

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.314.022.7-036.12:579

КОЛЧАНОВА
Наталья Эдуардовна

**ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ РОТОВОЙ
ПОЛОСТИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ТЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО
ПЕРИОДОНТИТА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 –микробиология

Минск, 2018

Научная работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Научный руководитель: **Окулич Виталий Константинович**, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры клинической микробиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Чистенко Григорий Николаевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Коломиец Наталья Дмитриевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита диссертации состоится 25 октября 2018 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovet@bsmu.by, телефон 277-16-21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «24» сентября 2018 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций
кандидат медицинских наук, доцент



А.П. Музыченко

ВВЕДЕНИЕ

Микробы, находясь в полости рта, могут существовать в двух формах – свободно плавающей (планктонной) и закрепленной (сессильной) в составе биопленок. Форма существования бактерий в составе биопленки предоставляет им массу преимуществ в условиях организма. Связано это с тем, что микрофлора биопленки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы [Pratten J., 2010; Atshan S.S., 2013; Sim C. P., 2016; Kaplan J.B., 2010; Fey P.D, 2010; Coenye T., 2010; Чеботарь И.В., 2015].

Между микробной флорой полости рта и защитными факторами организма существует постоянное равновесие. Его нарушение приводит к патологическим процессам в полости рта, в том числе к развитию заболеваний пародонта. Важную роль в защитной системе организма играют эндогенные антимикробные пептиды и литические ферменты. В настоящее время известны сотни их представителей, которые выявляются в эпителиальных тканях, фагоцитирующих клетках и биологических жидкостях человека. Альфа- и бета-дефензины проявляют выраженную бактерицидную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [Banaschewski V.J., 2015; Jonathan Y., 2012; Абатуров А.Е., 2011]. Эластаза нейтрофилов способна расщеплять широкий спектр субстратов экстрацеллюлярного матрикса, включая эластин, протеогликаны, коллаген и фибронектин [Акмалова Г.М., 2015; Гороховский В.Н., 2015; Jonathan Y., 2012].

В настоящее время распространенность болезней пародонта в мире составляет 98% и является основной причиной потери зубов у лиц старше 40 лет [Юдина Н.А., 2009; Дедова Л.Н., 2016; Царев В.Н., 2016]. Нерешенными аспектами проблемы воспалительных заболеваний пародонта остаются вопросы этиологии, патогенеза, лечения и профилактики. Образование биопленок бактериями пародонтального кармана является важным звеном в патогенезе хронического пародонтита. В связи с этим изучение новых подходов к исследованию биопленок, иммунного ответа на инфекционные агенты, образующие микробный матрикс, изменение тактики антибиотикотерапии, с учетом способности микроорганизмов образовывать биопленку, а также поиск механизмов воздействия на формирование и разрушение уже образованных биопленок, является перспективным и актуальным научно-практическим направлением.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами

Работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» на базе кафедры клинической микробиологии, терапевтической стоматологии и научно-исследовательской лаборатории в рамках научно-исследовательского проекта БРФФИ «Изучение патогенеза развития воспалительных заболеваний периодонта», номер госрегистрации 20150964, М15-М075, срок выполнения 2015-2017 гг.; Государственной научно-технической программы «Новые методы оказания медицинской помощи» по заданию «Разработать тест-системы для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам возбудителей стрептококковой инфекции с учетом способности формировать биопленку», номер госрегистрации 20170048, срок выполнения III кв. 2016- II кв. 2019 гг.

Тема диссертационного исследования соответствует пункту 4 «Медицина и фармация» перечня «Приоритетные направления научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг.», утвержденного Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г., № 190.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – на основании результатов бактериологических и молекулярно-генетических методов исследования определить роль биопленкообразующих микроорганизмов периодонтального кармана в развитии хронического периодонтита с учетом роли факторов неспецифической резистентности макроорганизма.

Задачи исследования:

1. Установить взаимосвязь качественного, количественного состава периодонтопатогенов и стрептококков ротовой полости с тяжестью течения хронического периодонтита.

2. Разработать устройство для формирования биопленки в динамических условиях *in vitro* и изучить чувствительность сформированного экзополимерного матрикса к ферментам и антисептикам.

3. Оценить межвидовую и внутривидовую вариабельность чувствительности к ферментам и антисептикам экзополимерного матрикса, образованного микроорганизмами периодонтального кармана, ассоциированными с хроническим периодонтитом, и резистентность бактерий в составе биопленки к антибиотикам.

4. Определить связь уровня протеолитической активности и дефензинов в ротовой жидкости с тяжестью течения хронического периодонтита.

Объект исследования: микроорганизмы полости рта и ротовая жидкость, полученные от пациентов с хроническим периодонтитом и лиц без патологии периодонта в анамнезе, штамм *Eikenella corrodens* ATCC № ВАА-1152.

Предмет исследования: состав микрофлоры полости рта и иммунологические показатели ротовой жидкости, полученные при применении лабораторных методов исследования пациентов с хроническим периодонтитом.

Научная новизна

Впервые установлено, что возникновение и прогрессирование хронического периодонтита зависит не только от видового состава периодонтопатогенных возбудителей, но и от общего количества микроорганизмов «желтого комплекса» и массы образованного ими экзополимерного матрикса.

Разработано и запатентовано устройство для формирования биопленки в динамических условиях, которое позволяет имитировать анатомо-физиологические особенности полости рта при культивировании микроорганизмов ротовой полости.

Разработан и запатентован метод определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов в составе биопленки. Впервые изучена резистентность биопленкообразующих стрептококков, выделенных у пациентов с хроническим периодонтитом, к антибактериальным препаратам.

Впервые показана связь уровня протеолитической активности и дефензинов в ротовой жидкости с тяжестью течения хронического периодонтита, и предложено использование определения активности эластазы ротовой жидкости в клинической практике в качестве диагностического критерия.

Положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с хроническим периодонтитом в отличие от лиц без патологии периодонта выявлены комплексные изменения микрофлоры ротовой полости: увеличение количества бактерий «желтого комплекса» (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*) и массы образованного ими экзополимерного матрикса; увеличение количества выделенных периодонтопатогенных возбудителей *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*; присоединение микроорганизмов видов *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*; возрастание количества периодонтопатогенов в ассоциациях. Сочетание периодонтопатогенов 1-го порядка: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, выделенных из периодонтальных карманов ($r=0,77$, $p<0,001$), одновременно с увеличением количества стрептококков ($r=0,96$, $p<0,001$), обладающих высокой способностью формировать биопленку ($r=0,62$; $p<0,001$), статистически значимо коррелирует с тяжестью хронического периодонтита.

2. Устройство для формирования микробной биопленки в динамических условиях *in vitro* позволяет учитывать при культивировании биопленки циркуляцию ротовой жидкости в физиологических условиях полости рта.

3. Матрикс биопленки, образованный стрептококками, выделенными из периодонтального кармана у пациентов с хроническим периодонтитом, обладает значительной межвидовой и внутривидовой вариабельностью по спектру чувствительности к ферментам и антисептикам. Наибольшей способностью к разрушению экзополимерного матрикса обладают протеиназа К и диметилсульфоксид независимо от вида микроорганизма, его способности и условий (статических или динамических) формирования биопленки. Для стрептококков в составе биопленки характерна более высокая минимальная подавляющая концентрация антибактериальных препаратов.

4. У пациентов с хроническим периодонтитом в ротовой жидкости наблюдаются изменения показателей факторов неспецифической резистентности полости рта, характеризующиеся ростом эластазной активности и уровня альфа-дефензинов, что статистически значимо коррелирует с количеством микроорганизмов «желтого комплекса» ($r=0,67$; $p<0,001$; $r=0,68$; $p<0,001$ соответственно) и образованной ими массы экзополимерного матрикса ($r=0,52$; $p<0,001$; $r=0,66$; $p<0,001$ соответственно).

Личный вклад соискателя ученой степени

Соискателем совместно с научным руководителем сформулированы цель и задачи исследования, определены методы и основные этапы выполнения работы. Диссертантом самостоятельно установлены комплексные изменения микрофлоры ротовой полости при хроническом периодонтите, изучены состав периодонтопатогенов с помощью ПЦР-исследования в режиме реального времени и способность стрептококков формировать биопленку, что отражено в публикациях [4,5,6,8,9,12,15,18], вклад соискателя – 85%. Разработано и запатентовано устройство для формирования микробной биопленки в динамических условиях *in vitro* [23], вклад соискателя – 90%. Соискателем выявлена межвидовая и внутривидовая вариабельность по спектру чувствительности к ферментам и антисептикам матрикса биопленки, сформированной стрептококками [1,3,7,10,13,16,17,19,21], вклад соискателя – 80%. Соискателем выполнены исследования показателей факторов неспецифической резистентности ротовой жидкости у пациентов с хроническим периодонтитом, что отражено в публикациях [2,11,14,20], вклад соискателя – 85%. На основании проведенного исследования разработана инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь [22], вклад соискателя – 75%. Получены патент на способ определения минимальной подавляющей концентрации антибиотика для бактерий,

способных формировать биопленку [24], и уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на способ диагностики воспалительного заболевания челюстно-лицевой области [25], вклад соискателя – 85%.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты научных исследований были представлены на 26-ом Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Амстердам, Нидерланды, 2016); Российско-Китайском конгрессах по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2016, 2017); 3-й Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016); XVIII международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке»: «Глобальная интеграция современных исследований и технологий в медицину и образовательное пространство» (Москва, 2016); научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые XXI – от идеи к практике» (Самара, 2015); на научно-практическом семинаре «Резистентность бактерий к антибактериальным средствам и внедрение программы WHONET в практическое здравоохранение Республики Беларусь» (Минск, 2016); республиканской научно-практической конференции с международным участием «90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси» (Минск, 2015); 6-й международной научной молодежной конференции «Научные стремления – 2015» (Минск, 2015); на научных сессиях ВГМУ (Витебск, 2014-2017).

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии ГГМУ; 1-й кафедре терапевтической стоматологии БГМУ; на кафедре терапевтической стоматологии ВГМУ; на кафедре стоматологии детского возраста и ЧЛХ УО ВГМУ; на кафедре хирургической стоматологии БГМУ; в лечебный процесс УЗ «Витебский областной клинический стоматологический центр» и филиал №2 УЗ «Витебский областной клинический стоматологический центр»; ГУ «Витебский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; УЗ «Витебская областная клиническая больница»; УЗ «Брестская областная больница»; УЗ «Могилевская областная больница»; УЗ «Гомельская областная клиническая больница».

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 21 печатная работа: журнальных статей – 7 (2 статьи написаны единолично), соответствующих пункту 18 «Положения о

присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», объемом 4,3 авторских листа; статей в сборниках научных трудов – 14. Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена инструкция по применению: рег. № 022-0415. Получено 2 патента и 1 уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах текста, включает 43 таблицы, 20 рисунков. Состоит из оглавления, перечня условных обозначений, введения; общей характеристики работы, главы аналитического обзора литературы, главы, содержащей материалы и методы исследования, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, библиографического списка, включающего 262 источника (на русском языке – 80, на иностранном языке – 182), списка публикаций соискателя, приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования

Клиническую часть исследования осуществляли на базе УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника» и кафедре терапевтической стоматологии УО «Витебский государственный медицинский университет» за период времени с 2014 по 2017 гг. (таблица 1, 2). Лабораторную и экспериментальную части исследования проводили на кафедре клинической микробиологии и клинико-диагностической лаборатории УО «ВГМУ», в микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии».

Таблица 1. – Группы обследованных лиц для изучения микрофлоры полости рта

Группы сравнения	Обследованные лица				Возраст			
	мужчины		женщины		мужчины		женщины	
	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	средний, M±σ	min/max значения	средний, M±σ	min/max значения
Контрольная группа	14	46,6	16	53,3	57,7±8,7	42/74	55,7±8,5	36/72
ХПЛ	18	56,3	14	43,7	54,1±10,8	31/75	54,8±11,2	46/69
ХПС	14	45,2	17	54,8	55,2±12,4	33/76	59,8±10,1	34/77
ХПТ	15	44,1	19	55,9	49,7±14,3	25/79	58,5±11,4	29/72

Материалом для изучения микрофлоры полости рта служило содержимое десневой борозды или периодонтального кармана. Для определения уровня протеолитических ферментов, антимикробных пептидов и иммуноглобулинов использовали ротовую жидкость.

Таблица 2. – Группы обследованных лиц для изучения показателей ротовой жидкости

Группы сравнения	Обследованные лица				Возраст			
	мужчины		женщины		мужчины		женщины	
	абс., n	отн., %	абс., n	отн., %	средний, M±σ	min/max значения	средний, M±σ	min/max значения
Контрольная группа	11	44	14	56	57,3±9,6	42/74	55,2±8,7	36/72
ХПЛ	14	62,5	10	41,6	52,8±11	31/75	57,8±10,3	44/69
ХПС	19	45,2	23	54,8	56,5±12,3	33/76	60,1±10,3	34/77
ХПТ	13	56,5	10	43,5	50,1±14	25/79	57,1±13	29/72

Идентификацию аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводили с использованием тест-систем (rapid ID 32 STREPT – для стрептококков, ID 32 STAPH – для стафилококков, ID 32 C – для грибов, rapid ID 32 A – для анаэробов) с помощью автоматизированного биохимического анализатора АТВ Expression (bioMérieux, Франция). Количество стрептококков в периодонтальном кармане определяли путем подсчета колониеобразующих единиц по методу Мельникова-Царева. Молекулярно-генетическое исследование с целью определения генетических маркеров периодонтопатогенных бактерий проводили с использованием ПЦР в режиме реального времени тест-системой «Дентоскрин» с флуоресцентной детекцией результата (Литех, РФ) с помощью амплификатора ДТ-96 (ДНК-технология, Россия). Определение способности микроорганизмов периодонтального кармана к образованию биопленки проводили с применением 96-луночкового полистиролового планшета, в качестве красителя использовали генцианвиолет. Для исследования трипсиноподобной протеолитической активности использовался хромогенный субстрат (Sigma-Aldrich, USA) бензоил-DL-аргинин-4p-нитроанилид (БАПНА). Определение эластазной активности в ротовой жидкости проводили модифицированной методикой Бэйли Дж. Уровень бета-1-дефензина и альфа-дефензинов в ротовой жидкости определяли методом ИФА с использованием тест-систем HUMAN HNP 1-3 ELISA Kit (Elabscience, USA) и Human DEFb1 ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., USA). Для оценки способности химических и биологических объектов разрушать бактериальную биопленку использовали суспензию экзополимерного матрикса, меченого Конго красным.

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Тип распределения количественных признаков определяли на основе критерия Шапиро-Уилка. Для признаков с нормальным распределением данные представлены (M±σ). При

распределении признака, отличного от нормального, данные представлены (Me; LQ-UQ). Оценку статистической значимости различий между зависимыми группами проводили с использованием непараметрического теста Вилкоксона. Для оценки статистической значимости между несвязанными группами использовался критерий Манна-Уитни. Для сравнения двух независимых групп по качественному признаку использовали двусторонний критерий Фишера. Для сравнения трех и более выборок использовали дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Однофакторный корреляционный анализ проводился с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Роль микроорганизмов полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта

В ходе клинико-лабораторных исследований бактериологическим методом из зубодесневой борозды и пародонтальных карманов было выделено и идентифицировано 127 микроорганизмов, из них были представители рода *Streptococcus spp.* ($n=121$; 95,3%), *Staphylococcus spp.* ($n=3$; 2,4%), *Candida spp.* ($n=3$; 2,4%). Установлено, что самыми многочисленными микроорганизмами в полости рта были стрептококки, которые являются представителями «желтого комплекса». При качественном анализе характера условно-патогенной микрофлоры, выделенной бактериологическим методом, установлено, что при хроническом пародонтите возрастает степень разнообразия видов микроорганизмов в 3 раза при сравнении с таковой в контрольной группе. При сравнении частоты выделения отдельных видов микроорганизмов «желтого комплекса», а также их ассоциаций в зависимости от степени тяжести хронического пародонтита статистически значимых различий не выявлено ($p>0,05$). При количественном анализе характера условно-патогенной микрофлоры, выделенной бактериологическим методом, установлено, что у пациентов с хроническим пародонтитом количество условно-патогенных микроорганизмов выше, чем в контрольной группе (Me, LQ-UQ; 4,7, 4-5 lgКОЕ/мл). В группе пациентов с легкой степенью данный показатель составил 5, 4,7-5,7 lgКОЕ/мл ($p<0,01$), со средней – 6,7, 6-6,7 lgКОЕ/мл ($p<0,001$) и тяжелой степенью хронического пародонтита – 8, 7,7-8 lgКОЕ/мл ($p<0,001$). При более тяжелом течении процесса в тканях пародонта увеличивается количество бактерий по сравнению с легкой, средней степенью тяжести хронического пародонтита ($p<0,001$).

С применением молекулярно-генетического метода при качественном исследовании поддесневой области на наличие пародонтопатогенных микроорганизмов установлено, что статистически значимо ($p<0,001$) частота выделения пародонтопатогенных видов 1-го и 2-го порядков при хроническом

периодонтите (96%) выше по сравнению с контрольной группой (30%). Относительная частота выявления периодонтопатогенов 1-го порядка у пациентов с хроническим периодонтитом возросла в сравнении с контрольной группой, для вида *T. forsythia* в 14,7 раз. Микроорганизмы *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* были идентифицированы только в группах с патологией периодонта. Для периодонтопатогенов 2-го порядка также было характерно увеличение относительной частоты выявления у пациентов с хроническим периодонтитом в сравнении с контрольной группой: для *P. intermedia* в 12,2 раза, *T. denticola* в 10 раз, *F. nucleatum* в 5 раз, *P. endodontalis* в 7,4 раза (рисунок 1).

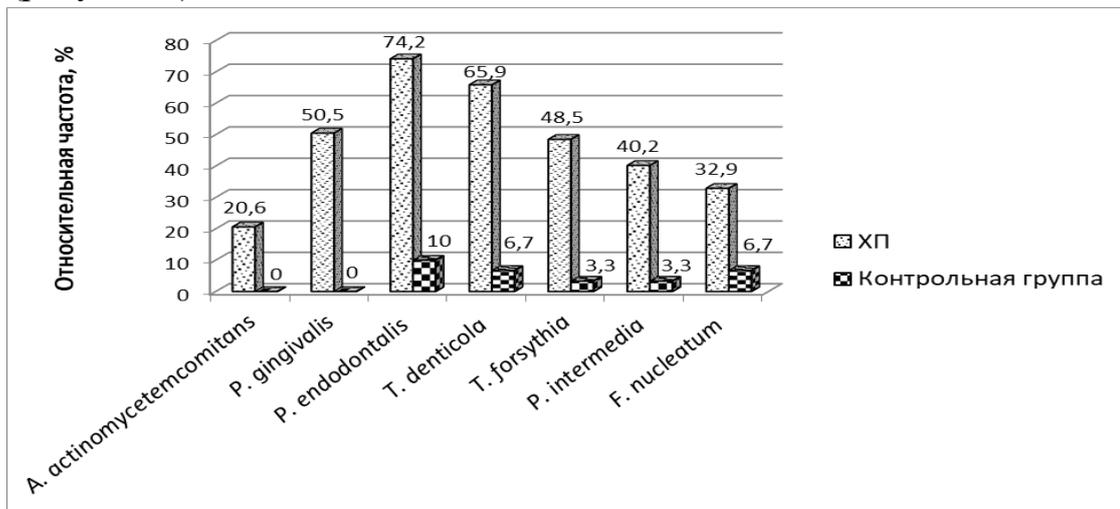


Рисунок 1. – Относительная частота выявления периодонтопатогенов 1 и 2 порядков у обследованных пациентов, %

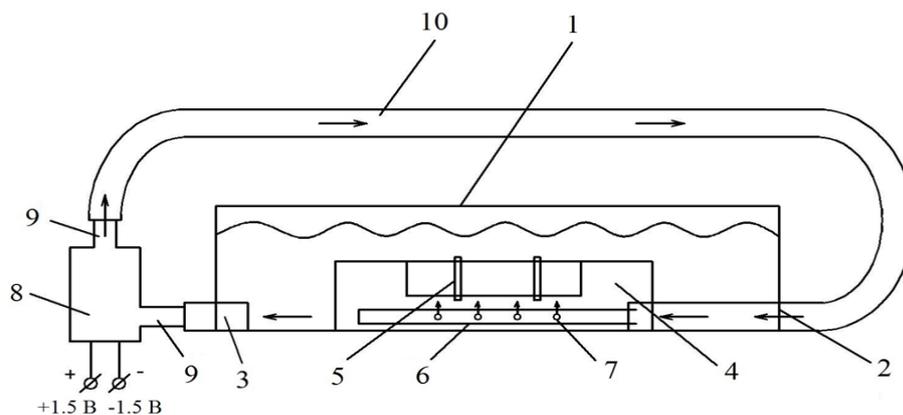
Ассоциации периодонтопатогенов 1-го и 2-го порядков, включающих от 4-х до 6-ти видов, встречались только при хроническом периодонтите. С применением количественного анализа ПЦР в режиме реального времени установлено увеличение концентрации периодонтопатогенов у пациентов с хроническим периодонтитом (геном-эквивалент/мл) в сравнении с контрольной группой ($p < 0,001$). Аналогичная тенденция наблюдалась при прогрессировании воспалительного процесса, так статистически значимо ($p < 0,001$) возрастает концентрация периодонтопатогенов у пациентов с хроническим периодонтитом от $3,6 \times 10^6$; $3,5 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^8$ геном-эквивалент/мл при легкой степени, $1,5 \times 10^7$; $4,3 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^8$ геном-эквивалент/мл при средней степени и до $5,7 \times 10^7$; $1,8 \times 10^7$ - $7,3 \times 10^8$ геном-эквивалент/мл при тяжелой степени заболевания.

При исследовании установлено, что общее количество микроорганизмов «желтого комплекса», наличие периодонтопатогенов 1-го порядка (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*) статистически значимо коррелируют с прогрессированием воспалительного процесса ($r=0,96$, $p < 0,001$; $r=0,77$, $p < 0,001$ соответственно). Количество микроорганизмов «желтого комплекса» у пациентов увеличивается в 4 раза при хроническом периодонтите

легкой степени тяжести, в 64 раза – при средней степени, в 2154 раза – при тяжелой степени. Количество периодонтопатогенов способно возрасти в 295 раз при легкой степени, в 439 раз – при средней степени, в 2667 раз – при тяжелой степени по сравнению с контрольной группой. Выявлена связь количества микроорганизмов «желтого комплекса» ($p < 0,001$), массы биопленки, образованной стрептококками ($p < 0,001$), и наличия в ассоциации периодонтопатогенов 1-го порядка ($p < 0,001$) с тяжестью течения хронического периодонтита.

Биопленка микроорганизмов периодонтального кармана как фактор патогенности при хроническом периодонтите

С целью получения биопленки с характерными свойствами *in vitro* разработано и запатентовано устройство для формирования микробной биопленки в динамических условиях, учитывающее циркуляцию ротовой жидкости в физиологических условиях (рисунок 2).



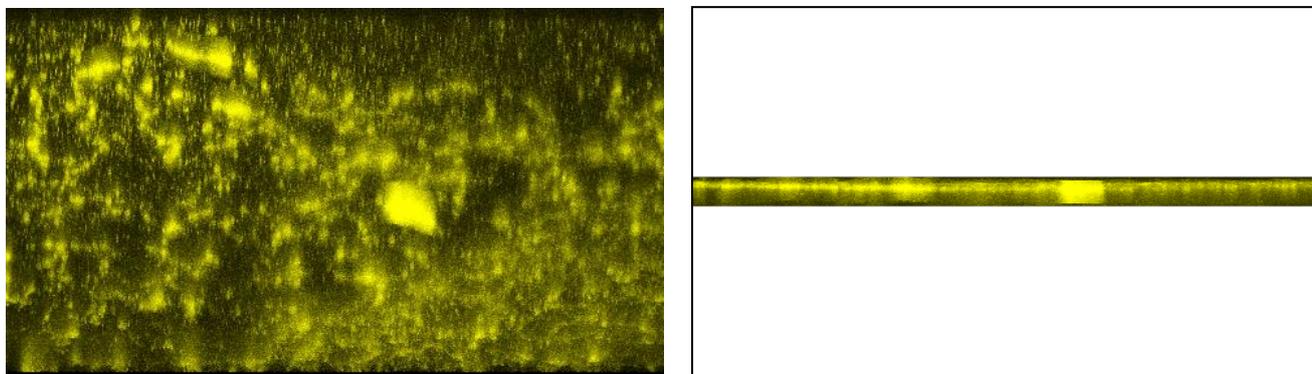
Примечание – 1 – корпус; 2 – входное отверстие; 3 – выходное отверстие; 4 – п-образный профиль; 5 – держатели из нержавеющей стали; 6 – трубка из нержавеющей стали; 7 – отверстия диаметром 1 мм; 8 – водяная помпа; 9 – патрубки; 10 – силиконовая трубка

Рисунок 2. – Устройство для формирования биопленок в динамических условиях

Для изученных нами изолятов стрептококков масса потенциально образованной ими биопленки не отличалась ($p > 0,05$) в статических и динамических условиях и составила $39,6 \pm 14,8$ мкг/лунку, $23,9 \pm 13,2$ мкг/лунку соответственно. В то же время для изолятов стафилококков, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом, в статических условиях масса биопленки составила $119,8 \pm 28,3$ мкг/лунку, а в динамических была ниже $32,5 \pm 24,1$ мкг/лунку ($p < 0,05$).

В статических условиях микроорганизмы «желтого комплекса», выделенные от лиц контрольной группы, формировали биопленку массой 0; 0-5,29 мкг/лунку ($\min=0$, $\max=23$). Для микроорганизмов, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом, была характерна зависимость

формирования массы биопленки от степени тяжести заболевания: легкая степень - 3,83; 0-5,57 мкг/лунку, средняя - 8,85; 5,7-19,26 мкг/лунку, тяжелая - 22,94; 15,2-40,06 мкг/лунку. Статистически значимо масса биопленки, образуемая микроорганизмами «желтого комплекса», выше при тяжелой степени течения хронического периодонта, чем в контрольной группе, а также в группах с легкой и средней степенью течения заболевания ($p < 0,001$). Выявлена средняя положительная корреляция тяжести хронического периодонтита с массой биопленки, образованной микроорганизмами «желтого комплекса» ($r = 0,62$; $p < 0,001$). При изучении микробных биопленок с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF и с использованием флуоресцентного красителя DAPI получена характерная для биопленок трехмерная организация (рисунок 3).



а – горизонтальная

б – вертикальная плоскость

Рисунок 3. – Изображение биопленки *S. oralis*, полученное с помощью конфокальной микроскопии

При изучении действия антисептиков и ферментов на матрикс биопленки установлена значительная межвидовая и внутривидовая гетерогенность чувствительности матрикса к агентам, разрушающим биопленку (таблица 3).

Наибольшая внутривидовая вариабельность данных наблюдалась у изолятов *E. coli* к гиалуронидазе I типа (от 0,04 до 11,7 мкг/мл) и трипсину (от 0,07 до 23,3 мкг/мл). При сравнении чувствительности экзополимерного матрикса биопленок, сформированных микроорганизмами разных видов, к ферментам и антисептикам было установлено, что наименее устойчивым являлся матрикс биопленки, сформированный изолятами *Streptococcus spp.*, выделенными от пациентов с хроническим периодонтитом. Наибольшей способностью ($p < 0,001$) к разрушению экзополимерного матрикса, по сравнению с другими исследованными антисептиками и ферментами, обладали 25% диметилсульфоксид (63,25; 36,95-71,86 мкг/мл) и протеиназа К (8,83; 6,28-34,97 мкг/мл).

Таблица 3. – Способность активных веществ к расщеплению экзополимерного матрикса монобио пленок в зависимости от вида микроорганизма, Me; LQ – UQ; (min/max), мкг/мл

Исследуемый изолят/ Активное вещество	<i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=6)	<i>S. epidermidis</i> (n=4)	<i>S. aureus</i> (n=6)	<i>E. coli</i> (n=6)	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> (n=3)
Гиалуронидаза I (<i>bovine testis</i>)	4,7; 1,13-7,5 (0,4/9,6)	3,8; 2,65-4,14 (1,8/4,1)	7,3; 1,45-10,1 (0,7/11,8)	3,5; 0,74-7,65; (0,04/11,7)	0,5; 0,22-0,54 (0,2/0,5)
Трипсин (<i>bovine pancreas</i>)	16,1; 3,69-27,3 (3,7/33,3)	1,7; 1,1-2,5 (1/2,6)	8,0; 1,57-14,1 (1,5/35,7)	3,2; 2,25-4,01 (0,07/23,3)	0,7; 0,2-4,1 (0,2/4)
Протеиназа К (<i>tritrichium album</i>)	44,0; 8,1-55,3 (1,1/82,5)	5,0; 2,8-8,1 (1,7/9,9)	11,9; 5,1-18,1 (3,9/18,2)	28,5; 9,7-49,7 (4,1/58,7)	3,8; 2,0-19,5 (2/19,5)
ДНКаза I типа (<i>bovine pancreas</i>)	16,5; 5,1-21,8 (3,7/28)	1,3; 1,1-1,8 (0,9/2,1)	1,0; 0,73-1,2 (0,38/2,4)	0,5; 0,04-14,1 (0/14,1)	1,7; 0,1-2,4 (0,08/2,4)
Диметилсульфоксид 25%	89,5; 52,1-116,8 (25/164)	21,3; 15,1-48,6 (11,8/73,2)	39,9; 36,9-47,1 (25,9/172)	54,4; 44,5-63,12 (24,1/75,5)	14,6; 8,9-63,4 (8,8/63,4)

Биопленка, сформированная в динамических условиях, при действии на нее антисептиками и ферментами более стабильна ($p < 0,001$). Устойчивость микробного матрикса в динамических условиях возрастает в 5 раз для 25% диметилсульфоксида, в 20 раз для гиалуронидазы I-го типа, в 2 раза для протеиназы К и в 5 раз для трипсина по сравнению с аналогичной биопленкой, сформированной в статических условиях.

При сравнении МПК₉₀ для изолятов *Streptococcus spp* в составе биопленки обнаружено, что МПК увеличилась от 2 до 512 раз для всех антибиотиков по сравнению с их МПК₉₀ для планктонных форм, кроме моксифлоксацина. Увеличение МПК₉₀ наблюдалось для β -лактамовых антибиотиков – пенициллинов (бензилпенициллин в 32 раза, амоксициллин-клавуланат в 512 раз; для карбапенемов (имипенем в 2 раза, меропенем в 16 раз); для глицилциклинов (тигексиклин в 2 раза); для фторхинолонов (ципрофлоксацин в 4 раза).

Неспецифические факторы резистентности ротовой полости при хроническом периодонтите

Эластазная и БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости повышаются при развитии хронического периодонтита (таблица 4,5).

Таблица 4. – Активность эластазы ротовой жидкости до лечения

Группы сравнения	Me; LQ – UQ, пкат	p
1. Контрольная (n=25)	0,0009; 0,0002-0,0013	p ₁₋₂ >0,05; p ₁₋₃ <0,001 p ₁₋₄ <0,001; p ₂₋₃ <0,001 p ₂₋₄ <0,001; p ₃₋₄ <0,01
2. ХПЛ (n=24)	0,0012; 0,00057-0,0028	
3. ХПС (n=42)	0,0079; 0,0033-0,015	
4. ХПТ (n=23)	0,025; 0,0094-0,034	

При исследовании у пациентов с хроническим периодонтитом легкой степени тяжести эластазная и БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости статистически значимо не отличалась от контрольной группы ($p>0,05$).

У пациентов с хроническим периодонтитом при устранении воспалительного процесса в периодонтальных тканях эластазная активность статистически значимо снижалась при средней степени тяжести до 0,0012; 0,00053-0,0022 пкат ($p<0,001$) и при тяжелой – до 0,0011; 0,00014-0,0064 пкат ($p<0,001$).

Таблица 5. – БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости до лечения

Группы сравнения	Me, LQ - UQ, пкат	p
1. Контрольная (n=25)	2,6; 1,59-3,79	$p_{1-2}>0,05$; $p_{1-3}<0,001$ $p_{1-4}<0,001$; $p_{2-3}<0,001$ $p_{2-4}<0,01$; $p_{3-4}>0,05$
2. ХПЛ (n=24)	2,96; 2,58-3,56	
3. ХПС (n=42)	4,43; 3,45-6,22	
4. ХПТ (n=23)	5,84; 3,4-8,93	

После проведенного лечения БАПНА-амидазная активность статистически значимо снизилась у пациентов со средней степенью тяжести до 3,1; 2,72-4 пкат ($p<0,05$) и тяжелой – до 3,79; 2,72-5,79 пкат ($p<0,001$).

Эластазная и БАПНА-амидазная активность ротовой жидкости у пациентов с хроническим периодонтитом коррелируют со стоматологическими индексами PI Silnes-Loe, SBI, PI Pussel, $r=0,69$; 0,66; 0,64, ($p<0,001$) и $r=0,61$; 0,6; 0,58, ($p<0,05$) соответственно. Между глубиной периодонтального кармана и эластазной активностью выявлена сильная корреляция ($r=0,78$, $p<0,05$), с БАПНА-амидазной активностью – средняя корреляция ($r=0,59$, $p<0,05$). Установлена более сильная корреляционная связь эластазной активности с уровнем воспалительного процесса в тканях периодонта, чем аналогичная для БАПНА-амидазной активности.

При определении тяжести течения хронического периодонтита на основании проведенного ROC-анализа установлено, что увеличение показателя активности эластазы ротовой жидкости выше 0,019 пкат с чувствительностью 85,7% и специфичностью 69,5% характерно для группы пациентов с тяжелой степенью хронического периодонтита, показатель выше 0,0015, но ниже 0,019 с чувствительностью 100% и специфичностью 60,87% для группы пациентов со средней степенью тяжести хронического периодонтита. После проведенного противовоспалительного лечения наблюдалось снижение показателя активности эластазы у пациентов с тяжелой степенью менее 0,0065 пкат с чувствительностью 86,9% и специфичностью 82,3%, а со средней степенью тяжести – менее 0,0016 пкат с чувствительностью 97,6% и специфичностью

70,3%. Данный показатель позволяет оценить динамику воспалительного процесса.

При развитии воспалительного процесса в тканях периодонта происходит статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровня альфа-дефензинов (2595,1; 1693,3-4732,7 нг/мл) и бета-1-дефензинов (4,14; 3,4-5,3 нг/мл) в ротовой жидкости по сравнению с величинами этих показателей в контрольной группе (358,9; 290,5-450,8 нг/мл; 2,48; 1,9-3,9 нг/мл соответственно). При анализе корреляции альфа-дефензинов с БАПНА-амидазной и эластазной активностью ротовой жидкости установлена средняя положительная корреляционная связь ($r=0,54$ и $r=0,61$; $p < 0,001$ соответственно). В то же время, при изучении взаимосвязи уровня бета-1-дефензина с БАПНА-амидазной и эластазной активностью ротовой жидкости значимой корреляции не выявлено.

Анализ связи неспецифических факторов резистентности ротовой жидкости с микробным фактором позволил установить, что эластазная активность имеет среднюю положительную корреляционную связь с количеством микроорганизмов «желтого комплекса» ($r=0,67$; $p < 0,001$) и образованной ими массы экзополимерного матрикса ($r=0,52$; $p < 0,001$). Для уровня альфа-дефензинов установлена положительная средняя корреляционная связь с количеством микроорганизмов «желтого комплекса» ($r=0,68$, $p < 0,001$) и массой, образованной ими биопленки ($r=0,66$; $p < 0,001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. При тяжелом течении хронического периодонтита 94,1% микроорганизмов «желтого комплекса» обладали способностью формировать экзополимерный матрикс биопленки, при средней степени хронического периодонтита 83,9%, при легкой – 71,9%. В 100% случаев биопленку образовывали стрептококки *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*. Масса биопленки, образованной стрептококками, при тяжелой степени течения хронического периодонтита больше, чем у лиц без патологии периодонта (22,94; 15,2-40,06 мкг/лунку и 0; 0-5,29 мкг/лунку, $p < 0,001$ соответственно), а также превышает массу биопленки в группах с легкой (3,83; 0,0-5,57 мкг/лунку, $p < 0,001$) и средней степенью (8,85; 5,7-19,26 мкг/лунку, $p < 0,001$) заболевания [1, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 16].

2. У пациентов с хроническим периодонтитом в сравнении с контрольной группой лиц без патологии периодонта чаще встречаются ($p < 0,001$) периодонтопатогены 1 порядка – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($p < 0,001$) и 2 порядка – *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas*

endodontalis. Количество периодонтопатогенных микроорганизмов в ассоциациях у пациентов с хроническим периодонтитом увеличивается от 4-х видов и более ($p < 0,001$) по сравнению с группой лиц без патологии периодонта. Количество микроорганизмов «желтого комплекса» у пациентов с хроническим периодонтитом увеличивается в 4 раза при легкой степени хронического периодонтита, в 64 раза – при средней степени, в 2154 раза – при тяжелой степени; количество периодонтопатогенов возрастает в 295 раз при легкой степени хронического периодонтита, в 439 раз – при средней степени, в 2667 раз – при тяжелой степени по сравнению с контрольной группой лиц без патологии периодонта в анамнезе. Выявлена связь количества микроорганизмов «желтого комплекса» ($p < 0,001$), массы биопленки, образованной стрептококками ($p < 0,001$), и наличия в ассоциации периодонтопатогенов 1-го порядка ($p < 0,001$) с тяжестью течения хронического периодонтита [5, 6, 13].

3. Разработанное устройство для формирования биопленки в динамических условиях *in vitro* позволяет создавать условия образования микробного матрикса в ротовой полости близкие к физиологическим. С использованием разработанного устройства установлено, что при формировании микробного матрикса в динамических условиях его устойчивость к препаратам, разрушающим биопленку, возрастает в 5 раз для диметилсульфоксида 25%, в 20 раз для гиалуронидазы 1 типа, в 2 раза для протеиназы К и в 5 раз для трипсина по сравнению с аналогичной биопленкой, сформированной в статических условиях [7, 23].

4. Наиболее распространенные в клинической практике антисептики (хлоргексидин 0,05%, 2%; перекись водорода 3%, фурацилин, цетилпиридиния хлорид, септомирин) не разрушали экзополимерный матрикс, сформированный микроорганизмами ротовой полости. Наибольшей способностью к разрушению экзополимерного матрикса стрептококков обладал фермент протеиназа К (18,83; 6,28-34,97, $p < 0,05$) и антисептик диметилсульфоксид (63,25; 36,95-71,86 мкг/мл, $p < 0,001$) в 25% концентрации [1, 3, 7, 9, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 21].

5. При сравнении МПК₉₀ антибиотиков для *Streptococcus spp* в составе биопленки обнаружено, что МПК₉₀ увеличилась от 2 до 512 раз для антибиотиков, используемых в лечении хронического периодонтита, по сравнению с их МПК₉₀ для планктонных форм, за исключением моксифлоксацина. Возросла МПК₉₀ для пенициллинов (бензилпенициллин в 32 раза, амоксициллин-клавуланат в 512 раз); карбапенемов (имипенем в 2 раза, меропенем в 16 раз), глицилциклинов (тигекцилин в 2 раза) и фторхинолона – ципрофлоксацина в 4 раза [7, 24].

6. При тяжелом течении хронического периодонтита в ротовой жидкости повышался ($p < 0,01$) уровень активности эластазы до 0,025 пкат и содержание

альфа- и бета-дефензинов до 2595,1 нг/мл и 4,14 нг/мл соответственно по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе активность эластазы была 0,0009 пкат, а уровень альфа- и бета-дефензинов 358,9 нг/мл и 2,48 нг/мл соответственно. После проведенного противовоспалительного лечения данные показатели эластазы и альфа-дефензинов статистически значимо снижались. При определении тяжести течения хронического периодонтита увеличение показателя активности эластазы ротовой жидкости выше 0,019 пкат характерно для группы пациентов с тяжелой степенью хронического периодонтита, показатель выше 0,0015, но ниже 0,019 для группы пациентов со средней степенью тяжести хронического периодонтита. После проведенного противовоспалительного лечения наблюдалось снижение показателя активности эластазы у пациентов с тяжелой степенью менее 0,0065 пкат, со средней степенью тяжести – менее 0,0016 пкат [2, 8, 14, 20, 22, 25].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Метод определения активности эластазы ротовой жидкости внедрен в практическое здравоохранение и учебный процесс. Данное исследование рекомендуется в качестве дополнительного метода при обследовании пациентов с хроническим периодонтитом в стоматологических поликлиниках и позволяет на основании данных лабораторных исследований подтвердить диагноз, определить степень тяжести течения и динамику воспалительного процесса в тканях периодонта [22, 25].

2. Микробиологическое исследование с оценкой способности микроорганизмов периодонтального кармана образовывать биопленку при лечении тяжелых форм хронического периодонтита позволит правильно скорректировать лечение и на основании полученных результатов использовать наиболее эффективные антибиотики. Для эмпирической антибиотикотерапии тяжелых форм хронического периодонтита предпочтительно применять антибиотики фторхинолонового ряда (ципрофлоксацин, моксифлоксацин) или глицилциклинов – тигециклин [24].

3. При наличии способности у микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническим периодонтитом, формировать биопленку, рекомендовано использовать для местного лечения 25% раствор диметилсульфоксида в качестве первичной антисептической обработки периодонтальных карманов для разрушения матрикса микробной биопленки [23].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Колчанова, Н. Э. Определение образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивости к химическим и биологическим объектам / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – № 3. – С. 56–61.
2. Колчанова, Н. Э. Уровень бета-1-дефензина, БАПНА-амидазной и эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с хроническим периодонтитом / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, А. Г. Денисенко // Вестн. ВГМУ. – 2015. – Т. 15, № 2. – С. 105–112.
3. Колчанова, Н. Э. Метод определения биопленки на основе флуоресценции и изучение разрушения матрикса биопленки периодонтального кармана / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин // Мед. академ. журн. – 2016. – № 4. – С. 86–87.
4. Колчанова, Н. Э. Микробиологические аспекты хронического периодонтита, вызванного бактериями, образующими биопленку / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич // Здоровье и образование в 21 веке. – 2017. – Т. 19, № 4. – С. 26–29.
5. Колчанова, Н. Э. Роль микрофлоры и ее способности формировать биопленку в патогенезе хронического периодонтита / Н. Э. Колчанова // Вестн. ВГМУ. – 2017. – Т. 16, № 5. – С. 127–135.
6. Колчанова, Н. Э. Современные аспекты изучения микроорганизмов полости рта, образующих биопленку, при патологии периодонта / Н. Э. Колчанова, Ю. П. Чернявский, В. К. Окулич // Стоматолог. – 2017. – № 5. – С. 57–68.
7. Колчанова, Н. Э. Устойчивость матрикса моно- и многокомпонентных биопленок, образованных микрофлорой периодонтального кармана, в статических и динамических условиях среды *in vitro* и их антибиотикорезистентность / Н. Э. Колчанова // Вестн. ВГМУ. – 2017. – Т. 16, № 5. – С. 136–144.

Статьи в научных сборниках и материалах конференций

8. Колчанова, Н. Э. Взаимосвязь периодонтологического статуса и активности эластазы ротовой жидкости у пациентов с хроническим периодонтитом / Н. Э. Колчанова, Е. В. Новогран, А. В. Хацкевич // Студенческая медицинская наука XXI века : материалы XV Междунар. науч.-практ. конф. – Витебск, 2015. – С. 416–418.

9. Колчанова, Н. Э. Методические аспекты определения образования микробных сообществ бактериями периодонтального кармана и исследования препаратов разрушающих биопленку / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. – Минск : ГУ РНМБ, 2015. – Вып. 8. – С. 91–95.

10. Колчанова, Н. Э. Образование биопленки микрофлорой пародонтального кармана при воспалительных заболеваниях пародонта / Н. Э. Колчанова // Аспирантские чтения-2015 : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием «Молодые ученые XXI века – от идеи к практике». – Самара, 2015. – С. 203–204.

11. Колчанова, Н. Э. Определение действия химиопрепаратов на микробную биопленку периодонтального кармана / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич // 90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси : материалы Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 125-летию со дня рождения Б. Я. Эльберта. – Минск, 2015. – С. 55–58.

12. Колчанова, Н. Э. Оценка способности микрофлоры периодонтального кармана к образованию микробных сообществ, и возможность влияния на микробную биопленку ферментами и антисептиками / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, В. Е. Шилин // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. – Минск, 2015. – Вып. 5. – С. 74–77.

13. Колчанова, Н. Э. Определение микрофлоры периодонтального кармана с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Н. Э. Колчанова, А. В. Хацкевич, Э. А. Богнат // Студенческая медицинская наука XXI века и I Форум молодежных научных обществ : материалы XVI междунар. конф. студентов и молодых ученых и I Форума молодеж. науч. о-в. – Витебск : ВГМУ, 2016. – С. 534–536.

14. Колчанова, Н. Э. Уровень бета-1-дефензина, бапна-амидазной эластазной активности ротовой жидкости у пациентов с хроническим периодонтитом / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич // Обеспечение демографической безопасности при решении актуальных вопросов хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии: сб. тр. Нац. конгр. с междунар. участием «Паринские чтения 2016», Минск, 5–6 мая 2016 г. – Минск, 2016. – С. 248–251.

15. Колчанова, Н. Э. Устойчивость биопленки периодонтального кармана к химическим и биологическим объектам / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 71-й науч. сес. сотр. ун-та. – Витебск, 2016. – С. 77–79.

16. Колчанова, Н. Э. Изучение образования матрикса микробной биопленки микроорганизмами при хроническом периодонтите / Н. Э. Колчанова,

В. К. Окулич, В. Е. Шилин // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. Вып. 10. – Минск, 2017. – С. 160–167.

17. Определение чувствительности матрикса микробной биопленки к ферментам и антисептикам / Н. Э. Колчанова, Б. Б. Н. Фершиши, В. К. Окулич, С. А. Сенькович, В. В. Алексейкова // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. Вып. 10. – Минск, 2017. – С. 156–160.

18. Колчанова, Н. Э. Оценка эффективности действия антисептиков и ферментов на матрикс биопленки периодонтального кармана при хроническом периодонтите / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, Б. Б. Н. Фершиши // Проблемы мед. микологии. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 84.

19. Колчанова, Н. Э. Оценка эффективности применения антисептиков и ферментов для разрушения биопленки периодонтального кармана / Н. Э. Колчанова, Ю. П. Чернявский // Стоматология. Эстетика. Инновации. – 2017. – Т. 1, № 2. – С. 223–227.

20. Kalchanava, N. E. Evaluation of the expression of oral liquid biomarkers in diagnostics of chronic periodontitis / N. E. Kalchanava, V. K. Okulich, B. B. N. Ferchichi // Biological markers in fundamental and clinical medicine. – 2017. – Vol. 1, N 4. – P. 25–27.

21. Kalchanava, N. E. Spectrophotometric analysis of the effects of antiseptics and enzymes on the exopolymeric matrix of bacterial biofilms / N. E. Kalchanava, B. B. N. Ferchichi // Biological markers in fundamental and clinical medicine. – 2017. – Vol. 1, N 4. – P. 47–49.

Инструкция по применению

22. Метод определения активности эластазы ротовой жидкости для диагностики гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области : инструкция по применению № 022-0415 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь от 23.12.2015 г. / Н. Э. Колчанова, В. К. Окулич, А. А. Кабанова, А. И. Гончарова, Д. Е. Корнеева ; разработчик Витебский гос. мед. ун-т. – Витебск, 2015. – 5 с.

Патенты

23. Устройство для формирования биопленок в динамических условиях : пат. 11446 Респ. Беларусь, МПК С 12 М 1/00 / Окулич В. К., Колчанова Н. Э., Шилин В. Е., Плотников Ф.В. ; заявитель и патентообладатель Витебский гос. мед. ун-т. – № и 20170020 ; заявл. 30.01.17 ; опубл. 30.08.17, Афіц. бюл. № 4. – С. 141.

24. Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибиотика для бактерий, способных формировать биопленку : пат. Респ. Беларусь, МПК С 12 Q 1/18 / Окулич В. К., Кабанова А. А., Плотников Ф. В., Сенькович С. А., Колчанова Н. Э. ; заявитель и патентообладатель Витебский

гос. мед. ун-т. – № а 20150466 ; заявл. 21.09.15 ; опубл. 30.08.18, Афіц. бюл. № 4. – С. 90.

25. Способ диагностики воспалительного заболевания челюстно-лицевой области: положительный результат предварительной экспертизы на выдачу патента № а20170012 / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, А.И. Гончарова, Н.Э. Колчанова. – Опубл. 14.04.2017.

A handwritten signature in black ink, consisting of several stylized, overlapping loops and lines, positioned in the lower right quadrant of the page.

РЭЗІЮМЕ

Калчанавы Наталля Эдуардаўна

Ўтварэнне біяпленак мікраарганізмамі ротавай поласці і іх уплыў на цяжэння хранічнага перыядантыту

Ключавыя словы: перыядантапатагены, біяпленка, ротавае вадкасць, эластаза, хранічны перыядантыт

Мэта працы: на грунце бактэрыялагічных і малекулярна-генетычных метадаў даследавання вызначыць ролю ўтвараючых біяпленку мікраарганізмаў перыядантальнай кішэні ў развіцці хранічнага перыядантыту з улікам фактараў неспецыфічнай рэзістэнтнасці макраарганізма

Метады даследавання: бактэрыялагічныя, імуналагічныя, клінічныя, лабараторныя, інструментальныя, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: устаноўлена, што ўзнікненне і прагрэсаванне хранічнага перыядантыту залежыць не толькі ад відавочнага складу перыядантагенных узбуджальнікаў, але і ад колькасці мікраарганізмаў і масы, утворанага імі эксапалімернага матрыксу. Распрацаваны і запатэнтаваны прыбор для фарміравання біяпленкі ў дынамічных умовах.

Выяўлена, што біяпленка валодае значнай міжвідавочнай і ўнутрывідавочнай варыябельнасцю па спектры адчувальнасці да ферментаў і антысэптыкаў. Найбольшай здольнасцю да разбурэння эксапалімернага матрыксу валодае пратаіназа К і дымецілсульфаксід.

Распрацаваны і запатэнтаваны метады вызначэння адчувальнасці антыбіётыкаў мікраарганізмамі ў складзе біяпленкі. Стрэптакокі ў складзе біяпленкі дэманструюць больш высокую падаўляльную канцэнтрацыю ў параўнанні з іх планктоннымі формамі.

Упершыню паказана сувязь эластазнай актыўнасці, узроўню дэфензінаў у ротавай вадкасці з цяжкасцю цяжэння хранічнага перыядантыту. Прапанавана выкарыстанне вызначэння актыўнасці эластазы ротавай вадкасці ў клінічнай практыцы ў якасці дыягнастычнага крытэрыю.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя даныя могуць быць выкарыстаны для дыягностыкі ў мікрабіялагічных лабараторыях і ўрачамі-стаматолагамі для лячэння пацыентаў з цяжкімі формамі хранічнага перыядантыту.

Галіна ўжывання: клінічная мікрабіялогія, стаматалогія

РЕЗЮМЕ

Колчанова Наталья Эдуардовна

Образование биопленок микроорганизмами ротовой полости и их влияние на течение хронического периодонтита

Ключевые слова: периодонтопатогены, биопленка, ротовая жидкость, эластаза, хронический периодонтит

Цель работы: на основании результатов бактериологических и молекулярно-генетических методов исследования определить роль биопленкообразующих микроорганизмов периодонтального кармана в развитии хронического периодонтита с учетом роли факторов неспецифической резистентности макроорганизма.

Методы исследования: бактериологические, иммунологические, клинические, лабораторные, инструментальные, статистические.

Полученные результаты и их новизна: установлено, что возникновение и прогрессирование хронического периодонтита зависит не только от видового состава периодонтопатогенных возбудителей, но и от количества микроорганизмов и массы, образованного ими экзополимерного матрикса. Разработано и запатентовано устройство для формирования биопленки в динамических условиях.

Выявлено, что матрикс биопленки обладает значительной межвидовой и внутривидовой вариабельностью по спектру чувствительности к ферментам и антисептикам. Наибольшей способностью к разрушению экзополимерного матрикса обладали протеиназа К и диметилсульфоксид. Разработан и запатентован метод определения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов в составе биопленки. Стрептококки в составе биопленки демонстрируют более высокую минимальную подавляющую концентрацию по сравнению с их планктонными формами.

Впервые показана связь эластазной активности, уровня дефензинов в ротовой жидкости с тяжестью течения хронического периодонтита. Предложено использование определения активности эластазы ротовой жидкости в клинической практике в качестве диагностического критерия.

Рекомендации по использованию: полученные данные могут быть использованы для диагностики в микробиологических лабораториях и врачами-стоматологами для лечения пациентов с тяжелыми формами ХП.

Область применения: клиническая микробиология, стоматология

ABSTRACT

Kalchanava Natallia

The formation of biofilms by oral microorganisms and their effect on the course of chronic periodontitis

Keywords: periodontopathogen, biofilm, oral liquid, elastase, chronic periodontitis.

Aim of the study: to determine the role of biofilm-forming microorganisms of the periodontal pocket in the development of chronic periodontitis on the basis of the results of bacteriological and molecular genetic methods of research, taking into account the role of factors of nonspecific resistance of the macroorganism

Research methods: bacteriological, immunological, clinical, laboratory, instrumental, statistical.

Results and their novelty: it is established that the onset and progression of chronic periodontitis depends not only on the periodontopathogenic species composition, but also on the number of microorganisms and the mass of the exopolymer matrix, formed by them. A device for the formation of biofilms under dynamic conditions has been developed and patented.

It is known that the matrix of biofilm has a significant interspecies and intraspecies variability in the spectrum of sensitivity to enzymes and antiseptics. The highest ability to destroy the exopolymer matrix was demonstrated by proteinase K and dimethylsulfoxide. A method for determining antibiotics sensitivity of microorganisms in a biofilm was developed and patented. Streptococci in the biofilm have shown a higher minimum inhibitory concentration compared to their planktonic forms.

For the first time, it has been shown, that the scale of elastase activity and the level of defensin in the oral fluid depends on the severity of chronic periodontitis. It has been proposed to use the determination of the activity of oral fluid elastase in clinical practice as a diagnostic criterion.

Recommendations: the obtained data can be used for diagnostic works in microbiological laboratories and by dentists for the treatment of patients with severe forms of chronic periodontitis.

Field of application: clinical microbiology, dentistry.

Подписано в печать 20.09.2018 г. Формат бумаги 60×84 1/16.
Бумага типографская №2. Гарнитура Times. Усл. печ. л. 1,51.
Уч.-изд. л. 1,63. Тираж 60 экз. Заказ № 908
Издатель и полиграфическое исполнение:
УО «Витебский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/453 от 30.12.2013
Пр-т Фрунзе, 27, 210023, Витебск