

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

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ ЗУБНОГО КАМНЯ
НА ПРОЦЕССЫ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

Выполнил: Первушин Андрей Викторович

направление подготовки

06.04.01. Биология направленность
(профиль) образовательной программы
Фундаментальная и прикладная
микробиология

Руководитель: Борцова Юлия Львовна,
к.б.н., доцент кафедры фундаментальной и
прикладной микробиологии

Выпускная квалификационная
работа допущена к защите:
«17» 06 2025 г.

Выпускная квалификационная работа
защищена с оценкой «отлично»
«24» 06 2025 г.

Уфа, 2025

Список сокращений и условных обозначений

АФК - активные формы кислорода

МО - микроорганизм

СРО – свободно-радикальное окисление

ХЛ – хемилюминесценция

ХЧ – химически чистый

ЧДА – чистый для анализа

САДС – селективный агар для стрептококков

ЖСА – желточно-солевой агар

Оглавление

Список сокращений и условных обозначений	2
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	6
1.1 Микрофлора ротовой полости	6
1.2 Заболевания ротовой полости бактериологической этиологии	10
1.2.1 Одонтолитиаз	10
1.2.2 Пародонтит	12
1.3 Оксидативные процессы	14
1.3.1 Окислительный стресс в среде организма человека	14
1.3.2 Влияние окислительного стресса на микроорганизмы	17
1.3.3 Регистрация хемилюминесценции как метод исследования оксидативных процессов	18
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1. Подготовительный этап исследования	26
2.1.1. Подготовление реагентов	26
2.1.2. Сбор и подготовка материала	30
2.2. Культуральный метод	30
2.3. Микроскопический метод	33
2.4. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии	34
2.5. Метод регистрации хемилюминесценции	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	38
3.1. Выделение и идентификация культур микроорганизмов	38
3.2. Исследования хемилюминесценции	41
3.2.1. Исследования хемилюминесценции биоматериала	41
3.2.2. Исследования хемилюминесценции культур микроорганизмов	44
3.2.3. Статистическая обработка результатов	48
ВЫВОДЫ	51
Список литературы	53

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Одонтолитиаз – патологический процесс формирования зубного камня на поверхности зуба. Процесс формирования зубного камня начинается с адгезии бактерий на поверхности зуба. В благоприятной среде ротовой полости бактерии начинают активно размножаться и формировать биопленку – множественное скопление микроорганизмов, погруженных во внеклеточную полимерную матрицу. Биопленка предотвращает негативное воздействие на бактериальные клетки внешних факторов среды. Усваивая питательные вещества, бактерии выделяют кислоты, способствующие деминерализации зубной эмали. Шероховатая поверхность зубного налета облегчает последующую адгезию бактерий и остатков пищи, что приводит к ее уплотнению. На фоне повышенной концентрации минерализующих компонентов (ионов кальция, фосфора) и повышении рН происходит образование солей в зубном налете, его отвердение и формирование зубного камня. Зубной камень в процессе роста отслаивает десну и углубляет зубодесневой карман, что способствует развитию пародонтита – воспалительно-дистрофического процесса, происходящего в тканях, окружающих зубы. Помимо нарушения гигиены полости рта, причинами одонтолитиаза могут быть нарушения обмена веществ, челюстно-лицевые травмы, установки ортодонтических конструкций и пломб. Поэтому профилактика и лечении одонтолитиаза и пародонтита должны включать действие на конкретный пародонтопатогенный элемент, коим являются микроорганизмы. Оксидативные процессы, будучи естественными факторами, могут играть важную роль в механизмах действия антисептиков, так как активные формы кислорода повреждают клеточные мембранные, белки и нуклеиновые кислоты микроорганизмов, приводя к их гибели. Микроорганизмы также вырабатывают механизмы защиты от оксидативного стресса, используя нейтрализующие активные формы кислорода ферменты: супероксиддисмутаза, пероксидаза и каталаза. Изучение уровня

оксидативной активности микробных сообществ поможет понять потенциал использования активных форм кислорода в профилактике и лечении одонтолитиаза и пародонтита. В ходе исследования также будет предложена разработка методики экспресс-теста исследования биологического материала методом регистрации хемилюминесценции в исследовательских целях.

Целью исследования заключается в исследовании оксидативной активности биологического материала пациентов с пародонтитом легкой и средней тяжести и выделенного из него сообщества штаммов микроорганизмов, идентифицированных до вида.

Задачи исследования:

- 1) Выделить культуры микроорганизмов из биологического материала и провести их идентификацию;
- 2) Изучить оксидативное действие инокулированных культур микроорганизмов при добавлении в тест-систему активных форм кислорода;
- 3) Изучить оксидативное действие биологического материала при добавлении в тест-систему активных форм кислорода;
- 4) Выполнить статистическую обработку полученных данных;
- 5) Проанализировать взаимосвязь оксидативного действия биологического материала и выделенных из него микроорганизмов.

Научная новизна. Впервые был оценен уровень окислительных процессов в биологическом материале пациентов с пародонтитом легкой и средней тяжести и выделенных из них штаммов микроорганизмов методом регистрации хемилюминесценции в модельной системе активных форм кислорода, проанализирована взаимосвязь между полученными показателями с целью разработки терапии, включающую исследование и влияние на уровень оксидативных процессов, а также использование окислительного стресса в терапевтических целях. Была предложена разработка методики экспресс-теста биологического материала методом регистрации хемилюминесценции в исследовательских целях.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Микрофлора ротовой полости

Полость рта – благоприятная среда для обитания разнообразных микроорганизмов. Наличие питательных веществ, стабильной температуры, слабощелочной реакции и постоянной влажности обеспечивает условия для их адгезии, колонизации и размножения.

Микрофлора полости рта – сложный, динамичный биоценоз, состоящий из постоянных и меняющихся популяций микроорганизмов. Ее формирование – результат длительной эволюции под влиянием множества эндогенных и экзогенных факторов, связанных как с внешней средой, так и с состоянием организма.

В полости рта взрослого человека обитает большое количество видов микроорганизмов, исследование которых культуральным и молекулярно-генетическим методом зафиксировано в расширенной базе данных микробиома ротовой полости eHOMD (expanded Human Oral Microbiome Database). На данный момент в базе данных содержится информация о 834 таксономических группах, из которых 523 таксонов преимущественно ротовой полости, 49% которых наименованы и культивированы, 21% не наименованы, но культивированы и 29% составляют некультивируемые филогенетические типы. Они преимущественно локализуются на поверхности зубов, слизистых оболочках, в межзубных промежутках, слюне, кариозных полостях, в области шейки зуба, на спинке языка и в других труднодоступных для самоочищения слюной участках (в слюне – до 10^9 микроорганизмов в 1 мл, в десневых карманах – до 10^{11} , общая плотность микробиома составляет 10^5 ед.). Микрофлору полости рта составляют как аутохтонные виды — постоянные обитатели, специфичные для данной экосистемы, — так и аллохтонные, попадающие из других частей организма и окружающей среды с пищей, водой и воздухом.

Микробиота полости рта представлена грамположительными и грамотрицательными, аэробными и анаэробными микроорганизмами. Грамположительные кокки преимущественно представлены стрептококками, а грамположительные палочки – лактобациллами. Среди грамотрицательных палочек преобладают строгие анаэробы (бактероиды, превотеллы, порфиromонады), а также встречаются нитевидные лептотрихии и веретенообразные фузобактерии. Факультативно-анаэробные грамотрицательные микроорганизмы представлены гемофилами. В полости рта также присутствуют актиномицеты, спирохеты, представленные непатогенными трепонемами, лептоспиралами и боррелиями, и простейшие. Многие из этих микроорганизмов обладают потенциальной патогенностью и могут быть вовлечены в развитие заболеваний полости рта.

В ротовой полости обитают как условно-патогенные, так и непатогенные зеленящие стрептококки (например, *Streptococcus salivarius*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. milleri*, *S. mitis*). Эти бактерии расщепляют углеводы с образованием органических кислот и преобразуют простые углеводы в полимерные соединения, к примеру декстрины. Образование декстринов способствует адгезии бактерий к поверхности зубов и формированию зубного налета.

К кариесогенным бактериям, производящим кислоты, относятся палочковидные грамположительные и грамотрицательные бактерии родов *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* и *Fusobacterium*. В отличие от них, бактерии рода *Veillonella*, расщепляя органические кислоты до углекислого газа и воды, проявляют противокариозное действие. Однако следует отметить, что факторы патогенности этой группы микроорганизмов недостаточно изучены.

Протеолитической активностью обладают бактерии рода *Peptostreptococcus*, обнаруживаемые в ассоциациях с фузобактериями и

спирохетами преимущественно при разных местных патологических процессах.

В полости рта наиболее распространены спирохеты рода *Treponema*, в частности, *T. denticola* и *T. vincentii*. Они обнаруживаются в десневых карманах и, ассоциируясь с фузобактериями и некоторыми видами бактероидов, могут вызывать язвенно-некротический гингивит.

Бактерии родов *Actinomyces* и *Actinobacillus* постоянно присутствуют в полости рта и участвуют в формировании зубного налета.

Не исключено обнаружение в ротовой полости лептотрихий, пропионибактерий, коринебактерий и микоплазм, количество которых увеличивается при различных стоматологических заболеваниях.

Состав микрофлоры полости рта существенно зависит от нескольких факторов: состояния иммунной системы, межмикробных взаимодействий в биоценозе, а также влияния внешних и внутренних факторов, таких как антибиотики, гормоны и токсины. Многие микроорганизмы погибают под воздействием неспецифических и специфических факторов защиты, например лизоцима, секреторных иммуноглобулинов группы А слюны и мокроты, и фагоцитоза. Сочетание неблагоприятных факторов может привести к дисбиозу. Ослабление иммунитета создает условия для развития эндогенной инфекции, вызванной представителями нормальной микрофлоры.

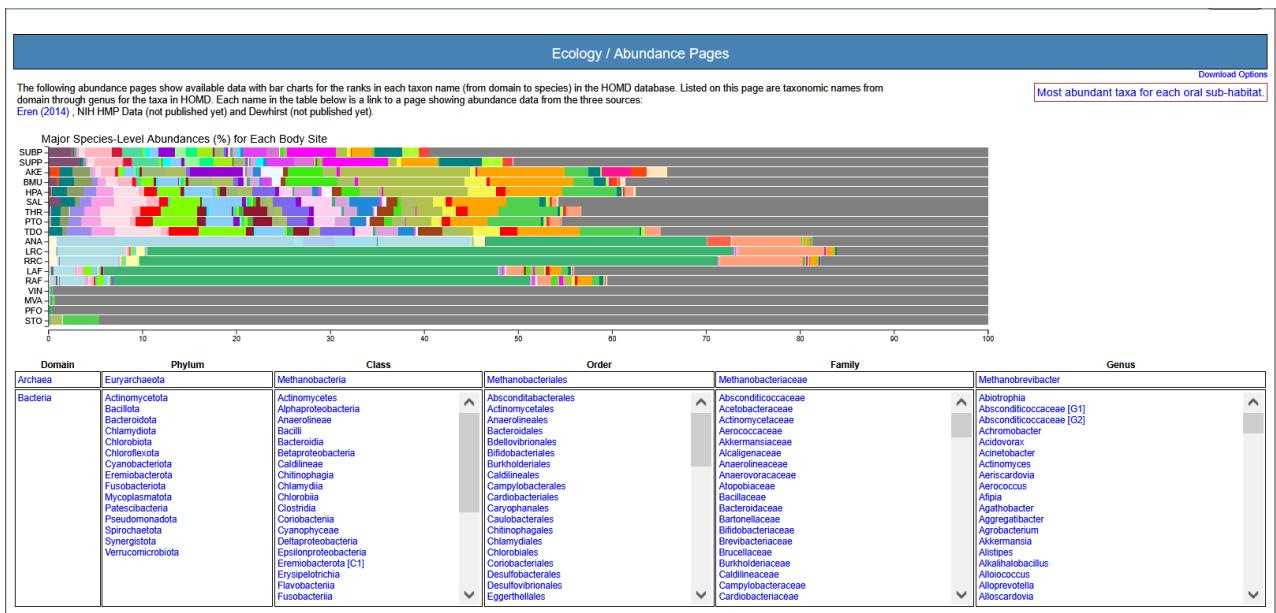


Рис. 1. Экология микроорганизмов ротовой полости, визуализированная в виде линейчатой гистограммы в расширенной базе данных микробиома ротовой полости eHOMD

1.2 Заболевания ротовой полости бактериологической этиологии

Как уже было отмечено в предыдущем параграфе, под воздействием неблагоприятных факторов на микробное сообщество ротовой полости может возникнуть состояние его дисбаланса, так называемого дисбактериоза (дисбиоза). Дисбиоз играет значимую роль в развитии стоматологических инфекций, которые в условиях ослабления защитной функции организма (естественные барьеры, бактерицидные ферменты и иммуноглобулины, клеточно-гуморальный иммунитет) могут перейти из локализованной формы в генерализованную, то есть затрагивающую всю систему организмов. Помимо гигиены полости рта, играющей отнюдь не маловажную, и, можно сказать, ключевую роль в развитии стоматологических инфекций, также факторами их развития являются нарушения обмена веществ, челюстно-лицевые травмы, установки ортодонтических конструкций и пломб.

1.2.1 Одонтолитиаз

Одонтолитиаз – патологический процесс формирования зубного камня на поверхности зуба.

Образование зубного камня берет начало с формирования зубного налета – пелликулы, состоящей из связанной с белками воды (80% объема), гликопротеидов и декстрина, и также содержащей кальций, фосфор, калий, натрий, фтор, органические и неорганические анионы, бактериальные ферменты (фосфатаза, протеаза, коллагеназа, гиалуронидаза и др.). Немаловажный компонент пелликулы – микробное сообщество, заключенное в органический матрикс гликопротеидной (компонент слюны) и полисахаридной (бактериальный компонент) природы.

Совершая адгезию на поверхности зуба, микроорганизмы окружают себя матриксом для защиты от внешних факторов неблагоприятного воздействия, размножаются и продуцируют глико- и протеолитические

ферменты, расщепляющие органические субстраты с образованием различных продуктов реакции – органических кислот, пептидов, ароматических соединений, газов и др.

Образование зубного налета начинается с колонизации аэробными видами микроорганизмов, а с образованием слоя плотного воздухонепроницаемого матрикса поверхность зуба также способны колонизировать анаэробные микроорганизмы. В среднем, в зубном налете обнаружаются стрептококки, стафилококки, пептострептококки, нейссерии, вейлонеллы, лактобактерии, дифтероиды, грибы.

Образование зубного налета является первым этапом формирования зубной бляшки – прочно прикрепленной к зубу структуры из скопления бактерий, полисахаридов и белков. Механизм образования заключается в том, что образованный зубной налет имеет шероховатую поверхность, облегчающую адгезию других микробных клеток, которые, колонизируя поверхность зубного налета, также образуют биопленку, то есть идет наложение зубного налета, его утолщение и уплотнение.

При действии ионов кальция, фосфора (минерализующий компонент) и повышении водородного показателя (рН) происходит осаждение и концентрация солей, приводящие к минерализации (отвердеванию) зубной бляшки, то есть, к формированию зубного камня.



Рис. 2. Наддесневой (супрагингивальный) зубной камень. Отмечается воспаленная, гиперемированная десна.

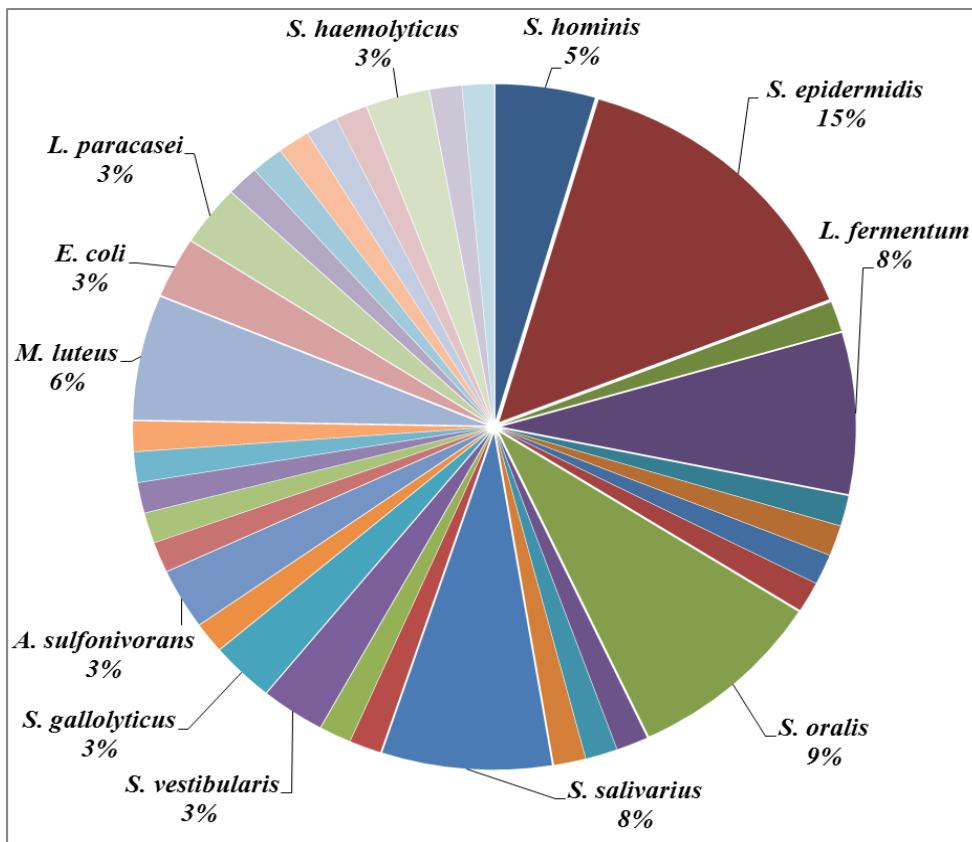


Рис. 3. Диаграмма микробиоты зубного камня, изученной культуральным методом с идентификацией методом масс-спектрометрии MALDI-TOF в лаборатории микробиома человека (по материалу Газизуллиной Г.Р., Гимрановой И.А., Акмаловой Г.М., Валиахметовой Д.З., 2024 г.)

1.2.2 Пародонтит

Супрагингивальные (наддесневой) и субгингивальные (поддесневой) зубные отложения, пролиферируя в десневой бороздке, отслаивая десневой эпителий, вызывают ее углубление с формированием пародонтального кармана. Данный процесс сопровождается деструкцией прикрепленного аппарата зуба, в частности, разрушением коллагеновых волокон периодонта. В результате развивается пародонтит – хроническое воспалительно-дегенеративное заболевание пародонта, характеризующееся резорбцией альвеолярной кости, гингивитом, образованием пародонтальных абсцессов и, в итоге, потерей зубов. Большая роль отводится иммунопатологическим процессам и инфекционным агентам – бактериям видов *Porphyromonas*

gingivalis, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*.

Хронический одонтогенный воспалительный процесс (хронический гингивит) способствует прогрессированию пародонтита. Это обусловлено постоянной абсорбцией бактериальных метаболитов из десневых карманов, что приводит к регионарному лимфадениту и развитию аллергических реакций.

Пародонтит характеризуется хроническим инфекционным процессом в пародонте, являющимся источником постоянной бактериемии и эндотоксинемии. Это состояние способствует развитию хронического сепсиса и может способствовать обострению или поддержанию ревматических заболеваний, септического эндокардита, нефропатий и других системных патологий.



Рис. 4. Абсцедирующий пародонтит

1.3 Оксидативные процессы

Оксидативные процессы, или окислительный стресс, представляет собой состояние клеточной дисфункции, обусловленное накоплением активных форм кислорода (АФК). Он характеризуется нарушением баланса между продукцией АФК в ходе окислительного метаболизма и эффективностью антиоксидантной системы организма, не способной своевременно нейтрализовать реакционноспособные промежуточные продукты и восстановить повреждения. Дисбаланс окислительно-восстановительного гомеостаза приводит к накоплению токсичных соединений и свободных радикалов, таких как супероксидный анион-радикал (O_2^-), гидроксильный радикал ($\cdot OH$) и перекись водорода (H_2O_2), вызывающих повреждение всех клеточных компонентов: белков, липидов и ДНК, включая разрывы цепей ДНК.

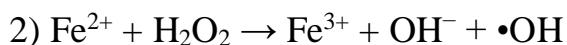
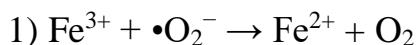
1.3.1 Оксилительный стресс в среде организма человека

В ходе нормального клеточного метаболизма ежедневно продуцируется порядка 20 миллиардов АФК. Образование свободных радикалов является одним из механизмов клеточной защиты от патогенов. Дополнительным источником АФК служат реакции детоксикации ксенобиотиков и β -окисление жирных кислот. В биологических системах человека реакции Фентона и Габера-Вейса являются основными источниками образования гидроксильных радикалов.

Реакция Фентона представляет собой реакцию окисления органических соединений пероксидом водорода (H_2O_2) в присутствии катализитических количеств ионов железа(II). Открытие Генри Дж. Х. Фентоном в 1894 году касалось катализитического действия солей железа в окислительных процессах. В ходе реакции ионы железа(II) окисляются пероксидом водорода до ионов железа(III), образуя при этом высокореактивные гидроксильные радикалы ($\cdot OH$), ответственные за деградацию органических субстратов:



Реакция Габера-Вейса, катализируемая ионами железа, приводит к образованию гидроксильных радикалов ($\cdot\text{OH}$) из пероксида водорода (H_2O_2) и супероксид-аниона ($\cdot\text{O}_2^-$). Несмотря на относительно низкую скорость некатализитической реакции, она может протекать в биологических системах, индуцируя окислительный стресс. Протекает в две стадии:



Общая реакция:



Окислительный стресс с химической точки зрения характеризуется значительным сдвигом клеточного редокс-потенциала в окислительную сторону, что проявляется, например, в снижении соотношения восстановленного и окисленного глутатиона. Выраженность эффектов окислительного стресса коррелирует с его интенсивностью. При незначительных нарушениях гомеостаза клетка способна к восстановлению. Однако, при высоком уровне окислительного стресса наблюдается клеточная гибель. В ответ на стресс клеточная гибель может происходить по двум основным механизмам: апоптозу или некрозу. Апоптоз характеризуется программируемой деградацией внутриклеточного содержимого до нетоксичных продуктов. Некроз, напротив, развивается при высокой интенсивности стрессового воздействия, приводя к нарушению целостности клеточной мембранны и выбросу внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство. Это может вызвать повреждение соседних клеток и тканей.

Ключевым компонентом окислительного стресса является образование АФК, включающих свободные радикалы и пероксиды. Несмотря на относительно низкую реакционную способность супероксидного анион-радикала, его спонтанное дисмутирование или катализируемое ионами переходных металлов превращение приводит к образованию более реакционноспособных радикалов. Это обуславливает повреждение клеточных макромолекул, включая липиды, ДНК и белки, путём окислительной модификации. Хотя АФК постоянно генерируются в клетке, их концентрация в физиологических условиях поддерживается на низком уровне благодаря эффективной антиоксидантной системе и механизмам репарации повреждённых молекул. Экзогенные факторы, такие как вдыхание атмосферных свободных радикалов, радиационное облучение и воздействие автомобильных выхлопных газов, способствуют повышению уровня свободных радикалов в организме и развитию окислительного стресса. Подобный эффект оказывают курение (активное и пассивное), употребление алкоголя и продуктов, богатых ненасыщенными жирными кислотами, ингибируя антиоксидантную систему организма.

Окислительный стресс оказывает системное воздействие на организм. Кожа, и в особенности её эпидермис, подвергается высокому уровню окислительного стресса вследствие прямого контакта с экзогенными факторами, такими как ультрафиолетовое излучение и загрязнители окружающей среды. Образование свободных радикалов в эпидермисе и дерме ингибирует процессы репарации белков, включая коллаген – ключевой компонент, определяющий эластичность кожных покровов. Это приводит к преждевременному старению кожи, проявляющемуся в виде морщин, снижения тургора и развития различных дерматозов. Помимо кожных проявлений, окислительный стресс ассоциируется с системными симптомами, такими как хроническая усталость, нарушения сна и микроциркуляции. Он также является этиологическим фактором ряда

заболеваний, включая сердечно-сосудистую патологию, нейродегенеративные заболевания и онкологические процессы.

1.3.2 Влияние окислительного стресса на микроорганизмы

Клеточные формы жизни вынуждены адаптироваться к потенциально повреждающему действию побочных продуктов кислородного метаболизма. Активные формы кислорода (АФК) способны повреждать различные клеточные компоненты, включая нуклеиновые кислоты, белки и липиды. Супероксид-анион (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2) – наиболее изученные АФК – постоянно образуются эндогенно в результате самоокисления молекулярного кислорода в различных флавопротеинах, как дыхательных, так и недыхательных, как аэробных, так и анаэробных организмов. Для защиты от этих токсичных соединений бактерии синтезируют ферменты, такие как супероксиддисмутазы (преобразующие O_2^- в O_2 и H_2O_2), каталазы и пероксидазы, обеспечивающие детоксикацию H_2O_2 и поддержание гомеостаза АФК. Бактериальная мембрана обладает избирательной проницаемостью в отношении пероксидов, которые способны проникать через неё и вызывать повреждение клеток. Источники пероксидов включают фотохимические реакции, экскрецию молочнокислыми бактериями, а также, косвенно, фагоциты, продуцирующие супероксид-анион посредством НАДФН-оксидазы. Супероксид-анион, будучи непроницаемым для цитозольных мембран при нейтральном рН, не способен проникать в бактериальную клетку, находящуюся внутри фагосомы. Предполагается, что спонтанная дисмутация супероксид-аниона в пероксид является причиной наблюдаемой токсичности для фагоцитированных бактерий. Поскольку мембранны непроницаемы для супероксид-аниона, для повышения его внутриклеточной концентрации в бактериальных клетках *in vitro* и *in vivo* необходимы механизмы, отличные от простой диффузии. Антибиотики с окислительно-восстановительным механизмом действия, такие как

синтетические виологены и паракват, а также природные хиноны и феназины, проникают в бактериальные клетки. Внутри клеток они окисляют окислительно-восстановительные ферменты, генерируя молекулярный кислород и передавая ему электроны. Синглетный кислород, являющийся короткоживущей активной формой кислорода, способен к диффузии между клетками.

Оксидативный стресс индуцирует повреждения различных клеточных компонентов, включая структурные элементы ДНК, нуклеотидные основания, свободные и окисленные аминокислоты, а также белковые кофакторы. В ответ на оксидативный стресс бактерии активируют различные системы регуляции стресс-реакции, специфика которых зависит от природы повреждающего агента. В грамположительных бактериях фактор транскрипции PerR, функциональный аналог OxyR, регулирует экспрессию генов, во многом совпадающих с генами, контролируемыми OxyR. Оба регулятора стимулируют экспрессию ферментов, катализирующих деградацию H_2O_2 , тем самым снижая уровень оксидативного повреждения. Однако, в отличие от PerR, OxyR индуцирует экспрессию дисульфид-редуктаз, обеспечивающих восстановление уже повреждённых белков. Несмотря на эффективность системы реагирования, повреждение клеточных соединений в результате окислительного стресса происходит быстро и носит необратимый и неспецифический характер.

1.3.3 Регистрация хемилюминесценции как метод исследования оксидативных процессов

Излучение света веществом обусловлено различными механизмами. Хемилюминесценция (ХЛ) представляет собой спонтанное излучение, возникающее при переходе частиц из электронно-возбуждённого состояния, образованного в ходе химической реакции. В биологических системах биолюминесценция катализируется ферментами, обеспечивающими *in situ*

химические превращения. В качестве примера можно привести взаимодействие люциферина с кислородом в присутствии люциферазы, ионов магния или кальция, и аденоцинтрифосфата (АТФ), приводящее к излучению света. Окисление люциферина приводит к образованию хемивозбуждённого промежуточного продукта. Энергия этого продукта может быть высвобождена путём прямой фотоэмиссии или посредством резонансного переноса энергии к соседнему флуорофору, вызывая его возбуждение и последующую флуоресценцию. Люминол и люциферин являются наиболее изученными представителями люминогенов, способных к хемилюминесценции. Эти соединения демонстрируют высокую чувствительность к окислению перекисью водорода и супероксид-анион-радикалом. Излучение света обусловлено химическими преобразованиями образующихся в ходе реакции хемивозбужденных промежуточных продуктов. В определённых условиях перекиси способны генерировать синглетный кислород, который, при условии отсутствия взаимодействия с другими реагентами, испускает инфракрасное излучение с длиной волны 1270 нм в процессе излучательной дезактивации. Кроме того, оксалатные эфиры и производные 1,2-диоксетана представляют собой эффективные предшественники как прямой, так и косвенной хемилюминесценции. Их фотофизические свойства, определяемые природой флуорофорного акцептора энергии, позволяют создавать настраиваемые излучающие системы. Благодаря этому они находят широкое применение в биосенсорных технологиях, диагностике и молекулярной визуализации. При непрямой ХЛ происходит трансфер энергии, приводящий к возбуждению флуорофора или фотосенсибилизатора. Возбуждение фотосенсибилизатора может инициировать последующие реакции независимо от состояния флуорофора. В присутствии молекулярного кислорода фотосенсибилизатор способен генерировать активные формы кислорода.

ХЛ представляет собой эффективный аналитический метод, применяемый для детектирования и количественного определения активных

форм кислорода и азота, а также биомолекул, таких как аминокислот, дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот, олигопептидов и полипептидов различных структур, микроорганизмов, клеток и металлов.

Хемилюминесцентные методы анализа получают всё более широкое распространение в научном сообществе благодаря преодолению ряда ограничений, присущих традиционным фотометрическим методам. Существующие обзоры преимущественно фокусируются на применении конкретных хемилюминесцентных соединений, таких как люминол, ципридин, люциферин и пероксиоксалаты, в сенсорных, диагностических и терапевтических технологиях.

ХЛ, обусловленная окислением 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона (люминола), представляет собой широко распространённую и хорошо изученную систему. Процесс осуществляется в щелочной среде при добавлении окислителя. Водные растворы люминола находят широкое применение в аналитической химии. Окисление люминола сопровождается обратным интеркомбинационным переходом, приводящим к кратковременному излучению синего света с максимумом интенсивности при длине волны 425 нм. Длительность ХЛ определяется концентрацией реагентов, наличием добавок и условиями поддержания реакции, варьируя от нескольких секунд до нескольких часов. Каталитическое воздействие на ХЛ люминола и его производных оказывают различные соединения, включая пероксидазы и гем-содержащие соединения, которые часто используются в качестве добавок. В качестве примера можно привести пероксидазу хрина (HRP), катализирующую образование свободного радикала люминола из двух молекул аниона люминола. В водных растворах пероксид водорода является типичным окислителем, индуцирующим хемилюминесценцию люминола. Кроме того, окисление люминола может каталитически происходить под действием озона и гипохлоритов в присутствии ионов переходных металлов.

В аprotонных растворителях, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), ХЛ люминола обусловлена основными условиями среды и присутствием молекулярного кислорода (O_2). Каталитическое воздействие гидроксилированных промежуточных продуктов, образующихся в ходе процессов окисления 1,2-дивинилбензола (ДВБ) с использованием персульфата в качестве инициатора, приводит к значительному усилению хемилюминесценции.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемого материала использовались зубные камни, извлеченные у пациентов с пародонтитом легкой и средней тяжести на приеме у врача-стоматолога.

Объектами исследования были образцы зубных камней и их микробиота.

Для работы были использованы:

1. Питательная среда для контроля стерильности сухая (Тиогликолевая среда) производства ФБУН Государственный Научный Центр Прикладной Микробиологии и Биотехнологии, Московская область, Оболенск, содержащая панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, натрия хлорид, Д-глюкоза, натрия тиогликолят, натрий углекислый, цистеина гидрохлорид, агар 0,75%. Данная питательная среда используется в качестве транспортной среды для изъятого биоматериала, обеспечивающая максимальную сохранность бактериальной микробиоты до момента исследования. Среда использовалась без модификаций (без добавления антибиотических препаратов, питательных водорастворимых компонентов, кислородредуцирующих добавок);

2. Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) производства ФБУН Государственный Научный Центр Прикладной Микробиологии и Биотехнологии, Московская область, Оболенск, содержащий панкреатический гидролизат рыбной муки, пептон ферментативный, натрия хлорид, агар >2%. Данная питательная среда является основой для приготовления сложных питательных сред (сахарно-кровянной агар по Цейсслеру для выделения прихотливых к условиям культивирования и составу питательной среды микроорганизмов, селективная, дифференциально-диагностическая среда желточно-солевой агар Чистовича (ЖСА) для выделения бактерий группы *Staphylococcus* и первичной идентификации видов с летицловителлазной активностью);

3. Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий (Эндо-агар) производства ФБУН Государственный Научный Центр Прикладной Микробиологии и Биотехнологии, Московская область, Оболенск, содержащая панкреатический гидролизат кильки, дрожжевой экстракт, лактозу, фуксин основной, сульфат натрия двузамещенный, сульфит натрия, хлорид натрия, карбонат натрия, агар >2%. Является селективной средой для культивирования грамотрицательных бактерий (рост грамположительных бактерий подавляется анилиновыми красителями, коим в составе питательной среды является фуксин основной) и дифференциально-диагностической для лактозоположительных микроорганизмов. Использовалась для выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и первичной идентификации вида *Escherichia coli*;

4. Агар MRS для лактобактерий производства HIMEDIA, Индия, содержащий протеозопептон, мясной экстракт, дрожжевой экстракт, глюкозу, твин-80, аммония цитрат, натрия ацетат, магния сульфат, марганца сульфат, калия гидрофосфат, агар >2%. Является питательной средой для культивирования бактерий рода *Lactobacillus*, плохо растущих на простых питательных средах и средах без специализированных добавок;

5. Селективный агар для стрептококков (САДС) производства HIMEDIA, Индия, содержащий триптон, папаиновый гидролизат сои, натрия хлорид, L-цистин, натрия сульфат, натрия цитрат, декстрозу, натрия азид, кристаллический фиолетовый, агар >2%. Является селективной средой для выделения культур микроорганизмов родов *Streptococcus* и *Enterococcus* при первичном посеве;

6. 0,9% раствор натрия хлорида (изотонический раствор, физиологический раствор). Использовался для суспензирования культур микроорганизмов, транспортировки биоматериала для исследования методом регистрации хемилюминесценции, окраски бактериальных мазков, приготовления желточной эмульсии;

7. Раствор кристаллического фиолетового (генцианвиолет), раствор Люголя, раствор сафранина из коммерческого набора. Предназначены для окраски бактериальных мазков по методу Грама;
8. Фосфатный буфер (20 мМ КН₂РО₄, 105 мМ KCl, pH = 7,5);
9. Цитрат натрия (50мМ);
10. Люминол (5-10 М);
11. Железо сернокислое (50мМ);
12. 96% раствор этилового спирта. Использовался для окраски бактериальных мазков, дезинфекции рабочего места и выполнения антисептических мероприятий в аварийной ситуации;
13. Кровь дефибринированная для приготовления кровяного агара Цейссlera;
14. Глюкоза ХЧ/ЧДА для приготовления кровяного агара Цейссlera;
15. Яйцо куриное для приготовления желточной эмульсии;
16. Хлорид натрия ХЧ для приготовления желточно-солевого агара Чистовича;
17. Средство моющее «Лотос автомат». Использовался для мытья лабораторной посуды;
18. 6% раствор пероксида водорода. Использовался для мытья лабораторной посуды, выполнения антисептических мероприятий в аварийной ситуации;
19. Средство дезинфицирующее «ГЛАВХЛОР» таблетированное. Использовалось для приготовления дезинфицирующих растворов;
20. Дистиллированная вода (единожды перегнанная вода). Использовалась для мытья лабораторной посуды, приготовления 0,9% раствора натрия хлорида, окраски бактериальных мазков;
21. Проточная вода. Использовалась для мытья лабораторной посуды, приготовления дезинфицирующих средств;
22. Лабораторные инструменты и оборудование:
 - 1) Колбы 250 мл. термостойкие;

- 2) Чашки Петри;
- 3) Мерный цилиндр 100 мл, 2 класс точности;
- 4) Флаконы на 250, 400 мл.;
- 5) Пробки ватно-марлевые для флаконов;
- 6) Крафт-бумага
- 7) Стеклянные палочки;
- 8) Щетка лабораторная;
- 9) Стекла предметные;
- 10) Лопаточка;
- 11) «Мостик» и «ванночка» для окраски мазков;
- 12) Емкости для дезинфицирующего раствора;
- 13) Игла медицинская;
- 14) Петли бактериологические №0, 1, 4;
- 15) Пробирки полимерные 1,5 мл типа Eppendorf
- 16) Дозатор 200-1000 мкл, 0,5-10 мкл;
- 17) Наконечники для дозаторов одноразовые;
- 18) Весы электронные торсионные;
- 19) Плитка;
- 20) Сухожаровой шкаф;
- 21) Автоклав настольный;
- 22) Центрифуга-вортекс
- 23) Ламинарный бокс;
- 24) Термостат в режиме 37°C
- 25) Микроскоп световой с источником искусственного света;
- 26) Масс-спектрометр Autof MS 2600 MALDI-TOF;
- 27) Хемилюминометр ХЛМ-003.

2.1. Подготовительный этап исследования

2.1.1. Подготовление реагентов

Для работы микробиологическими методами необходимо соблюдать правила асептики и антисептики, то есть недопущения контаминации рабочих реагентов, посуды, инструментов и оборудования представителями посторонней микрофлоры для объективности результатов исследования и использования средств индивидуальной защиты (СИЗ), знание антисептических мероприятий для избежания заражения большой концентрацией патогенных агентов. Поэтому весь процесс исследования начинается со стерилизации лабораторной посуды.

Для избавления от механических загрязнений и следов органических соединений (белки, жиры) производится предстерилизационная очистка. Посуда (чашки Петри, колбы конические) предварительно замачивается в горячем 5% растворе моющего средства (порошок «Лотос автомат», «Пемоксоль») с добавлением 6% пероксида водорода для ослабления связи загрязняющего вещества и поверхности посуды. После производится механическая чистка в этом же растворе с помощью лабораторных ёршиков, щеток, губок для посуды. После механической очистки всех площадей посуды (поверхностных и внутренних) моющее средство смывается проточной водой, а для избавления от солей проточной воды посуда трижды ополаскивается дистиллированной водой. Контроль чистоты лабораторной посуды осуществляется визуально. После ополаскивания вода должна равномерно стекать с поверхности чашек Петри и стенок флаконов тонкой пленкой. Вымытая посуда высушивается либо в перевернутом положении на лабораторных подносах при комнатной температуре (холодная сушка), либо в сухожаровом шкафу 15-30 мин при 80°C, до полного высыхания. После высушивания посуда осматривается на просвет: поверхность стекла должна была быть прозрачной, без следов подтеков, пятен, матового налета и иных артефактов. Сухая чистая посуда упаковывается в крафт-бумагу или специальные стерилизационные упаковки и загружается в сухожаровой шкаф

для сухожаровой стерилизации в режиме либо 60 минут при 180°C, либо 30 минут при 200°C. Пригодность стерильной посуды составляет не более трех суток, после чего сухожаровую стерилизацию необходимо повторить.

Культуральный метод анализа подразумевает посев биоматериала или культуры микроорганизмов на питательные среды, являющиеся реактивами, которые необходимо перед исследованием приготовить. В исследовании используются синтетические питательные среды, представленные гигроскопичным мелкодисперсным порошком с точным весом конкретных компонентов питательной среды (рис. 5.).



Рис. 5. Питательные среды, использованные в исследовании (слева направо): агар Эндо, тиогликолевая среда, MRS агар, САДС, ГРМ-агар.

Первым этапом приготовления питательной среды является растворение сухого вещества. На каждой упаковке указана рецептура приготовления литра питательной среды. Методом пропорций рассчитываем необходимое количество сухого вещества для приготовления конкретного объема среды (по расчету 25 мл на чашку Петри, 1 мл на эплендорф). С помощью лабораторной лопаточки в максимально возможных асептических условиях и с использованием СИЗ набираем навеску сухого вещества,

измеряя вес на торсионных весах. Допускается погрешность в 10% в силу потери вещества в результате неравномерного распределения в жидкости и остатка на поверхности набора навески. Вода для приготовления питательных сред используется дистиллированная. Необходимый ее объем набирается мерным цилиндром. Измерение объема дистиллированной воды производится по мерке на уровне нижнего мениска горизонта жидкости. Сухое вещество и дистиллированная вода перемешиваются в конической термостойкой колбе стеклянной палочкой до растворения сухого вещества в воде. Однородная или с единичными комочками смесь ставится на плитку. Разные питательные среды требуют разного условия кипячения, какие-то кипятятся определенное количество времени, какие-то – до полного растворения сухого вещества, какие-то кипятить нежелательно или строго запрещено, исключительно нагрев. В нашем случае кипячение каждой среды должно было занимать не менее двух минут. Не допуская выкипания среды, по истечению времени колбы ставятся на теплую поверхность во избежание резкого перепада температуры посуды.

Вторым этапом приготовления является стерилизация. Производится методом паровой стерилизации в специальном устройстве – автоклаве. Расплавленные питательные среды заливаются в заранее стерилизованные флаконы со стерильными пробками и загружаются в камеру автоклава, не допуская перекрытия механических частей камеры. Режим стерилизации составляет 15 минут при 112°C. Среду Эндо не стерилизуют в автоклаве, поэтому она не заливается во флакон.

По окончанию стерилизации флаконы со средами извлекаются и среды остужают до 50-60°C не открывая флаконы. Розлив и модификация сред производится в асептических условиях в ламинарном боксе.

Для приготовления кровяного агара по Цейсслеру во флакон с остуженным ГРМ-агаром добавляется стерильный раствор глюкозы такой концентрации, чтобы итоговая среда содержала 5% глюкозы, либо добавляется стерильный порошок глюкозы в соответствующей необходимой

концентрации навеске. Далее добавляется дефибринированная кровь в том количестве, чтобы ее содержание в среде составляло 2%, и осторожно, не вспенивая, перемешиваем компоненты с питательной средой и разливаем в стерильные приоткрытые чашки Петри.

Для приготовления желточно-солевого агара по Чистовичу необходимо приготовить желточную эмульсию. Для этого куриное яйцо моется моющим средством и дезинфицируется 96% раствором этанола. В асептических условиях яйцо вскрывается, желток отделяется от белка, а содержимое желтка отделяется от вителлиновой мембраны и добавляется в 150 мл стерильного физиологического раствора в стерильной колбе, после чего энергично перемешивается. В ГРМ-агар добавляется стерильный хлорид натрия в том количестве, чтобы его содержание в среде составляло 10% и желточная эмульсия в количестве, равном 20% содержанию в среде, и также осторожно перемешивается и разливается в чашки Петри.

Остальные среды разливаются без модификации.

Тиогликолевая среда разливается с помощью дозатора с одноразовыми наконечниками в эплендорфы в количестве 1 мл.

После разлива приоткрытые чашки Петри со средами оставляют в ламинарном боке подсушиваться в режиме ультрафиолетового облучения на 30 мин, за исключением среды Эндо – она подсушивается без влияния ультрафиолетового облучения. Эплендорфы с тиогликолевой средой оставлять открытыми нет необходимости.

Для хранения чашки со средами закрывают и переносят в холодильник, чашки со средой Эндо можно упаковать в стерильную крафт-бумагу для защиты от воздействия солнечного света. Срок хранения питательных сред 3-7 дней.

Фосфатный буфер готовится из 20мМ КН₂РО₄ и 105мМ KCl, 50мМ цитратом натрия регулируется pH буфера, который должен составлять 7,5, проверяется универсальной лакмусовой бумагой, 5-10М люминола обеспечивает буферу возможность светиться при инициации, которая

достигается 50мМ сернокислого железа. Готовый буфер может храниться не более месяца.

2.1.2. Сбор и подготовка материала

Сбор материала проводил квалифицированный врач-стоматолог в условиях смотрового кабинета стоматологической клиники у пациентов с диагнозом «пародонтит легкой тяжести» и «пародонтит средней тяжести». С помощью кюретки, металлического инструмента, имеющего вид двустороннего крючка с чашеобразными концами (по-другому инструмент называется «хирургическая ложка»), ведется сбор материала с пародонтального кармана по пришеечной поверхности зуба. Порционно собранный зубной камень немедленно погружается в два эплендорфа, с тиогликолевой средой и физиологическим раствором, эплендорфы закрываются. Транспортировка не должна занимать более часа времени, промедление может повлиять на микробный состав биоматериала, ошибочность и отсутствие объективности исследования.

При доставке материала в лабораторию образцы зубного камня при всей возможности гомогенизируются в среде эплендорфа, измельчаясь стерильной медицинской иглой и с помощью перемешивания центрифугой-вортексом.

Образцы в тиогликолевой среде далее исследуются культуральным методом и ставятся в термостат на 24 часа при 37°C на случай необходимости повторного посева, если первый посев вырос крайне скучно.

Образцы в физиологическом растворе исследуются методом регистрации хемилюминесценции.

2.2. Культуральный метод

Культуральный метод позволяет получать культуры микроорганизмов – скоплений микроорганизмов, видимых невооруженным глазом в виде

колоний, образованных на плотной питательной среде, либо в виде помутнения в жидкой питательной среде. Колония представляет собой результат деления одной бактериальной клетки на плотной питательной среде, следовательно, культуральные свойства, то есть морфологические свойства колоний, присущи конкретному роду, виду, а иногда и штамму. Поэтому важный момент исследования культуральным методом – получение изолированных колоний, отделенных от колоний других видов микроорганизмов, для дальнейшей работы с конкретной колонией, а значит, с конкретной разновидностью микроорганизма. Для этого существуют методы посева на плотную питательную среду, самым ходовым которой является метод истощающего штриха – метод посева, при котором массу микроорганизмов с биоматериала «разносят» по поверхности питательной среды, отделяя и отдаляя микроорганизмы друг от друга по трем-четырем секторам (рис. 6.)

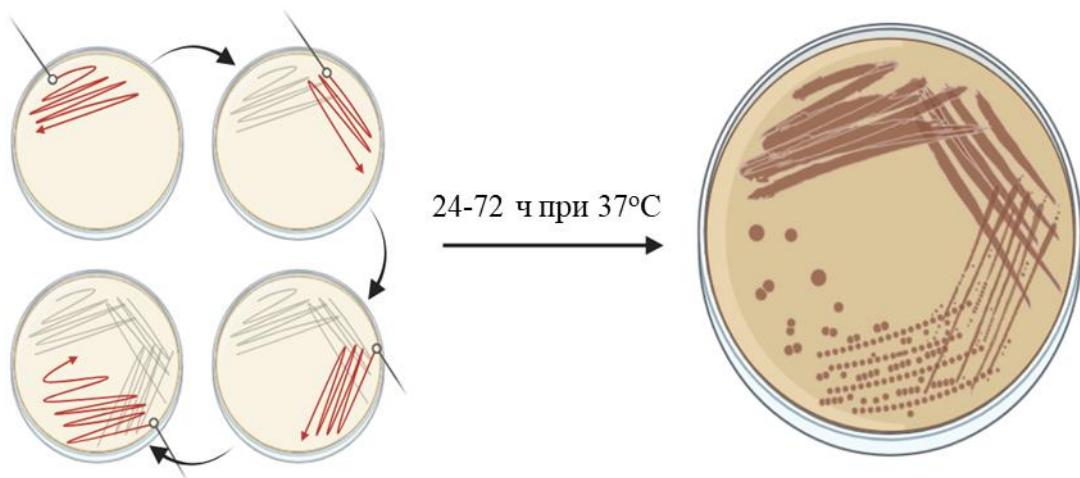


Рис. 6. Техника посева биоматериала методом истощающего штриха с целью выделения изолированных колоний микроорганизмов

Еще один важный момент культурального метода – получение чистой культуры. Чистая культура – культура микроорганизмов на плотной/жидкой питательной среде, соответствующая одному конкретному штамму.

Получение чистой культуры необходимо для работы с конкретным штаммом микроорганизма методами, подразумевающими использование большого количества бактериальных клеток (биохимическая идентификация, тест на антибиотикорезистентность, тест на антагонистические свойства и д.р.).

Посев гомогенизированного биоматериала проводился бактериологической петлей 4 размера/калибра на каждую чашку Петри (на 1 образец использовалось пять сред) методом истощающего штриха. Засеянные чашки Петри со средой Цейссlera, САДС и MRS ставились в эксикатор – сосуд, обеспечивающий герметизацию содержимого (рис. 7). Это свойство позволяет культивировать микроорганизмы в атмосфере с пониженной концентрацией кислорода по следующей методике: в эксикатор загружаются чашки Петри с засеянными средами, около них ставится зажженная чайная свечка, крышка эксикатора закрывается, запечатываясь парафином, и в запечатанной камере эксикатора свечка сжигает находящийся там воздух, снижая его концентрацию до <5%. Эти условия позволяют культивировать такие микроорганизмы, как *Streptococcus*, *Lactobacillus* и другие анаэробные/микроаэрофильные разновидности. Остальные чашки (ЖСА, Эндо), эксикаторы с чашками и остатки материала в эппендорфе с тиогликолевой средой загружались термостат для культивирования 24-48ч при 37°C. Ежедневно чашки проверяются на наличие роста, при его отсутствии в течение 5 дней результат считается отрицательным.



Рис. 7. Лабораторный эксикатор емкостью 30 л.

2.3. Микроскопический метод

Микроскопический метод анализа позволяет изучить морфологию микроорганизма – родоспецифичную характеристику. Также по микроскопии микроорганизмы можно поделить на две большие группы – грамположительные и грамотрицательные. Подразделение на эти две группы зависит от строения клеточной стенки: у грамположительных она толстая и содержит тейхоевые и липотеихоевые кислоты, у грамотрицательных она тонкая, но содержит наружную мембрану. Обнаружение данных групп микроорганизмов возможно благодаря проявляемым ими тинкториальным свойством – свойством того, как они воспринимают красители при окраске, и в случае строения клеточной стенки данное свойство проявляется при окраске по Граму. При данной окраске грамположительные бактерии окрашиваются в синий цвет, грамотрицательные бактерии – в красный цвет. Окрашивание произведено согласно общепринятой методике, в результате которой обнаружены доминирующие морфологические группы: грамположительные кокки, расположенные цепочкой, грамположительные палочки, расположенные хаотично/короткими цепочками, грамположительные кокки, расположенные в кластере. Грамотрицательные микроорганизмы не обнаружены, рост на среде Эндо отрицательный.

По результатам микроскопии изоляты пересеиваются на среду Цейсслера и культивируются для получения чистой культуры.



Рис 8. Микроскопия мазка чистой культуры, окрашенного по методу Грама. На фото грамположительные кокки в скоплениях в виде цепочки из 4-10 клеток, предположительно род *Streptococcus*.

2.4. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии

Масс-спектрометрия MALDI-TOF – аналитический метод, основанный на измерении отношения массы к заряду ионизированных молекул (m/z). Результирующий масс-спектр представляет собой графическое изображение распределения ионов по значениям m/z , позволяющее проводить как качественный, так и количественный анализ исследуемого образца. Применение чистых культур микроорганизмов в качестве аналитов обеспечивает получение масс-спектров, специфичных для узких таксономических групп, таких как род, вид и штамм. Идентификация микроорганизма осуществляется посредством биоинформационического анализа полученных спектров встроенным алгоритмами. Идентификация основана на сравнении полученных масс-спектров с эталонными спектрами, содержащимися в базах данных, предоставляемых производителями масс-спектрометров. Таксономическая принадлежность исследуемых

микроорганизмов определяется на основании достаточного числа совпадений.

Для идентификации методом масс-спектрометрии необходимы чистые культуры микроорганизма, выросшие на питательных средах без ингибирующих и дифференцирующих компонентов, в нашем случае среда Цейссlera. Культура набирается в небольшом количестве деревянной зубочисткой и наносится на лунку планшета равномерным слоем, после чего сверху добавляется матрица (коричная кислота), расщепляющая твердофазный образец для последующего возбуждения свободных летучих молекул электронной «бомбардировкой». Возникшие в результате ионы проходят детектор, где измеряется их ток и фиксируется на спектре. Программа масс-спектрометра выдает результаты с определенной вероятностью (процентное содержание совпадений с эталонными спектрами в базе данных), результат $>80\%$ является наиболее достоверным.



Рис. 9. Система масс-спектрометра Autoflex MS 2600, выполняющая масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF.

2.5. Метод регистрации хемилюминесценции

После идентификации микроорганизмов бактериальная масса чистой культуры инокулируется в физиологическом растворе до концентрации 3×10^8 КОЕ/мл (стандарт мутности по МакФарланду 1)

Биологический материал и его инокулированная микрофлора были исследованы на предмет активности процессов свободно-радикального окисления методом хемилюминесценции в модельной системе активных форм кислорода (АФК). К 10 мл образца был добавлен 1 мл раствора сульфата железа(II), что инициировало окисление железа и образование активных форм кислорода. Для усиления хемилюминесцентного сигнала в реакционной смеси присутствует люминол. Регистрация излучения осуществлялась в течение 3 минут с помощью хемилюминометра ХЛМ-003. ХЛМ-003 предназначен для измерения излучения в диапазоне длин волн 300–600 нм и его чувствительность составляет от 10^4 до 10^7 фотонов в секунду. Для калибровки измерений интенсивности хемилюминесценции использовался стандартный образец ЖС-19 (ГОСТ 9411-81), излучающий в видимом диапазоне спектра и откалибранный в абсолютных единицах квантового выхода (кванты·с⁻¹·(4 пг/м)⁻¹). Образец имеет форму параллелепипеда с размерами $5 \times 8 \times 8$ мм³ и массой 581–614 мг. Интенсивность свечения составляет $5,1 \cdot 10^5$ квантов в секунду, но для удобства статистического анализа и интерпретации результатов данное значение берется за 1 условную единицу

Хемилюминометр ХЛ-003, соединённый с компьютером посредством специализированного программного обеспечения, регистрирует и отображает результаты исследования в графическом виде, предоставляя количественные значения светосуммы, максимальной светимости, параметров вспышки и др. в условных единицах. Исследование проводилось с использованием встроенной мешалки (обеспечивающей перемешивание анализируемого образца, буферного раствора и инициатора хемилюминесценции). Время анализа одного образца составляло 5 минут. В стеклянный цилиндрический

сосуд объёмом 20 мл вводили 20 мл буферного раствора (шприцем) и 1 мл анализируемого образца (дозатором со стерильными одноразовыми наконечниками 200–1000 мкл). Начало работы хемилюминометра сигнализировалось двумя звуковыми сигналами. Первый сигнал инициировал сброс детекции АФК для калибровки начальной точки графика. Второй сигнал служил сигналом к введению 1 мл раствора сульфата железа (II) в специальный канал для запуска хемилюминесцентной реакции и регистрации параметров вспышки – точки максимальной интенсивности свечения. После завершения цикла анализа мешалка, сосуд и канал ввода сульфата железа (II) промывались дистиллированной водой, а полученные данные сохранялись в базе данных.



Рис. 10. Система хемилюминометра ХЛ-003, выполняющая регистрацию активных форм кислорода в исследуемом материале в модельной системе АФК.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Из-за невозможности проведения исследования в один анализ по причине чувствительности оборудования и времени исследования, а также из-за отсутствия фиксированного значения контрольного образца, данное исследование выполнялось в три анализа, в каждом из которых свои значения контрольных образцов. Но несмотря на это, методом пропорциональных вычислений результаты исследования были откалиброваны под определенный контроль, чтобы было возможно провести статистическую обработку результатов.

3.1 Выделение и идентификация культур микроорганизмов

В результате микробиологического посева и идентификации выделенных культур было выделено 8 видов и в общей сложности 25 штаммов микроорганизмов. В таблице 1 указаны успешно доведенные до чистой культуры и идентифицированные микроорганизмы из образцов зубных камней.

Таблица 1

Результаты микробиологического исследования образцов зубных камней.

№ п/п	Образец	Результат микробиологического исследования
1	Образец 1	<i>S. epidermidis</i> 1/2*, <i>L. gasseri</i> 1/1, <i>S. anginosus</i> 1/1
2	Образец 2	<i>S. oralis</i> 1/2, <i>M. luteus</i> , <i>S. constellatus</i> 2/1
3	Образец 3	<i>L. gasseri</i> 2/1, <i>S. salivarius</i> 1/1
4	Образец 4	<i>S. epidermidis</i> 2/2, <i>L. gasseri</i> 3/1
5	Образец 5	<i>S. oralis</i> 2/2, <i>S. anginosus</i> 2/1, <i>S. constellatus</i> 1/1
6	Образец 6	<i>L. gasseri</i> 4/1, <i>S. salivarius</i> 2/1
7	Образец 7	<i>S. oralis</i> 1/3, <i>S. anginosus</i> 1/3

8	Образец 8	<i>S. oralis</i> 2/3, <i>L. fermentum</i> , <i>S. salivarius</i>
9	Образец 9	<i>S. oralis</i> 3/3, <i>S. anginosus</i> 2/3, <i>S. epidermidis</i> 2/3
10	Образец 10	<i>S. oralis</i> 4/3, <i>S. epidermidis</i> 1/3

Примечание для таблицы 1: *- число с дробной чертой обозначает порядковое число номера колонии / порядковое число анализа

Учитывая специфику исследования, можно сделать вывод, что были выделены первичные колонизаторы зубной поверхности – микроорганизмы, с которых начинается образования зубного налета, перерастания его в зубную бляшку и минерализацию ее в зубной камень.

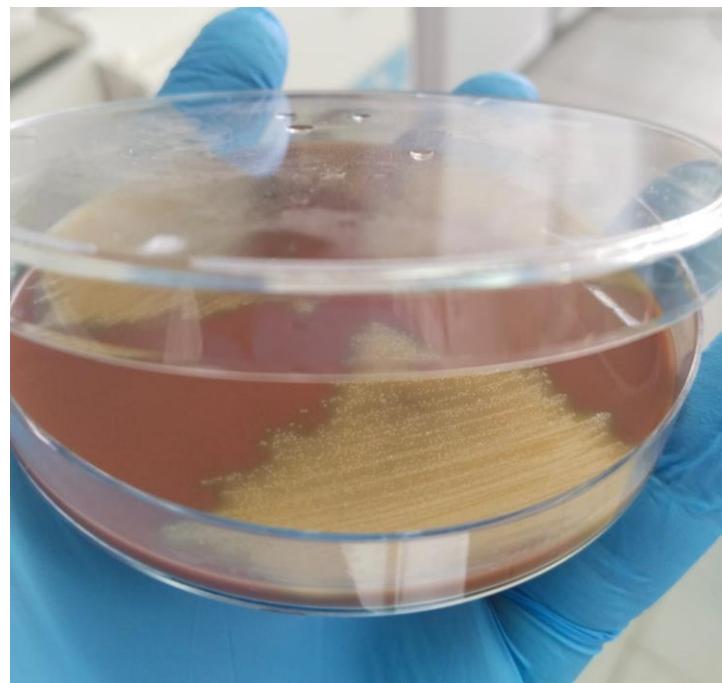


Рис. 11. Чистые культуры *S. oralis* на кровяном агаре Цейсслера. Видна зона α -гемолиза, производимая ферментативной активностью.

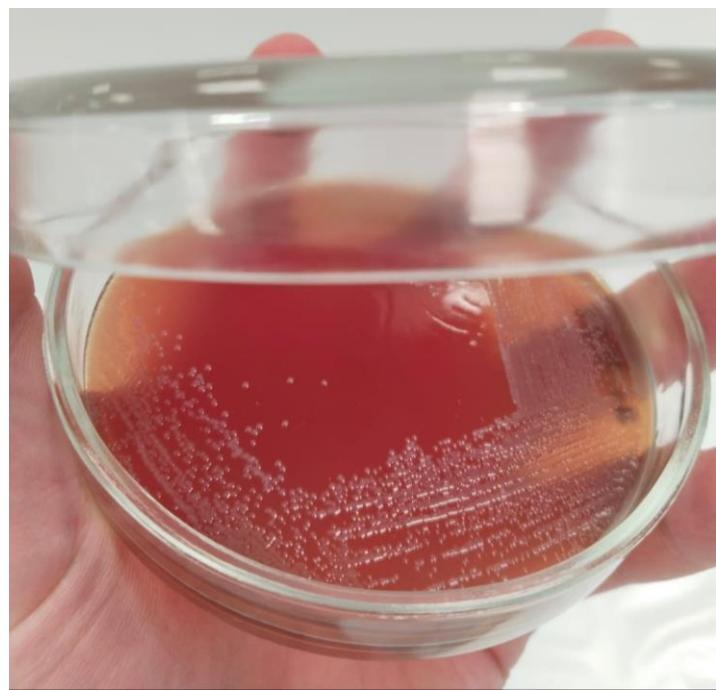


Рис. 12. Чистая культура *S. epidermidis* на кровяном агаре Цейссlera.

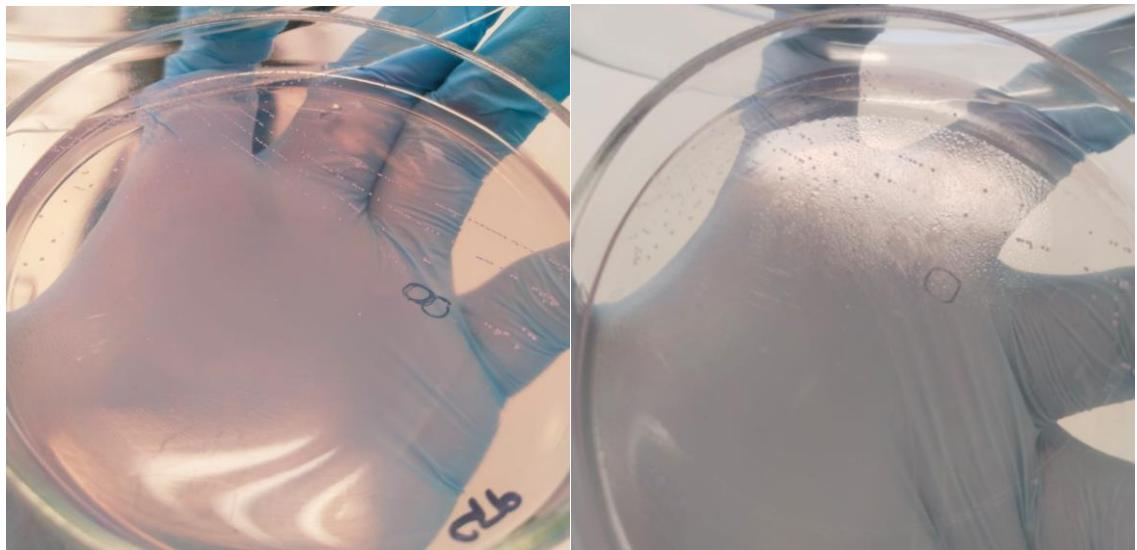


Рис. 13. Изоляты *Streptococcus* на селективном агаре для стрептококков. Рост в виде мелких гладких (S) колоний сиреневого цвета, в частности с фиолетовым центром.

3.2 Исследования хемилюминесценции

Было проведено исследование свободнорадикального окисления в образцах биоматериала и инокулюмов выделенных из него микроорганизмов в модельной системе АФК. В качестве контроля был взят фосфатный буфер с люминолом без добавленного субстрата (k1) и с добавлением физиологического раствора как контроль среды (k3).

3.2.1 Исследования хемилюминесценции биоматериала

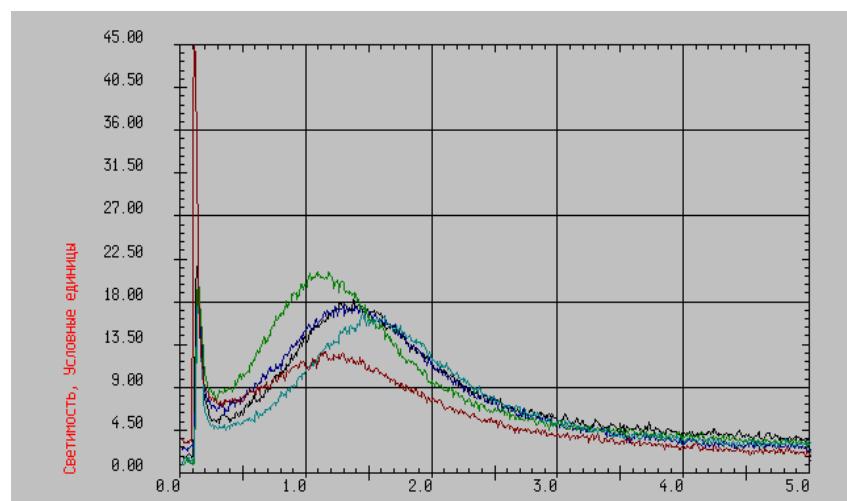


Рис. 14. График записи хемилюминесценции при оксидативном действии 1 мл физиологического раствора с биоматериалом в 20 мл фосфатного буфера, составляемый программой хемилюминомера ХЛ-003, анализ 1

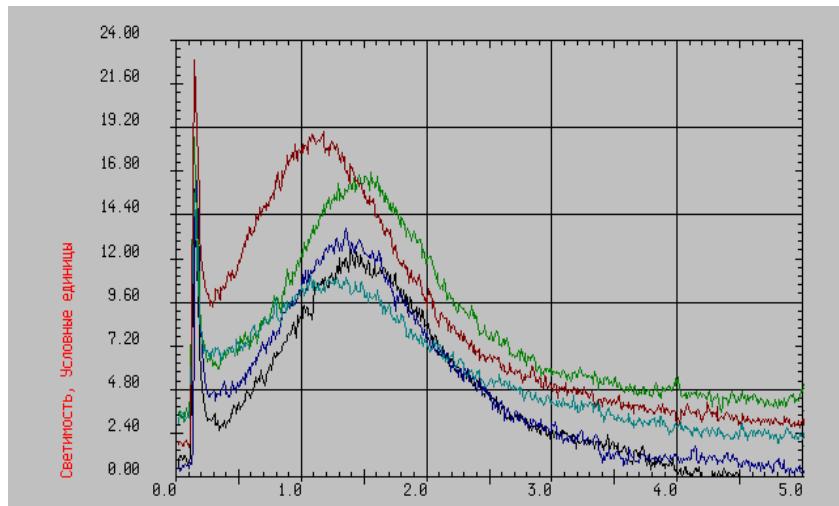


Рис. 15. График записи хемилюминесценции при оксидативном действии 1 мл физиологического раствора с биоматериалом в 20 мл фосфатного буфера, составляемый программой хемилюминомера ХЛ-003, анализ 1

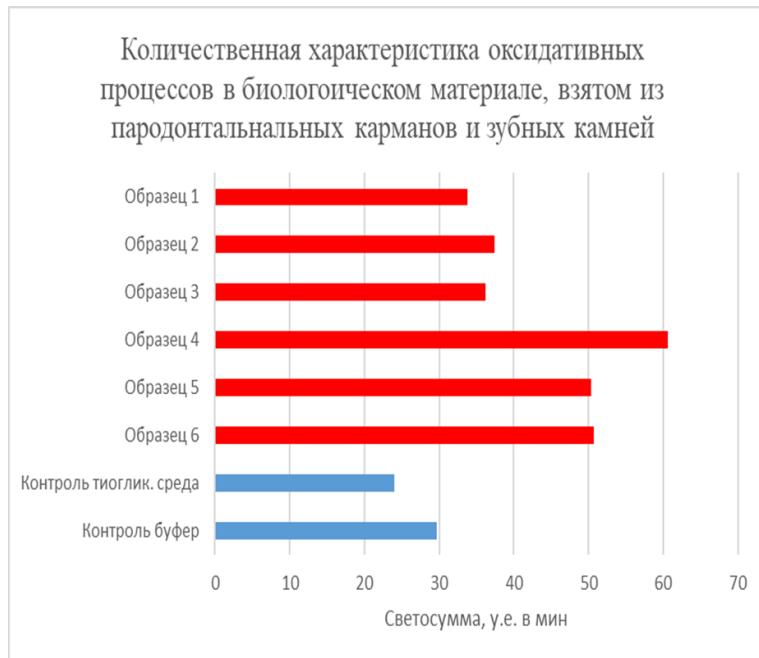


Рис. 16. Линейчатая диаграмма показателей оксидативных процессов в биологическом материале (анализ 1).

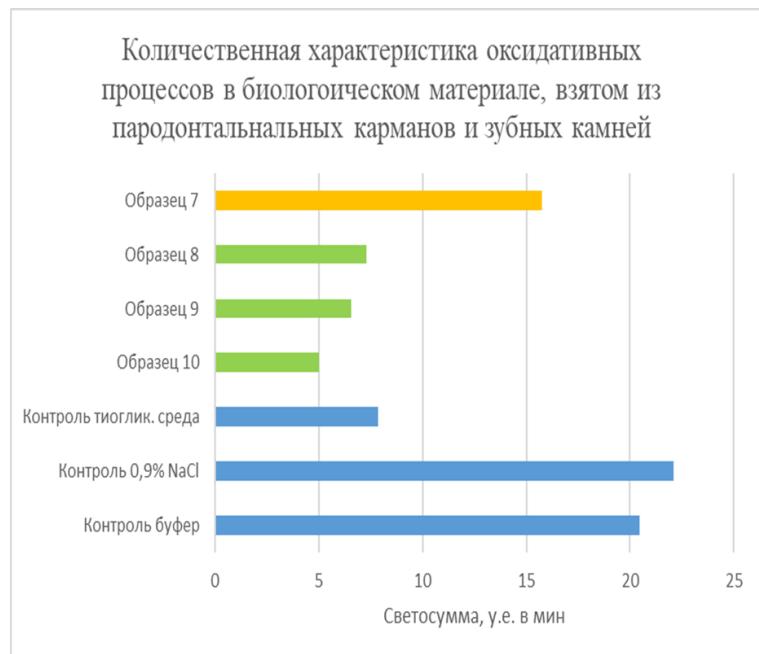


Рис. 17. Линейчатая диаграмма показателей оксидативных процессов в биологическом материале (анализ 2).

Таблица 2

Оксидативные процессы в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода при добавлении биологического материала, взятом из пародонтальных карманов и зубных камней

№ п/п	Препарат	Светосумма свечения (у.е. в мин)
Анализ 1		
1	Контроль буфер	29,68
2	Контроль тиогликолевая среда	24
3	Образец 1	33,8
4	Образец 2	37,39
5	Образец 3	36,19
6	Образец 4	60,66
7	Образец 5	50,4
8	Образец 6	50,75
Анализ 2		
9	Контроль буфер	20,44

10	Контроль 0,9% NaCl	22,08
11	Контроль тиогликолевая среда	7,84
12	Образец 7	15,74
13	Образец 8	7,29
14	Образец 9	6,58
15	Образец 10	5,01

3.2.2 Исследования хемилюминесценции культур микроорганизмов

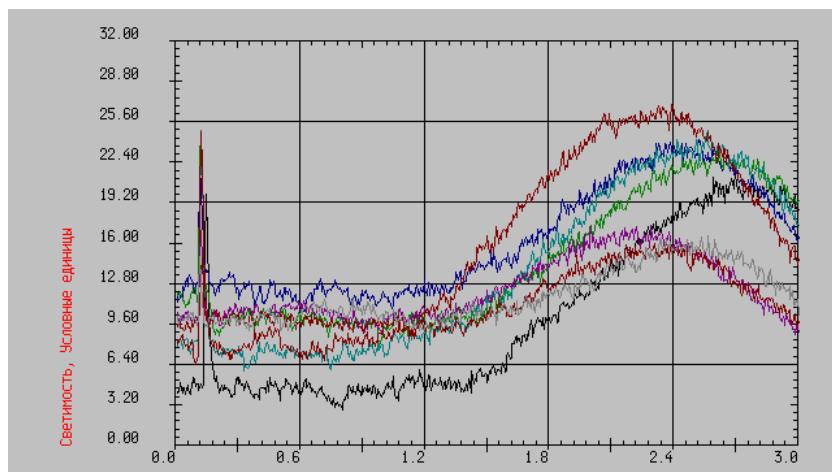


Рис. 18. График записи хемилюминесценции при оксидативном действии 1 мл физиологического раствора инокулированными микроорганизмами в 20 мл фосфатного буфера, составляемый программой хемилюминомера ХЛ-003, анализ 1

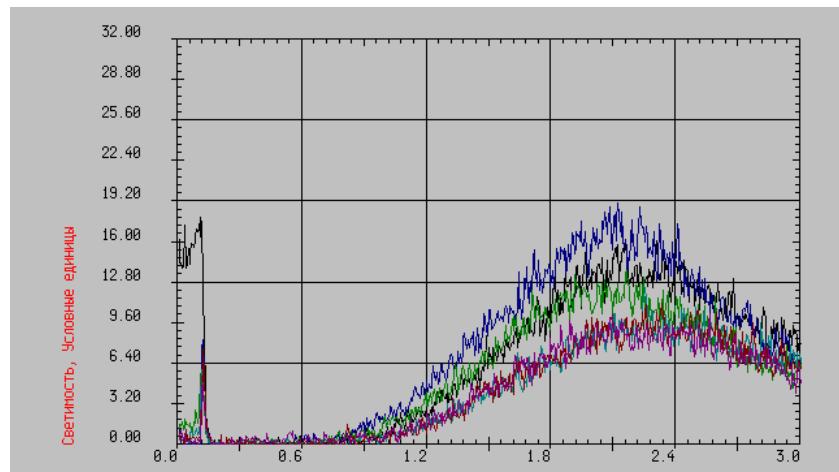


Рис. 19. График записи хемилюминесценции при оксидативном действии 1 мл физиологического раствора инокулированными микроорганизмами в 20 мл фосфатного буфера, составляемый программой хемилюминомера ХЛ-003, анализ 2

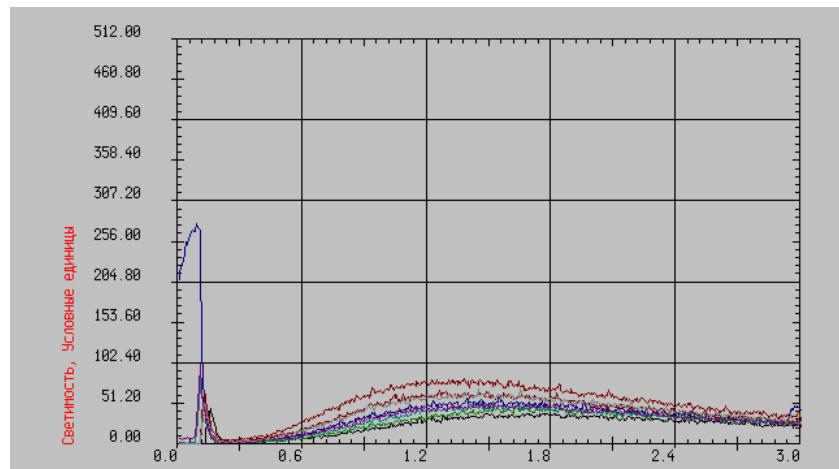


Рис. 20. График записи хемилюминесценции при оксидативном действии 1 мл физиологического раствора инокулированными микроорганизмами в 20 мл фосфатного буфера, составляемый программой хемилюминомера ХЛ-003, анализ 3

Более показательно результаты исследования оксидативной активности в бактериальных инокулюмах отражены в линейчатых диаграммах (рис. 21, 22, 23)

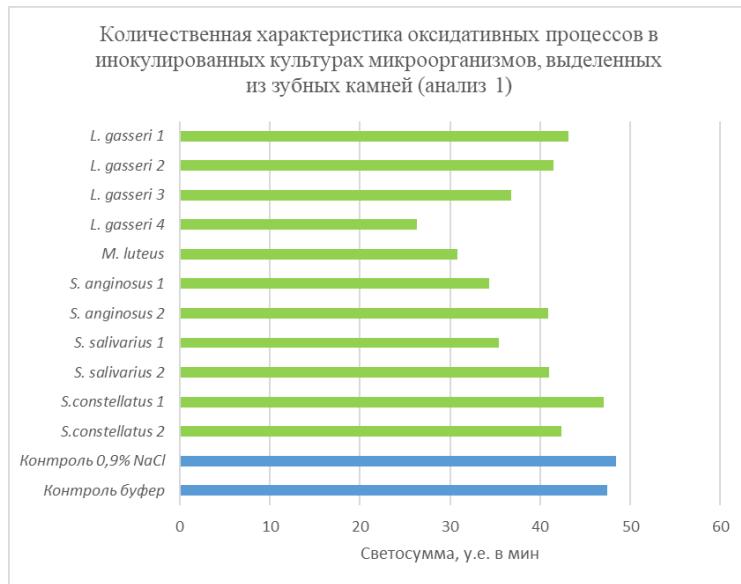


Рис. 21. Линейчатая диаграмма показателей оксидативных процессов в инокулированных культурах микроорганизмов, выделенных из зубных камней (анализ 1).

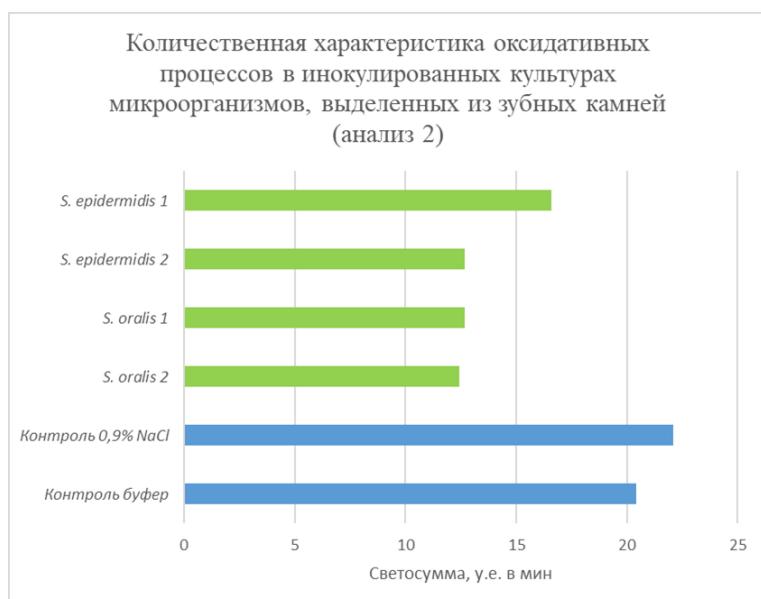


Рис. 22. Линейчатая диаграмма показателей оксидативных процессов в инокулированных культурах микроорганизмов, выделенных из зубных камней (анализ 2).

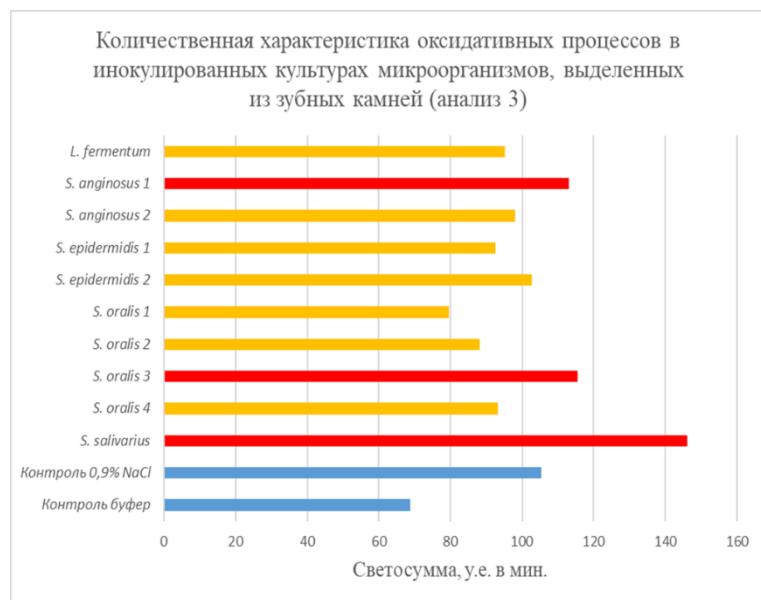


Рис. 23. Линейчатая диаграмма показателей оксидативных процессов в инокулированных культурах микроорганизмов, выделенных из зубных камней (анализ 3).

Таблица 3

Оксидативные процессы в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода при добавлении инокулюмов штаммов микроорганизмов, выделенных из зубных камней пациентов с пародонтитом

№ п/п	Препарат	Светосумма свечения (у.е. в мин)
Анализ 1		
1	Контроль буфер	47,46
2	Контроль 0,9% NaCl	48,39
3	<i>L. gasseri</i> 1	43,11
4	<i>L. gasseri</i> 2	41,46
5	<i>L. gasseri</i> 3	36,84
6	<i>L. gasseri</i> 4	26,36
7	<i>M. luteus</i>	30,85
8	<i>S. anginosus</i> 1	34,35
9	<i>S. anginosus</i> 2	40,90

10	<i>S. salivarius</i> 1	35,40
11	<i>S. salivarius</i> 2	40,98
12	<i>S. constellatus</i> 1	47,06
13	<i>S. constellatus</i> 2	42,38
Анализ 2		
14	Контроль буфер	20,44
15	Контроль 0,9% NaCl	22,08
16	<i>S. epidermidis</i> 1	16,60
17	<i>S. epidermidis</i> 2	12,69
18	<i>S. oralis</i> 1	12,66
19	<i>S. oralis</i> 2	12,45
Анализ 3		
20	Контроль буфер	68,74
21	Контроль 0,9% NaCl	105,28
22	<i>L. fermentum</i>	95,16
23	<i>S. anginosus</i> 1	113,12
24	<i>S. anginosus</i> 2	98,00
25	<i>S. epidermidis</i> 1	92,56
26	<i>S. epidermidis</i> 2	102,62
27	<i>S. oralis</i> 1	79,56
28	<i>S. oralis</i> 2	88,15
29	<i>S. oralis</i> 3	115,49
30	<i>S. oralis</i> 4	93,33
31	<i>S. salivarius</i>	146,18

3.2.3 Статистическая обработка результатов

Полученные данные представляют самостоятельные значения, однако, измерив уровень оксидативного действия зависимых локусов, необходимо ответить на вопрос – есть ли взаимосвязь? На данный вопрос поможет ответить статистический метод анализа, проведенный с помощью программы StatSoft STATISTICA 10.

	<i>С-а образцов</i>	<i>Ср. знач. с-ы МО</i>
Среднее	41,097	31,04
Стандартная ош	4,654005694	3,514449854
Медиана	36,79	24,26
Мода	#Н/Д	#Н/Д
Стандартное отн	14,71725824	11,11366626
Дисперсия выбо	216,59769	123,5135778
Эксцесс	-1,085059288	-1,885854527
Асимметричнос	0,366839791	0,545969282
Интервал	43,94	26,68
Минимум	20,52	20,74
Максимум	64,46	47,42
Сумма	410,97	310,4
Счет	10	10
Уровень надежн	10,52809232	7,950237911

Рис. 24. Описательная статистика результатов исследования оксидативных процессов в биоматериале и в культурах микроорганизмов.

Описательная статистика показала, что разница между оксидативным действием в биоматериале и в выделенных из него микроорганизмах различается.

Двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями		
	<i>С-а образцов</i>	<i>Ср. знач. с-ы МО</i>
Среднее	41,097	31,04
Дисперсия	216,59769	123,5135778
Наблюдения	10	10
Объединенная дисперсия	170,0556339	
Гипотетическая разность средн	0	
df	18	
t-статистика	1,724479119	
P(T<=t) одностороннее	0,050875688	
t критическое одностороннее	1,734063607	
P(T<=t) двухстороннее	0,101751375	
t критическое двухстороннее	2,10092204	

Рис. 25. t-критерий Стьюдента результатов исследования.

Критерий Стьюдента (t-статистика) меньше по модулю критического значения (t критическое двухстороннее). Вероятность ошибки больше

заданного уровня значимости альфа (0,05), из чего делается вывод, что различие значений в данных выборках статистически не значимы.

U критерий Манна-Уитни (Таблица данных1)									
По перемен. Пер1									
Отмеченные критерии значимы на уровне $p < 0,05000$									
Перем.	Сум.ранг а	Сум.ранг б	U	Z	p-уров.	Z скорр.	p-уров.	N а	N б
Пер2	125,0000	85,00000	30,00000	1,474061	0,140466	1,474061	0,140466	10	10
									0,143140

Рис. 26. Критерий Манна-Уитни результатов исследования

Непараметрический анализ (критерий Манна-Уитни) также указал на отсутствие статистической значимости у результатов исследования.

	С-а образцов	Ср. знач. с-ы МО
С-а образцов	1	
Ср. знач. с-ы МО	-0,386713279	1

Рис. 27. Значение корреляции результатов исследования.

Корреляционный анализ указал на слабую обратную корреляцию, то есть чем выше оксидативное действие в зубных камнях, тем ниже оксидативное действие в культурах микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. В результате микробиологического исследования из 10 образцов зубного камня пациентов с диагнозом пародонтит выделено 8 видов и в общей сложности 25 штаммов микроорганизмов, толерантных к кислороду;
2. В большинстве образцов инокулированных штаммов выделенных из зубных камней микроорганизмов прослеживается антиоксидантная защитная система. Препараты некоторых штаммов микроорганизмов видов *S. anginosus*, *S. oralis*, *S. salivarius* содержат повышенную концентрацию активных форм кислорода, что может свидетельствовать о низком потенциале защиты и возможном развитии цепных реакций при перекисном окислении липидов в культуре клеток;
3. В семи образцах биологического материала прослеживается прооксидантное действие, вероятно, за счет воспалительной реакции организма, возникшей при пародонтите. В трех образцах количество активных форм кислорода ниже контрольного, что является результатом либо действием транспортной питательной среды с тиогликолятом натрия, либо самолечением пациентов средствами с выраженным антиоксидантным действием;
4. Методом статистического анализа (построение гистограмм, вычисление t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни и корреляционного анализа) отмечены различия и незначительная обратная взаимосвязь между оксидативным действием в зубных камнях и оксидативным действием выделенных из них микроорганизмов;
5. Для получения более объективных результатов необходимо проведение дополнительных экспериментальных работ и регламентирования хода работы. Данное исследование поможет в дальнейшем изучении

оксидативного стресса как с точки зрения патогенного фактора, так и с точки зрения потенциального бактерицида.

Список литературы

1. Abdullayeva, G.D., Jamalova, F.A. MIKROBIOM TEXNOLOGIYALARI VA PROBIOTIK TERAPIYA // Самаркандский государственный медицинский университет. – 2025. – URL: <https://adti.uz/wp-content/uploads/2025/05/JMM-1.pdf> (дата обращения: 19.06.2025).
2. Agüero-Chapin, G., Antunes, A., Mora, J.R., Pérez, N., Contreras-Torres, E., Valdes-Martini, J.R., Martinez-Rios, F., Zambrano, C.H., Marrero-Ponce, Y. Complex Networks Analyses of Antibiofilm Peptides: An Emerging Tool for Next-Generation Antimicrobials' Discovery // *Antibiotics*. – 2023. – Vol. 12, № 4. – P. 747. – DOI: 10.3390/antibiotics12040747.
3. Ahmad, M., Aduru, S.V., Smith, R.P., Zhao, Z., Lopatkin, A.J. The role of bacterial metabolism in antimicrobial resistance // *Nat Rev Microbiol.* – 2025. – Vol. 23, № 7. – P. 439-454. – DOI: 10.1038/s41579-025-01155-0.
4. Асташкина, А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов / А.П. Асташкина. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. – 19 с.
5. Бельская, Л.В. Оценка уровня окислительного стресса по изменению кинетики хемилюминесценции слюны / Л.В. Бельская, Е.А. Сарф // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 4. – С. 847-852.
6. Бричагина, А.С. Метод хемилюминесценции в изучении процессов липопероксидации при артериальной гипертензии и стрессе / А.С. Бричагина, М.И. Долгих, Л.Р. Колесникова, Л.В. Натяганова // *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)*. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 133-137.
7. Буланников, А.С. Заболевания пародонта, клиника, диагностика и лечение // Мед. помощь. – 2005. – № 4. – С. 21–24.

8. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова, Г.И. Эль-Регистан. – Москва, 2005.
9. Владимиров, Г.К. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной емкости в лекарственном растительном сырье / Г.К. Владимиров, Е.В. Сергунова, Д.Ю. Измайлова, Ю.А. Владимиров // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2016. – № 2. – С. 65-72.
10. Вырмаскин, С.И. Оптимизация комплексного лечения больных хроническим генерализованным пародонтитом: дис. канд. мед. наук. – Самара, 2005. – 17 с.
11. Грудянов, А.И. Диагностика в пародонтологии / А.И. Грудянов, А.С. Григорьян, О.А. Фролова. – М., 2004. – 104 с.
12. Грудянов, А.И. Профилактика воспалительных заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, В.В. Овчинникова. – М., 2007. – 80 с.
13. Гусева, Т.М. Сравнительная активность антисептиков разных химических групп / Т.М. Гусева, В.В. Дьякова, Я.А. Большаков. – 2020.
14. Диева, М.Б. Применение средств "АСЕПТА" в комплексном лечении гингивита / М.Б. Диева, А.Ю. Туркина, М.М. Бухтуев // Фарматека. – 2013. – № S5. – С. 24-25.
15. Друговская, И.М., Кулемина, И.А. ПАРОДОНТОПАТОГЕНЫ 2 ПОРЯДКА // МЕЖДУНАРОДНЫЕ НАУЧНЫЕ СТУДЕНЧЕСКИЕ ЧТЕНИЯ - 2025: сборник статей III Международной научно-практической конференции (22 мая 2025 г.). – Петрозаводск: МЦНП «НОВАЯ НАУКА», 2025. – С. 24-31.
16. Еловикова, Т.М. Влияние ополаскивателя "АСЕПТА" на состояние ротовой жидкости у больных ревматоидным артритом / Т.М.

- Еловикова, Н.Н. Колотова, Л.А. Соколова // Уральский медицинский журнал. – 2008. – № 10 (50). – С. 65-69.
17. Жукова, Э.Ю. Эффективность профессионального контроля гигиены полости рта: дис. канд. мед. наук. – СПб., 2002. – 20 с.
18. Завадский, С.П. Физико-химические методы изучения антиоксидантной активности растительного сырья и продуктов его переработки / И.И. Краснюк, Ю.Я. Харитонов, В.В. Тарасов, А.Н. Кузьменко, Д.А. Козин, Н.Б. Саидов, О.В. Ольшанская, А.А. Евграфов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 2 (19). – С. 214-221.
19. Зайцева, В.В. Принципы хемилюминесцентного анализа / В.В. Зайцева, В.С. Михайленко, М.А. Кича // Вестник МАНЭБ. – 2021. – Т. 26, № 3. – С. 68–74.
20. Зверьков, А.В. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков / А.В. Зверьков, А.П. Зузова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия: Научно-практический журнал. – Смоленск: Межрегиональная ассоциация общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии», 2013.
21. Зенков, Н.К. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе / Н.К. Зенков, А.В. Чечушков, П.М. Кожин, Г.Г. Мартинович, Н.В. Кандалинцева, Е.Б. Меньщикова // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 195-214.
22. Ившина, И.Б. Большой практикум "Микробиология": учеб. пособие / И.Б. Ившина. – СПб.: Проспект науки, 2014. – 108 с.
23. Исследование бактериофага DT57C оказалось в центре научного спора // MICROBIUS. – 2025. – URL: <https://microbius.ru/news/issledovanie->

[bakteriofaga-dt57c-okazalos-v-tsentre-nauchnogo-spora](#) (дата обращения: 19.06.2025).

24. Камиль, О.М. Обзор влияние условий процесса на хемилюминесценции (хл) в ходе химической реакции люминола - перекисью водорода в присутствии катализатора / О.М. Камиль // Аллея науки. – 2017. – № 7. – С. 207-220.
25. Кичерова, О.А. Вред и польза окислительного стресса / О.А. Кичерова, Л.И. Рейхерт, К.П. Кичерова // Медицинская наука и образование Урала. – 2019. – Т. 20, № 4 (100). – С. 193-196.
26. Колтовой, Н.А. Книга 4. Часть 1. Хемилюминесценция / Н.А. Колтовой. – Москва, 2017. – С. 145.
27. Кондратенко, Е.И. Свободные радикалы, антиоксиданты и старение / Е.И. Кондратенко, Е.В. Курьянова, А.В. Трясучев. – Астрахань: Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2021. – С. 129.
28. Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies // Nat Rev Microbiol. – 2017. – Vol. 15, № 12. – P. 740-755. – DOI: 10.1038/nrmicro.2017.99.
29. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 760 с.
30. Korshunov, S., Imlay, J.A. Antioxidants are ineffective at quenching reactive oxygen species inside bacteria and should not be used to diagnose oxidative stress // Mol Microbiol. – 2024. – Vol. 122, № 1. – P. 113-128. – DOI: 10.1111/mmi.15286.

- 31.Ксенофонтов, Б.С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии / Б.С. Ксенофонтов. – Форум: Инфра-М, 2019.
- 32.Кулешова, С.И. Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред / С.И. Кулешова, С.А. Процак, С.А. Лисунова, Г.Ю. Романюк // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 130-134.
- 33.Кулыгин, Д.А. Разновидности люминесценции / Д.А. Кулыгин // Инновационная наука. – 2016. – № 12-4. – С. 36-38.
- 34.Ле Ань Туан, Канарский, А.В., Щербаков, А.В., Чеботарь, В.К. Эффективность культивирования дрожжей *Debaryomyces hansenii* на питательной среде из мелассы // Агробиология. – 2015. – № 5. – С. 648-654. – DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.648rus.
- 35.Луцкая, И.К. Лекарственные средства в стоматологии / И.К. Луцкая, В.Ю. Мартов. – М.: Мед. лит., 2009. – 384 с.
- 36.Матвеева, Н.С. Активированная хемилюминесценция как метод изучения свободнорадикальных реакций в клетках и тканях: дис. канд. биол. наук. – Москва, 2012.
- 37.Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / под ред. А.А. Воробьева. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: МИД, 2012. – 702 с.
- 38.Mourenza, Á., Gil, J.A., Mateos, L.M., Letek, M. Oxidative Stress-Generating Antimicrobials, a Novel Strategy to Overcome Antibacterial Resistance // Antioxidants (Basel). – 2020. – Vol. 9, № 5. – P. 361. – DOI: 10.3390/antiox9050361.
- 39.Munteanu, I.G., Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, № 7. – P. 3380. – DOI: 10.3390/ijms22073380.

40. Munteanu, I.G., Apetrei, C. Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials // Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. – New York, NY: Humana Press, 2017. – P. 379-408. – DOI: 10.1007/978-1-4419-7347-4_18.
41. Нестеров, В.Н. Перекисное окисление липидов в фотосинтезирующих органах разных типов галофитов / В.Н. Нестеров, О.А. Розенцвет // Экобиотех. – 2020. – Т. 3, № 2. – С. 118-123.
42. Никитина, О.А. Система антиоксидантной защиты: регуляция метаболических процессов, генетические детерминанты, методы определения / О.А. Никитина, М.А. Даренская, Н.В. Семенова, Л.И. Колесникова // Сибирский научный медицинский журнал. – 2022. – Т. 42, № 3. – С. 1-17.
43. Oxidative stress and antioxidants: From free radicals to the pathogenesis of diseases // Antioxidants. – Academic Press, 2023. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37597078/> (дата обращения: 19.06.2025).
44. Павлов, В.Н. Свободнорадикальное окисление и канцерогенез: дискуссионные вопросы / В.Н. Павлов, И.Р. Рахматуллина, Р.Р. Фархутдинов, В.А. Пушкирев, К.В. Данилко, Э.Ф. Галимова, Ю.Л. Баймурзина, И.В. Петрова, К.С. Мочалов // Креативная хирургия и онкология. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 54-61.
45. Павлов, В.Н. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов коэнзима q и l-карнитина у мужчин с идиопатической патоспермии / В.Н. Павлов, Э.Ф. Галимова, В.А. Катаев, Р.Р. Фархутдинов, К.С. Мочалов, Ю.Л. Баймурзина, Ш.Н. Галимов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 6. – С. 161-163.
46. Пискарев, И.М. Инициирование и исследование свободно-радикальных процессов в биологических экспериментах: монография / И.М.

Пискарев, И.П. Иванова, А.Г. Самоделкин, М.Н. Иващенко. – Н. Новгород: ФГБОУ ВО Нижегородская ГСХА, 2016. – С. 88-89.

- 47.Прокопчук, Т.М. Антимутагенез и антиоксиданты / Т.М. Прокопчук // НАУКА И СОВРЕМЕННОЕ ОБЩЕСТВО: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ, ДОСТИЖЕНИЯ И ИННОВАЦИИ: сборник статей VII Международной научно-практической конференции. – Пенза, 2021. – С. 9-11.
- 48.Ромодин, Л.А. Изохинолизиновые производные кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции в реакциях липидной пероксидации / Л.А. Ромодин, Ю.А. Владимиров, С.В. Шангин, Г.К. Владимиров, Н.П. Лысенко, Е.И. Демихов // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 680-690.
- 49.Соловьев, В.В. Содержание флавоноидов в прополисе в зависимости от различных факторов / В.В. Соловьев // Современные подходы к развитию агропромышленного, химического и лесного комплексов. Проблемы, тенденции, перспективы: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. – Великий Новгород, 2021. – С. 272-277.
- 50.Сулейманова, А.Д. Роль минеральных веществ в регуляции процессов свободно-радикального окисления в организме / А.Д. Сулейманова, Е.Н. Любина // Actualscience. – 2016. – Т. 2, № 1. – С. 7-8.
- 51.Tawiah, P.O., Gaessler, L.F., Anderson, G.M., Oladokun, E.P., Dahl, J.-U. A novel silver-ruthenium-based antimicrobial kills Gram-negative bacteria through oxidative stress-induced macromolecular damage // mSphere. – 2025. – Р. e0001725. – DOI: 10.1128/msphere.00017-25.
- 52.Тринеева, О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 4. – С. 180-197. – URL:

<https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/515/0> (дата обращения: 19.06.2025).

- 53.Феоктистова, Н.А. Основы микробиологии. Экологическая микробиология / Н.А. Феоктистова. – УлГАУ имени П.А. Столыпина, 2020.
- 54.Ходос, М.Я. Мониторинг окислительного стресса в биологических объектах / М.Я. Ходос, Я.Е. Казаков, М.Б. Видревич, Х.З. Брайнина. – 2017.
- 55.Цаплев, Ю.Б. Совместная хемилюминесценция лофина и люминола в присутствии пероксида водорода и гемина / Ю.Б. Цаплев, Р.Ф. Васильев, В.Д. Кънчева, А.В. Трофимов // Химическая физика. – 2020. – Т. 39, № 6. – С. 7-12.
- 56.Шаповалов, Ю.А. Радикалы в структурах клетки / Ю.А. Шаповалов, П.П. Гладышев, С.Т. Тулеуханов, Е.В. Швецова, Ж.Т. Абрасулова // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 691-704.
- 57.Шичкова, Ю.С. Роль путей клеточной сигнализации в развитии последствий окислительного стресса / Ю.С. Шичкова // Научный электронный журнал Меридиан. – 2020. – № 3 (37). – С. 6-8.
- 58.Шишкина, Л.Н. Система регуляции перекисного окисления липидов как основа экологического тестирования / Л.Н. Шишкина, М.В. Козлов, Л.И. Мазалецкая, А.Ю. Повх, В.О. Швыдкий, Н.И. Шелудченко // Химическая физика. – 2020. – Т. 39, № 6. – С. 52-58.
- 59.Шлапакова, Т.И. Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии / Т.И. Шлапакова, Р.К. Костин, Е.Е. Тягунова // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46, № 5. – С. 466-485.
- 60.Шугалей, И.В. Тиамин как препарат выбора для снижения оксидативного стресса / И.В. Шугалей, М.А. Илюшин, А.М. Судариков

// XXIV Вишняковские чтения "Вузовская наука: условия эффективности социально-экономического и культурного развития региона". Материалы международной научной конференции. Отв. редактор Е.Г. Седлецкая. – Санкт-Петербург - Бокситогорск, 2021. – С. 242-245.

61. Yan, Y., Shi, P., Song, W., Bi, S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: In Vitro and In Vivo Perspectives // Theranostics. – 2019. – Vol. 9, № 14. – P. 4047–4065. – DOI: 10.7150/thno.33228.
62. Янушевич, О.О. Стоматологическая заболеваемость населения России. Состояние пародонта и слизистой оболочки полости рта. – М., 2008. – 228 с.
63. Янькова, Т.В. Хемилюминесцентная реакция окисления N-октиллюминола гипохлорит-ионом в мицеллярной среде / Т.В. Янькова, П.В. Мельников, Н.К. Зайцев // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т. 61, № 5. – С. 376-382.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

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

Автор работы: Первушин Андрей Викторович

Самоцитирование

рассчитано для: Первушин Андрей Викторович

Название работы: АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА МИКРОБИОТЫ ЗУБНОГО КАМНЯ НА ПРОЦЕССЫ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

Тип работы: Выпускная квалификационная работа

Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ

РЕЗУЛЬТАТЫ



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 20.06.2025

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.2, 14-50, введение с.4-14, выводы с.51-52

Модули поиска: Переводные заимствования; Сводная коллекция ЭБС; Переводные заимствования IEEE; Цитирование; Рувики; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Шаблонные фразы; ИПС Адилет; Публикации РГБ (переводы и перефразирования); Перефразирования по коллекции IEEE; IEEE; Коллекция НБУ; Диссертации НББ; СМИ России и СНГ; Патенты СССР, РФ, СНГ; Кольцо вузов; Публикации РГБ; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; СПС ГАРАНТ: аналитика; Публикации eLIBRARY; Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Кольцо вузов (переводы и перефразирования); Медицина; Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования);...

Работу проверил: Халилова Рита Камилевна

ФИО проверяющего

Дата подписи: 24.06.2025г.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.

**ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ
ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

обучающегося Первушкина Андрея Викторовича группы БМ-201
по теме: «Анализ влияния состава микробиоты зубного камня на процесс оксидативного
стресса».

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 (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, 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, направленность «Фундаментальная и прикладная микробиология».

Научный руководитель:
к.б.н., доцент кафедры
фундаментальной и
прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Дата 17.06.2025



Бордова Ю.Л.

Секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Первушкина Андрея Викторовича группы БМ-201
по теме: «Анализ влияния состава микробиоты зубного камня на процесс оксидативного
стресса».

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 (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, 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, направленность «Фундаментальная и прикладная микробиология».

Рецензент:

с.н.с. лаборатории прикладной
микробиологии УИБ УФИЦ РАН, к.б.н.

Ясаков Т.Р.

Дата 17.06.2025



ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Первушкина Андрея Викторовича группы БМ-201
по теме: «Анализ влияния состава микробиоты зубного камня на процесс оксидативного
стресса».

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 (магистратура). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, 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, направленность «Фундаментальная и прикладная микробиология».

Рецензент:
к.б.н., доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Дата 17.06.2025

Подпись:

А.Р. Моналов

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России *Коф*



подпись