



Новые аспекты в изучении патогенной микрофлоры полости рта и методы борьбы с возбудителями воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта

Д.В. Левкович

Кафедра пропедевтики стоматологических заболеваний СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; стоматологический центр «Стомус», г.Санкт-Петербург, Россия

В работе представлены результаты изучения действия антисептиков и ДНКазы на микробные биоплёнки. Установлено, что представители нормальной микрофлоры ротовой полости при ортодонтическом лечении образуют моно- и смешанные биоплёнки на поверхности зуба и несъёмной конструкции. Показано, что использованные антисептики и нуклеаза вызывают уменьшение биомассы биоплёнок и числа КОЕ (колониеобразующая единица), образующих их бактерий. Выявлен эффект усиления действия антисептиков на бактерии биоплёнок в присутствии ДНКазы. Показанный феномен усиления действия антисептиков ДНКазой был идентичен у разных антисептиков и биоплёнок, образованных моно и смешанной культурой.

Ключевые слова: микробные биоплёнки, антисептики, ДНКаза, ортодонтическое лечение, внеклеточная ДНК, воспалительные заболевания слизистой полости рта

АКТУАЛЬНОСТЬ. В последние годы благодаря применению новых эффективных методов изучения микробных экосистем, наши представления о формировании патогенной и условно-патогенной микрофлоры полости рта чрезвычайно расширились. Разработка лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и других прогрессивных методов выявления и количественного исследования некультивируемых бактерий произвели революцию в области изучения патогенной и условно патогенной микрофлоры полости рта [1,2].

Микробиологические, биохимические и молекулярно-биологические исследования показывают, что все микроорганизмы в полости рта существуют в форме биоплёнок, представляющих из себя полимер с включенным в него микробным сообществом [3,4]. Микробные биоплёнки имеют сложную структуру и динамику созревания. Предполагается, что в природе большинство бактерий выживает только в составе биоплёнок, тогда, как единичные клетки погибают [5]. Объединение бактерий с образованием биоплёнки позволяет им распределять метаболическую нагрузку между различными членами этого микробного сообщества [6]. В составе биоплёнок микробы приобретают устойчивость к антимикробным препаратам и защитным силам организма, поэтому лечение заболеваний, связанных с такими микробными сообществами, может быть неэффективным [7]. Возможно, что такая устойчивость к антимикробным препаратам обусловлена медленным

ростом бактерий внутри биоплёнки или индукцией генетически деформированной реакции на стрессовое воздействие. Бактериальные экзополисахариды и другие структурные компоненты биоплёнки также могут повышать устойчивость микроорганизмов [8,9]. Среди различных молекул, обнаруженных внутри матрикса микробных биоплёнок, особое внимание привлекают липиды и внеклеточная ДНК. Роль внеклеточной ДНК заключается в поддержании и передаче генетической информации внутри микробных биоплёнок [6-8]. Недавно было установлено, что внеклеточная ДНК играет важную роль в процессе проникновения в микробные биоплёнки антимикробных препаратов [3,5,6,10]. Установлено, что разрушение внеклеточной ДНК матрикса биоплёнки повышает эффективность действия антимикробных препаратов [4,11,12].

Вышеприведённые данные свидетельствуют о том, что все используемые в современной стоматологии противовоспалительные антимикробные препараты не совсем эффективны, т.к. не обладают способностью проникновения во внутрь микробных биоплёнок, и, следовательно, не могут в полном объёме воздействовать на патогенные микроорганизмы, объединённые в биоплёнки.

Таким образом, разработка новых антимикробных препаратов, способных изменять свойства биоплёнок и приводить их к разрушению, остаётся чрезвычайно актуальной.



ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Повышение эффективности комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта за счёт оценки микрофлоры и использования новых препаратов, действующих на микроорганизмы в составе биоплёнок, образующихся на поверхности несъёмной ортодонтической аппаратуре.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. В клинических и лабораторных условиях исследование нового антисептика «Мультицид» (состав: антисептик мультицид, карбоксиметилцеллюлоза, дистиллированная вода, глицериновое масло, масло мяты и вещество, изменяющее свойство матрикса микробных биоплёнок ДНКазы 1). Примером для сравнения послужил классический антисептик хлоргексидин в традиционной концентрации 0,05%. Предметом исследования был биологический материал с поверхности несъёмной ортодонтической аппаратуры, полученный от пациентов, проходящих ортодонтическое лечение. Ортодонтическая несъёмная аппаратура создаёт множество ретенционных пунктов для образования микробного налёта и зубной бляшки (разновидность биоплёнки) [1]. Всё это ведёт к возникновению воспалительных заболеваний полости рта, таких как гингивит и пародонтит.

Объектом исследования служили штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, полученные от больных в ходе ортодонтического лечения с помощью несъёмной аппаратуры: *Streptococcus mitis* VT1007 и *Neisseria subflava* VT4007.

Жизнеспособность бактерий оценивали, определяя число колониеобразующих единиц (КОЕ) методом серийных разведений. Для этого готовили последовательные десятикратные разведения в физиологическом растворе и по 0,1 мл высевали на агаризованную среду, после чего инкубировали 24 часа при $T=37^{\circ}\text{C}$ и подсчитывали количество выросших колоний. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антисептиков определяли на жидкой и плотной питательной средах, используя метод серийных разведений.

Исследовано 105 мужчин в возрасте от 18 до 40 лет. Все они обратились в клинику с жалобами на неправильный прикус и неровно стоящие зубы.

Всем пациентам перед установкой брекет-системы проводили терапевтическую и хирургическую сана-

ции, а также профессиональную гигиену. Через две недели мы разделили пациентов на три группы. Первая группа в комплексном лечении применяла гелеобразную композицию на основе антисептика «Мультицид» и вещества, изменяющего свойства матрикса микробных биоплёнок (состав: антисептик мультицид, дезоксирибонуклеаза, карбоксиметилцеллюлоза, дистиллированная вода, глицериновое масло, масло мяты) в заданной концентрации (0,3%).

Пациенты второй группы использовали раствор на основе антисептика хлоргексидина биглюконата в 0,05% концентрации (состав: хлоргексидин, вода очищенная). Пациентам третьей группы не проводили специфической терапии (табл.1).

В среднем в группе пациентов на момент первичного обследования через 2 недели после установки несъёмной ортодонтической аппаратуры ИГФВ составил $1,3 \pm$ балла, индекс гигиены Грина-Вермиллиона (ОИ-с) – $0,8 \pm$, РМА – 0,0%, ИК – 0,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Использованные штаммы бактерий, относящиеся к представителям нормальной микрофлоры ротовой полости, изолированные у пациентов с несъёмной аппаратурой при ортодонтическом лечении, образовывали моно- и смешанные биоплёнки.

В матриксе полученных биоплёнок была обнаружена внеклеточная ДНК.

Добавление антисептиков и/или ДНКазы 1 изменяло изученные свойства биоплёнок. В экспериментах были использованы хлоргексидин – 2000 мг/л, «Мультицид» – 250 мг/л и ДНКазы 1 – 10 мг/л. Концентрация хлоргексидина была выбрана как одна из наиболее используемых в стоматологии. Количество «Мультицида» и ДНКазы 1 было заведомо ниже, поскольку препараты находятся в стадии изучения.

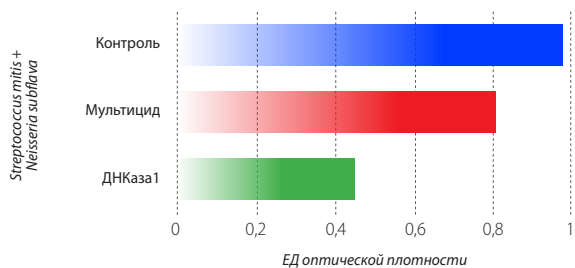
Установлено, что уменьшение количества внеклеточного матрикса указывает на увеличение доступности клеток биоплёнок по отношению к внешним воздействиям. Представляется, что аналогичная ситуация имеет место и при использовании антисептиков. Обращает на себя внимание, что в пределах использованных концентраций антисептиков и ДНКазы 1 максимальное снижение биомассы зарегистрировано в присутствии фермента, действующего на внеклеточную ДНК.

ТАБЛИЦА 1. СХЕМА ПРИМЕНЯЕМОЙ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ ПО ГРУППАМ ПАЦИЕНТОВ

	I группа	II группа	III группа
Используемый препарат	«Мультицид» + ДНКазы 1	Хлоргексидин биглюконат 0,05%	Не проводилось специфической терапии
Схема применения	По 2 раза в день 7 дней ежемесячно (3 курса)	2 раза в день ротовые ванночки 1 мин. после еды, 7 дней ежемесячно (3 курса)	-

Присутствие «Мультицида» приводило к снижению плотности биоплёнок относительно контроля на 20%, а ДНКазы1 - на 60% (рис.1).

РИС. 1. ВЛИЯНИЕ АНТИСЕПТИКОВ И ДНКазы1 НА БИОМАССУ СФОРМИРОВАННЫХ БИОПЛЁНОК

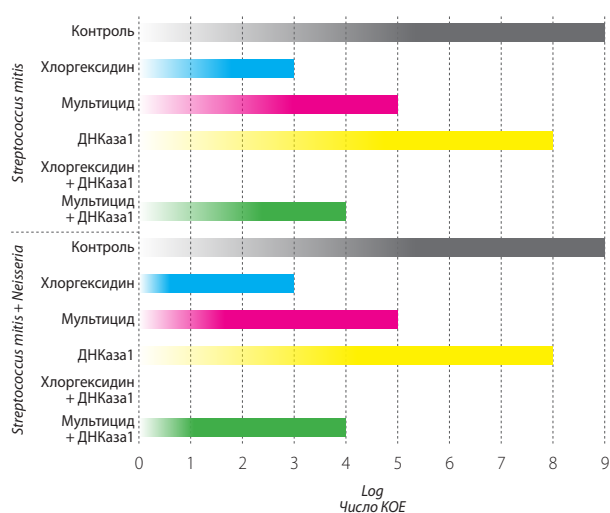


Использованные антисептики показали высокую активность по отношению к бактериальным биоплёнкам и вызывали в них значительное снижение числа КОЕ (рис.1). Максимальное снижение числа жизнеспособных бактерий зарегистрировано в присутствии хлоргексидина. При действии данного антисептика число КОЕ в биоплёнках, образованных стрептококками или их ассоциацией с нейссериями, снижалось на 6 порядков. «Мультицид» в этих же условиях снижал число КОЕ на 4 порядка. Вместе с тем, эти данные не позволяют напрямую сравнивать два антисептика между собой, поскольку «Мультицид» был использован в концентрации в 10 раз меньшей, чем хлоргексидин. Полученные результаты позволяют констатировать эффективное действие испытанных антисептиков на бактерии биоплёнок использованных штаммов. В присутствии ДНКазы 1 также было зарегистрировано незначительное снижение числа КОЕ.

Совместное использование антисептиков и ДНКазы1 при действии на сформированные бактериальные биоплёнки приводило к потенцированию антимикробного действия. Хлоргексидин и ДНКазы1 в использованных концентрациях приводили к эрадикации биоплёнок. Совместное использование «Мультицида» и ДНКазы1 увеличивало антимикробную активность в 10 раз по сравнению с действием одного антисептика (см. табл.2, рис. 2).

В первой и второй группе на 4-6 неделе значительных изменений ИГФВ, ОНI-s, РМА, ИК не произошло,

РИС.2. ВЛИЯНИЕ АНТИСЕПТИКОВ И ДНКазы НА ЧИСЛО КОЕ СФОРМИРОВАННЫХ БИОПЛЁНОК



в третьей группе мы наблюдали увеличение всех показателей ИГФВ 1,4±, ОНI-s 1,4±, РМА 2%, ИК 0,1±.

Через 8 – 10 недель после начала лечения нами было зафиксировано появление жалоб: 2 (6%) пациента в 3 группе отмечали появление неприятного запаха изо рта, во второй группе 17 (48,5%) человек жаловались на изменение вкусовой чувствительности при приёме пищи и 19 (54,2%) обследованных отметили появление серо-коричневого окрашивания зубов.

В первой группе наблюдалось дальнейшее снижение гигиенических индексов (ГИ), в то время как во второй группе после незначительного увеличения на 4-6 неделе ГИ приблизился к первоначальному уровню. Индексы РМА и ИК оставались в этих группах не изменёнными. В третьей группе произошло увеличение как гигиенических, так и пародонтальных индексов ИГФВ 1,8±, ОНI-s 1,7±, РМА 3%, ИК 0,3±, всё это свидетельствует о начальных признаках воспаления тканей пародонта.

Через 12 недель после установки ортодонтической аппаратуры в первой и во второй группе гигиенические индексы на уровне значений «хорошей гигиены полости рта», пародонтальные индексы оставались неизменёнными. В третьей группе все индексы, и гигиенические и пародонтальные, продолжали увеличиваться.

ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ ЧИСЛА КОЕ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИСЕПТИКОВ И ДНКазы1 НА СФОРМИРОВАННЫЕ БИОПЛЁНКИ

Микробные ассоциации	Число КОЕ					
	Контроль	Хлоргексидин 2000мг/л	Мультицид 250мг/л	ДНКазы1 10мг/л	Хлоргексидин + ДНКазы1	Мультицид + ДНКазы1
Streptococcus mitis	1 x 10 ⁹	1 x 10 ³	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁸	эрадикация	1 x 10 ⁴
Streptococcus mitis + Neisseria subflava	1 x 10 ⁹	1 x 10 ³	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁸	эрадикация	1 x 10 ⁴



ТАКИМ ОБРАЗОМ, применение антисептиков в сочетании с ДНКазой1 обладает этиотропным воздействием на микробные биоплёнки и приводит их к разрушению, что в свою очередь, ведёт к уменьшению возникновения воспалительных заболеваний полости рта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробиология и иммунология для стоматологов / Р.Дж.Ламонт, М.С.Ланц, Р.Л.Берне, Д.Дж.Лебланк /Перевод с англ. Под ред. В.К.Леонтьева. - Издательство «Практическая медицина»; 2010, 84-92
2. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities Biofilms / V.V.Tetz, V.P.Korobov, N.K.Artemenko, L.M.Lemkina, N.V.Panjikova, G.V.Tetz // - 2004; 1:149-155
3. Тец В.В. Бактериальные биоплёнки. Антимикробная терапия /В.В.Тец// Consilium medicum. 2007, -С.13 – 15
4. Влияние условий культивирования на содержание ДНК бактерий и проницаемость их мембран / В.В. Тец, С.Д. Иванов, Г.В. Тец, М.М.Писарева, В.А.Ямшанов // Вестник РАМН.- 2005.-№ 7.-С.15-18
5. Тец В.В. Бактериальные биоплёнки /В.В. Тец// Экстравыпуск. 2007
6. Тец В.В. Бактериальные сообщества /В.В. Тец/. В кн. «Клеточные сообщества»: Издательство СПбГМУ; 1998, 15-73
7. Тец Г.В. Совместное действие антибиотиков и дезоксирибонуклеазы на бактерии /В.В. Тец, К.Л. Артёменко // Антибиотики и химиотерапия. – 2006, 51:3-6
8. Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S. and Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol. 2005,13:34-40
9. Moscoso M., García E. and López R. Biofilm Formation by Streptococcus pneumoniae: Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion. J. Bacteriol. 2006. 188:7785-7795
10. Действие левофлоксацина на бактериальные биоплёнки / В.В. Тец, Н.К. Артёменко, Н.В. Заславская, Г.В. Тец // Клинико-лабораторный консилиум. 2007; 14:12-17
11. Тец В.В. Применение фермента дезоксирибонуклеазы у больных с абсцессами и флегмонами челюстно-лицевой области /В.В.Тец [и др.]// Стоматология. – 2006. – Т. 85, №6. – С.40–46
12. Tetz V.V., Rybalchenko O.V., Savkova G.A. Ultrastructure of surface film of bacterial colonies. J Gen Microbiol 1993; 137:1081-1088

Summary

New aspects in the study of pathogenic oral cavity microflora and methods of dealing with agents of inflammatory diseases oral mucosa

D.V. Levkovich

The results of studying the effect of antiseptics and DNase on microbial biolays presented in article. Established that that representatives of normal microflora in the oral cavity during orthodontic treatment form a single and mixed biolays on the tooth surface and fixed constructs. It is shown that the used antiseptics and nuclease causing a reduction in biolays biomass and the number of CFU (colonial forming unit), the constituent bacteria. The effect of enhancing the action of antiseptics on bacterial biolays in the presence of DNase revealed. Illustrated the phenomenon of amplification of antiseptics DNase was identical in different antiseptics and biolays formed by mono and mixed culture.

Key words: microbial biolays, antiseptics, DNase, orthodontic-energy treatment, inflammatory diseases of the oral cavity

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Д.В.Левкович - аспирант кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний СПбГМУ им.акад. И.П.Павлова; Россия, г.Санкт-Петербург
Телефон +7921903054. E-mail: dvlpter@gmail.com