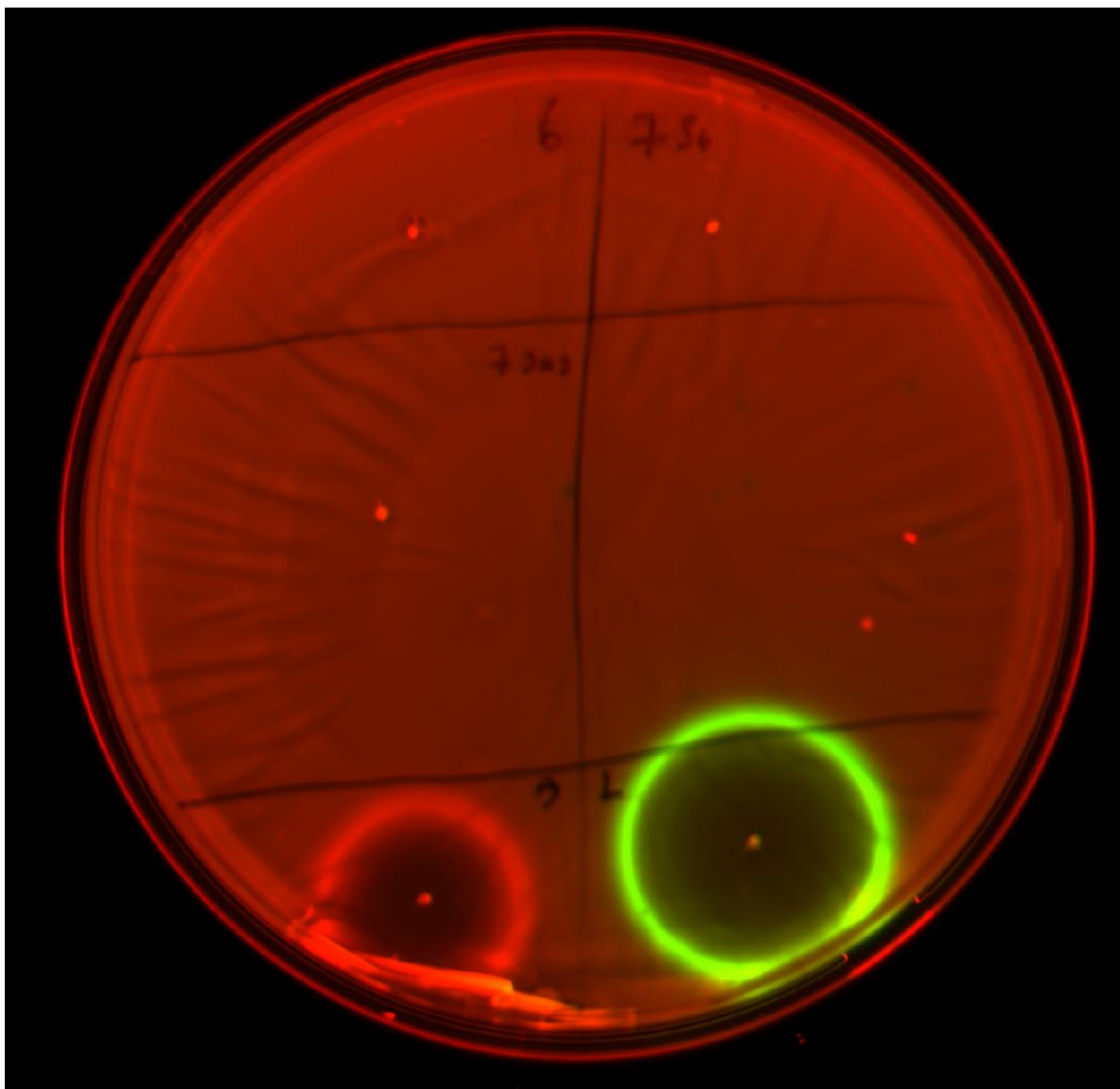


Рисунок 20. Отсутствие антибактериальных свойств у микроорганизмов.
Контроли эритромицин и левофлоксацин.

3.3. Антагонистическая активность микроорганизмов

Антагонистические свойства были обнаружены у следующих микроорганизмов:

- *L.fermentum* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*) (рис. 21),
- *L.plantarum* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*) (рис. 23),

- *E.faecium* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*) (рис. 22),
- *St.salivarius* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.epidermidis*),
- *S.epidermidis* (по отношению к *E.coli*),
- *K.pneumoniae* (по отношению к *E.coli*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*).

Зоны ингибиции роста бактерий штаммами антагонистами представлены в таблице 1.

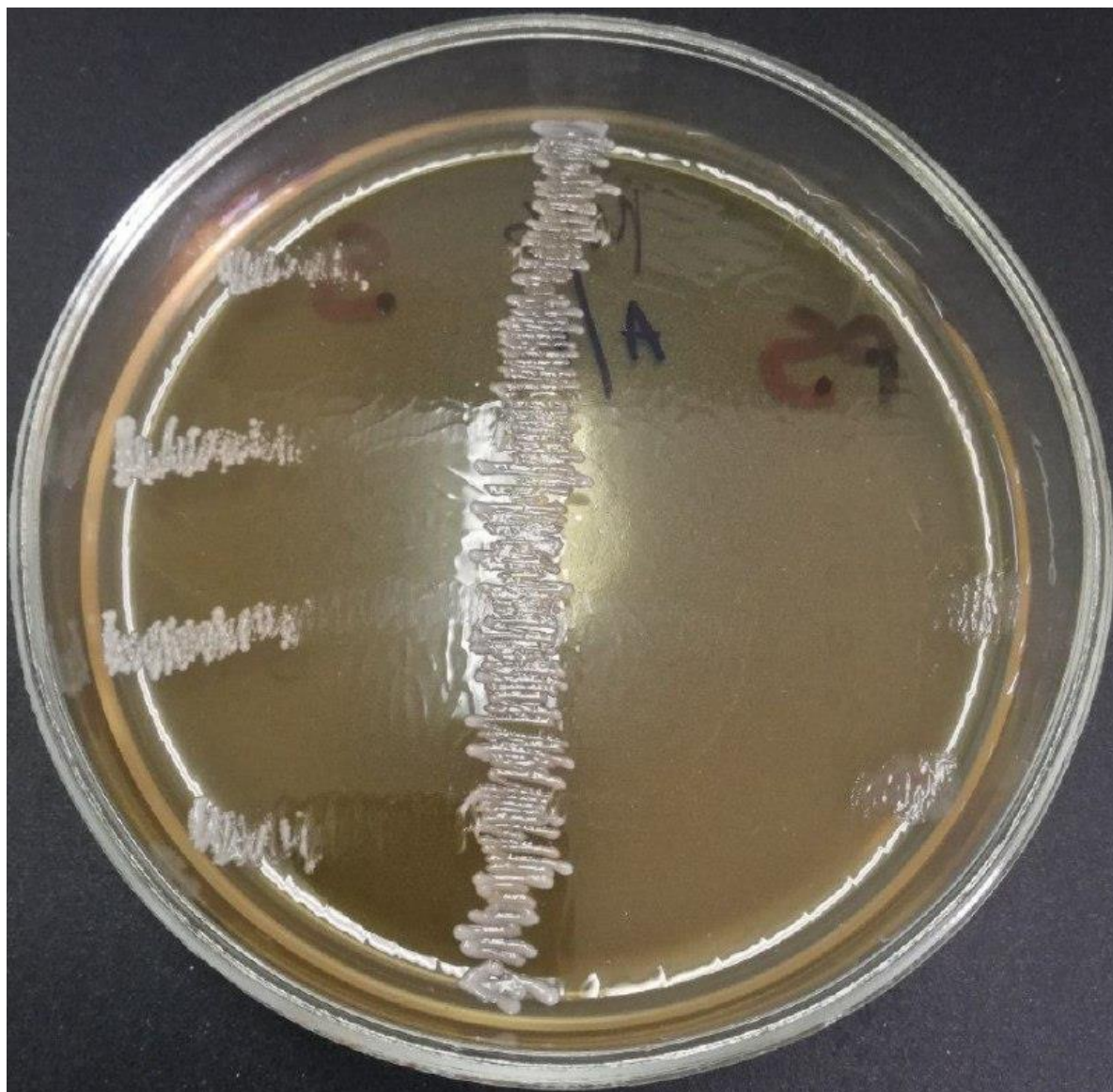


Рисунок 21. Антагонистические свойства *Lactobacillus fermentum* против *P.aeruginosa* (справа) и *S.aureus* (слева).

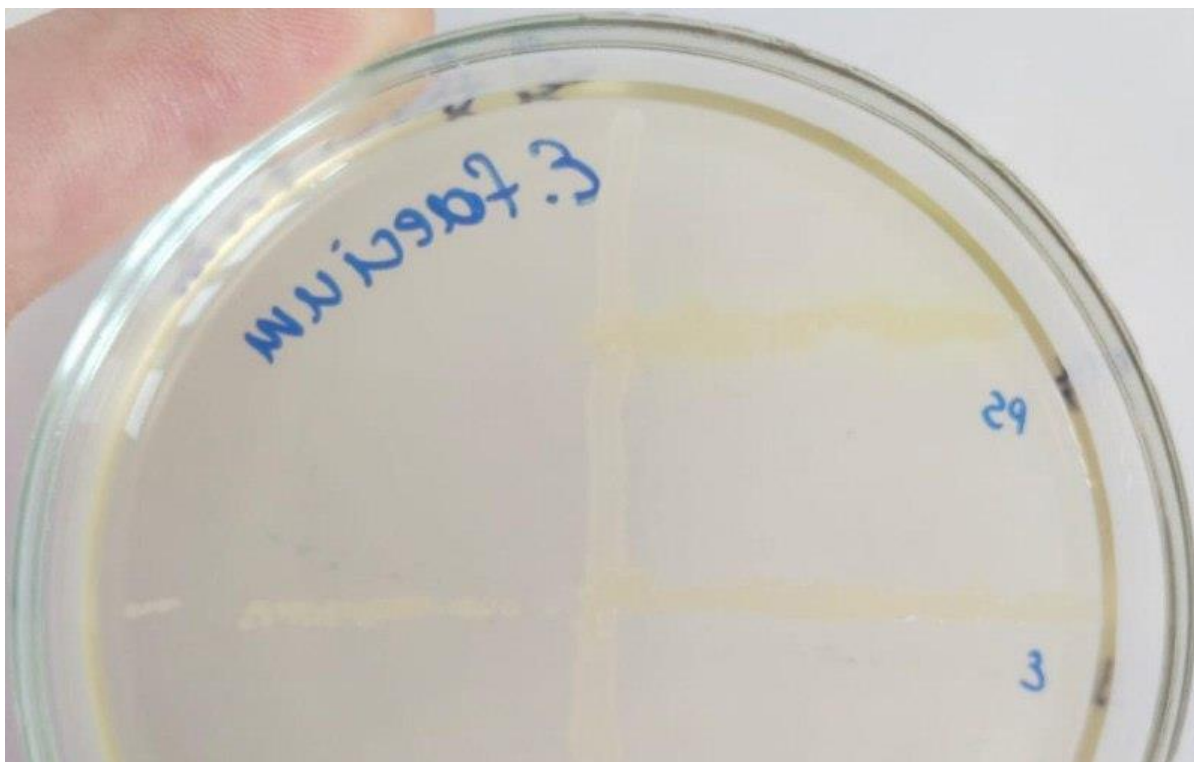


Рисунок 22. Антагонистические свойства *Ent. faecium* против *Ps. aeruginosa* (слева сверху), зона подавления 30мм и *E. coli* (центральный штрих).



Рисунок 23. Антагонистические свойства *L. plantarum* против *Ps. aeruginosa* (справа сверху – 2-3мм).

Бактерии антагонисты	Зоны ингибиции роста микроорганизмов, мм					
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>St.salivarius</i>
<i>L.fermentum</i>	14	25-40	18	18	35	6
<i>L.plantarum</i>	0	2-3	13	16	18	2-3
<i>E.faecium</i>	0	30	2-3	0	0	0
<i>St.salivarius</i>	10	12	16	0	15	-
<i>S.epidermidis</i>	0	0	15	0	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	0	0	26	-	9	20

Таблица 1. Антагонистические свойства микроорганизмов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлена способность только условно-патогенной микрофлоры, выделенной из пародонтальных карманов, продуцировать различные антибактериальные компоненты, при этом антагонистическими свойствами обладали *L.fermentum*, *L.plantarum*, *E.faecium*, *St. alivarius*, *S.epidermidis*, *K. pneumoniae*, что необходимо учитывать при выборе терапии и профилактики развития воспалительных заболеваний пародонта.

ВЫВОДЫ

1. По результатам бактериологического исследования содержимого из пародонтальных карманов от пациентов пародонтитом различной степени тяжести было выделено 244 штамма чистых культур, из них наиболее часто встречались следующие роды микроорганизмов: *Streptococcus spp.* (25,4%) – 14 видов, *Staphylococcus spp.* (14,7%) – 7 видов, *Lactobacillus spp.* (10,6%) – 5 видов, *Enterococcus spp.* (7,7%), а также грибы рода *Candida* (10,2%) – 6 видов.
2. Антибактериальные свойства были выявлены: с механизмом действия – нарушение синтеза белка у *K.pneumoniae* (3 штамма) и *P.aeruginosa* (1 штамм), с механизмом действия – нарушение транскрипции/репликации ДНК – у *S.epidermidis* (1 штамм).
3. Антагонистические свойства были обнаружены у следующих микроорганизмов: *L.fermentum* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*), *L.plantarum* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*), *E.faecium* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*), *St.salivarius* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.epidermidis*), *S.epidermidis* (по отношению к *E.coli*), *K.pneumoniae* (по отношению к *E.coli*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*).
4. Выявлена способность условно-патогенной микрофлоры из пародонтальных карманов продуцировать различные антибактериальные компоненты, при этом антагонистическими свойствами обладали: *L.fermentum*, *L.plantarum*, *E.faecium*, *St.alivarius*, *S.epidermidis*, *K.pneumoniae*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Абаев М., Беркутова И.С., Домашев Д.И. Качество жизни пациентов с различными формами пародонтита // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. - 2012. - №4.
- 2) Автандилов А.Г., Воронов И.А., Лебеденко И.Ю. и др. Стафилококки в ротовой полости и их роль в биодеструкции съемных неметаллических протезов // Российский стоматологический журнал. - 2015. - №1.
- 3) Бажутова И.В., Исматуллин Д.Д., Лямин А.В. и др. Клиническое значение представителей рода *Streptococcus* при развитии пародонтита // Инфекция и иммунитет. - 2022. - №1.
- 4) Бауэрмейстер В.Д. Микробиологическая диагностика заболеваний тканей пародонта // Новое в стоматологии. - 2003. - № 7. - С. 27-30.
- 5) Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л.Б. Борисов. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2001. – 736с.
- 6) Боровский Е.В. Биология полости рта / Е.В. Боровский, В.К. Леонтьев. - 2-е изд. - М.: Медицинская книга, 2001. - 304 с.
- 7) Брусницына Е.В., Гаврилов И.В., Сайпеева М.М. и др. Пробиотики в профилактике кариеса при ортодонтическом лечении // Уральский государственный медицинский университет. - Екатеринбург, 2022. - №22(3).
- 8) Ватаманюк Н. В. Особенности микробного пейзажа у больных генерализованным пародонтитом на доклинико-рентгенологической стадии его развития // Медичні перспективи. - 2014. - №4.
- 9) Ведешина Э.Г., Бабичев С.А. Коррекция микробиоценоза полости рта у больных пародонтитом // Кубанский научный медицинский вестник. - 2012. - №1.
- 10) Винник А.В. Роль микроорганизмов в развитии хронического гингивита // Астраханский медицинский журнал. - 2022. - №4.

- 11) Воробьева, А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебное пособие для студентов медвузов. - Москва : Мед. информ. агенство, 2004. - 136 с.
- 12) Герасимова Л.П., Усманова И.Н., Али Мохаммед Аль-Кофиш Мохаммед и др. Анализ микробного состава биотопов полости рта у лиц молодого возраста в зависимости от стоматологического статуса // Уральский Медицинский журнал. - 2017. - № 7. - С. 31-35.
- 13) Гладышева И.В. Антагонистическая активность коринебактерий // Вестник ОГУ. -2014. - №13 (174).
- 14) Глушанова Н.А., Блинов А.И., Бахаев В.В. Об антагонизме пробиотических лактобацилл // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2004. - №6.
- 15) Горбачева И.А., Шестакова Л.А. Патогенетическая коморбидность заболеваний внутренних органов и полости рта // Пародонтология. - 2008. - № 3. - С.3-5.
- 16) Губайдуллин А.Г., Туйгунов М.М., Булгаков А.К. и др. Особенности патогенеза заболеваний пародонта, вызванных *Porphyromonas gingivalis* // Медицинский вестник Башкортостана. - 2015. - №5 (59).
- 17) Давидович Н.В., Галиева А.С., Давыдова Н.Г. и др. Спектр и детерминанты резистентности клинических изолятов оральных стрептококков // Клиническая лабораторная диагностика. - 2020. - №10.
- 18) Даурова Ф.Ю., Цакоева А.А., Пильщикова О.В. и др. Оценка микробной флоры корневых каналов у больных с хроническими формами верхушечного периодонтита // Образовательный вестник «Сознание». - 2007. - №6.
- 19) Жаркова О.А. Иммунологические и микробиологические аспекты хронических периодонтитов // Вестник ВГМУ. - 2006. - №3.
- 20) Заборских Е.И. Антагонистическая активность мезофильных молочнокислых стрептококков и их экспериментальная селекция: дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 1976.

- 21) Закаревич Н.В., Даниленко В.Н. Серин-треониновые протеинкиназы бактерий - потенциальная мишень для регуляции состава микробиоты человека // Вестник РГИУ. - 2017. - № 2. - С.20-29.
- 22) Зорина О.А., Кулаков А.А., Борискина О.А. и др. Соотношение патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов при пародонтите разной степени тяжести // Acta Naturae (русскаяязычная версия). - 2011. - №2.
- 23) Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. - №60(12). – С.59-64.
- 24) Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия АлтГУ. - 2012. - №3-1.
- 25) Клименко Т.М., Скуратова Т.А., Пенчук Е.А. Медикаментозное лечение периодонтита // Главврач Юга России. - 2015. - № май (44).
- 26) Ковалевская В.С., Молодкина Н.Р., Тимофеев Т.И. Антагонистические Свойства Пробиотических Штаммов Молочнокислых Бактерий. Научные труды КубГТУ, 2016, № 14.
- 27) Корбакова С.А., Краснослободцева В.И., Остапова Т.С. и др. Иммунобиологический подход к индивидуальной гигиене полости рта // БОНЦ УрО РАН. - 2017. - №3.
- 28) Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов. – СПб: СпецЛит, 2002. – 591с.
- 29) Куришбаева Б.Т. Пародонтит. Виды лечения // Вестник хирургии Казахстана. - 2012. - №3 (31).

- 30) Купчак О.И., Нонева Н.О. Влияние микрофлоры корневых каналов на микробный баланс ротовой полости // Инновации в стоматологии. - 2014. - №3 (5).
- 31) Лукьянов Д.А. Никандрова А.А., Имамутдинова А.Н. и др. Поиск новых антибиотиков и изучение их механизмов действия // XX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии: материалы конференции. ТИБОХ ДВО РАН. - Владивосток, 2023. - С. 60.
- 32) Мигунов А.А., Мигунова И.Г. Комплексное лечение генерализованного пародонтита: клинический случай // Вестник КБ №51. - 2016. - №6 (1).
- 33) Мирсаева Ф.З., Ханов Т.В., Кузнецова Т.Н. и др. Видовой состав микрофлоры в содержимом пародонтальных карманов при обострении хронического генерализованного пародонтита // Проблемы стоматологии. - 2018. - №3.
- 34) Наврузова Угилхон Орзижон Кизи. Современные аспекты этиопатогенеза генерализованного пародонтита (обзор литературы) // Биология и интегративная медицина. - 2019. - №2 (30).
- 35) Николаева Е.Н., Царев В.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — индикаторы риска возникновения и развития пародонтита // Стоматология для всех. - 2011, - №3. - С.4-9.
- 36) Пестов А.Ю., Крамарь В.О., Калашникова С.А. и др. Биофизические параметры ротовой жидкости при нарушении микрофлоры полости рта // Вестник ВолГМУ. - 2012. - №3(43).
- 37) Правосудова Н.А., Мельников В.Л. Микробиология полости рта // Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов. - Пенза. - 2013.
- 38) Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 768 с.

- 39) Рахмонова Ш.Э., Абдурахманов А.А., Шодиева М.С. Пародонтит Тяжелой Степени: Патогенез, Диагностика, Физиологические Аспекты, Устранение Инфекции, Лечение // Вестник науки. - 2023. - №10(67) .
- 40) Сальникова М.М., Сайтов В.Р., Рахматуллин И.Ф. и др. Ультратонкое строение возбудителя некробактериоза *Fusobacterium necrophorum* // Ветеринарная патология. - 2012. - №2 (40).
- 41) Семенов А.В. Антагонизм как результат межмикробных отношений // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. - 2013.
- 42) Сергеев Ю.А., Кругляк С.Е., Петровский А.Э. Взаимосвязь пародонтита с развитием периодонтита // Международный журнал прикладных наук и технологий «Integral». - 2018. - №4.
- 43) Способ приготовления пробиотика: А.С. 2280465 / Соловьева И.В., Соколова К.Я., Ефимов Е.И. и др. // Бюлл. - 2006. - №21.
- 44) Тармакова С.С., Цыбикова Л.А., Николаева Э.С. Антагонистическая активность бифидобактерий и фитобактериальных средств // Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География. - 2010. - №4.
- 45) Тунева Н.А., Богачева Н.В. Сравнительная оценка микробной контаминации при пародонтите и периимплантите. Обзор // Вестник ПГУ. Биология. - 2021. - №2.
- 46) Усманова И.Н., Герасимова Л.П., Туйгунов М.М. и др. Ранняя диагностика риска развития и прогрессирования кариеса и воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста, проживающих в регионе с неблагоприятными факторами окружающей среды // Медицинский вестник Башкортостана. - 2014. - №6.
- 47) Усова Н.Ф. Воспалительные заболевания пародонта: патогенез, принципы комплексного лечения // БМЖ. - 2013. - №1.
- 48) Ушаков Р.В., Царев В.Н. Микрофлора полости рта и ее значение в развитии стоматологических заболеваний // Стоматология для всех. - 1998. - №3. - С.22-24.

- 49) Хайрова Э.И., Лебедева С.Н., Харитонов Т.Л. Особенности лечения пародонтита в зависимости от клинических проявлений // БМИК. - 2017. - №9.
- 50) Хомидова С.Х., Сулейманов С.Ф. Микробно–иммунологические параметры при развитии пародонтитов с актиномикотическим генезом // SAI. - 2023. - №8.
- 51) Царев В.Н., Николаева Е.Н. Микробиологическая диагностика воспалительных заболеваний полости рта и челюстно-лицевой области с помощью отечественной системы «МультиДент» // Образование, наука и практика в стоматологии: сборник трудов 2-й Всероссийской научно-практической конференции. - 2005. - С. 224-226.
- 52) Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии - основной фактор возникновения и развития пародонтита // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2017. - №5.
- 53) Цепов, Л.М., Николаев М.М., Нестерова Д.А. Проблема этиологии воспалительных генерализованных заболеваний пародонта // Современная стоматология - эффективность профилактики и лечения. Нанотехнологии в стоматологии: материалы конференции, посвященной 60-летию ТГМА. - Тверь, 2014. - С. 310-319.
- 54) Царев В.Н., Николаева Е.Н., Носик А.С. и др. Современные методы микробиологической диагностики заболеваний тканей пародонта // Медицинский алфавит. Стоматология. - 2005. - № 2. - С. 26-29.
- 55) Червинец Ю.В., Бондаренко В.М., Шабанова Н.А. и др. Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл // Микробиология. - 2006. - №7.
- 56) Шибаева А.В., Аймадинова Н.К., Трубникова Е.В. и др. Изучение роли *Prevotella intermedia* в развитии хронического пародонтита методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Вестник РГМУ. - 2015. - №4.

- 57) Шуленина О.В., Яровой Б.Ф., Тимковский А.Л. и др. Флуоресцентные репортеры в поиске новых антибактериальных препаратов. // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт биомедицинских систем и технологий. - СПб, 2018. - С. 219-221.
- 58) Юркина А.С. Носительство зубной спирохеты *treponema denticola* (ex flügge 1886) в полости рта людей // Вестник Сыктывкарского университета. Серия 2. Биология. Геология. Химия. Экология. - 2021. - №1
- 59) Abreham K, Zamiri I. Production of a bacteriocin, ulceracin 378, by *Corynebacterium ulcerans* //Antimicrob Agents Chemother. -1983.- №24(2). - P. 262-7.
- 60) Amano A. Bacterial adhesinsto host components in periodontitis // Periodontol. 2000. -2010, 52:12-37.
- 61) Amano A., Furuta N., Tsuda K. Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oralpathogens // Periodontol 2000. - 2010, 52: 84-93.
- 62) An W.F., Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening // Molecular Biotechnology. - 2010.
- 63) Bacon C.W., Hinton D.M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species // Biological Control. – 2002, - №23. – P. 274-284.
- 64) Brochut P.F., Grenier D., Nakayama K., et al. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities // Oral Microbiol. Immunol. - 2001,16: 79-87.
- 65) Chi B., Qi M., Kuramitsu H.K. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration // Res. Microbiol. - 2003,154: 637-643.
- 66) Chung T.C., Axelsson L., Lindgren S.E. et al. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* // Microbial ecology in health and disease. - 1989. - Vol.2. - P.137-144.
- 67) Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A. et al. MatrixAssisted Laser Desorbtion Ionization-Time of Flight Mass Specrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of

- Clinical Microbiology // Clin. Microbiol. Rev. - 2013. - Vol.26. - № 3. - P. 547–603.
- 68) Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology // FEMS Microbiol. Rev. - 2012. - Vol.36. - P. 380–407.
- 69) Ezzo P.J., Cutler C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease // Periodontology 2000. - 2003.32: 24-35.
- 70) Feng Z., Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues // Periodontology 2000. - 2006, 40(1): 50-76.
- 71) Feucht E.C., DeSanti C.L., Weinberg F. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells // Oral Microbiol. Immunol. - 2003,18: 359-363.
- 72) Funk G.A. von Graevenitz, Clarridge III J. E., Bernard K.A. Clinical microbiology of coryneform bacteria - a review // Clin. Microbiol. - 1997.- Vol.10. - P. 125-159.
- 73) Hashimoto M., Asai Y., Tamai R. et al. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide. FEBS Letters // - 2003, - №543. - P. 98-102.
- 74) Heitz-Mayfield L.J. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis // J. Clin. Periodontol. - 2005, 32 (6): 196-209.
- 75) Iwahara K., Kuriyama T., Shimura S. et al. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the B-lactamase genes of *Prevotella* spp. in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR // J. Clin. Microbiol. - 2006. - № 449 (1). - P. 172-176.
- 76) Kelk P., Claesson R., Hanstrom L. et al. Abundant secretion of bioactive interleukin - 1 beta by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin // Infect.Immun. - 2005, 73:453-458.

- 77) Lavigne J.P., Espinal P., Dunyach-Remy C. et al. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? // Clin. Chem. Lab Med. - 2013. - Vol.51. - №2. - P.257–270.
- 78) Leben C. Epiphytic Microorganisms in relation to plant disease // Annual Review of Phytopathology. – 1965, - №3. - P. 209-230.
- 79) Leifert C., Li H., Chidburee S., et. al. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45 // Journal of Applied Bacteriology. – 1995, - №78. – P. 97-108.
- 80) Moter A., Riep B., Haban V. et al. Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects // J. Clin. Microbiol. - 2006, 44 (9): 3078-3085.
- 81) O'Brien-Simpson N.M., Veith P.D., Dashper S.G. et al. Antigens of bacteria associated with periodontitis // Periodontology 2000. - 2004, 35: 101-134.
- 82) Osterman I.A. et al. Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2016.
- 83) Saito K., Takahashi N., Horiuchi H., Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis* // J. Periodont. Res. - 2001, 36: 355-360.
- 84) Schenkein H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease // Periodontology. 2000. - 2006, 40 (1): 77-93.
- 85) Suda R., Kobayashi M., Nanba R. et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students // J. Periodontol. - 2004, 75 (8): 1084-1089.
- 86) Tanaka S., Minami M., Murakami Y. et al. The detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in

- tooth, tongue and buccal mucosa plaques in children, using immunoslot blot assay (IBA) // *Pediatr. Dent.* - 2006, 30 (3): 251-256.
- 87) Tanner A.C.R., Kent R. Jr., Dyke Van T. et al. Clinical and other risk indicators for earlyperiodontitis in adults // *J. Periodontol.* - 2005. - №76 (4). - P. 573-581.
- 88) Tanner A.C.R., Paster B.J., LuS.C. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis // *J. Dent. Res.* - 2006. - №85 (4). - P. 318-323.
- 89) Tran S.D., Rudney J.D., Sparks B.S. et al. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis // *J. Periodontol.* - 2001, 72 (1): 1-10.
- 90) Trevilatto P.C., Tramontina V.A., Machado M.A.N. et al. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis // *J. Clin. Periodontol.* - 2002, 29:233-239.
- 91) Tribble G.D., Lamont R.J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontaltissue // *Periodontol.* - 2010. - №52. - P. 68-83.
- 92) Whng P.L., Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts - CDI4 and Toll-like receptors // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* - 2002, 13: 132-142.

ПРИЛОЖЕНИЕ



МАТЕРИАЛЫ

**III МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ
МИКРОБИОЛОГИИ В НАУКЕ И ОБРАЗОВАНИИ»**



Рязань, 2024

конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии в науке и образовании». Рязань, 2023 год. С. 71-73.

2. Ardain A., Domingo-Gonzalez R., Das S., Kazer S., Howard N. et al Group 3 innate lymphoid cells mediate early protective immunity against tuberculosis // *Nature*. 2019. No 570. P. 528-532.

3. Cambier C., Falkow S., Ramakrishnan L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis* // *Cell*. 2014. No 159 (7). P. 1497-1509.

4. Nazarov J.S.E. Comparative immunobiological characteristics of primary and secondary tuberculosis with multiple and extensively drug resistance // *International Journal of Health Systems and Medical Sciences*. Vol. 2. No 5. P. 108-110.

5. Scriba J. Thomas, Anna K. Coussens, Helen A. Fletcher. Human immunology of tuberculosis // *Microbiology Spectrum*. 2017. No 5 (1). P. 213-237.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ПАРОДОНТИТОМ

Ненно П.В., Гимранова И.А., кандидат медицинских наук, доцент,

Баймиев Ал.Х., доктор биологических наук, доцент,

Баймиев А.Х., доктор биологических наук, доцент

**ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава
России, г. Уфа, Республика Башкортостан**

Введение. На сегодняшний день заболевания пародонта являются достаточно актуальной проблемой в практике врачей стоматологов. Около 95% взрослых и 80% детей страдают теми или иными признаками заболеваний пародонта. Пародонт является комплексом околозубных тканей, функцией которых является фиксация зубов. Данные ткани могут подвергаться воспалительным процессам, и в отсутствии лечения это приводит к нарушению жевательной функции и утрате зубов [1]. На данный момент, существующие методы лечения заболеваний пародонта неэффективны и не приводят к выздоровлению пациентов.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись: ротовая жидкость и жидкость с пародонтальных карманов от пациентов разной возрастной группы с заболеваниями пародонта. Клинический материал был получен из клиники «Примадент» г.Уфы. Посев биологических жидкостей производился на коммерческие питательные среды: агар MRS (HIMEDIA, Индия), агар ГМФ (НИЦФ, Россия) с добавлением животной крови 5% от объема среды, агар Солевой (НИЦФ, Россия), Шоколадный агар (Оболensk, Россия), агар Сабуро (Оболensk, Россия), агар Эндо (Оболensk, Россия). Инкубацию посевов производили в CO₂ инкубаторе и термостате при 37°C до 2х суток, чашки с агаром Сабуро – до 4х дней при 28°C. Далее проводили идентификацию при помощи масс-спектрометрии Autof MS2600. Затем идентифицированные культуры инкубировали в течение 2х суток в термо-шейкере при 37°C с целью увеличения биомассы. Антибактериальные свойства определяли с использованием штамма *E.coli* BW25113 дельта *tolC*, в который встроен плазмидный вектор pDualrep2, содержащий в себе гены флуоресцентных белков: *Katushka2S* (максимум испускания 635 нм) и *RFP* (максимум испускания 584 нм). При действии антибиотика на процесс синтеза белка, увеличивается выработка дальнего красного белка *Katushka2S*. А при

нарушении в клетке репликации ДНК либо транскрипции повышается экспрессия красного белка RFP. Штамм *E.coli* BW25113 имеет повышенную чувствительность к антибактериальным веществам, так как у него отсутствует ген *tolC*. *TolC* является порином, благодаря которому из клетки удаляются различные соединения через внешнюю мембрану [2-5]. Посев *E.coli* BW25113 и анализируемого штамма производился на питательную среду LB, с последующей инкубацией в термостате на 37°C 24ч. В качестве контроля эксперимента использовали два антибиотика: левофлоксацин (маркер нарушения репликации ДНК/транскрипции) и эритромицин (маркер нарушения синтеза белка). Анализ результатов проводился на приборе Bio RAD ChemiDoc MP Imaging System.

Результаты и обсуждение. В процессе исследования у пациентов были обнаружены бактерии: *Staphylococcus aureus*, *S. capitis*, *S. wamari*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus mitis*, *St. Viridans*, *St. salivarius*, *St. parasanguinis*, *Corynebacterium amycolatum*, *Lactobacillus* spp., *Neisseria* spp., *Enterobacter kobei*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. stutzeri*, *Bacillus pseudomycoides*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter junii*, *Micrococcus luteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Leuconostoc citreum*, *Mobiluncus mulieris*, *Kocuria rosea*, *Weissella cibaria* и грибы: *Candida albicans* и *C. tropicalis*. Антибактериальные свойства были выявлены у 6,86% бактерий. Способность подавлять рост иных микроорганизмов обнаружена у *K. pneumoniae* (71,42% от общего количества случаев) и *Ps. aeruginosa* (14,28%) с механизмом действия – нарушение транскрипции/репликации ДНК, а также у *S. epidermidis* (14,28%) с механизмом действия – нарушение синтеза белка (рис. 1). У остальных бактерий антибактериальные свойства не были обнаружены.

Заключение. По результатам исследования биоматериала от пациентов с заболеваниями пародонта, была выявлена способность условно-патогенной микрофлоры из пародонтальных карманов продуцировать различные антибактериальные компоненты, что приводит к подавлению роста других микроорганизмов ротовой полости.

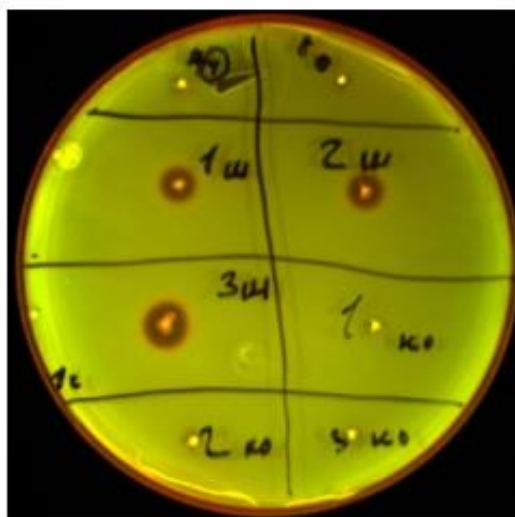


Рис. 1. Антибактериальные свойства бактерий с действием на процесс синтеза белка *E.coli* BW25113 дельта *tolC*.

Библиографический список

1. Гончарик П.В., Кравченко А.В., Панасюк Г. Д. Заболевания пародонта. // Практическое пособие для врачей. ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Гомель, 2018. С. 37.
2. Лукьянов Д.А. Никандрова А.А., Имамутдинова А.Н., Волюнкина И.А. Поиск новых антибиотиков и изучение их механизмов действия. // XX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии: материалы конференции. ТИБОХ ДВО РАН. Владивосток, 2023. С. 60.
3. Шуленкина О.В., Яровой Б.Ф., Тимковский А.Л., Полесскова Е.В. Флуоресцентные репортеры в поиске новых антибактериальных препаратов. // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт биомедицинских систем и технологий. СПб, 2018. С. 219-221.
4. An W.F., Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening // Molecular Biotechnology: электронный журнал. 2010. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-010-9251-z> (дата обращения: 02.04.2024).
5. Osterman I.A. et al. Sorting Out Antibiotics' Mechanisms of Action: a Double Fluorescent Protein Reporter for High-Throughput Screening of Ribosome and DNA Biosynthesis Inhibitors // Antimicrobial Agents and Chemotherapy: электронный журнал. 2016. URL: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.02117-16> (дата обращения: 02.04.2024).

РНКАЗА СЛЮНЫ, КАК ФАКТОР ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

**Пикулев М.А., Морозов И.А., Годовалов А.П., кандидат медицинских наук, доцент
ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика
Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
г. Пермь, Россия**

Введение. В последние годы наблюдается рост заболеваемости инфекциями, обусловленными РНК-содержащими вирусами. Среди этих вирусов значительный ущерб здоровью населения приносят коронавирусы, вирусы гриппа и кори, респираторно-синцитиальный вирус и др. К сожалению, до сих пор отсутствуют эффективные этиотропные средства лечения таких инфекций. Однако, поскольку для большинства этих вирусов наиболее характерен воздушно-капельный путь заражения, важно провести поиск противовирусных агентов в слюне, назальном секрете, отделяемом ротоглотки. В ротовой жидкости человека содержится РНКазы А, которая по данным отечественных исследований, обладает противовирусной активностью по отношению к респираторно-синцитиальному вирусу, снижая его способность проникать в эпителиальные клетки [1].

Цель исследования: изучение активности РНКазы слюны практически здоровых людей.

Материалы и методы. В исследование включили 50 (25 мужчин, 25 женщин) практически здоровых добровольцев, у которых натошак получали пробы нестимулированной, смешанной слюны. У всех участников исследования в анамнезе был COVID-19, подтвержденный с помощью ПЦР. Тяжесть и давность заболевания оценивали по амбулаторным картам. Активность РНКазы слюны определяли по убыли оптической плотности окрашенного раствора РНК, с помощью спектрофотометра PowerWave (США). Кроме этого оценивали концентрацию общего белка с помощью биуретовой реакции



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**“БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ”**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕРТИФИКАТ

Ненно Полине Вадимовне

за участие в полуфинале программы "УМНИК"

уникальный номер: 00260767-4adc-11ed-bbb5-00262d0c4073_6

г. Уфа, 13 октября 2022 г.

Ректор,
академик РАН



В.Н. Павлов

ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Обучающийся Ненно Полины Вадимовны группы БМ-201А
(фамилия, имя, отчество)

Выпускная квалификационная работа на тему:

Антибактериальные свойства штаммов бактерий, полученных из пародонтальных карманов у больных пародонтитом.

Обучающийся Ненно Полина Вадимовна успешно закончил(а) курс обучения по направлению подготовки 06.04.01. Биология. Итогом обучения явилось выполнение выпускной квалификационной работы, которая является исследовательской работой обучающегося.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования и анализа данных источников литературы, а также обобщения полученной информации. В процессе выполнения экспериментальной части были проведены самостоятельные исследования, освоены методы группировки, сравнения, логический, социологических исследований, экономико-математические и другие. Тема раскрыта полно, выводы отражают основные результаты исследования и могут быть использованы в практической деятельности.

В период выполнения выпускной квалификационной работы обучающийся показал(а) себя трудолюбивым, добросовестным исследователем, проявил(а) самостоятельность и творческую инициативу.

Работа отвечает требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, аккуратно оформлена и может быть рекомендована к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Научный руководитель:

Гимранова И.А.
(подпись)

Подпись:	<u>И.А. Гимрановой</u>
Заверяю:	
Ученый секретарь ФГБОУ ВО ИУМ	
Минздрава России	

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу обучающегося группы Б-201 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Ненно Полины Вадимовны

на тему: «Антибактериальные свойства штаммов бактерий, полученных из пародонтальных карманов у больных пародонтитом»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой. Полностью соответствует требованиям выпускной квалификационной работы.

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения. Тема выпускной квалификационной работы обладает значительной актуальностью и научной важностью. Существующие методы лечения заболеваний пародонта малоэффективны и не приводят к полному выздоровлению.

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. Выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с предъявляемыми требованиями. В работе проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике, обобщены основные научные достижения, определены цели и задачи выполняемой работы в соответствии с существующим уровнем научных исследований по данной теме.

4 Выполненная работа может помочь создать новые препараты на основе метаболитов бактерий для лечения и профилактики заболеваний пародонта.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Освоены методы планирования и анализа данных больших объемов с использованием методов статистики.

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: материалы III международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты микробиологии в науке и образовании» 27-28 мая 2024 года, г.Рязань на тему: «Антибактериальные метаболиты бактерий, полученных из пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом».

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Проведенный уровень исследований выпускника в данной квалификационной работе показывает хороший уровень теоретической и методической подготовки.

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями.

9 Обоснованность выводов и предложений. Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение.

10 Замечания по усмотрению рецензента. Замечаний нет (дополнительные замечания представлены на листах приложения).

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций.

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию магистр.

Рецензент:

канд.биол.наук, старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной генетики человека
Института биохимии и генетики УФИЦ РАН



Казанцева Анастасия Валерьевна

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Ненно Полины Вадимовны группы БМ-201А

(фамилия, имя, отчество)

по теме: Антибактериальные свойства штаммов бактерий, полученных из пародонтальных карманов у больных пародонтитом.

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01. Биология. Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи.

При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, логический, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет.

Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований.

Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно.

Результаты проведенной работы имеют практическую значимость.

На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации магистр по направлению подготовки 06.04.01. Биология.

Рецензент Хакимова Л.Р. *Хак*
(Ф.И.О., подпись)

дата 24.05.24

Подпись: <u>Л.Р. Хакимовой</u>
Заверяю: Ученый секретарь ФГБОУ ВО ВГМУ Минздрава России <i>А.В.В.</i>

ДОКЛАД

2 слайд.

В настоящее время заболевания пародонта являются одними из распространенных и сложных патологий в современной стоматологической практике. По данным ВОЗ, около 95% взрослого населения и 80% детей имеют признаки различных заболеваний пародонта.

Данные заболевания представляют собой воспалительные процессы комплекса тканей, окружающих и удерживающих зуб, что может приводить к возникновению гнойно-воспалительных очагов, деструкции окружающих тканей и потере зубов.

На сегодняшний день, существующие методы лечения малоэффективны и не приводят к полному выздоровлению.

3 слайд.

Целью нашего исследования явилось- Изучение особенностей антибактериальных свойств бактерий, выделенных из содержимого пародонтальных карманов пациентов с пародонтитом различной степени тяжести.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Проведение бактериологического исследования содержимого пародонтальных карманов.
2. Идентификация до вида полученных чистых культур бактерий методом масс-спектрометрии.
3. Выявление наличия/отсутствия антибактериальных свойств идентифицированных микроорганизмов.
4. Определение антагонистических свойств бактерий.

4 слайд.

В качестве материала для исследования послужило содержимое пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом различной степени тяжести в возрасте от 32 до 68 лет. Клинический материал был получен во время приема врача-стоматолога в стоматологической поликлинике №2 и клинике «Примадент» г. Уфа.

Методами исследования являлись:

1. Метод культурального посева на питательные среды (Эндо, эк агар, ка, шок, мрс, жса, мх) с последующим получением чистых культур бактерий.
2. Идентификация чистых культур методом масс-спектрометрии MALDI-TOF

3. Метод определения антибактериальной активности идентифицированных штаммов с помощью системы двойных репортеров и прибора Bio RAD ChemiDoc MP Imaging System.
4. Выявление антагонистической активности выделенных штаммов методом перпендикулярных штрихов.

5 слайд.

То есть схема исследования выглядела таким образом:

Сначала проводился первичный посев исследуемого материала с последующим получением чистых культур бактерий.

Затем проводилась идентификация микроорганизмов на масс-спектрометре.

После чего выявлялась антибактериальная и антагонистическая активность бактерий.

И в конце проводился анализ полученных результатов.

6 слайд.

Идентификация микроорганизмов проводилась методом масс-спектрометрии малди тофф.

Метод заключается в том, что:

Берутся чистые культуры микроорганизмов, которые наносятся на металлическую пластину, туда же наносится матрица (матрица превращает энергию лазера в энергию возбуждения и помогает в ионизации белков бактерий). Затем пластинку помещают в устройство ввода прибора, где уже непосредственно происходит ионизация, с последующим разделением ионов по отношению масса/заряд. И в конце выдается результат в виде масс-спектров, характерных для конкретных бактерий.

7 слайд.

Благодаря масс-спектрометру было идентифицировано 53 вида бактерий и 10 видов грибов.

На данной диаграмме можно посмотреть частоту встречаемости облигатно-аэробных бактерий у пациентов с заболеваниями пародонта.

Было выявлено 10 видов бактерий, относящихся к 7 родам (*Acinetobacter*, *Kocuria*, *Neisseria*, *Stenotropomonas*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Псевдартробактер*)

8 слайд.

Среди факультативно-анаэробных микроорганизмов было выявлено 42 вида, относящихся к 15 родам.

Среди них 14 видов стрептококков и 7 видов стафилококков.

Из стрептококков наиболее часто встречался *St.viridans* (у 15 пациентов), *St.salivarius* (у 14 пациентов), *St.oralis* (12 пациентов) и *St.anginosus* (10

пациентов). Среди стафилококков – *S.epidermidis* (21 пациент) и *S.haemolyticus* (8 пациентов).

9 слайд.

Здесь представлено процентное содержание выделенных видов лактобактерий, энтеробактерий, коринебактерий, энтерококков...и тд

10 слайд.

Также было идентифицировано 10 видов грибов: 6 дрожжеподобных видов рода *Candida* и 4 вида плесневых грибов.

11 слайд.

Общий анализ частоты встречаемости микроорганизмов, населяющих пародонтальные карманы, показал, что наиболее часто встречающимися являются бактерии из семейств: *Streptococcaceae* (60,7%), *Staphylococcaceae* и *Enterobacteriaceae* (35,2%), *Lactobacillaceae* (25,4%) и грибы рода *Candida* (24,5%).

12 слайд.

Все идентифицированные микроорганизмы были проверены на наличие либо отсутствие антибактериальных свойств.

Метод основывался на использовании **системы двойных репортеров**.

Для исследования использовали штамм *E.coli* BW25113 дельта *tolC*. Данный штамм сверхчувствителен к антибиотикам, так как у него удален ген *tolC*. **TolC** это основной порин, который выводит разные соединения из клетки сквозь внешнюю мембрану.

Производили посев данного штамма в чашки Петри газонным методом на среду LB (состав: дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, триптон – 10 г/л). С помощью электронного дозатора на чашку капали по 5 мкл инокулята чистых культур идентифицированных микроорганизмов с последующей инкубацией в теч 24ч при 37 градусах.

У данного штамма есть встроенный плазмидный вектор *pDualrep2*, который содержит гены двух флуоресцентных белков: *RFP* (максимум испускания 584 нм) и *Katushka2S* (максимум испускания 635 нм).

Поэтому, оценивая результаты на приборе гель документирования, можно видеть, что в случае действия антибактериального вещества на **процесс синтеза белка**, возрастает экспрессия (дальнего красного) белка *Katushka2S*, и появляется **красное** свечение вокруг зоны ингибиции роста кишечной палочки (макролиды, тетрациклины, амфинеколы).

На рис 4. Экспрессия (красного) белка *RFP* увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа (это может быть нарушение **репликации ДНК либо транскрипции**), это проявляется в виде **зеленого** свечения зоны ингибиции роста киш.палочки (нитроимидазолы, хинолоны).

В результате нашего исследования антибактериальная активность была выявлена у 5 бактерий (2% от всех 244) (3 вида - 5,66% от всех видов).

Это 3 штамма *K.pneumoniae* (71,42%) и *P.aeruginosa* (14,28%) с механизмом действия – нарушение синтеза белка, а также *S.epidermidis* (14,28%), с механизмом действия – нарушение репликации ДНК/транскрипции. Клебсиелла представлена на рис.3, а синегнойная палочка и стаф. на рис.4.

(Флуорофор образуется из аминокислотных остатков самого белка при окислении кислородом).

13 слайд.

В качестве контроля на чашки наносили антибиотики *эритромицин* (маркер нарушения синтеза белка) и *левофлоксацин* (маркер включения в клетке SOS-ответа).

14 слайд.

Также были исследованы антагонистические свойства бактерий методом перпендикулярных штрихов по отношению к основным условно-патогенным бактериям *P.aeruginosa*, *S.aureus* и *E.coli*, а также, учитывая полученные данные по антибактериальной активности – к *K.pneumoniae* и эпидермальному стафилококку.

Оценивали зоны ингибиции роста. Они были обнаружены у:

L.fermentum по отношению к *S.aureus* на рис.6 слева можно видеть зоны ингибиции роста (зона подавления 14мм), к *Ps.aeruginosa* справа, практически полное подавление роста (25-40мм), (не читать. а также к *K.pneumoniae* (18 мм) и *S.epidermidis* (35мм).

L.plantarum – на рис 8. Показала частичное подавление роста *Ps.aeruginosa* (зона подавления 2-3мм), (не читать. *K.pneumoniae* (16 мм), *S.epidermidis* (18 мм)) Слева отсутствует подавление золотистого стафилококка).

E.faecium на рис 7. полностью ингибировал рост *Ps.aeruginosa* слева вверху (зона подавления 30мм) и частично *E.coli* слева внизу (2-3мм). (Не читать. При этом не было подавление роста зол.стаф. и эпид).

15 слайд.

Также были проверены:

St.salivarius, он показал подавление роста *S.aureus* (10мм), синегн 12, киш 16, эпид 15.

S.epidermidis – подавлял рост *E.coli* (15мм).

K.pneumoniae – также подавляла рост *E.coli* (26мм), *St.salivarius* (20мм), эпид 19 мм.

16 слайд.

Таким образом, выявлена способность только условно-патогенной микрофлоры, выделенной из пародонтальных карманов продуцировать различные антибактериальные компоненты, подавляющие рост других микроорганизмов; при этом антагонистическими свойствами обладали *L.fermentum*, *L.plantarum*, *E.faecium*, *St.salivarius*, *S.epidermidis*, *K.Pneumoniae*.

Выводы разрешите не зачитывать они представлены на слайде

1. По результатам бактериологического исследования содержимого пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом различной степени тяжести было выделено 244 штамма чистых культур, из них наиболее часто встречались следующие роды микроорганизмов: *Streptococcus spp.* (25,4%) – 14 видов, *Staphylococcus spp.* (14,7%) – 7 видов, *Lactobacillus spp.* (10,6%) – 5 видов, *Enterococcus spp.* (7,7%), а также грибы рода *Candida* (10,2%) – 6 видов.
2. Антибактериальные свойства были выявлены: с механизмом действия - нарушение синтеза белка *K. pneumoniae* (3 штамма) и *P.aeruginosa* (2 штамма), с механизмом действия – нарушение транскрипции/репликации ДНК - *S.epidermidis* (2 штамма).
3. Антагонистические свойства были обнаружены у следующих микроорганизмов: *L.fermentum* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*), *L.plantarum* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*), *E.faecium* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*), *St.salivarius* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.epidermidis*), *S.epidermidis* (по отношению к *E.coli*), *K.pneumoniae* (по отношению к *E.coli*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*).
4. Выявлена способность только условно-патогенной микрофлоры, выделенной из пародонтальных карманов продуцировать различные антибактериальные компоненты, подавляющие рост других микроорганизмов; при этом антагонистическими свойствами обладали *L. fermentum*, *L. plantarum*, *E. faecium*, *St. salivarius*, *S.epidermidis*, *K. Pneumoniae*.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Институт развития образования
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Ненно Полина Вадимовна

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ

Научный руководитель:
к.м.н., доцент кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии
Гимранова Ирина Анатольевна

Актуальность исследования

В настоящее время заболевания пародонта являются одними из распространенных и сложных патологий в современной стоматологической практике. По данным ВОЗ, около 95% взрослого населения и 80% детей имеют признаки различных заболеваний пародонта.



Цель исследования

Изучение особенностей антибактериальных свойств бактерий, выделенных из содержимого пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом различной степени тяжести

Задачи исследования

1. Проведение бактериологического исследования содержимого пародонтальных карманов.
2. Идентификация до вида полученных чистых культур бактерий методом масс-спектрометрии.
3. Выявление наличия/отсутствия антибактериальных свойств идентифицированных микроорганизмов.
4. Определение антагонистических свойств бактерий.

3

Материалы и методы

В качестве материала для исследования послужило содержимое пародонтальных карманов от пациентов с пародонтитом различной степени тяжести в возрасте от 32 до 68 лет. Клинический материал был получен во время приема врача-стоматолога в стоматологической поликлинике №2 и стоматологической клинике «Примадент» г. Уфа.

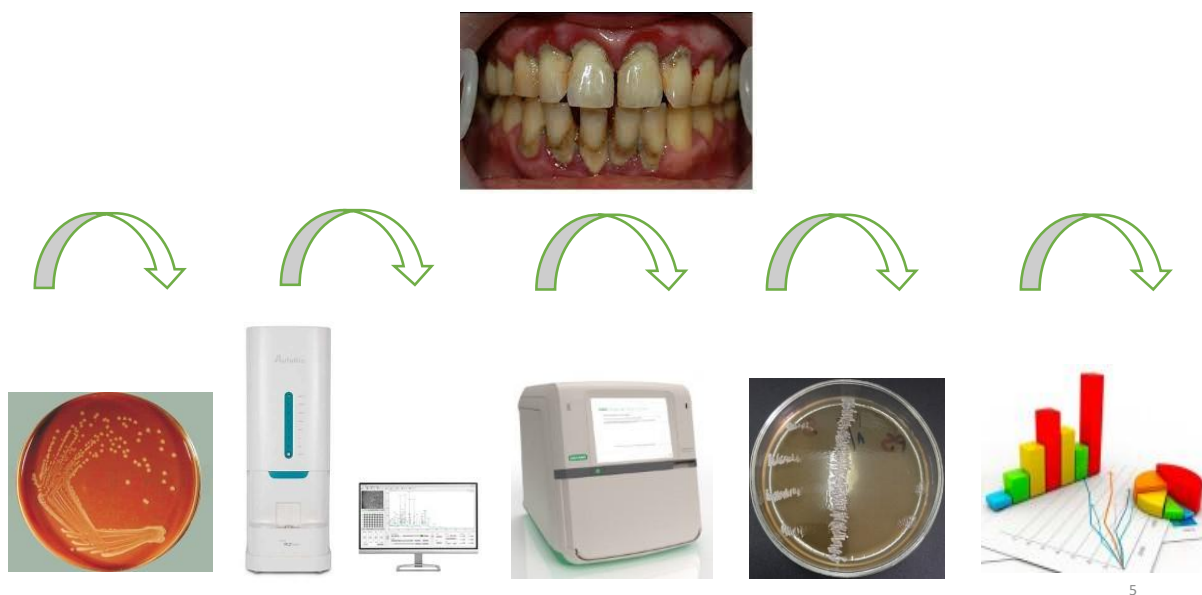
Методы исследования:

1. Метод культурального посева на питательные среды с последующим получением чистых культур бактерий.
2. Идентификация чистых культур методом масс-спектрометрии MALDI-TOF.
3. Метод определения антибактериальной активности идентифицированных штаммов с помощью системы двойных репортеров и прибора Bio RAD ChemiDoc MP Imaging System.
4. Выявление антагонистической активности выделенных штаммов методом перпендикулярных штрихов.



4

Материалы и методы



Идентификация бактерий с помощью масс-спектрометра



Рис 1. Масс-спектрометр

Identification Result: *Staphylococcus epidermidis* 9.131

Mass Spectrum

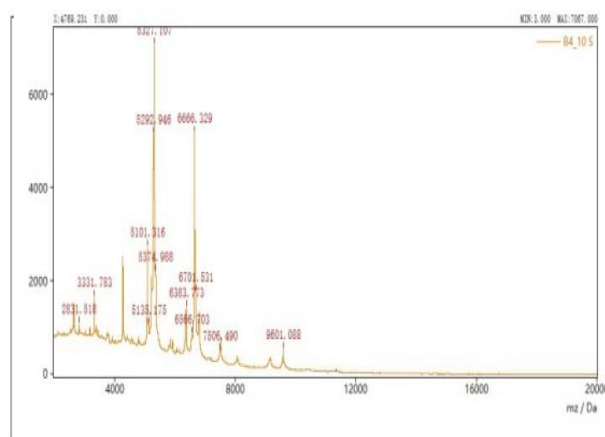


Рис 2. Масс-спектр *Staphylococcus epidermidis*

Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов

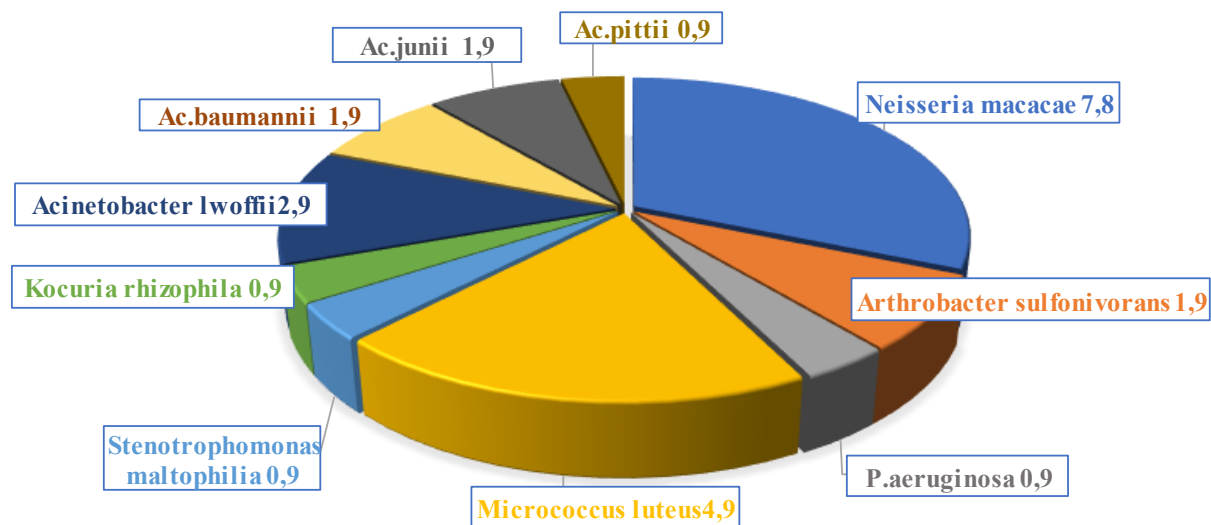


Диаграмма 1. Аэробные микроорганизмы, % встречаемости у пациентов

Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов

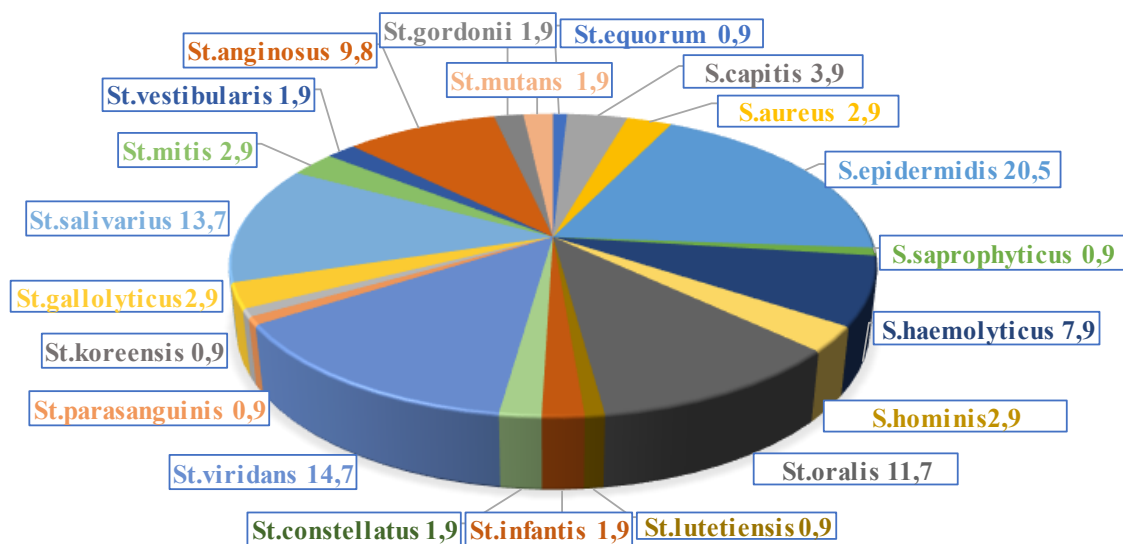


Диаграмма 2. Факультативно-анаэробные микроорганизмы. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., % встречаемости у пациентов

Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов

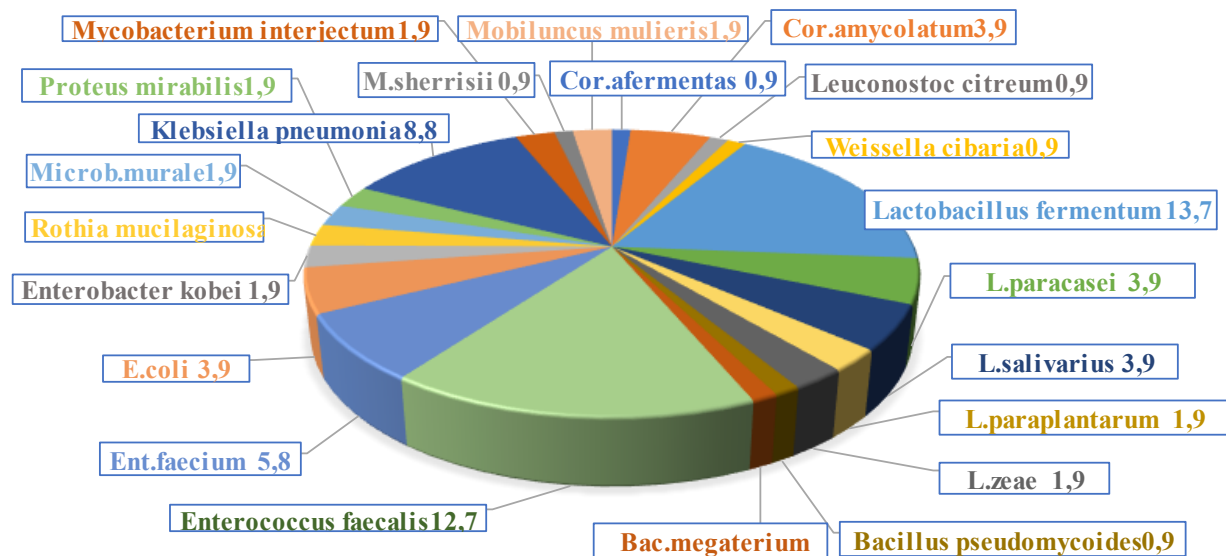


Диаграмма 3. Факультативно-анаэробные микроорганизмы, % встречаемости у пациентов

Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов

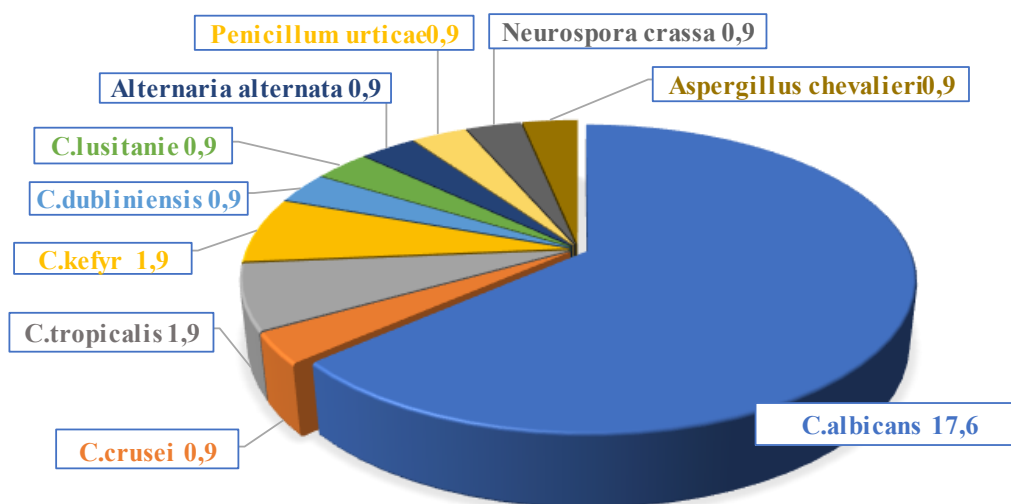


Диаграмма 4. Грибы, % встречаемости у пациентов

Микробиологическое исследование содержимого пародонтальных карманов

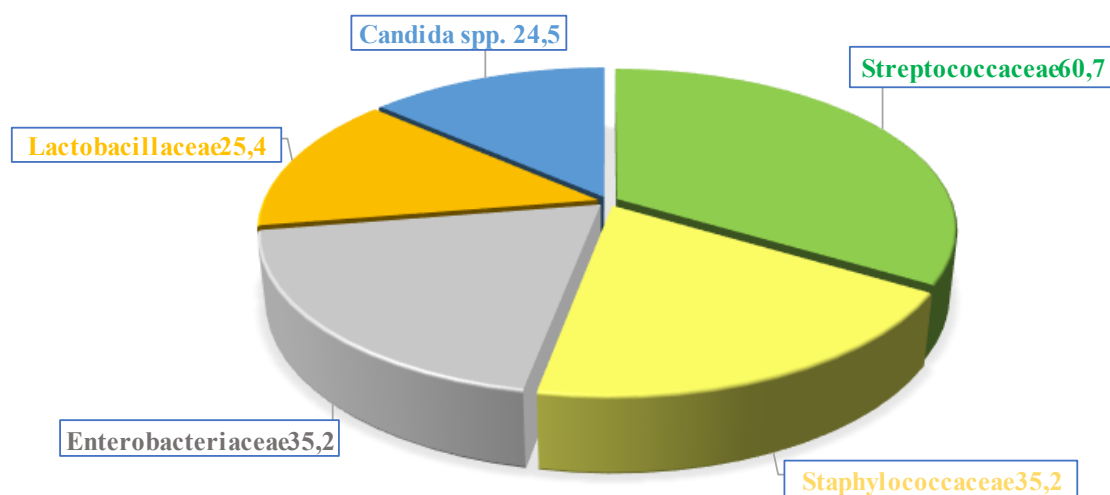


Диаграмма 5. Семейства микроорганизмов, % встречаемости у пациентов

Антибактериальные свойства микроорганизмов

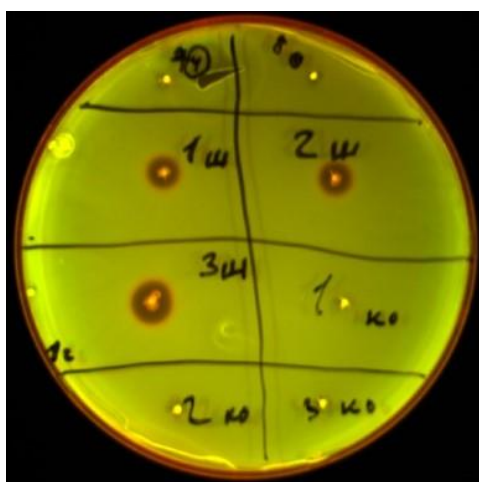


Рис 3. Антибактериальные свойства у *K.pneumoniae* Механизм действия – нарушение синтеза белка.

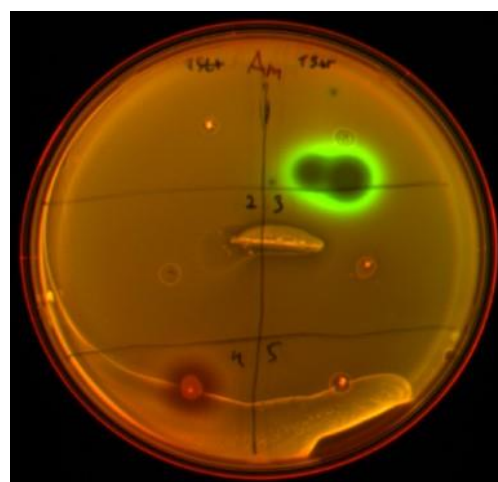


Рис 4. Антибактериальные свойства у *P.aeruginosa* (нарушение синтеза белка) и *S.epidermidis* (нарушение транскрипции/репликации ДНК).

Антибактериальные свойства микроорганизмов

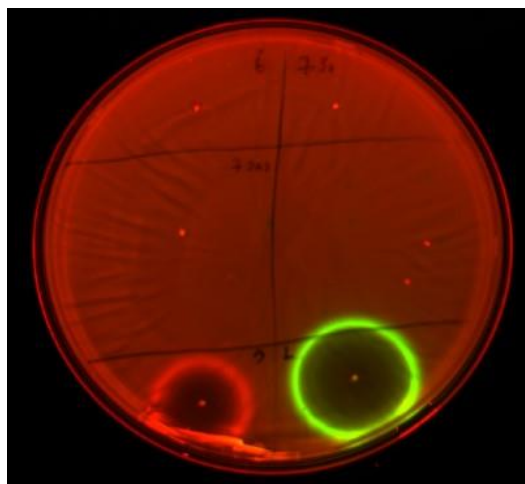


Рис 5. Отсутствие антибактериальных свойств у микроорганизмов.

Контроли эритромицин (маркер нарушения синтеза белка) и левофлоксацин (маркер включения в клетке SOS-ответа).

Антагонистические свойства микроорганизмов



Рис. 6. Антагонистические свойства *Lactobacillus fermentum* по отношению к *S.aureus* (слева) и *P.aeruginosa* (справа).

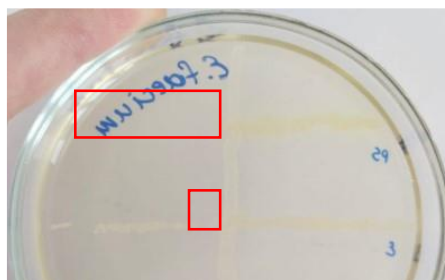


Рис. 7.
Антагонистические свойства *Ent. faecium* по отношению к *P.aeruginosa* (слева вверху) и *E.coli* (слева внизу).

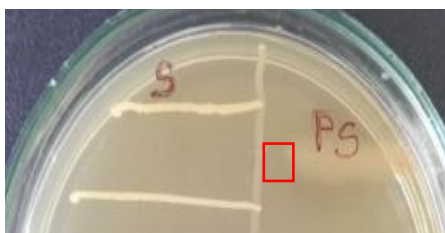


Рис. 8.
Антагонистические свойства *L. plantarum* по отношению к *P.aeruginosa*

Антагонистические свойства микроорганизмов

Бактерии антагонисты	Зоны ингибиции роста микроорганизмов, мм					
	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>St.salivarius</i>
<i>L.fermentum</i>	14	25-40	18	18	35	6
<i>L.plantarum</i>	0	2-3	13	16	18	2-3
<i>E.faecium</i>	0	30	2-3	0	0	0
<i>St.salivarius</i>	10	12	16	0	15	-
<i>S.epidermidis</i>	0	0	15	0	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	0	0	26	-	9	20

Выводы

- По результатам бактериологического исследования содержимого из пародонтальных карманов от пациентов пародонитом различной степени тяжести было выделено 244 штамма, из них наиболее часто встречались следующие роды микроорганизмов: *Streptococcus spp.* (25,4%) – 14 видов, *Staphylococcus spp.* (14,7%) – 7 видов, *Lactobacillus spp.* (10,6%) – 5 видов, *Enterococcus spp.* (7,7%), а также грибы рода *Candida* (10,2%) – 6 видов.
- Антибактериальные свойства были выявлены: с механизмом действия – нарушение синтеза белка у *K.pneumoniae* (3 штамма) и *P.aeruginosa* (1 штамм), с механизмом действия – нарушение транскрипции/репликации ДНК – у *S.epidermidis* (1 штамм).
- Антагонистические свойства были обнаружены у следующих микроорганизмов: *L.fermentum* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*), *L.plantarum* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*), *E.faecium* (по отношению к *P.aeruginosa*, *E.coli*), *St.salivarius* (по отношению к *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.epidermidis*), *S.epidermidis* (по отношению к *E.coli*, *K.pneumoniae* (по отношению к *E.coli*, *S.epidermidis*, *St.salivarius*).
- Выявлена способность условно-патогенной микрофлоры из пародонтальных карманов продуцировать различные антибактериальные компоненты, при этом антагонистическими свойствами обладали: *L.fermentum*, *L.plantarum*, *E.faecium*, *St.salivarius*, *S.epidermidis*, *K.pneumoniae*.

Апробация результатов исследования



АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ПАРОДОНТИТОМ

Ненно П.В., Гигранова И.А., кандидат медицинских наук, доцент,
Баймиев А.Л.Х., доктор биологических наук, доцент,

Баймиев А.Л.Х., доктор биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава
России, г. Уфа, Республика Башкортостан

Введение. На сегодняшний день заболевания пародонта являются достаточно актуальной проблемой в практике врачей стоматологов. Около 95% взрослых и 80% детей страдают теми или иными признаками заболеваний пародонта. Пародонт является комплексом околозубных тканей, функцией которых является фиксация зубов. Данные ткани могут подвергаться воспалительным процессам, и в отсутствие лечения это приводит к нарушению жевательной функции и утрате зубов [1]. На данный момент, существующие методы лечения заболеваний пародонта неэффективны и не приводят к выздоровлению пациентов.

Материалы и методы. Материалом для исследования являлись: ротовая жидкость и жидкость с пародонтальных карманов от пациентов разной возрастной группы с заболеваниями пародонта. Клинический материал был получен из клиники «Примидент» г.Уфы. Посев биологических жидкостей производился на коммерческие питательные среды: агар MRS (HIMEDIA, Индия), агар ГМФ (НИЦФ, Россия) с добавлением животной крови 5% от объема среды, агар Солевой (НИЦФ, Россия), Шоколадный агар (Оболенск, Россия), агар Сабуро (Оболенск, Россия), агар Эндо (Оболенск, Россия). Инкубацию посевов производили в CO₂ инкубаторе и термостате при 37°C до 2х суток, чашки с агаром Сабуро – до 4х дней при 28°C. Далее проводили идентификацию при помощи масс-спектрометрии AutoF MS2600. Затем идентифицированные культуры инкубировали в течение 2х суток в термо-шейкере при 37°C с целью увеличения биомассы. Антибактериальные свойства определяли с использованием штамма E.coli BW25113 дельта toIC, в который встроены плазмидный вектор pDualger2, содержащий в себе гены флуоресцентных белков: Katushka2S (максимум испускания 635 нм) и RFP (максимум испускания 584 нм). При действии антибиотика на процесс синтеза белка, увеличивается выработка дальнего красного белка Katushka2S. А при