

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
Московский государственный медико-стоматологический университет
им. А. И. Евдокимова

На правах рукописи

УДК 616.314.17. — 002 — 022.7 — 076

Ипполитов Евгений Валерьевич

**Мониторинг формирования микробной биопленки и
оптимизация диагностики воспалительных
заболеваний пародонта**

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

03.02.03 — «Микробиология» (медицинские науки)
14.03.09 — «Клиническая иммунология, аллергология»
(медицинские науки)

Научные консультанты:

Заслуженный работник высшей школы
Российской Федерации,
д. м. н., профессор В. Н. Царёв;
Заслуженный врач
Российской Федерации,
д. м. н., профессор С. Д. Арутюнов

Москва
2016

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	6
Цель исследования	11
Задачи исследования	11
Научная новизна	13
Практическая значимость	14
Основные положения, выносимые на защиту	15
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	16
Личный вклад автора	17
Внедрение результатов исследования	17
Апробация работы	18
Публикации	20
Объем и структура диссертации	20
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
МИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА	21
1.1. Современные представления об инфекционной этиологии воспалительных заболеваний пародонта и роли биопленок	21
1.2. Пародонтопатогенные бактерии и факторы микроокружения	24
1.3. Взаимосвязь процессов микробной адгезии и колонизации при формировании биопленки в полости рта	39
1.4. Моделирование биопленок в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	43
1.5. Антибактериальная терапия и опыт изучения резистентности бактерий к антибиотикам, формирующейся в биопленках	47
1.6. Значение взаимодействий, ассоциированных с факторами врожденного иммунитета при заболеваниях пародонта	59
1.7. Резюме	74
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	77
2.1. Дизайн и объекты диссертационного исследования	77
2.2. Методы клинического обследования пациентов	83
2.3. Характеристика стоматологических материалов	86
2.4. Характеристика штаммов микроорганизмов	86
2.5. Методы микроскопического исследования	87
2.5.1. Световая и иммунолюминесцентная микроскопия	87
2.5.2. Сканирующая электронная микроскопия	88
2.5.3. Просвечивающая трансмиссионная электронная микроскопия	88
2.5.4. Сканирующая зондовая атомно-силовая микроскопия	89
2.6. Методы бактериологического исследования	89
2.6.1. Взятие материала для исследования	89
2.6.2. Выделение чистых культур и их идентификация	90
2.6.3. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам	91
2.7. Изучение первичной микробной адгезии <i>in vitro</i>	92
2.8. Модель формирования микробной биопленки <i>in vitro</i>	94
2.9. Экспериментальная модель пародонтита <i>in vivo</i> на лабораторных животных (крысах)	95
2.10. Прямое белковое профилирование штаммов анаэробных бактерий с помощью масс-спектрометрии 16S-рибосомальных белков	96

2.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ КАНДИДА С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР	97
2.11.1. Взятие образцов материала для ПЦР	97
2.11.2. Выделение ДНК	98
2.11.3. Амплификация ДНК	98
2.11.4. Детекция продуктов амплификации	99
2.11.5 Обратная гибридизация ДНК	100
2.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ С ПОМОЩЬЮ ПЦР	101
2.12.1. Взятие исследуемого материала и выделение ДНК	101
2.12.2. Идентификация ДНК с помощью ПЦР	101
2.12.3. Детекция ДНК методом электрофореза	102
2.13. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ТВЕРДОФАЗНЫЙ МЕТОД)	103
2.13.1. Иммуноферментный анализ содержания антител к грибам рода <i>Candida</i> в сыворотке крови	103
2.13.2. Иммуноферментный анализ содержания интерлейкинов в сыворотке крови и десневой жидкости	104
2.13.3. Иммуноферментный анализ содержания дефензинов HNP 1-3 в сыворотке крови и десневой жидкости	105
2.14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ	106
2.15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ	106
2.16. ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ TOLL-LIKE-РЕЦЕПТОРОВ НА КЛЕТКАХ ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ	106
2.17. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И КРИТЕРИИ	107
2.17.1. Диаграмма квантилей	107
2.17.2. Критерий Манна — Уитни	108
2.17.3. Критерий хи-квадрат	108
2.17.4. Двусторонний критерий Фишера	108
2.17.5. Величина относительного риска	108
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ	109
3.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ IN VITRO	109
3.2. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ОБРАЗЦОВ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ПЕРВИЧНОЙ АДГЕЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO	122
3.3. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ МИКРОБНОЙ АДГЕЗИИ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ	134
3.4. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ ШИН ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДЛОЖЕННЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА	140
3.5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ДЛЯ КОЛОНИЗАЦИИ ПАРОДОНТА НА КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ ПАРОДОНТА IN VIVO	149
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ОЦЕНКА АССОЦИАЦИЙ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ ВИДОВ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗИ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ	162
4.1. РЕЗУЛЬТАТЫ ОБЪЕКТИВНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ИНДЕКСНОЙ ОЦЕНКОЙ СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА	162
4.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ ПО НОЗОЛОГИЧЕСКИМ ФОРМАМ (ХРОНИЧЕСКИЙ ГИНГИВИТ, ХРОНИЧЕСКИЙ ПАРОДОНТИТ, КАНДИДА-АССОЦИИРОВАННЫЙ ПАРОДОНТИТ)	170

4.2.1. Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта в норме	171
4.2.2. Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта при хроническом гингивите	173
4.2.3 Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта при хроническом пародонтите	174
4.2.4 Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта при кандида-ассоциированном пародонтите	175
4.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ НА НАЛИЧИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ	177
4.4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ПАРОДОНТОПАТОГЕНОВ В БИОПЛЕНКЕ И ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ	182
4.5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ БИОПЛЕНКОПРОДУЦИРУЮЩИХ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ	194
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ	203
5.1. Количественный состав популяций лейкоцитов периферической крови	203
5.2. Функциональная активность нейтрофилов в периферической крови и полости рта	207
5.3. Экспрессия лейкоцитарных эндогенных антимикробных пептидов	209
5.4. Экспрессия на лейкоцитах десневой жидкости рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-4	217
5.5. Цитокиновый профиль десневой жидкости, биопленки пародонта и плазмы периферической крови	227
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	237
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	268
ВЫВОДЫ	272
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ РАЗРАБОТОК	276
ПРИЛОЖЕНИЯ	278
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	282

Перечень условных обозначений

АФК	— активные формы кислорода
ВПМ	— внеклеточный полимерный матрикс
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛПС	— липополисахарид
ИГ (ОHI-S)	— упрощенный индекс гигиены
МАКС.	— максимальный
МИН.	— минимальный
МПК90	— минимальная подавляющая концентрация для 90% штаммов
ПИ (PI)	— пародонтальный индекс
ПК	— пародонтальный карман
ПМА (РМА)	— папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ХГ	— хронический гингивит
ХП	— хронический пародонтит
ХПЛ	— легкой
ХПС	— средней
ХПТ	— тяжелой степени тяжести
КАП	— кандида-ассоциированный пародонтит
hBD	— β -дефензины
HNP 1 — 3	— α -дефензины человека
TLR	— Toll-like-рецепторы
IL (ИЛ)	— интерлейкин
A. a.	— <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
P. g.	— <i>Porphyromonas gingivalis</i>
P. i.	— <i>Prevotella intermedia</i>
T. d	— <i>Treponema denticola</i>
T. f.	— <i>Tannerella forsythia</i>
VS	— <i>V. parvula</i> + <i>S. salivarius</i> (взвесь кандидатных пробиотических штаммов)
Pcor	— значение p с коррекцией на число сравнений по Бонферони
PM. — U.	— значение p , определяемое с помощью критерия Манна — Уитни
CD	— маркеры кластера дифференцировки

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия наблюдается значительный рост заболеваемости пародонтитом и гингивитом (особенно среди детей и подростков) как в Российской Федерации, так и за рубежом, что является важным фактором снижения качества жизни пациентов с патологией пародонта [111, 208, 210].

Пародонтит — это распространенное воспалительное заболевание, затрагивающее структуры, служащие опорой зубам. Он инициируется ростом биомассы бактерий с образованием биопленки в области десневого края, которая распространяется по эмали зуба (наддесневая) и уходит вглубь по пришеечной части до цемента корня зуба (поддесневая). Бактериальный состав биопленок, с присутствием которых связано развитие пародонтита, уже хорошо документирован, и исследования в данном направлении постоянно продолжаются [57, 81, 242].

В последние годы благодаря применению новых научных методов (сканирующая электронная микроскопия, различные молекулярные исследования) существенно изменился взгляд на зубной налет, который в настоящее время рассматривается как смешанная (мультивидовая) биопленка. Межклеточные коммуникации, образующиеся в биопленках, отличаются у здоровых людей и у пациентов с пародонтитом [54, 96, 281, 410, 453].

Тем не менее роль некоторых ответных реакций организма, изменяющихся в результате воспаления, а также влияние на этот процесс таких факторов микроэкологии полости рта, как уровень pH, температура, окислительный стресс, продукция цитокинов и гормонов, степень болезнетворности пародонтопатогенных бактерий, равно как и взаимосвязь процессов образования биопленки и деструкции тканей пародонта остаются недостаточно изученными [90, 323, 281, 410].

Первостепенное значение в этиологии болезней пародонта и их прогрессировании, развитии рецидивов хронического пародонтита несомненно играют специфические возбудители из группы облигатно-анаэробных бактерий

(так называемые пародонтопатогенные виды, по номенклатуре ВОЗ). А учитывая, что в полости рта человека находится от 530 до 800 видов микробов, значительная часть которых не культивируется, это существенно осложняет диагностику заболеваний пародонта и требует применения молекулярных методов исследования для точной идентификации возбудителей [31, 32, 55, 188, 447, 449].

В перечисленных работах показано, что микроорганизмы способны к дифференцированной организации сообществ с изменением свойств ассоциаций, имеющих медицинское значение. Разработана концепция биологической пленки, которая позиционируется авторами как специализированная экосистема, обеспечивающая поддержку жизнеспособности всей микробной ассоциации и сохранение ее компонентов, а также существенное увеличение биомассы этой популяции [94, 100, 216, 348].

Важнейшими направлениями исследований являются: изучение свойств микробных биопленок, оценка их влияния на развитие стоматологических заболеваний, их противодействие антибактериальным препаратам, используемым для лечения, которые изучены слабо, а данные о влиянии на биопленки эндогенных и экзогенных энзимов и факторов врожденного иммунитета крайне противоречивы. Кроме того, полимерный матрикс, продуцируемый бактериями и окружающий микроколонию, служит защитным барьером.

У исследователей отмечается значительный интерес к воздействию традиционных препаратов антибактериального действия на микроорганизмы, составляющие микробное сообщество, то есть в условиях сформировавшихся биопленок [22, 32, 315, 450]. Продолжаются исследования по поиску новых эффективных средств, с помощью которых возможно было бы снизить агрессивный потенциал микробных биопленок в полости рта и в результате добиться существенного снижения распространенности и интенсивности основных стоматологических заболеваний — воспалительных заболеваний пародонта и кариеса зубов [110, 311, 356].

Изучение биопленок, формирующихся в условиях текучих сред в естественной среде обитания, выявило существенные различия между планктонными и биопленочными формами существования микробиоты, включая различия в поведении бактерий, биохимических процессах, биосинтезе различных продуктов, обмене информацией, в том числе генетической. Очевидно, что биопленки могут способствовать передаче генов резистентности к антибиотикам и к различным химическим биоцидам [31, 220, 221]. В результате воспаления, инициируемого микробами биопленки, pH в десневой борозде увеличивается от 6,8–7,0 до значений выше 7,5. Считается, что высокая pH может ускорять рост и протеиназную активность некоторых пародонтальных патогенов за счет активизации процессов генной экспрессии [334, 335, 338, 351].

Это помогает понять, почему антимикробные препараты как системного действия, так и применяемые местно, не всегда бывают эффективны, даже в тех случаях, когда антибактериальный препарат, казалось бы, безукоризненно подобран по спектру своего действия и активности на конкретный вид пародонтопатогенов. Последнее позволяет объяснить, почему в практической стоматологии механическое удаление зубного налета и гигиенические мероприятия в полости рта (личная и профессиональная гигиена) являются важнейшей составляющей комплексного лечения пациентов с заболеваниями пародонта [42, 43, 52, 69, 81].

В настоящее время исследователями данной проблемы получены новые сведения об устойчивости пародонтальной инфекции полости рта к современным антибактериальным средствам. Установлена продукция различных протективных факторов у микробов пародонтопатогенной группы, в частности β -лактамаз, отвечающих за устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином и даже к карбапенемам [4, 31, 73, 133]. Если не более 10–15 лет назад считалось, что анаэробная флора обладает высокой чувствительностью к производным имидазола и линкосамидам [57, 76, 356], то сегодня резистентные штаммы из группы бактероидов, фузобактерий, пептострептококков,

кlostридий выявляются достаточно часто [311]. Среди штаммов пародонтопатогенных анаэробных бактерий, циркулирующих в Российской Федерации (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*), выявлены Tet- и Erm-гены резистентности к тетрациклинам и макролидам (эритромицину) с частотой 56,8 и 11,8% соответственно [54, 81, 89, 93].

К этому следует добавить, что резистентность анаэробных бактерий, в том числе пародонтопатогенной группы, изучена единичными авторами. Вместе с тем полученных данных достаточно, чтобы поставить вопрос о разработке и совершенствовании схем применения антибактериальных препаратов с учетом внутриклеточной локализации пародонтопатогенов и их устойчивости в составе биопленок.

Формирование биопленок, по-видимому, является основой персистенции ряда видов бактерий на слизистой оболочке полости рта и пародонта, что подтверждается некоторыми новыми фактами, в пользу того, что представители пародонтопатогенных видов обладают механизмами нейтрализации защитных систем нашего организма, причем, как врожденного, так и адаптивного иммунитета [36, 259, 283, 294, 315].

Так, в последнее время исследователи активно изучали роль факторов адаптивного иммунитета, в частности в рамках расширенной парадигмы хелперных ответов разных типов — Th1, Th2 и Th17 — и выработки соответствующих цитокинов пытались объяснить защитные и деструктивные механизмы патогенеза пародонтита [11, 13, 84, 106, 109, 205, 317, 458]. Однако пусковая сторона этих механизмов — состояние факторов врожденного иммунитета — оставалась в тени. Между тем было показано, что при воспалении в пародонте ведущую роль в процессах деструкции играют лейкоциты и наблюдается инфильтрация десны клетками, повышенно экспрессирующими Toll-like-рецепторы по сравнению со здоровой тканью десны. Именно фагоцитирующие клетки обладают функцией непосредственного контакта с микробной биопленкой и ответственны за развитие последующего сценария

иммунных реакций [155, 329, 330].

Сигнальные взаимодействия между компонентом и Toll-like-рецепторами обычно служат для координации иммунитета организма хозяина. Однако пародонтопатогены *Porphyromonas gingivalis* обладают C5 — конвертазоподобной активностью и влияют на взаимодействия компонента и TLR, чтобы разрушать защиту организма хозяина и избегать элиминации. Интересно отметить, что дефектный иммунный надзор приводит к ремоделированию пародонтальной микробиоты в дисбиотическое состояние, которое является причиной воспаления при пародонтите. Лучшее понимание механизмов модулирования *Porphyromonas gingivalis* функций компонента, приводящих к дисбиозу, позволит получить новые мишени для терапевтического применения компонента против *Porphyromonas gingivalis*. Пародонтопатогены, такие как *Porphyromonas gingivalis*, применяют различные приемы для нарушения структурной и функциональной целостности десневого эпителия. *Porphyromonas gingivalis* прилипают, инвазируют и реплицируются внутри эпителиальных клеток [124, 250, 414, 456].

Porphyromonas gingivalis, *F. nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* и стрептококки полости рта индуцируют секрецию эпителиальными клетками IL1 α , IL1 β , IL-6, IL-8, IL-10, LL37, HBD 1, 2, 3 [294]. Взаимодействие микробов с клетками и тканями организма хозяина в значительной степени обусловлено общим метаболизмом бактерий и вирулентным синергизмом в биопленке [245, 247]. Кроме этого, различия в ответе хозяина, возможно, связаны с вариациями экспрессии бактериальных геномов, оказывающих вклад в структуру биопленки, повышенной резистентности к антибиотикам и физиологическому микроокружению внутри биопленки [136, 139, 238, 246, 253, 301, 304, 334].

Таким образом, высокая распространенность воспалительных заболеваний пародонта, недостаточная эффективность и длительные сроки терапии, склонность к хроническому рецидивирующему течению с вовлечением в патогенетический круг многочисленных иммунных механизмов обуславливают актуальность проблемы оптимизации диагностики заболеваний пародонта,

обоснования показаний и тактики проведения антибактериальной терапии, разработки принципов выбора и назначения эффективных противомикробных и иммуномодулирующих препаратов.

Это определило направление нашей работы — разработку алгоритма исследования молекулярных и клеточных механизмов формирования биопленки *in vitro* и *in vivo*, оценку ее роли в патологии пародонта, а также применение полученных знаний в диагностике и обосновании лечения стоматологических заболеваний.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики и обоснование тактики лечения воспалительных заболеваний пародонта с учетом динамики формирования микробной биопленки и анализа ее микробного состава по данным микробиологических, иммунологических и молекулярных методов исследования в эксперименте при ее моделировании *in vitro* и в клинических условиях.

Задачи исследования:

1. Создать модель для изучения микробной биопленки *in vitro* в условиях анаэробноз и движения жидкости и дать характеристику этапов формирования микробной биопленки полости рта в эксперименте *in vitro* на различных объектах по данным световой иммерсионной, электронной сканирующей и зондовой атомно-силовой микроскопии.
2. Изучить морфологические особенности грамположительных и грамотрицательных биопленко-продуцирующих, в том числе пародонтопатогенных, штаммов бактерий при моделировании биопленки *in vitro* в виде моно- и смешанной биопленки.
3. Изучить основные параметры поверхности образцов фрезерованных сплавов и полимерных (полиакриловых и полиуретановых) стоматологических материалов, используемых для лечения больных пародонтитом, с помощью зондовой атомно-силовой микроскопии и методики

оценки первичной микробной адгезии бактерий пародонтопатогенной группы и грибов *Candida*.

4. Дать сравнительную оценку адгезии микробной флоры полости рта при использовании различных способов обработки стоматологических материалов для изготовления шинирующих конструкций и протезов (полиакрилаты, полиуретан, сплавы титана и циркония).

5. Провести оценку микробного состава биопленки у больных с разными нозологическими формами воспалительных заболеваний пародонта с помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии и выявить возможные дифференциально-диагностические критерии морфологической картины биопленки у пациентов с патологией пародонта (хронический гингивит, хронический пародонтит, кандида-ассоциированный пародонтит) и частоту выделения отдельных представителей пародонтопатогенной группы бактерий и дрожжевых грибов рода *Candida* в составе микробной биопленки при развитии заболеваний пародонта по данным молекулярных методов исследования.

6. Установить частоту выявления приоритетных патогенов из числа пародонтопатогенных бактерий 1 и 2 порядка, других вероятных возбудителей при различных нозологических формах воспалительных заболеваний пародонта — хроническом гингивите, хроническом пародонтите, кандида-ассоциированном пародонтите.

7. Использовать экспериментальную модель пародонтита на крысах для исследования колонизации кандидатными пробиотическими штаммами из числа известных антагонистов приоритетных патогенов.

8. Провести сравнительный анализ частоты выявления резистентности к антибиотикам по данным фенотипических и генотипических методов и выявления основных механизмов резистентности, формирующихся в условиях смешанных биопленок в клинических условиях (хромосомные, плазмидные).

9. Уточнить показания для применения антибиотиков и антибактериальных химиопрепаратов в комплексном лечении анаэробных и смешанных инфекционных воспалительных процессов в пародонте с учетом результатов проведенного исследования.

10. Оценить роль молекулярных факторов врожденного иммунитета — цитокинов и альфа-дефензинов, Toll-like рецепторов как маркеров диагностики воспалительных заболеваний пародонта.

11. Обосновать тактику лечения пародонтита с учетом полученных результатов исследования микробного и иммунного факторов патогенеза воспалительных заболеваний пародонта.

Научная новизна:

В настоящей работе впервые систематизированы данные о формировании биопленки и описаны фазы этого процесса с помощью современных методов микроскопии (в том числе сканирующей электронной, трансмиссионной, лазерной зондовой атомно-силовой) и оригинальной методики оценки первичной адгезии микроорганизмов. Выявлены морфологические различия формирования биопленки грамположительными и грамотрицательными бактериями, в том числе биопленки смешанного типа.

Создана авторская модель для изучения микробной биопленки *in vitro* и технология оценки ее чувствительности к антибактериальным препаратам. Изучена морфология смешанной биопленки с участием пародонтопатогенных видов.

Предложена экспериментальная модель пародонтита на крысах для изучения антагонистического действия пробиотических штаммов микрофлоры полости рта. Проведен анализ колонизации пародонта в условиях эксперимента *in vivo* у крыс смесью кандидатных пробиотических штаммов *Veillonella parvula* и *Streptococcus salivarius* K 12.

Получены доказательства роли отдельных представителей анаэробной флоры в составе биопленки (*A. actinomicetemcomitans*, *B. forsithus*, *P. intermedia*,

P. gingivalis, *T. denticola*) в возникновении и развитии обострений заболеваний пародонта, на основе анализа частоты выделения у больных, особенностей паразитизма, симбиоза и устойчивости к антибиотикам.

Изучена частота антибиотикорезистентных штаммов пародонтопатогенных бактерий и выявлены механизмы резистентности (плазмидные или хромосомные) с помощью молекулярно-генетического метода исследования (ПЦР).

Обосновано и рекомендовано применение антибактериальных препаратов, активных в отношении внутриклеточных форм возбудителей. Сформулированы показания по применению антибактериальных препаратов разных классов в комплексном лечении больных воспалительными заболеваниями пародонта, а также предложены кандидатные пробиотические штаммы для стабилизации микробиоценоза полости рта.

Особый интерес представляло проведение лабораторных исследований и сопоставление результатов обнаружения молекулярных факторов врожденного иммунитета — цитокинов, антимикробных пептидов — дефензинов и Toll-like-рецепторов иммунных клеток в десневой жидкости, омывающей биопленку, или в парадонтальном кармане при развитии патологии пародонта. Подобные исследования в сравнительном аспекте при разной патологии пародонта ранее не проводились.

На основании оценки факторов врожденного иммунитета уточнены показания для назначения иммуномодулирующей терапии (препаратов, содержащих провоспалительные цитокины) при лечении заболеваний пародонта.

Практическая значимость

Предложен алгоритм для этиологической диагностики воспалительных заболеваний пародонта, основанный на применении молекулярно-биологических методов исследования, включая оценку генома резистентности к антибактериальным препаратам.

Усовершенствована методика оценки адгезии микробов и создана экспериментальная модель для изучения биопленки *in vitro*. Полученная модель использована для разработки новой методики оценки чувствительности микробов непосредственно в биопленке к антибактериальным препаратам.

Получены и систематизированы данные о чувствительности пародонтопатогенных бактерий к противобактериальным антибиотикам и химиопрепаратам, а также изучена частота встречаемости антибиотикорезистентных штаммов пародонтопатогенных бактерий, выделенных при воспалительных заболеваниях пародонта.

Установлены механизмы резистентности — плазмидные или хромосомные — к антибактериальным препаратам с помощью молекулярно-генетического метода исследования (ПЦР), и на основании полученных данных усовершенствованы показания для проведения антибактериальной терапии. Предложено использовать генетические маркеры *Mec*, *VanA*, *VanB*, *Clx-m*, *Erm*, *Tet*, *QnrB* для выявления антибиотикорезистентных штаммов у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

Изучены кандидатные пробиотические штаммы *S. Salivarius* и *V. parvula* и предложено использовать ассоциацию для замещения патогенов в экспериментальной модели пародонтита на крысиной модели.

Рекомендовано применение антибактериальных препаратов внутриклеточного действия на патогены в составе биопленок в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта у пациентов. Обосновано применение цитокинотерапии с учетом профиля цитокинов пациентов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Возникновение и прогрессирование воспалительных заболеваний пародонта ассоциировано с формированием микробных биопленок на слизистой оболочке полости рта и пародонта смешанного характера, причем микробные биопленки при основных видах воспалительных заболеваний пародонта — гингивите, пародонтите и кандидозе — существенно отличаются по видовому

составу ассоциаций возбудителей.

2. Микробные биопленки анаэробных пародонтопатогенных видов могут быть смоделированы в эксперименте *in vitro* и использованы для изучения особенностей роста грамположительных и грамотрицательных бактерий и оценки их чувствительности к антибактериальным препаратам.

3. Использование кандидатных пробиотических штаммов резидентной микрофлоры может быть использовано для замещения патогенов в биопленке пародонта на экспериментальной крысиной модели лигатурного пародонтита.

4. Выбор антибактериальных препаратов при воспалительных заболеваниях пародонта следует проводить с учетом данных о внутриклеточном паразитизме пародонтопатогенных видов бактерий и их резистентности к препаратам в биопленке пародонта у больных воспалительными заболеваниями пародонта. Бактерии, выделенные из пародонтального кармана у больных заболеваниями пародонта, могут содержать хромосомные и плазмидные факторы резистентности к антибактериальным препаратам — *Mec*, *VanA*, *VanB*, *Clx-m*, *Erm*, *Tet*, *QnrB*.

5. При воспалительных заболеваниях пародонта отмечаются существенные количественные изменения факторов врожденного иммунитета — интерлейкинов, дефензинов, нейтрофилов десневой жидкости, экспрессии Toll-like-рецепторов, которые взаимосвязаны со степенью тяжести пародонтита.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Мониторинг формирования микробной биопленки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта соответствует формуле научных специальностей: 03.02.03 – «Микробиология» со следующими областями исследований указанной специальности по пунктам: 2 – выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; 3 – морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов; 6 – сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов; 8 – использование сапрофитных бактерий антагонистов, продуцентов биологически активных веществ для

оптимизации микробиоценозов; и 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» со следующими областями исследований этой специальности: изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии); разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов.

Личный вклад автора

Автором лично проводились анкетирование пациентов, которые соответствовали критериям включения в исследование, взятие материалов для микробиологического и иммунологического исследований, а также все виды лабораторных исследований, использованных в диссертационной работе. Также автор формировал базу данных, проводил систематизацию, математическую и статистическую обработку клинико-лабораторных данных, полученных в результате исследования, готовил научные публикации по теме исследования, документы по внедрению в практику, необходимый патентно-информационный поиск и оформление заявок на изобретения.

Внедрение результатов исследования

Внедрение полученных нами результатов осуществлено в учебно-образовательный процесс в виде разделов учебника «Микробиология, вирусология и иммунология полости рта» / под ред. профессора В.Н. Царёва (М.: Практическая медицина, 2013. – Гл. 15–17, 22–27), разделов руководства для врачей по медицинской микробиологии «Оппортунистические инфекции» / под ред. А.С. Лабинской и соавт. (М.: Бином – 2013. – кН. 3. – Т.1. – С.126 –138; М.: Бином – 2014. – кН. 3. – Т.2. – С.224 –233), 3-х учебных пособий для студентов с грифом УМО Минздрава РФ («Учебное пособие по иммунологии», М., 2012. – 81с.; «Биоплёнки и микрофлора при патологии рта», М., 2014. – 71с.; «Частная микробиология», М., 2015. – 83с.) и демонстрационных материалов для занятий студентов в ГБОУ ВПО МГМСУ им. А. И. Евдокимова (кафедра микробиологии,

вирусологии, иммунологии; кафедра пропедевтической стоматологии, кафедра пародонтологии и гериатрической стоматологии), ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (кафедра микробиологии с вирусологией и иммунологией), слушателей системы последиplomного образования ГБОУ ДПО РМАПО (кафедра стоматологии), в научно-исследовательский и лечебно-диагностический процесс в виде 4-х патентов РФ, 3-х принятых заявок на изобретения РФ, диагностических алгоритмов, используемых Клинико-диагностическом центре ГБОУ ВПО МГМСУ им. А. И. Евдокимова и ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава РФ.

Апробация работы

Основные положения работы доложены и апробированы на следующих научных форумах:

- IX научно-практическая конференция «Инфекционные болезни и антимикробные средства», 6–7 октября 2011 г., Москва;
- XXXIV Итоговая научная конференция молодых ученых МГМСУ, апрель 2012 г., Москва;
- «Образование, наука и практика в стоматологии». IX Всероссийская научно-практическая конференция по объединенной тематике «Пути повышения качества стоматологической помощи», 20–22 февраля, 2012 г., Москва;
- «Образование, наука и практика в стоматологии» X Всероссийская научно-практическая конференция по объединенной тематике «Стоматология и социально значимые заболевания», 11–13 февраля, 2013 г., Москва;
- Всероссийская научно-практическая конференция по трансляционной медицине «Микробиология — практическому здравоохранению», посвященная 70-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А. И. Евдокимова, 21 мая 2013 г., Москва;
- Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 75-летию медико-профилактического факультета

Омской государственной медицинской академии, 7–8 ноября 2013 г., Омск;

- Infectious Diseases. Russia-Japan Forum. The 4th ISTC TI “Probiotics and Health” Workshop 26–31 October 2013. Tokyo — Kyoto;
- I Междисциплинарный конгресс по заболеваниям органов головы и шеи «Медицина XXI века: междисциплинарный подход в патологии органов головы и шеи», 27–29 мая 2013 г., Москва;
- Международный форум университетской науки — 2014 совместно с II международным конгрессом по биоревматологии (BRIC — GARN 2014 EURASIA) 5–7 июня 2014 г., Москва;
- Всероссийская научно-практическая конференция специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с международным участием , 19–21 ноября 2014 г., Москва;
- Форум университетской науки — 2015 «Научное медицинское прогнозирование: молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния», 9–11 февраля 2015 г., Москва;
- «1st Sino-Russian Young Scholars International Academic Conference on Critical Disease (Cardiovascular Disease) Prevention and Treatment, the 7th Sino-Russian International Academic Conference on Medicine, the 5th Symposium of the Cold Zone Cardiology Disease» October 12–14, 2015 Harbin, China;
- XIII Всероссийский стоматологический форум «Стоматологическое образование. Наука. Практика», 7–10 февраля 2016 г., Москва;
- совместное заседание кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, кафедры пропедевтической стоматологии, кафедры хирургии полости рта, лаборатории молекулярно-биологических исследований, лаборатории иммунологии, лаборатории патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний Научно-исследовательского медико-стоматологического института ГБОУ ВПО «МГМСУ им. А. И. Евдокимова» Минздрава России, кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России с участием сотрудников кафедры

микробиологии с вирусологией и иммунологией ГБОУ ВПО «Тверской ГМУ» Минздрава России, ФБУН «МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, лаборатории анатомии микробов ФБУН «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» РАН «18» ноября 2015 г., Москва.

Публикации

По теме исследования с участием автора опубликованы 45 печатных работ, в том числе: 37 — в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, включая 4 патента РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация структурно включает: «Введение», главы «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», три главы собственных результатов экспериментальных и клинико-лабораторных исследований, главу «Обсуждение результатов», заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Обзор литературы включает 484 источника, в том числе 111 отечественных и 373 иностранных авторов.

Диссертация изложена на 337 страницах компьютерного текста Times New Roman (14 пт). Иллюстрации представлены 37 таблицами, 70 рисунками и фотографиями.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с научно-отраслевыми программами: 30.03 «Вопросы этиологии, патогенеза, профилактики и лечения болезней пародонта и слизистой оболочки полости рта» и 11.00 «Микробиология».

Регистрационный номер темы НИР — 01200700512.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Микробные биопленки и современные подходы к диагностике и лечению воспалительных заболеваний пародонта

1.1. Современные представления об инфекционной этиологии воспалительных заболеваний пародонта и роли биопленок

С воспалительными заболеваниями десен и пародонта сталкиваются миллионы людей во всём мире, и эти заболевания, инициируемые ростом и размножением бактерий с образованием биопленки в зубодесневой борозде, являются многофакторными. Установлено, что биопленки пародонта отличаются разнообразием — их природа и коммуникации безусловно отличаются у здоровых людей и больных пародонтитом [387].

Бактериальный состав биопленок, с присутствием которых связано развитие пародонтита, за последние десятилетия XX века был хорошо исследован и документирован, однако анализ накопленной информации постоянно продолжается и пересматривается исследователями.

На Всемирном рабочем совещании клинических пародонтологов (1996 г.), а затем на I Всероссийском съезде пародонтологов (2005 г.) в отношении трактовки механизмов патогенеза воспалительных заболеваний пародонта принято решение расценивать их как следствие проявлений защитных реакций организма хозяина на внедрение специфических бактерий, способных колонизировать биопленку в области зубодесневого прикрепления [81]. В качестве возбудителей пародонтита были выделены представители трех видов бактерий: актинобацилла (по новой классификации — *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), таннерелла (*Tannerella forsythia*) и порфиромонас (*Porphyromonas gingivalis*) [54, 59, 431].

Наиболее распространенными нозологическими формами, относящимися к данной патологии, следует считать гингивит и пародонтит [405].

Гингивит — поверхностное воспаление десны, обусловленное избыточным формированием наддесневой биопленки. Как правило, она представляет собой рыхлый («белый») налет, состоящий из остатков пищи с большим количеством планктонных форм бактерий, поэтому он легко удаляется при чистке зубов.

Пародонтит — воспаление всех тканей пародонта, приводящее к их деструкции и резорбции альвеолярной кости, которое является результатом смешанной полимикробной инфекции определенными возбудителями, колонизирующими десневую и особенно поддесневую биопленку, и иммунологическими феноменами, развивающимися у восприимчивых индивидуумов [62, 63, 405].

Пародонтит следует рассматривать как постепенно прогрессирующее рецидивирующее хроническое заболевание, которое характеризуется сменой фаз обострения и ремиссии [81].

В настоящее время доказано, что возбудителями пародонтита являются *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* и *P. gingivalis* — бактерии, способные к передаче от человека к человеку, внутриклеточному паразитизму и высокой активности в продукции токсических субстанций. Именно эти признаки В. Н. Царёв предложил считать критериями пародонтопатогенных видов бактерий на I Всероссийском съезде пародонтологов (Москва, 2005 г.). В отечественной рабочей классификации их рекомендовано называть пародонтопатогенами 1 порядка (или типа), что соответствует термину «красный комплекс» по Sohransky [90].

В то же время известно, что с болезнями пародонта ассоциировано более 20 видов бактерий («оранжевый» и «желтый» комплексы по Sohransky, в отличие от «зеленого», представленного резидентными видами). Вопрос об этиологической или патогенетической роли этих анаэробных бактерий — *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, — а также некоторых представителей извитых форм — *Wolinella recta*, *Seimonas sputigena*, *Treponema denticola* остается открытым. Следует также учитывать, что при развитии воспалительных заболеваний пародонта, как правило, резко

увеличивается количественная обсемененность десневой борозды и пародонтальных карманов представителями стабилизирующих резидентных видов [52, 63, 69, 90].

В последние годы получены данные о возможной роли недавно открытых видов — *Filifactor alocis* и *Desulfobulbus spp.* Некоторыми исследователями вновь ставится вопрос об участии в развитии воспаления пародонта также и грамположительных бактерий — *Streptococcus intermedius*, *Parvimonas micra*, анаэробных представителей рода *Actinomyces* и даже *Staphylococcus aureus* [134, 218, 234, 393].

В очагах поражения пародонта и в поддесневых бляшках у пациентов с агрессивным пародонтитом помимо бактерий обычно обнаруживают вирусы [276, 490]. Более того, при анализе поддесневых бляшек связь с дрожжевыми грибами *Candida albicans*, образующими биопленку, была отмечена приблизительно у 50% пациентов с тяжелой хронической формой пародонтита и только у 15% здоровых людей [160].

Подробная характеристика основных пародонтопатогенных видов и факторов их вирулентности по данным зарубежной литературы за последние 20 лет представлена нами в обзорной статье [60, 61], в которой сделано заключение о том, что микроорганизмы в полной мере отвечают критериям Роберта Коха, которые по предложению S. S. Socransky (1998) [431] следует интерпретировать для инфекций полости рта следующим образом:

1. Высокая частота обнаружения предполагаемого возбудителя в очаге активно развивающегося воспалительного процесса при значительной количественной обсемененности по сравнению со здоровыми участками (пародонта).
2. Устранение предполагаемого возбудителя из очага воспаления должно прекращать развитие болезни.
3. Возбудитель должен обладать факторами вирулентности, которые способствуют развитию воспаления и деструкции тканей.
4. На пародонтопатоген в организме должен развиваться клеточный или

гуморальный иммунный ответ.

5. Патогенный потенциал предполагаемого возбудителя должен быть воспроизведен в модельных экспериментах на животных.

По мнению Р. J. Ezzo и соавт. [208], ряд видов пародонтопатогенов следует считать лишь индикаторами, но не факторами риска, так как отношение шансов (характеристика вероятности развития пародонтита) при наличии в очагах воспаления только одного из них увеличивается незначительно.

1.2. Пародонтопатогенные бактерии и факторы микроокружения

Как показывают многочисленные литературные данные, пародонтит является многофакторным процессом, который определяется обширным количеством факторов, в том числе: индивидуальными особенностями субъекта, социальными, поведенческими, системными, генетическими факторами, изменениями на уровне зубных рядов, микробного состава зубного налета, функционирования иммунной системы и другими [57, 96, 81, 281, 216, 402].

Наряду с этим считается, что пародонтальное воспаление запускают специфические микробы зубной биопленки, а в процессе развития заболевания из-за действия микробных токсинов и запускаемых ими иммунных реакций происходит разрушение опорных структур зубов, то есть тканей десны, пародонта и альвеолярной кости [13, 37, 81].

Формирование и развитие биопленки полости рта благодаря современной технике сканирующей электронной, иммунофлюоресцентной и атомно-силовой микроскопии достаточно хорошо изучено и уже вошло в учебники и руководства [54, 242, 387]. В начальной фазе доминируют грампозитивные и аэробные бактерии. Затем в биопленке появляется всё больше грамотрицательных анаэробных пародонтопатогенов. Клинически процесс развития пародонтита ведет к повышенному поддесневому воспалению и образованию пародонтальных карманов. Микроокружение поддесневой области идеально для пародонтопатогенов, поскольку имеет щелочную среду, богато необходимыми

для анаэробов питательными веществами — геминами и протеинами, различными цитокинами и гормонами.

Бактериальные клетки в биопленке окружены внеклеточным полимерным матриксом (ВМП), который состоит из полисахаридов, протеинов и внеклеточной ДНК и может занимать до 90% всей массы биопленки [183, 187, 215, 314, 337]. ВМП защищает патогены от таких клеток организма хозяина, как макрофаги, гуморальных иммунных факторов, антител и антибиотиков.

Помимо прочего, высокая плотность бактериальных клеток в биопленке позволяет маленьким молекулам осуществлять посредничество в коммуникациях как внутри популяции одного вида бактерий, так и между различными видами бактерий, т. е. осуществлять в биопленке кворум-сенсинг, который сам через патогены может регулировать экспрессию генов вирулентности. Более того, и ответ организма хозяина, и факторы среды при пародонтите могут влиять на образование биопленки и экспрессию гена вирулентности у пародонтопатогенов.

Среда в полости рта — это идеальное (богатое питательными веществами и теплое) место как для роста бактерий, так и для формирования их сообществ. По выражению известного исследователя этой проблемы И. И. Олейника (1991), «это и питательная среда, и термостат одновременно» [65]. Эта первая часть пищеварительного тракта предоставляет бактериям идеальные лишённые прикрытия поверхности зубов, к которым они могут прикрепиться и где они могут размножаться [54, 242, 387].

Ротовая полость изобилует энзимами, расщепляющими белки; для нее характерны изменения значений pH, силы сдвига и высокие скорости движения жидкостей. Несмотря на эти относительно жесткие условия, бактерии, обитающие в ротовой полости, разработали механизмы выживания, обратив себе в пользу среду обитания. Следствием их выживания и продуктом их жизнедеятельности является зубной налет — биопленка, состоящая из компонентов выделений хозяина, полисахаридов и бактерий [319]. В качестве примеров бактерий ротовой полости, способных формировать биопленки на

зубах и десне, можно привести следующие виды микроорганизмов: *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* и *Bacteroides forsythus* [175]. *S. mutans* синтезирует полимеры глюкозы (глюканы) из очищенной сахарозы с помощью внеклеточной глюкозилтрансферазы [252]. Эти полисахариды формируют ворсистое покрытие и позволяют бактериям исключительно эффективно прикрепляться к поверхности зубов. Далее штамм *S. mutans* способен выдерживать кислую среду и в то же время выделять дополнительные кислые продукты жизнедеятельности, таким образом усиливая болезнетворность и потенциальное развитие кариеса зубов. Дефицит селектина индуцирует повышенную уязвимость к бактериальной колонизации и прогрессивному развитию заболевания [357].

Поэтому в настоящем обзоре мы считаем необходимым обсудить эту сеть коммуникационных молекулярных взаимодействий (рис. 1).



Рис. 1. Схема взаимодействия между пародонтопатогенами и организмом хозяина в поддесневой среде

Биопленка на поверхности зубов активирует как врожденный, так и адаптивный иммунные ответы организма хозяина, что, в свою очередь, оказывает обратное действие на биопленку. Поскольку в промежутках между зубами и под пришеечной частью десны скапливаются бактерии, нейтрофилы

организма хозяина прибывают в эту область, и это позволяет контролировать численность и удалять вредоносные микроорганизмы. Несмотря на их активный приток [452], нейтрофилы — непродуктивное средство удаления образующейся бактериальной биопленки [416].

Если штамм *S. mutans* растет в присутствии сахарозы, он лучше способен противостоять нейтрофилам [437]. Хотя заранее инкубированные в сахарозе бактерии вызывают увеличение нейтрофильных богатых кислородом продуктов только в 1,5 раза по сравнению с необработанными бактериями [437]. Преинкубация в сахарозе бактерий *Streptococcus* связано с повышенным лизосомальным выделением и нейтрофильным фагоцитозом [128].

Полиморфноядерные лейкоциты, прибывающие в очаг поражения под воздействием хемотаксических факторов, например, градиента IL-8 и ICAM-1 в эпителии соединительной связки периодонта, инициируют первую линию защиты организма хозяина [454].

К этим характеристикам следует отнести:

- температуру;
- pH среды;
- железо и гемины;
- гормоны;
- факторы окислительного стресса;
- факторы воспаления и цитокины.

Изменения микроэкологии полости рта оказывают воздействие на различные функции и вирулентность различных видов микробов. Бактерии могут реагировать на *температурные изменения* на уровне протеинов, например, регуляторов транскрипции, киназ (в том числе гистидин-киназы в сочетании с регулятором ответа цитоплазмы) и шаперонов, а также через их мембранные липиды [419]. В пародонтальном кармане происходит локальное повышение поддесневой температуры приблизительно на 2 °C по сравнению со здоровыми зонами полости рта [209].

Вследствие повышения температуры в поддесневой области воспалительная реакция вызывает выделение из клеток организма хозяина таких активных форм кислорода (АФК), как перекись водорода (H_2O_2) и супероксид (O_2^-), а также цитокинов, которые должны уничтожить бактерии. Тем не менее биопленка является сообществом, и поэтому в процессе воспаления могут изменяться характеристики не только бактерий и их вирулентности, но и межклеточного матрикса [454].

Повышение температуры влияет также на прикрепление бактерий, их коаггрегацию и выработку протеаз [119, 352, 376, 407]. В ответ на повышение температуры наблюдаются уменьшение экспрессии протеаз и снижение регуляции генов *P. gingivalis*, кодирующих фимбриальные протеины [119, 352]. Более того, по-видимому, температура влияет также на структуру липида А *P. gingivalis*. В условиях повышенной температуры увеличивается содержание монофосфорилированного пента-ацилированного липида А [181]. Этот липид А, в свою очередь, по-видимому, является более мощным активатором Toll-подобного рецептора 4 организма хозяина (TLR4), и он делает бактерии более устойчивыми к дефензинам организма хозяина [181].

Повышение температуры — это защитный механизм организма хозяина, который запускается в ответ на экспрессию генов вирулентности и генов белка теплового шока у бактерий [419]. Вместе с тем в рассматриваемом аспекте чистый эффект повышения температуры, видимо, заключается в том, что он благоприятствует пародонтопатогенам в поддесневых биопленках, потому что в очагах поражения с повышенными температурами обнаруживаются в больших количествах *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* [243].

Среда (рН) в пародонтальных карманах и особенно в десневой жидкости характеризуется щелочными значениями, которые могут достигать более 8,5 [144, 145, 202]. Некоторые пародонтопатогены, такие как *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *F. Nucleatum*, способны повышать рН среды путем ферментирования аминокислот (этот результат был получен *in vitro* [444]) — из-за этого может также локально подщелачиваться микросреда в поддесневых биопленках.

Показано, что если щелочная рН равна 8,2, то у *F. nucleatum* повышается гидрофобность поверхности клеток, клетки коаггрегируют и инициируется образование биопленки. При этом уменьшается внутриклеточное содержание полиглюкозы и увеличиваются отдельные клетки [482]. Если та же *F. nucleatum* растет в условиях немного более низкого рН, чем 8,2, например, при рН 7,8, в ее клетках увеличивается экспрессия формиминотетрагидрофолатциклодезаминазы, которая может повышать окружающий уровень рН [484]. Кроме этого, имеются наблюдения, что выработка окислительно-восстановительного акцептора флаводоксина, не содержащего железа, экспрессия которого обычно повышена при росте биопленок в условиях ограничения железа [292], в щелочной рН тоже повышается [484]. Клетки *F. nucleatum*, по-видимому, изменяют свой метаболизм в ответ на высокие значения рН, потому что некоторые ферменты метаболического пути, способные расщеплять глюкозу и участвовать в катаболизме глутаминовой кислоты и гистидина, снижают свою активность в планктонных бактериальных клетках, растущих в условиях щелочного рН, равного 7,8 [484].

Тем не менее, когда рН достигает 8,2, что индуцирует образование биопленки, содержание гликолитических ферментов не возрастает, в то время как увеличиваются запасы глюкозы и выработка лактата [170]. В противоположность повышенному запасанию глюкозы протеиновый синтез в биопленке *F. nucleatum* снижается при высоких значениях рН [170]. При рН 8,2 повышается выработка глутаминатдегидрогеназы. Это может указывать на то, что бактерии приспосабливаются к повышенной концентрации глутамата в десневой жидкости в области десневой борозды в связи с воспалением тканей пародонта [170].

Клеточный ответ на стресс у бактерий может также активироваться при щелочной рН, потому что *F. nucleatum* повышает экспрессию пептидил-пропил-сис-транс-изомеразы (PPI) и белка теплового шока GroEL [170, 484]. Среди этих белков белок GroEL может играть особую роль в ассоциациях между клетками организма хозяина и бактериями. Он может служить звеном между

пародонтитом и системными заболеваниями, такими как атеросклероз, так как (как было показано на мышах) вырабатываемый бактерией *F. nucleatum* белок GroEL индуцирует различные факторы риска атеросклероза у мышей [312].

Регулируемые уровнем pH внутриклеточные протеины могут изменять болезнетворность бактерий; в клеточной мембране бактериальной клетки действует как минимум одна группа протеинов, регулируемых уровнем pH.

Протеины, участвующие в адгезии с другими пародонтопатогенами, а также клетками организма хозяина, могут оказывать серьезное влияние на степень болезнетворности бактерий. Когда рост *F. nucleatum* происходил в условиях щелочной pH, равной 8,2, были обнаружены повышенные уровни изоформ адгезии FomA [170]. Изоформы FomA могут являться приманкой для других пародонтопатогенов, например, *P. gingivalis* [418]. Кроме этого, в исследованиях на мышах было показано, что их можно использовать в качестве возможной мишени для вакцин [321].

Некоторые из дезактивированных протеинов клеточной мембраны *F. nucleatum* вовлечены в синтез АТФ и поддержание нейтрального цито- и периплазматического уровня pH, что указывает, соответственно, на пониженную метаболическую активность и перестройку под щелочные условия обитания [483]. Часть из них, вероятно, играет двойную роль, как в случае бутират-ацетоацетат-СоА-трансферазы. Последняя вовлечена как в энергетический метаболизм, так и (поскольку она является фактором вирулентности) в выработку масляной кислоты [483].

Группа протеинов клеточной мембраны, которых становится больше при щелочной pH, содержит, по крайней мере, два предполагаемых поверхностных антигена: это протеин внешней мембраны (OMP), принадлежащий к семейству Omp класса поринов, и специфичный к патогену мембранный антиген, который, как предсказывалось, имеет высокую степень химического родства с Fe^{2+} [483]. Так же, как в случае поринов из семейства Omp IP, уровни экспрессии различных транспортных протеинов изменялись, когда рост клеток *F. nucleatum* с образованием биопленки происходил при pH 8,2, что может быть указанием на

измененную потребность в заборе различных растворов из микросреды, имеющейся в биопленке [170].

Большинство исследований, в которых изучалось влияние щелочной среды на пародонтопатогены, были выполнены с *F. nucleatum*. Тем не менее до 50% генов, регулируемых уровнем щелочной pH и кодирующих мембранные протеины клеток *F. nucleatum*, могли быть приобретены через горизонтальный перенос генов. Кроме того, аналогичные протеины также обнаружены у других пародонтопатогенов, таких как *P. gingivalis* и *Treponema denticola* [483].

Важную роль в формировании микробиоценоза и биопленки пародонта играют **железо и гемин**.

Поскольку свободное железо катализирует образование токсичных свободных радикалов из H_2O_2 , а они важны для функционирования как организма хозяина, так и патогенных бактерий, у человека развились сложные пути ограничения доступности свободных радикалов [412]. Таким образом, в среде, окружающей потенциальных колонизаторов, когда они попадают в человеческий организм, концентрация свободного железа близка к оптимальной. Большая часть железа организма хозяина связана железосвязывающими протеинами, такими как трансферрин, ферритин, лактоферрин и гемоглобин, которые содержат в себе гемин или гем. Тем не менее в условиях прогрессирующего пародонтита ситуация может изменяться. Выдвинута гипотеза о том, что концентрация гемина может повышаться из-за увеличения концентрации гемоглобина, вытекающего из сосудистых язвочек десневого кармана. Показано, что *P. gingivalis*, *T. denticola* и *A. actinomycetemcomitans* экспрессируют гемин-связывающие протеины на своих поверхностях, которые способствуют их коагрегации [260, 424, 394, 473]. Это может облегчить захват железа в условиях ограниченной концентрации свободного железа. Более того, гемин может также непосредственно регулировать болезнетворность *P. gingivalis* [115].

Хелирование железа (образование полимерного комплекса, например, с замыканием цепи в кольцо) у *A. actinomycetemcomitans* повышает экспрессию генов, связанных с внеклеточным полимерным матриксом (ген *pgaC*), фимбриальными протеинами (ген *tadV*) и ЛПС (ген *rmlB*), что также ведет к усиленному образованию биопленок [121]. Наиболее вероятно, что влияние ограниченных концентраций железа у бактерии *A. actinomycetemcomitans* опосредуется небольшими регуляторными РНК (sРНК), хотя гены, на которые нацелены эти sРНК, еще не идентифицированы [120].

Наиболее изученным (с точки зрения потребности в железе и его влиянии на жизнедеятельность) пародонтопатогеном, вероятно, является *P. gingivalis*. Ограничение концентрации железа является важным фактором роста и причиной окислительного стресса [314] и повышения экспрессии генов, участвующих в захвате железа. Оно также ингибирует гены *P. gingivalis*, связанные с запасанием железа, а также ответ на окислительный стресс [314]. Более того, ограничение концентрации железа и гемина может также провоцировать повышенное образование биопленок и вторжение одиночных бактерий в клетки организма хозяина [314], повышение секреции везикул и выработки протеаз *P. gingivalis* [428]. Потенциальным фактором болезнетворности *P. gingivalis*, регулируемым гемом, является ЛПС, а более точно — его липидом А [115]. Форма липида А *P. gingivalis*, являющаяся антагонистом Toll-подобного рецептора (TLR)-4, продуцируется в условиях высоких концентраций гемина, в то время как при низких концентрациях гемина широко распространенная форма липида А является агонистом TLR4; это указывает на то, что бактерия *P. gingivalis* может изменять ответ организма хозяина при вариабельности концентраций гемина в своей микросреде [115, 458]. Аналогичные данные по экспрессии генов ответственных за формирование биопленки выявлены у *P. intermedia* [261, 474].

Хотя известно, что различные виды бактерий реагируют на связанные со стрессами **гормоны адреналин и норадреналин**, молекулярные механизмы распознавания получили детальное объяснение [274], тем не менее реакции пародонтопатогенов изучены слабо. В исследовании — о влиянии

катехоламинов, адреналина и норадреналина на пародонтопатогены — сообщалось как о негативных, так и о позитивных эффектах на рост планктонных бактерий [395]. Тем не менее оба катехоламина подавляют рост пародонтопатогенов «красного комплекса» [431] *P. gingivalis* и *T. forsythia*, серотипы а и b *A. Actinomycetemcomitans*, а также *F. nucleatum* [395]. Таким образом, авторы подчеркивают важную роль негативных влияний на рост бактерий и выдвигают гипотезу, согласно которой эти виды могут использовать катехоламины для усиления экспрессии гена вирулентности [395]. Т. Saito и др. [403] продемонстрировали, что подавление роста бактерии *P. gingivalis* норадреналином сопровождается усиленной выработкой связанной с вирулентностью протеазы арг-гингипаином В и ингибированием генов, кодирующих протеины, связанных с биосинтезом полисахаридов.

Наиболее значительный рост уровней **женских половых гормонов** — эстрогена и прогестерона — возникает во время беременности [333]. Хотя гингивит беременных в настоящее время относят к классу «индуцированных зубным налетом десневых заболеваний, модифицированных эндокринной системой» [126], всё еще бурно обсуждается роль влияния гормональных уровней на прогрессирование гингивита во время беременности [213, 240, 285]. По-видимому, даже несмотря на то, что во время беременности воспаление десен может происходить интенсивнее, сами гормоны могут вызывать противоположные реакции в тканях пародонта, включая снижение воспалительных процессов [308, 325, 397, 425] и изменения в составе поддесневой биопленки [162, 282, 391]. Более того, некоторые грамотрицательные пародонтальные патогены, такие как *Prevotella melaninogenica*, *P. intermedia* и *P. Gingivalis*, способны захватывать эстрадиол и прогестерон, которые бактерии рода *Prevotella* могут использовать как фактор роста вместо витамина К [302]. Тем не менее оказывают ли эти гормоны влияние на образование биопленки и на вирулентность пародонтопатогенов, до сих пор не известно.

Патогенез, индуцируемый биопленкой, и последующее прогрессирующее заболевание пародонта не ограничиваются ротовой полостью, но могут

прогрессировать и давать системные осложнения [377]. Прогрессирующая бактериальная инфекция может вызвать низкоуровневый сепсис. Кроме того, хроническое воспаление в тканях пародонта, может индуцировать выделение вызывающих воспаление цитокинов, IL-1 β и TNF- α и стать причиной их попадания в системный кровоток [275, 388].

При повышенных количествах этих цитокинов происходят изменения в липидном метаболизме, что приводит к повышению уровней циркулирующих липопротеинов низкой плотности (LDL) и триглицеридов (TG) [404]. Эти изменения в липидном метаболизме вызываются:

- а) выработкой различных цитокинов;
- б) изменениями в динамике кровотока;
- в) модификацией гипоталамной/гипофизарной/адреналовой (надпочечной) оси, что приводит к выбросу гормонов, участвующих в липидном метаболизме, в частности адренокортикотропного гормона, кортизона, адреналина, норэпинефрина и глюкагона [278].

Следовательно, когда повышается количество IL-1 β и TNF- α , потенциально из-за хронического пародонтита, результатом может стать измененный липидный метаболизм. Тем не менее на этом процесс не заканчивается. Может возникнуть диабет 1 типа из-за повышенных уровней гормона IL-1 β , заставляющего протеин киназу C инициировать механическое разрушение панкреатических островковых β -клеток по типу апоптоза. Помимо разрушения β -клеток из-за активации PKC, IL-1 β способен повысить уровень окиси азота и истощить запасы энергии в этих клетках [427].

Аналогично, TNF- α индуцирует резистентность к инсулину и диабет 2 типа путем изменения активности тирозинкиназы, опосредованной рецептором инсулина. Другими механизмами являются сокращение инсулин-зависимого синтеза переносчика глюкозы и влияние на развитие зависимой от макрофагов цитотоксичности панкреатических островков [347].

Это объясняет литературные данные о синергизме нарушения микробиоценоза полости рта и иммунных процессов при диабете, сочетанном с пародонтитом [12, 67].

Ответ организма хозяина играет роль на местном уровне: произойдет ли обострение заболевания в ротовой полости, будет ли оно прогрессировать и перейдет ли в хроническую форму [49, 50, 57, 65]. Также важно, что потенциальные остаточные явления этого процесса переносятся тяжелее. Для пациентов, уже заболевших диабетом или предрасположенных к нему, любой местный воспалительный процесс может тяжело отразиться на качестве жизни [476].

Развитие воспаления в тканях пародонта сопряжено с **окислительным стрессом и образованием активных форм кислорода.**

Выделение активных форм кислорода (АФК) организмом хозяина (как часть его защитного механизма) опосредовано первоначальными колонизаторами — стрептококками, организованными в биопленки, что индуцирует окислительный стресс для других бактерий и особенно у представителей анаэробных видов в составе сообщества, что ведет к их гибели в случае недостаточности протективных механизмов. Анаэробные бактерии распознают АФК с помощью регуляторов транскрипции, таких как OxyR, PerR и OhrR. Для нейтрализации токсичного действия АФК бактериями вырабатываются пероксиддисмутазы, алкил-гидропероксид-редуктазы (AhpC) и каталазы [158, 277].

В бактериальном сообществе пародонтальной биопленки важную роль играет *F. nucleatum*, выступающая посредником между другими колонизаторами (появившимися на ранних этапах стрептококками и обосновавшимися позднее анаэробными пародонтопатогенами). *F. nucleatum*, как промежуточный колонизатор, по-видимому, способствует выживанию других анаэробных бактерий в биопленке [151]. Хотя *F. nucleatum* является облигатным анаэробом, она может адаптироваться к окислительному стрессу в биопленке и даже увеличить свою численность в аэробных условиях всего лишь за 2 дня [241, 426].

На ответ *F. nucleatum* при окислительном стрессе, по-видимому, влияет AhpC редокс система [435]. Более того, окислительный стресс также влияет на углеводный обмен веществ у *F. nucleatum*, модифицируя или повышая межклеточные концентрации расщепляющих глюкозу энзимов, и тем самым снижает выработку АТФ. Повышение содержания шаперонов (белков теплового шока) ClpB и DnaK, протеина теплового шока HtpG и белка-репрессора транскрипции HrcA у бактерий *F. nucleatum* в условиях окислительного стресса, по-видимому, направлено на уменьшение вредоносного воздействия АФК [435].

Кроме того, пародонтопатогены развили и другие формы адаптации к окислительному стрессу. Например, *P. gingivalis* при оксидативном стрессе вырабатывает супероксиддисмутазу, AhpC, рубреритрин (rbr), протеины теплового шока (HtpG) и шапероны GroEL и DnaK [364]. Аналогично, повышенные температуры, сопутствующие воспалению, увеличивают экспрессию супероксиддисмутазы *P. gingivalis* [117]. Помимо всего прочего, у *P. gingivalis* под действием окислительного стресса наблюдалось изменение экспрессии нескольких генов с неизвестными функциями [339].

Очевидно, что различные факторы окружающей среды, отличные от тех, которые жестко связаны с воспалительным ответом организма хозяина, могут меняться по мере прогрессирования пародонтита. Среди них можно назвать, например, pH, железо и гемин и наличие различных гормонов организма хозяина. Все эти факторы могут распознаваться, по крайней мере, некоторыми из пародонтопатогенов, хотя исследований на молекулярном уровне проведено немного, и сведения скудны.

Тем не менее полученные результаты предполагают, что у некоторых видов повышенный уровень pH и ограничение концентрации железа могут способствовать образованию биопленок и усиливать экспрессию гена вирулентности, что, в свою очередь, может изменить воспалительный ответ организма хозяина. При пародонтите перекрестные реакции между клетками организма хозяина и бактериальной биопленки отличаются неоднозначным характером и разнонаправленностью.

Ответ организма хозяина и изменения среды индуцируют стресс у бактерий, составляющих биопленку (таблица 1).

Таблица 1

**Факторы среды, влияющие на пародонтальную биопленку,
и факторы вирулентности бактерий**

Фактор	Влияние	Виды	Ссылки
Повышенная температура	Протеазы ↓ Фимбриальные протеины ↓ Липид А, активирующий TLR4 ↑	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	[352] [119] [181]
Окислительный стресс	Выработка АТФ ↓ Шапероны ClpB, DnaK ↑ Белок теплового шока HtpG ↑ Репрессор транскрипции HrcA ↑	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	[435] [435] [435] [435]
Окислительный стресс	Шапероны ClpB, DnaK ↑ Белок теплового шока HtpG ↑ Супероксид-дисмутаза ↑	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	[364] [364] [364]
IL-1β	Образование биопленки ↑ Метаболизм ↓	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	[372] [372]
Щелочная pH	Слипание между собой ↑ Образование биопленки ↑ Флаводоксин ↑ Запасы глюкозы ↑ Выработка лактата ↑ Энзимы синтеза протеинов ↓ Глутаминатдегидрогеназа ↑ PPI и GroEL ↑ Изоформы адгезии FomA ↑ Протеины синтеза АТФ ↓ Бутират-ацетоацетат CoA-трансфераза ↓ Поверхностные антигены Omp IP ↑	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	[482] [482] [484] [170] [170] [170] [170] [484, 170] [170] [483] [483] [483]
Ограничение железа	ВПМ (<i>pgaC</i>) ↑ Фимбриальные элементы (<i>tadV</i>) ↑ LPS (<i>rmlB</i>) ↑ Образование биопленки ↑	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	[121] [121] [121] [121]
Ограничение железа	Захват железа ↑ Запасы железа ↓ Ответ на окислительный стресс ↓ Образование биопленки ↑ Вторжение в клетки организма хозяина ↑	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	[314] [314] [314] [314] [314]
Высокая концентрация гема	Протеазы ↓ Везикулы ↓ Инактивация липида А с помощью TLR4 ↑	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	[428] [428] [115]
Норадреналин	Рост ↓ Арг-гингипаин В ↑	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	[395] [403]

Активность микроокружения влияет на состояние биопленки полости рта и колонизацию представителями пародонтопатогенных видов бактерий. Повышенная температура в поддесневой борозде, хотя и направлена на уничтожение патогенов, вроде бы, только снижает факторы вирулентности у патогенов (например, ингибирует протеазы у *P. gingivalis*) и оказывает недостаточное действие для уничтожения патогенов [243]. Изменение локального уровня pH в сторону создания щелочной среды, по-видимому, играет важную роль в сдвиге в составе биопленок пародонтопатогенов.

Биомасса биопленки в щелочных условиях растет, и, в частности, промежуточный колонизатор *F. nucleatum* обнаруживает повышенную адгезию и слипание с другими бактериями. Окислительный стресс и выработка воспалительного цитокина IL-1 β приводят к пониженному метаболизму в пародонтальной биопленке, но при этом усиливаются различные факторы вирулентности и интенсифицируется образование биопленки. Ограниченное количество свободного железа, по-видимому, усиливает образование внеклеточного полимерного матрикса биопленки [121].

Во время воспаления в пародонте повышенное количество гемина может ингибировать экспрессию факторов вирулентности бактерий и повысить экспрессию молекул, подавляющих иммунитет. В целом изменения среды, генерируемые при воспалении, благоприятствуют образованию биопленки и, по-видимому, дают бактериям укрытие, предоставляемое межклеточным матриксом и пониженным метаболизмом. Воспалительная среда с активными иммунными клетками и враждебным гуморальным ответом не идеальна для планктонных бактерий, которые выделяются из зрелой биопленки для поиска путей расширения территории и захвата новых мест обитания. Образование биопленки может объяснить наступление менее прогрессивных фаз в течении пародонтального воспаления и разрушении тканей пародонта и позволяет пародонтопатогенам проявлять жизнестойкость в поддесневых областях ротовой полости.

1.3. Взаимосвязь процессов микробной адгезии и колонизации при формировании биопленки в полости рта

Зубная бляшка, которая формируется на поверхности твердых тканей зуба (эмаль, дентин, цемент корня), представляет собой одно из наиболее типичных мультивидовых микробных сообществ макроорганизма, соответствующее основным критериям понятия «биопленка». Она характеризуется следующими классическими признаками микробных биопленок [96, 98, 100, 255, 375]:

- образование в условиях текучих сред (слюна, десневая и ротовая жидкость);
- сложная, многоярусная структурой и многокомпонентная по видовому составу;
- наличием в своем составе полимерно-клеточного матрикса и микроколоний микробов;
- регуляция функционирования в виде сложных сигнальных взаимодействий по типу как прямых, так и обратных связей, осуществляемых с участием специфических рецепторов, лигандов и сигнальных молекул.

Зубная бляшка, как общепризнанная модель комплексной многозвеньевой микрэкосистемы, является наиболее доступной для изучения, так как ее расположение позволяет достаточно легко осуществлять взятие материала и количественное исследование состава в пересчете на массу. А ее роль в развитии различных заболеваний полости рта — кариеса зубов, стоматитов, заболеваний десен — определяет особую актуальность изучения данной проблемы для практического здравоохранения [2, 47, 63].

Уникальным в полости рта является то, что это единственное место в организме, содержащее твердые, не обновляющиеся поверхности для микробной колонизации. Они состоят из естественных тканей зуба, таких как эмаль, дентин, цемент корня, а также и из различных материалов, включая ортопедические полимерные и металлические конструкции, как следствие деятельности врача-

стоматолога [6, 7, 34, 51].

Образование биопленки включает несколько последовательных этапов: адгезию планктонных форм бактерий, их размножение с последующей колонизацией данной экологической ниши (биотопа), формирование незрелой, а затем и зрелой микробной биопленки смешанного типа (мультивидовой) [8, 53, 91, 264, 451].

Согласно данным различных исследований в процессе первичной адгезии следует выделять процессы неспецифического и специфического характера.

Неспецифическая адгезия обеспечивается:

- химическими связями, которые устанавливаются между поверхностными молекулами микробов и клеток организма хозяина (водородные, гидрофобные, ионные, Ван-дер-Ваальса);
- биосинтетическими процессами формирования клейких полимеров, как правило, мукополисахаридов, из которых построена капсула бактерий (гликокаликс).

Специфическая адгезия определяется стереохимическим взаимодействием специфических белковых или гликопротеиновых молекул — адгезинов поверхности бактерий с рецепторными структурами пелликулы зуба или эпителиальных клеток организма хозяина.

В процессе колонизации следует выделять коадгезию — гомотипическую фиксацию планктонных форм к уже прикрепившимся клеткам того же вида — и коаггреацию — гетеротипическую фиксацию к ранее прикрепившимся бактериям других видов, которые получили название ранних и промежуточных колонизаторов. Большинство пародонтопатогенных видов относят к поздним колонизаторам [8, 54].

Таким образом, совокупность процессов первичной адгезии, коадгезии и коаггреации бактерий с последующим их бурным размножением приводит к селективной колонизации тканей хозяина с формированием структурированной смешанной микробной биопленки. Образование биопленки происходит как за

счет изначально фиксированных, та и за счет взвешенных в среде планктонных форм, а ее дальнейшее «созревание» обусловлено ростом и размножением бактерий.

Формирование микробной биопленки на поверхности реставрационных материалов (пломб) и ортопедических стоматологических конструкций (протезов) происходит вследствие сорбции бактерий из слюны на поверхности зубной коронки или зубочелюстного протеза и подчиняется тем же закономерностям.

По данным современной литературы основными факторами, способствующими формированию биопленки, являются: шероховатость и рельеф поверхности, характер субстрата и распределение свободной энергии на поверхности материала. Оказалось, что разные виды бактерий колонизируют разные биотопы полости рта: например, одни имеют тропизм к цементу корня зуба, другие — к эмали, третьи — к дентину, тканям пародонта, слизистой оболочке. По аналогии можно говорить также и о тропизме к тем или иным видам реставрационных (пломбировочных) или ортопедических (протезных) материалов [35, 47, 51, 97, 99].

Изучение процессов взаимодействия микроорганизмов с искусственными материалами при длительном их нахождении в организме человека продиктовано определением возможных рисков для здоровья пациентов, необходимостью разработки новых материалов, покрытий, устойчивых к микробной колонизации, а также эффективных способов удаления микроорганизмов без повреждения искусственных протезов и устройств. Искусственные материалы, в том числе и материалы медицинского назначения, могут быть колонизированы микроорганизмами и подвергаться биокоррозии или биодеструкции, в связи с чем к ним предъявляются жесткие санитарно-гигиенические требования [33, 35, 229].

Поэтому такого рода исследования наиболее актуальны в стоматологической практике, поскольку все используемые зуботехнические материалы длительное время находятся в ротовой полости, постоянно контактируя с микрофлорой, в составе которой могут быть патогенные виды бактерий и грибов [118, 301, 359, 399, 457, 468].

Установлено, что гидрофобные и электростатические взаимодействия определяют начальную фазу взаимодействия с субстратом, способствуют первичной адгезии [2, 72, 91, 116, 136]. Взаимосвязь характера различных стоматологических материалов — керамики, металлов, композитов, полимеров — с интенсивностью микробной адгезии и колонизации достаточно хорошо освещена в литературе последних лет [35, 98]. Однако подобных исследований в области базисных ортопедических пластмасс в доступной литературе не так много, и они, как правило, не раскрывают физико-химические основы процесса формирования биопленки.

С другой стороны, M. Quirynen et al. [390] в исследованиях *in vivo*, а затем и в клинике, показали, что шероховатость поверхности материала не менее, а в ряде случаев — и более важна для адгезии бактерий и последующего формирования биопленки, в то время как роль электростатических зарядов поверхности менее существенна. Эти исследования согласуются с работами других исследователей, которые установили, что шероховатость поверхности достоверно сильнее влияет на накопление налета, чем содержащиеся в материале антибактериальные вещества (например, фтор, выделяющийся из этих материалов, серебро или иные антибактериальные компоненты) [131, 139].

В. Н. Царёв с соавт. [54, 98] подчеркивают необходимость изучения двух принципиально различных по механизмам процесса, однако являющиеся последовательными стадиями формирования биопленки на поверхности стоматологических материалов, расположенных в полости рта, — адгезию и колонизацию.

В литературе содержатся многочисленные сообщения об изучении адгезии дрожжеподобных грибов рода кандида к поверхности реставрационных

материалов [48, 66], титановых, цирконовых [85, 98, 401] и акриловых протезов [44, 47, 100]. Исследования в области изучения механизмов микробной колонизации полимеров показали, что микроскопическая картина адгезии кандида на акриловых протезах связана со скоплением дрожжевых клеток в результате действия поверхностных сил напряженности. Исследования были выполнены с использованием сканирующей микроскопии, которая позволила сосчитать однородно распределенные дрожжи, располагающиеся по ходу прозрачных акриловых полос.

Наиболее точными приборами для измерения шероховатости контактным методом и получения трехмерного изображения являются атомно-силовые микроскопы (АСМ) [20, 56, 401]. Особенностью данных приборов являются: контроль высоты рельефа поверхности с точностью лучше 1 нм, высокое латеральное разрешение (менее 10 нм), высокое аспектное отношение (высокий угол заострения наконечника), возможность получения трехмерного изображения поверхности. Трехмерное изображение позволяет оценить сегментарность, анизотропию текстурированной поверхности [51], то есть имеет бóльшую информативность, чем двухмерный профиль, измеряемый классическими профилометрами. Атомно-силовое изображение имеет бóльшую наглядность, позволяет визуально отметить особенности рельефа, плохо поддающиеся анализу численными методами.

1.4. Моделирование биопленок в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Для изучения процессов формирования микробных биопленок и их влияния на ткани организма хозяина разработаны различные модели *in vitro* и *in vivo*, в том числе для изучения механизмов адгезии пародонтопатогенных бактерий к базисным и другим материалам, используемым в стоматологии, а также комплексная оценка факторов, определяющих адгезию и колонизацию, с использованием современных методов микроскопии и иммунохимии [2, 53, 100, 139, 334].

Начало изучению заболеваний тканей пародонта положили классические работы R. C. Page с соавт. [368, 369] и R. J. Oringer [365], разработавших модели экспериментального гингивита у людей *in vivo*. Эти исследования внесли значительный вклад в развитие пародонтологии в результате простой и инструктивной демонстрации этиологической роли бактериальной бляшки при гингивите. В отечественных исследованиях получили развитие модели лигатурного пародонтита на крысах, предложенные А. И. Воложиным с соавт. [18]. Позднее подобные работы показали роль клеточно-опосредованного иммунного ответа в этих процессах [429, 310].

Группа исследователей под руководством S. Offenbacher (2009) оценила вклад медиаторов воспаления при индукции и редукции экспериментального гингивита у людей, индуцированного бактериальным налетом [362, 363]. Авторы показали, что после удаления бактериального налета снижается экспрессия деструктивных медиаторов воспаления, продуцируемых в ответ на бактериальную бляшку. Хотя эти работы дали инструмент для изучения механизмов развития воспалительных заболеваний пародонта, проспективные механизмы прогрессирования заболеваний пародонта у людей не могут быть выяснены только при исследовании *in vivo* из-за этических ограничений [469].

Это особенно верно в связи с ростом числа работ, показывающих наличие ассоциаций заболеваний тканей пародонта и состояния соматического здоровья [38, 43, 362, 363, 324].

Чтобы преодолеть этические ограничения, ранее использовали модели на экспериментальных животных [232]. Эти работы помогли установить клинические признаки прогрессирования пародонтита: первоначальный субклинический гингивит, клинический гингивит и пародонтит с повреждением тканей пародонта и альвеолярной кости. Однако перенесение результатов исследований, полученных в экспериментах на животных, на человека имеет определенные ограничения, включая видовые различия и разнообразие микрофлоры. Они дают только аналогию процесса заболевания у человека, и, конечно, также возникает проблема этичности использования животных в

качестве моделей заболевания [235].

В качестве иллюстрации этой точки зрения можно отметить модель с мышинной черепной коробкой, применявшейся для изучения влияния *P. gingivalis* на костную ткань [150, 233, 313]. Она не связана с полостью рта и не дает информацию о взаимодействии с эпителиальными тканями, поэтому можно усомниться в ее аналитической значимости. Кроме этого в 90-е гг. прошлого столетия широко применяли модель введения пародонтопатогенов человека в мышиную ротовую полость. Но ключевые пародонтопатогены человека не присущи микрофлоре мышей, поэтому перед назначением антибиотиков необходимо снижение содержания резидентной микрофлоры. Вследствие этого остается под вопросом возможность влияния на организм хозяина и переноса полученных данных на полость рта человека.

Таким образом, основной недостаток моделей на экспериментальных животных — это то, что они неточно отражают заболевания пародонта, ставя больше вопросов, чем давая ответов. Более того, после работ S. S. Socransky с соавт. в конце 90-х гг. *P. gingivalis* из «красного» комплекса усиленно преподносили в качестве α -пародонтопатогена, то есть ведущего возбудителя [431]. Поэтому этот вид бактерий был объектом большинства исследований [249]. Тем не менее растущее число работ указывает на важную роль в патогенезе заболеваний пародонта такого вида бактерий, как *Filifactor alocis* [415]. Более того, вклад некультивируемых видов и многовидовых консорциумов еще до конца не оценен [380], что проблематично при моделировании на животных, поэтому исследования *in vitro* дают с этой точки зрения больше возможностей.

Всё это вновь поставило вопрос об актуальности **моделирования биопленок и заболеваний тканей пародонта *in vitro***.

Ранее были разработаны модели заболеваний тканей пародонта [268], которые позволили изучить механизмы взаимодействия бактерий разных видов между собой. В последнее время в эту концепцию включают участие клеток человека [138, 139, 192, 381, 383, 385]. Эти модели имеют преимущества по сравнению с исследованиями *in vivo* из-за этических аргументов.

Кроме того, контролируемые и воспроизводимые системы позволяют оценивать развитие биопленки «в реальном времени», ее состав, влияние микробов друг на друга и ответ на них клеток организма хозяина. Контролируемые системы имеют большую важность, особенно при изучении иммунных реакций. Группа исследователей под руководством В. Guggenheim [238] первой применила модель *in vitro* на основе культивирования мультивидовой биопленки и эпителиальных клеток, которая позволила оценить взаимодействие патогенов с клетками организма хозяина [138, 139, 237]. Инновационные подходы разработали R. Peuyala с соавторами (2011, 2012) [384, 385]. Эти группы исследователей независимо друг от друга показали различия цитокинового и хемокинового ответов на различные бактериальные биопленки и планктонные клетки.

С. К. Норе с соавт. (2012) разработал модель, состоящую из четырех видов бактерий. Данный минималистический подход был применен из-за проблем воспроизводимости результатов при использовании пулированной слюны или пулированных образцов биопленки [268]. Автор использовал моно- и мультивидовые биопленки, растущие на гидроксиапатите в искусственной слюне с последующим добавлением бактерий. Преимущества этого способа — воспроизводимость, рост на биологически релевантных субстратах и средах, формирование биопленки в форме, похожей на зубной налет. При этом получается ограниченное число бактериальных видов, что позволяет оценить вклад каждого вида в индукцию медиаторов воспаления.

В результате было показано, что отдельные бактерии выживают предпочтительно при росте в мультивидовых биопленках, по сравнению с монобиопленками. Это согласуется с другими моделями многовидовых биопленок, в которых были продемонстрированы мутуалистические взаимоотношения [378, 453]. Также показан различный цитокиновый и хемокиновый иммунный ответ на патогенные и комменсальные микробы. Хотя и патогенны, и комменсалы влияют на экспрессию и секрецию воспалительных медиаторов, патогены предпочтительнее индуцируют экспрессию и секрецию

медиаторов воспаления эпителиальными клетками. Более того, биопленки *P. gingivalis* индуцируют экспрессию генов IL-8, тогда как секреция IL-8 не коррелировала с экспрессией генов. Это можно объяснить тем, что бактерии выделяют гингипаины, ключевые иммуномодулирующие компоненты *P. gingivalis* [344]. Поэтому авторы считают, что данная модель позволяет отличать патогены и комменсалы, биопленки от планктонных бактерий.

1.5. Антибактериальная терапия и опыт изучения резистентности бактерий к антибиотикам, формирующейся в биопленках

Другой важной стороной проблемы функционирования биопленок в организме хозяина является положение о том, что они, как оказалось, открывают дополнительные возможности для реализации механизмов резистентности к антибактериальным агентам. Очевидно, что знание механизмов устойчивости бактерий (резистентности) к антибиотикам имеет крайне важное значение для успешной борьбы с инфекционной болезнью [400].

В соответствии с фундаментальным документом «Глобальная стратегия по сдерживанию антимикробной резистентности», принятым Всемирной организацией здравоохранения в 2001 г. [471], в США и большинстве стран Евросоюза распространение антимикробной резистентности рассматривается как одна из угроз национальной безопасности [166, 214]. В феврале 2004 г. на Совещании экспертов ВОЗ в Верингероде (ФРГ), посвященном ходу реализации данного документа, было предложено рассматривать феномен антимикробной резистентности как новую инфекцию, а мультирезистентные штаммы — в качестве возбудителя («супербактерии»).

Резистентность биопленок к антибиотикам развивается в силу нескольких механизмов (таблица 2). Одним из механизмов является природная, изначально присущая данным микроорганизмам резистентность. Другим механизмом является пониженная диффузия антибиотиков через биопленку или дезактивация их внутри внеклеточной матрицы биопленки. Наряду с другими

механизмами оказывают свое влияние, также пониженный рост микроорганизмов из-за ограниченного поступления питательных веществ и активация ответа на стресс [195].

Таблица 2

Резистентность к антибиотикам у некоторых распространенных патогенов, образующих биопленку

Вид микроба	Класс антибиотиков	Примеры
<i>Staphylococcus</i> (<i>aureus, epidermidis</i>)	β -лактамы (MRS)	Ампициллин
<i>Streptococcus mutans</i>	Хинолоны	Ципрофлоксацин
	Гликопептиды	Ванкомицин
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Имидазолы	Метронидазол
	Макролиды	Эритромицин
<i>Pseudomonas</i>	β -лактамы	Имипенем, цефтазидим
<i>Candida spp.</i>	Азолы	Флуконазол
<i>Aspergillus</i>	Азолы	Флуконазол, итраконазол

Природная резистентность микроорганизмов — это фактор, выходящий на первый план, когда мы рассматриваем такие микробы, как *Pseudomonas*, метицил-резистентные *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*. Эта резистентность биопленки может усиливаться в силу факторов окружающей среды. Например, эффлюксный насос (механизм вывода из клетки ксенобиотиков) у микроорганизмов рода *Pseudomonas* и *Candida* может усиливаться в ответ на формирование биопленок [305].

Известная высокая резистентность к имипенему у биопленок, образованных микроорганизмом *Pseudomonas* [195, 328], помимо замедленного роста, может быть следствием повышенного оттока (эффлюкса). При этом было установлено, что развитие гипоксии повышает устойчивость к антибиотикам за счет снижения эффлюкса [411].

Диффузия ципрофлоксацина в биопленку микроорганизма *P. Aeruginosa* существенно ниже по сравнению с рассредоточенными клетками [439], в тоже время биопленка *P. aeruginosa* в 15 раз менее подвержена тобрамицину, чем необъединенные клетки [270]. Существенно, что 2%-ная суспензия альгината, выделенная из *P. Aeruginosa*, подавляла диффузию тобрамицина (и гентамицина), т. е. давала эффект, обратный эффекту альгинатлиазы [262]. Аналогично тобрамицин был менее активен против образовавшего биопленку микроорганизма *Staphylococcus epidermidis* [197].

В литературе на подобную тему [228] было обнаружено, что степень диффузии нескольких β -лактамов (цефтазидим, цефсулодин, пиперациллин) и аминогликозидов (гентамицин, тобрамицин) через альгинатные гели была выше у β -лактамов. Эти результаты поддерживают данные, полученные для других сочетаний микроорганизмов и антимикробных агентов [123].

Скорость роста биопленки у *S. epidermidis* сильно влияет на его выживаемость. Чем выше скорость роста клеток, тем выше скорость его подавления ципрофлоксацином [198]. Аналогично, более зрелые прораставшие в течение 10 дней в хеостате биопленки микроорганизма *P. aeruginosa* были значительно более резистентными к тобрамицину и пиперациллину, чем незрелые (двухдневные) биопленки [125, 328]. При обработке 500 μ г пиперациллина плюс 5 μ г тобрамицина на миллилитр полностью подавлялись планктонные клетки и клетки в незрелых биопленках, но только 20% клеток погибало в более зрелых биопленках. Эти результаты поддерживают дополнительные данные об использовании других сочетаний микроорганизмов и антимикробных агентов [122, 172, 188]. Даже биопленки, образованные видами, в норме их не образующими, гетерогенны с точки зрения экспрессии генов (т. е. фенотипа): клетки, расположенные ближе к поверхности биопленки, отличаются от клеток, залегающих в толще [408, 455, 464].

Хроническая природа инфекций, связанных с образованием биопленок, повышает свой потенциал. Они действуют как резервуары при острых обострениях и способствуют развитию тяжелых иммунных осложнений. Из-за

своей неактивной природы инфекции, связанные с образованием биопленок, обычно диагностируются с очень большим опозданием. Это делает терапию, направленную на разрушение биопленки, менее привлекательным способом лечения, чем удаление биопленки с места ее прикрепления. Удаление в настоящее время выполняется путем замены внедренного медицинского приспособления. Удаление биопленки с помощью энзимов может оказаться более привлекательной перспективой. В этом отношении важным фактором следует считать возраст биопленки [258, 263, 438].

Еще один подход, который, вероятно, будет всё в большей степени использоваться в будущем, заключается в таком изготовлении медицинских приспособлений, которое ограничит бактериальное прикрепление и колонизацию. В этом плане определенные надежды возлагаются на современные антисептические препараты, в частности на основе хлоргексидина, триклозана и гексэтидина [24, 82]. Таким образом, контроль состава биоматериалов или введение в их состав антибиотиков и антисептиков — вот очевидные направления для будущих исследований [182, 262, 284, 289].

Назначение несвоевременной и неадекватной терапии инфекций в условиях широкого распространения устойчивых и мультирезистентных штаммов ведет к хронизации воспаления, развитию тяжелых осложнений, а при лечении внутрибольничных и тяжелых инфекций даже увеличивает вероятность летального исхода.

Поэтому очень важно на ранних стадиях заражения выявить тип антибиотикорезистентности, чтобы подобрать адекватную схему лечения и использовать наиболее эффективные антибактериальные препараты. В случае тяжелых инфекций это нужно сделать в кратчайшие сроки [83, 322].

В современной клинической практике можно выделить несколько вариантов антибактериальной резистентности, приводящих к крайне серьезным социально-экономическим последствиям. К таким вариантам следует отнести устойчивость микробов в отношении:

- β -лактамных антибиотиков у грамотрицательных бактерий, в частности представителей семейства *Enterobacteriaceae* и *P. aeruginosa* (продукция β -лактамаз);
- β -лактамных антибиотиков у представителей рода *Staphylococcus*, прежде всего *S. aureus*;
- макролидов у представителей рода *Streptococcus*;
- гликопептидных антибиотиков у представителей рода *Enterococcus*;
- аминогликозидов и противотуберкулезных препаратов у представителей рода *Mycobacterium*;
- фторхинолонов у грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Большинство из перечисленных вариантов обусловлены приобретением бактериями данной группы той или иной генетической детерминанты устойчивости (таблица 3), обнаружение которой возможно с помощью ПЦР.

Грамотрицательные бактерии, в том числе возбудители нозокомиальных инфекций, как правило, реализуют устойчивость к β -лактамным антибиотикам за счет продукции многочисленных β -лактамаз, при этом один штамм может продуцировать несколько различных ферментов.

Продуцируемые бактериями ферменты различны по своей субстратной специфичности, среди них выделяют следующие типы [475]:

- пенициллазы, гидролизующие только пенициллин и ампициллин;
- β -лактамазы расширенного спектра действия (ESBL), гидролизующие пенициллины и цефалоспорины;
- и, наконец, металло- β -лактамазы, или карбапенемазы, гидролизующие пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы.

Генотипирование на основе ПЦР остается золотым стандартом детекции и идентификации β -лактамаз, в том числе металло- β -лактамаз. [79, 83, 295].

Характеристика изученных маркеров резистентности к антибиотикам

Группа		Типичные препараты	Ген-маркер резистентности	Бактерии - носители генов
β-лактамные антибиотики				
	пенициллины	ампициллин амоксициллин бензилпенициллин пиперациллин	TEM-1,2; SHV-1,11	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> : <i>Proteus spp</i> , <i>Enierobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> : <i>Citrobacterspp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i>), <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acineiobacierspp.</i>
	цефалоспорины	I поколение: цефазолин цефалотин цефалексин	CTX-M, SHV-5,12	
		II поколение: цефуроксим цефаклор		
		III поколение: цефотаксим цефтриаксон цефтазидим цефиксим		
		IV поколение: цефепим	AmpC	
	карбапенемы	Меропенем Имипенем дорипенем	VIM, IMP, NDM, KPC, GES, OXA-20s, OXA-40s, OXA50s	
β-лактамные антибиотики		оксациллин	MecA	<i>S. aureus</i>
гликопептиды	ванкомицин	VanA, VanB	<i>E. faecaiis</i> , <i>E. faecium</i>	
	тейкопланин	VanA		
макролиды		эритромицин азитромицин кларитромицин	Mef, Erm	<i>Streptococcus spp.</i>
Фторхинолоны (II, III и IV поколение хинолонов)		II поколение: ципрофлоксацин офлоксацин III поколение: левофлоксацин IV поколение: Моксифлоксацин	GyrA, ParC, QnrA	<i>Streptococcus spp.</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enierobacteriaceae</i>

Необходимость обнаружения генов blaSHV, blaTEM, ответственных за продукцию пенициллаз, или β-лактамаз узкого спектра действия (NSBL)

Штаммы, продуцирующие β-лактамазы узкого спектра действия (NSBL), обычно вырабатывают TEM-1 и/или SHV-1 ферменты, которые разрушают пенициллины и ранние цефалоспорины, но чувствительны к другим классам β-лактамных антибиотиков. Мутации в промоторном участке гена TEM-1 могут привести к гиперпродукции этих ферментов. Подобная гиперпродукция может обернуться устойчивостью к другим β-лактамным антибиотикам, помимо пенициллина. Точечные мутации в этих ферментах могут привести к возникновению устойчивости к ингибиторам β-лактамаз, например, сульбактаму и клавулановой кислоте. Хромосомные и плазмидные механизмы кодирования β-лактамаз выявлены у *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra* и *Capnocytophaga spp.* [254, 296, 349]. К ним можно отнести также и гены *CfxA1* и *CfxA2* выявленные у анаэробных бактерий рода *Prevotella* [280]. Устойчивые штаммы особенно опасны при лечении инфекций у детей, когда препаратами выбора являются пенициллины и ранние цефалоспорины. При неадекватной терапии существует риск перехода заболевания в хроническую форму.

Для обнаружения генов устойчивости к пенициллинам и ранним цефалоспорином разработаны следующие отечественные наборы:

• Резистентность к пенициллинам — 1

Резистентность *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas* к пенициллинам и ранним цефалоспорином (гены TEM).

• Резистентность к пенициллинам — 2

Резистентность *Enterobacteriaceae* к пенициллинам и ранним цефалоспорином (ген SHV-не ESBL).

Необходимость обнаружения генов, ответственных за продукцию β-лактамаз расширенного спектра действия (ESBL)

Среди грамотрицательных бактерий гены blaSHV, blaTEM, blaCTX и blaAMPC, встречающиеся у *E. coli*, *K. pneumoniae* и *Acinetobacter spp.*, кодируют β-лактамазы расширенного спектра (ESBL) и чаще всего располагаются на

плазмидах [272]. ESBL — это β -лактамазы, способные гидролизовать все пенициллины и цефалоспорины, за исключением цефамицина, моксалактама и карбапенемов [332]. Варианты blaSHV, blaTEM, устойчивые к широкому спектру антибиотиков, образовались в результате мутаций генов TEM-1 и SHV-1. Наиболее часто встречаются CTX-M — продуцирующие грамотрицательные палочки. Во всём мире отмечается, что изоляты *E. coli*, продуцирующие ферменты типа CTX-M (особенно CTX-M-15), являются важной причиной инфекций мочевыводящих путей и инфекций крови [220, 386].

Для обнаружения устойчивости энтеробактерий к цефалоспорином разработан набор:

- **Резистентность к цефалоспорином — 1**

Резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином (гены CTX-M).

Необходимость обнаружения генов, ответственных за продукцию металло-бета-лактамаз, или карбапенемаз

Карбапенемы, главным образом имипенем и меропенем, являются основными агентами в борьбе с грамотрицательными палочками, обладающими множественной лекарственной устойчивостью. В этой связи распространение грамотрицательных бактерий, продуцирующих карбапенемазы, представляет серьезную проблему в сфере здравоохранения.

С 2009 г. Национальная референсная лаборатория Германии отслеживает молекулярную эпидемиологию карбапенемаз грамотрицательных нозокомиальных патогенов. В 2011 г. среди 1454 бактериальных изолятов устойчивость к карбапенемам была обнаружена у 34,4% штаммов *Enterobacteriaceae*, 19,9% штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и в 96,3% изолятов *Acinetobacter baumannii*.

Карбапенем-устойчивые *Enterobacteriaceae* резистентны почти ко всем антибиотикам и в 40% случаев приводят к смерти пациента. В США за 2009–2010 гг. в 13% случаев инфекций кровотока и катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей, вызванных *Klebsiella*, возбудитель был устойчив к карбапенемам. Для *E. coli* этот показатель составил около 2% [288].

Наиболее частыми карбапенемазами среди *Enterobacteriaceae* являются OXA-48, KPC и VIM-1 [221], у *Pseudomonas aeruginosa* — VIM-2 [287].

Продуцирующие их гены расположены на интегронах и могут легко встраиваться в плазмиды или хромосомы. Таким образом, довольно просто происходит обмен этими генами как внутри бактериальной популяции одного вида, так и между различными видами (например, *Pseudomonas* может обмениваться генетической информацией как с другими *Pseudomonas*, так и с другими грамотрицательными палочками). Для многих ферментов (GIM, VIM, SPM и IMP) до сих пор не разработаны ингибиторы.

Распространение NDM-1 гена, кодирующего Нью-Дели металло- β -лактамазу (NDM-1) в *Enterobacteriaceae*, является одной из основных проблем глобального здравоохранения. Первое обнаружение металло- β -лактамазы NDM типа зарегистрировано в многопрофильном российском стационаре в 2012 г. [4].

Продукт гена NDM-1 способен гидролизовать практически все β -лактамные антибиотики и в сочетании с другими механизмами резистентности делает бактерию устойчивой почти ко всем антибиотикам.

Первоначально плазмиды, кодирующие blaNDM-1, были обнаружены у *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Посредством конъюгации плазмиды могут передаваться и другим видам. Недавно blaNDM-1 были обнаружены в *Acinetobacter baumannii* и *Vibrio cholerae* [169].

NDM ферменты, такие как NDM-4, сейчас эволюционируют в более каталитически активные варианты [466].

Инфекции крови, вызванные OXA-48-продуцирующими *Enterobacteriaceae*, имеют плохой прогноз, поскольку часто происходит задержка между постановкой диагноза и началом адекватной терапии [355].

Обнаружение способности продуцировать металло- β -лактамазы различными представителями грамотрицательных бактерий, оценка масштабов встречаемости кодируемых их генов в клинических образцах важны для предотвращения распространения инфекции и проведения адекватной этиологической терапии пациентов [217].

Задачу обнаружения генов, кодирующих карбапенемазы, решают следующие наборы:

• **Резистентность к карбапенемам — 1**

Резистентность *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas* к карбапенемам (гены **VIM**).

• **Резистентность к карбапенемам — 2**

Резистентность *Enterobacteriaceae* к карбапенемам (гены **NDM**).

• **Резистентность к карбапенемам — 3**

Резистентность *Enterobacteriaceae* к карбапенемам (гены **OXA-48**).

Грамположительные бактерии, как правило, реализуют устойчивость к β -лактамным антибиотикам за счет модификации пенициллин-связывающих белков (ПСБ), являющихся их мишенями действия. В частности, стафилококки способны синтезировать ПСБ2а, обладающий сниженной аффинностью к пенициллинам (метициллину и оксациллину) и цефалоспорином. Способность к продукции такого белка кодируется геном *MecA*, передающимся в популяции в составе мобильной хромосомной кассеты.

Золотистый стафилококк способен поражать практически любые ткани организма человека, вызывая пневмонии, сепсис, остеомиелиты, маститы, инфекции кожи и тканей, мочевыводящих путей и др. Наличие гена *MecA* у *S. aureus* обуславливает его «метициллин-резистентность» — устойчивость к цефалоспорином, часто сопровождающуюся множественной устойчивостью к другим классам антибиотиков. Устойчивые штаммы, обозначаемые как MRSA, часто выявляются при заражении крови и осложненных инфекциях мочеполовой системы. При лечении инфекций кожи и мягких тканей, особенно в развивающихся странах, метициллин-резистентный золотистый стафилококк нельзя сбрасывать со счетов [430].

Для обнаружения метициллин-резистентных штаммов золотистого стафилококка предназначен отечественный набор:

• **Резистентность к цефалоспорином — 2**

Резистентность *S. aureus* к β -лактамным антибиотикам (ген **MecA**).

Гликопептидные антибиотики — ванкомицин и тейкопланин в терапии энтерококковых инфекций

Enterococcus faecalis и *Enterococcus faecium* являются причиной 85–90% энтерококковых и третьей по частоте причиной внутрибольничных инфекций, особенно бактериемии, сепсиса у детей, эндокардита, инфекций мочевыводящих путей. Большинство больничных изолятов энтерококков устойчивы к обычным антибиотикам, устойчивость к ванкомицину достигает 40% в популяции. Два гена резистентности (VanA и VanB) являются наиболее распространенными, особенно среди *E. faecium*. Штаммы с VanA геном устойчивы к ванкомицину и тейкопланину; штаммы с VanB устойчивы к ванкомицину, но сохраняют чувствительность к тейкопланину.

Ванкомицин-устойчивые энтерококки (VRE) являются важными этиологическими агентами внутрибольничных инфекций. Частота обнаружения VRE особенно высока в отделениях интенсивной терапии новорожденных в связи с иммунной недостаточностью у новорожденных, частым использованием антибиотиков и длительного срока госпитализации [142].

По данным последних публикаций, метод ПЦР является наиболее быстрым и чувствительным методом для одновременного обнаружения энтерококков и определения их резистентности к ванкомицину. Среднее время проведения ПЦР и стандартного микробиологического исследования занимает 10 часов и 5 дней, соответственно [267].

Для выявления устойчивости энтерококков к гликопептидным антибиотикам разработан набор:

• Резистентность к гликопептидам

Это касается механизмов резистентности *E. faecalis* и *E. faecium* к ванкомицину и тейкопланину (определение фенотипов **VanA** и **VanB**).

Необходимо подчеркнуть, что антибиотическую активность против микроорганизмов, образующих биопленку, невозможно точно определить с помощью стандартных методов микроразведения в бульоне NCCLS для испытания выносливости, поскольку эти методы основаны на том, чтобы

подвергнуть *планктонные* микроорганизмы действию антимикробного агента. Вместо этого биопленку подвергают антимикробному агенту после извлечения ее из субстрата, к которому она была прикреплена; ее также гомогенизируют (обеспечивают однородность) и подсчитывают количество клеток, оставшихся в живых после обработки [195]. При разработке удобной модели для исследования системы биопленки важными факторами, требующими учета, помимо среды, на которой растет культура, и затравки для проращивания культуры, являются субстрат и гидродинамика [195].

Использование современных ПЦР-наборов позволяет быстро и качественно выявлять генетически обусловленную устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и способствует выбору адекватной лекарственной терапии. Однако в представленном обзоре литературы крайне мало сведений о генетических механизмах резистентности анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы, что послужило основанием для наших исследований с использованием моделей биопленкообразующих штаммов этих возбудителей.

Приблизительно 80% бактериальных инфекций человека обусловлены влиянием биопленок [257]; главным образом инфекции ассоциированы с имплантатами и медицинскими устройствами, например, с катетерами, протезами клапанов сердца. Адгезия микробов на поверхности и последующее формирование биопленок является критическим моментом для применения многих биомедицинских систем [195, 212]. Действительно, увеличивающуюся резистентность биопленок к традиционным противомикробным препаратам считают главной причиной распространения резистентности к антибиотикам при нозокомиальных инфекциях [212, 433].

Резистентность биопленок связана с несколькими факторами [83, 177, 251, 266], такими как:

а) высокая частота мутаций и горизонтальный перенос генов в биопленке по сравнению с планктонными бактериями, которые объясняют быстрое развитие антибиотикорезистентности в биопленках;

б) появление зон с недостатком питательных веществ в биопленке, обуславливающих градиенты кислорода и питательных веществ, которые индуцируют переход бактерий в стационарную фазу, подобную гипобиозу, когда бактерии не подвержены антимикробным препаратам;

в) развитие оксидативного стресса, вызванного нарушением баланса между образованием реактивных форм кислорода и антиоксидантных систем, который увеличивает мутабельность в биопленке;

г) задержка проникновения антибиотиков в матрикс биопленки, который содержит полимеры, связывающие антибиотики, и затрудняет их действие, а также ферменты, деградирующие и деактивирующие антибиотики.

Трудности успешного лечения биопленкоассоциированных инфекций и возрастающая резистентность микробов к традиционным способам их устранения требуют поиска соединений с новыми механизмами действия. Большинство противомикробных продуктов, которые уже разработаны, являются производными уже известных соединений и мишенями тех же механизмов резистентности, поэтому их эффективность вряд ли может быть существенно повышена.

1.6. Значение взаимодействий, ассоциированных с факторами врожденного иммунитета при заболеваниях пародонта

В последние годы природные антимикробные пептиды, формирующиеся в организме человека, вызывают значительный интерес в качестве нового класса антимикробных препаратов по ряду причин. Среди них — широкий спектр активности, относительная селективность по отношению к мишени (бактериальным мембранам), стремительное развитие механизмов активности АМП и низкая частота появления резистентных штаммов. В нашем исследовании установлены статистически достоверное увеличение уровня АМП и взаимосвязь показателей со степенью тяжести ХП и другими нозологическими формами — КГ и КАП.

Так как резистентность к антибиотикам в основном связана с низкой скоростью и низкой метаболической активностью бактерий в таких сообществах, использование АМП для ингибирования формирования биопленки может быть потенциально привлекательным терапевтическим подходом. Действительно, в связи с основным механизмом действия АМП, основанным на их способности к пермеабиллизации и/или формированию пор в цитоплазматических мембранах [190], они обладают высоким потенциалом действия также на медленно растущие или даже не растущие бактерии

Среди других ответов организма хозяина на бактериальную колонизацию и формирование биопленки следует назвать выработку антител и выделение цитокинов. Цитокины, вовлеченные в иммунный ответ, — это прежде всего провоспалительные: фактор трансформации роста β (TGF- β), интерлейкин-4 (IL-4), IL-10 и IL-12 [368]. Эти цитокины взаимодействуют и активируют другие клетки очага воспаления, которые, в свою очередь, выделяют цитокины, вызывающие воспаление, протеазы и простаноиды, способствующие заболеванию пародонта, т. е. разрушению десны и резорбции кости [365, 368].

Поэтому одним из подходов к лечению или предотвращению прогрессирования заболевания пародонта может быть модуляция профиля выделения цитокинов. Так, цитокин IL-4 снижает число клеток воспалительного инфильтрата и вызывает повышенную регуляцию рецепторов-антагонистов IL-1 и таким образом снижает степень разрушительного воспаления [470]. Противовоспалительным эффектом обладают также IL-5, 7, 8.

Нейтрофилы и макрофаги выделяют зависимые от цинка и кальция ферменты типа эндопептидаз или матричные металлопротеиназы (MMPs). MMPs — это энзимы, разлагающие коллаген, желатин, ламинин, фибронектин и протеоглюканы. Эти энзимы, обнаруживаемые в областях зубного кариеса, повышают реструктуризацию соединительной ткани и резорбцию костей; и они также вносят существенный вклад в тяжесть заболевания пародонта [226]. Интересно, что бактериальные протеазы не вносят существенного вклада в прогрессирование заболевания, но скорее бактериальная биопленка вызывает

избыточные ответы организма хозяина, из-за чего повреждаются его собственные ткани.

При повреждении тканей организма хозяина, из фосфолипидов клеточной мембраны под влиянием фосфолипазы A_2 высвобождается арахидоновая кислота, которая затем преобразуется по метаболическому пути в циклооксигеназы или липоксигеназы. При пародонтите циклооксигеназа 2 (COX-2) является индуцируемым энзимом, чью повышенную регуляцию вызывают цитокины. Активация этих метаболических путей приводит к выработке простагландинов, простаглицлина, тромбоксана и лейкотриенов. В самом деле, признано, что повышенные уровни этих веществ высоко коррелируют с гингивитом, пародонтитом и инфекциями, связанными с имплантацией [374].

Воспалительные и фагоцитарные барьеры систем врожденного и адаптивного иммунитета координируются цитокинами, которые, по мнению R. Medzhitov и C. A. Jr. Janeway [341], являются «молекулярными светофорами», регулирующими скорость и степень иммунных реакций. Цитокины — коротко живущие, небольшие (10–30 kDa) гликопротеины, продуцируемые *de novo* в ответ на иммунные стимулы, опосредуют и регулируют иммунитет, воспаление, рост клеток, их дифференцировку и гемопоэз. Секретируются в основном лимфоцитами, моноцитами и макрофагами, но взаимодействуют с огромным числом клеток, связываясь со специфическими мембранными рецепторами. Связываясь с рецепторами на клеточных мембранах, они запускают комплексы вторичных мессенжеров, которые переносят сигнал в ядро клетки, при этом меняется экспрессия генов. При связывании с цитокинами происходят снижение или увеличение экспрессии мембранных протеинов, рост клеток, пролиферация, дифференцировка и секреция эффекторных молекул.

IL-1 и TNF- α относят к провоспалительным цитокинам из-за их вездесущности, раннего и интенсивного ответа на инвазирующие агенты (бактерии или токсины). TNF- α и IL-1 могут отдельно или синергично активировать любые клетки иммунной системы, а также фибробласты,

эндотелий, гладкомышечные клетки, астроциты, клетки микроглии), включая индукцию клеточных медиаторов (т. е. цитокинов, хемокинов, иммуноглобулинов, литических ферментов, простагландинов, презентацию антигенов), которые являются хемоаттрактантами лейкоцитов и моноцитов, стимулируют пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, усиливают проницаемость сосудов и ангиогенез, тромбообразование, увеличивают адгезию клеток и индуцируют лизис клеток.

IL-10 и изоформы TGF- β относят к противовоспалительным и/или иммуносупрессивным цитокинам. IL-10 ингибирует синтез IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α и иммуноглобулинов, деактивируют макрофаги и снижают клеточный иммунитет и презентацию комплекса антигенов с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II. Изоформы TGF- β ингибируют рост и пролиферацию клеток разного типа (эндотелиальных клеток, фибробластов, нейронов, эпителиальных клеток, гладкомышечных клеток, хондроцитов), ингибируют активность макрофагов, являются антагонистами факторов роста (EGF, PDGF, α/β FGF), снижают синтез иммуноглобулинов и ингибируют пролиферацию лимфоцитов.

При пародонтите во время активных фаз разрушения ткани пародонта и десневая жидкость обычно содержат высокие уровни посредников, таких как интерлейкин IL-1 β , способствующих воспалению [393]. Повышенная экспрессия IL-1 β является характеристикой воспалительных заболеваний пародонта. Она направлена на уничтожение патогенов, усиление иммунного ответа, но также приводит к повреждению тканей организма хозяина [387]. После идентификации пародонтопатогенов и бактериальных продуктов в тканях пародонта клетками первой линии защиты выделяются цитокины. Например, десневые эпителиальные клетки и фибробласты могут в качестве секрета выделять IL-1 β после инфицирования бактериями *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* или при культивировании на питательной среде в присутствии липоолигосахаридов *Treponema denticola*. Вещества, выделяемые *A. actinomycetemcomitans* в полости рта (такие как лейкотоксины и липополисахариды), индуцируют выделение

макрофагами IL-1 β [387]. Макрофаги и моноциты считаются главными продуцентами IL-1 β во время воспалительного процесса [360]. Выступая в качестве ключевого проводника воспалительного ответа, IL-1 β индуцирует выделение других способствующих воспалению медиаторов [461]. Однако выделение IL-6 и IL-8 из десневых эпителиальных клеток во время инфекции тканей пародонта может быть заторможено блокирующей индукцией IL-1 β [206]. Фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) и интерлейкины IL-6 и IL-8 являются цитокинами, обычно выделяемыми эпителиальными клетками после начала бактериальной инфекции [192, 434, 459]. Недавние исследования позволяют предположить, что ответ десневых клеток отличается в случае инфицирования полости рта однородной биопленкой [385], многовидовыми биопленками [238] и планктонными бактериями [382].

IL-1 β — жизненно важный цитокин, необходимый для борьбы организма против патогенов, может также встречать противодействие у микробов, колонизирующих организм хозяина. Первое свидетельство бактериального ответа на цитокины появилось в исследованиях с вирулентными штаммами *Escherichia coli* более 20 лет назад. Было показано, что клетки *E. coli* могут связывать IL-1 β и что рост биомассы этих видов усиливался после введения IL-1 β , в то время как лечение препаратами IL-4 или TNF- α оказывалось неэффективным. Более того, использование рецептора-ловушки IL-Ra для IL-1 β обернулось ростом численности *E. coli*. Позднее было продемонстрировано, что другие виды бактерий, такие как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. после того как подвергались действию IL-1 β , IL-6 или TNF- α , могли изменять характеристики своего роста [387].

В исследованиях роли IL-1 β в противостоянии патогенов и цитокинов центральной моделью служили грампозитивные бактерии *S. aureus*. Удивительно, но *S. aureus*, которые чаще всего связаны с назальными каналами и кожей, также были идентифицированы в поддесневых бляшках у 60% некурящих пациентов с агрессивным пародонтитом [218]. Согласно эксперименту, проведенному *in vitro*, рост биопленок *S. aureus* усиливался в

присутствии IL-1 β . Это усиление роста также наблюдалось с двумя линейными пептидными фрагментами (< 5 кДа IL-1 β человека). Помимо усиления роста интерлейкины модулировали экспрессию гена биопленок *S. aureus*. Они уменьшали экспрессию некоторых декодирующих токсины генов и повышали экспрессию генов, ответственных за прикрепление к тканям организма хозяина [290].

Гипотеза о способности бактерий к специфическому связыванию IL-1 β была подкреплена получением характеристик специфического рецептора внешней мембраны бактерий для IL-1 β у грамотрицательного возбудителя бубонной чумы *Yersinia pestis*. Белок, взаимодействующий с IL-1 β , известен как протеин сборки капсульного антигена F1 (Caf1A), который вносит свой вклад в транспортировку капсульного антигена (Caf1) через внешнюю мембрану [480]. Интересно, что последовательность у Caf1 на 28% одинакова с человеческим IL-1Ra [479]. Второй бактериальный рецептор для взаимодействия с цитокинами, протеин внешней мембраны OprF, связывающий только человеческий интерферон- γ , первоначально наблюдался у грамотрицательных *P. aeruginosa*. В качестве ответа на связывание с цитокином *P. aeruginosa* увеличивает экспрессию гена, кодирующего лектин (*lecA*), в зависимости от кворума, вырабатывающего общий ответ [472]. Гидрофобный связывающий галактозу лектин, локализованный во внеклеточном матриксе биопленок *P. aeruginosa*, вносит свой вклад в образование биопленок у различных видов бактерий и прикрепление к клеткам эндотелия [193].

IL-1 β — цитокин, продуцируемый несколькими типами клеток, — осуществляет ряд важных функций усиления воспаления и защиты хозяина [154]. IL-1 β вызывает индукцию синтеза коллагеназы фибробластами, что задерживает образование коллагена и кости, угнетает остеосинтез [43]. Кроме того, IL-1 β стимулирует костную резорбцию [231]. Ингибирование секреции IL-1 β приводило к снижению рекрутирования воспалительных клеток в участки, близкие к кости, и уменьшению потери костной ткани на 60% [231].

IL-6 — плейотропный провоспалительный цитокин, регулирующий некоторые биологические функции, включая воспалительный ответ и биологию костной ткани. Он активирует дифференцировку и трансформацию В-лимфоцитов в плазматические клетки с последующим синтезом иммуноглобулинов, фиксацией комплемента и секрецией хемотоксических веществ [168]. IL-1 β и IL-6 являются мощными антиапоптозными молекулами [171]. При ХП увеличивается экспрессия IL-6 [436]. Провоспалительные цитокины стимулируют секрецию IL-6 нейтрофилами, который связан с индукцией и поддержанием хронического воспаления. IL-6 усиливает экспрессию молекул адгезии VCAM-1 и ICAM-1, способствующих аккумуляции нейтрофилов в тканях [132]. Он связан с антиапоптозными эффектами нейтрофилов [306].

IL-8 — первичный хемокин, привлекающий нейтрофилы в участки воспаления, — является признаком хронического воспаления при пародонтите [320].

Продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8) связана с экспериментальным гингивитом, особенно с эпителиальными клетками, играющими центральную роль в регуляции иммунного ответа. Эпителиальные клетки выделяют эти молекулы в присутствии пародонтальной биопленки.

Раннюю миграцию клеток в десну при пародонтите индуцирует IL-17A, который относят скорее к адаптивному иммунному ответу [477], тем не менее он является ключевой молекулой, индуцирующей и опосредующей многие провоспалительные реакции [112]. IL-17A экспрессируется многими тканями, особенно гемопоэтическими, а также эпителиальными клетками, эндотелием и фибробластами [224].

Протективная роль IL-17A при бактериальных и грибковых инфекциях была показана при исследованиях на IL-17/IL-17A — дефицитных мышах, чувствительных к кандидозу слизистых [443], *Klebsiella pneumonia* [176], *Legionella pneumonia* [114] и *P. g.* [477]. Позднее было установлено, что IL-17

оказывает протективное действие, усиливая миграцию нейтрофилов в десневые ткани. IL-17 является привлекательной мишенью для модулирования деструктивных заболеваний костей, включая пародонтит [345].

TNF- α — цитокин с цитотоксическим и регуляторным действием. Оказывает провоспалительное действие, регулирует апоптоз и межклеточные взаимодействия иммунокомпетентных клеток.

IL-4 является своеобразным маркером интенсивности протекания реакций гуморального иммунитета, однако его уровни увеличиваются в поздние периоды пародонтита и связаны с хроническим прогрессированием заболевания [432]. IL-4 регулирует секрецию TNF- α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливает цитотоксический потенциал макрофагов, индуцирует пролиферацию NK [225].

IFN- γ секретируется Th1-клетками и индуцирует продукцию макрофагами IL1 β , TNF- γ и PGE-2. Поэтому он является провоспалительным цитокином [10]. Однако IFN- γ также ингибирует остеокластогенез, влияя на RANKL-RANK сигнальные пути, что свидетельствует о его двойной роли. В настоящее время не ясно, каким образом IFN- γ участвует в деструкции тканей пародонта [219].

Наиболее изученные цитокины (IL-1- IL-7) [165] и TNF [421], используют свои углеводсвязывающие домены для распознавания специфических олигосахарид-лигандов [164]. Рецептор-связывающий участок IL-1 связывается с его родственным рецептором, а вторая область, локализованная напротив, взаимодействует с углеводом. Например, IL-1 α и IL-1 β отличаются друг от друга механизмами связывания углевода. В то время как IL-1 α связывает N-гликан с двумя α -2-3-звенными остатками сиаловой кислоты, IL-1 β распознаёт α 2-3-сиаилированные β -галактозил-церамиды, у которых имеются очень длинные и необычно длинноцепочечные основания [462]. Более того, некоторые липоолигосахариды видов *Haemophilus* являются сиаилированными, и они кодируют сиалилтрансферазы [316, 331].

Насколько известно, *A. actinomycetemcomitans* является единственным пародонтопатогеном, который способен и распознавать, и связывать IL-1 β . У

клинических штаммов этого вида наблюдался физиологический ответ на цитокины, выражавшийся в снижении метаболизма и увеличении массы биопленки [371]. Биопленки *A. actinomycetemcomitans*, культивируемые в модели органотипической слизистой десны, связывали IL-1 β , но использование антибиотиков во время их совместного культивирования ингибировало связывание IL-1 β [370]. Более того, эти виды, по-видимому, поглощают IL-1 β , так как этот цитокин был обнаружен в межклеточном пространстве этих бактерий [370]. Два внутриклеточных протеина (трехмерная форма субъединицы β -синтазы АТР и бактериальный подобный гистону протеин HU) могут взаимодействовать с IL-1 β человека [370, 371]. Взаимодействие интернализованного IL-1 β с ключевым протеином в выработке клеточной энергии и протеином HU, конденсирующим геномную ДНК, может объяснить описанные выше физиологические ответы *A. actinomycetemcomitans*. Эти результаты позволяют предположить, что жизнестойкие клетки *A. actinomycetemcomitans* обладают специфическим механизмом усваивания IL-1 β . Согласно результатам недавних исследований *A. actinomycetemcomitans* кодирует липопротеин внешней мембраны, специфичный к *Pasteurellaceae* и ответственный за взаимодействие с IL-1 β [370]. Помимо различных видов бактерий, герпес-вирусы и дрожжевые грибки, обнаруживаемые в биопленках поддесневых областей, могут распознавать и связывать цитокины, вырабатываемые организмом хозяина [113].

Протективная роль IL-17 при микробных инфекциях полости рта была выявлена в экспериментах на животных с дефицитом IL-17/IL-17R, которые чувствительны к кандидозу слизистых [443] и к заболеваниям пародонта [477].

Вначале IL-17A был выявлен в Т-лимфоцитах [318], хотя при последующих исследованиях было показано, что их источником являются клетки других типов, включая $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты, НК, нейтрофилы, эозинофилы, LTi CD4 клетки [298] и тучные клетки [273]. IL-17A индуцирует продукцию цитокинов и факторов роста преимущественно с помощью сигнальных гетеродимеров IL-17RA и IL-17RC. IL-17A экспрессируется многими тканями,

особенно гемопоэтическими, а также эпителиальными клетками, эндотелием и фибробластами [224]. Оказалось, что IL-17 усиливает миграцию нейтрофилов в участок, инфицированный *P. gingivalis*. Однако на модели заболеваний пародонта у старых мышей было показано, что повышенные уровни IL-17 ассоциированы с избыточной инфильтрацией нейтрофилами из-за ингибирования развития эндотелиального локуса 1 (Dell) и стимулирования рекрутирования нейтрофилов при участии лимфоцитарного LFA-1 антигена [207]. То же показано и в отношении продукции IL-17 тучными клетками [346].

Поэтому можно предположить, что хотя IL-17 необходим для защиты поверхностей слизистых пародонта от потенциальных патогенов, избыточный ответ IL-17 может способствовать развитию заболеваний пародонта, что подтверждается работами многих исследователей в десневой жидкости [137, 445, 463], слюне [463], слюне и сыворотке крови при заболеваниях пародонта [196, 345, 367, 413].

Известен ряд работ, касающихся взаимоотношений биопленок и кишечного эпителия [39, 105, 107]. В них исследователи обсуждают, каким образом микроокружение в кишечнике модулирует адаптивный и врожденный иммунные ответы и координируется антигенпрезентирующими клетками. Иммунный гомеостаз полости рта можно объяснить подобным образом. В полости рта также обитают резиденты и патогены, которые формируют гомеостаз с эпителием [152, 153].

Это может быть обусловлено тем, что система врожденного иммунитета высокоактивна в здоровых тканях [103, 184]. Нарушение баланса в этой системе может оказывать вклад в разрушение тканей пародонта [369]. Также распознавание как резидентов, так и патогенов может инициировать врожденный иммунный ответ через TLR, которые распознают микробы [143]. А. Jose выявил четкие различия в ответе эпителиальных клеток после заражения комменсалами и патогенами. Эти данные согласуются с данными В. С. Dickinson и соавт. (2011) [192] и Y. Hasegawa с соавт. (2007) [259], которые изучали *in vitro* реакции десневого эпителия на патогены и резиденты. Резиденты полости рта *S.*

gordonii, а также *F. nucleatum* индуцировали транскриптом эпителиальных клеток менее значительно по сравнению с пародонтопатогенами *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*. Ограниченность этой работы была в том, что с эпителиальными клетками культивировали суспензию бактерий. Другие исследователи также выявили различный ответ эпителиальных клеток (секрецию цитокинов и хемокинов) на биопленки патогенов и резидентов [385]. Они также определили меньший уровень продукции IL-8 и IL1 α на *P. gingivalis* и *Streptococcus spp.* В настоящее время точно не известно, каким образом *S. mitis* взаимодействуют с системой врожденного иммунитета. Ранее было показано, что *S. mitis* значительно толерантны к β -дефензинам-2 человека и другим антимикробным пептидам [358, 366].

Кроме этого, *S. mitis* могут также модулировать экспрессию провоспалительного хемокина IL-8 [200]. Исходя из этого можно считать, что *S. mitis* в качестве полезного комменсала может дополнять иммунитет хозяина, поддерживая тканевой гомеостаз. С другой стороны биопленки смешанных патогенов и биопленки *P. gingivalis* обладают огромным числом факторов вирулентности, которые могут индуцировать врожденный иммунный ответ. *P. gingivalis* контактируют с эпителиальными клетками с помощью фимбрий и гингипаинов и проникают в клетки [239, 467]. ЛПС и его компонент липид А *P. gingivalis* индуцируют сильный ответ иммунной системы человека, поскольку связываются с комплексом TLR, способствуя секреции провоспалительных цитокинов эпителиальными клетками и клетками других типов [326]. Гингипаины *P. gingivalis* разрушают цитокины и сеть цитокиновых рецепторов хозяина, включая IL-1 β [420], INF- γ [478] и TNF- α [159]. Этим можно объяснить то, почему секреция данных цитокинов и хемокинов не коррелирует с экспрессией генов. Все эти факторы обуславливают патогенный потенциал *P. gingivalis*. Эпителиальные клетки не полностью защищают организм хозяина против действия налета, содержащего патогенные виды бактерий. В поддержании гомеостаза в области десен участвуют не только эпителиальные клетки, но и другие различные клетки, рецепторы и медиаторы воспаления.

Разные виды бактерий в составе зубной биопленки индуцируют различный цитокиновый профиль эпителиальных клеток десны, что может отражать их индивидуальную вирулентность или статус резидента. При этом *P. gingivalis* индуцируют высокие уровни IL1 β , *A. actinomycetemcomitans* — IL-8, *F. nucleatum* — IL1 β , IL-6, *S. gordonii* индуцировал минимальный хемокиновый ответ.

Для системы врожденного иммунитета характерен дифференцированный цитокиновый ответ на бактерии полости рта, высоко консервативные микробоассоциированные молекулярные паттерны (MAMP) которых распознаются с помощью паттерн-распознающих рецепторов, таких как TLR, NOD и GPCR [342]. Связывание этих рецепторов активирует сигнальные пути митоген-активизируемой протеиновой киназы (MAPK), которые индуцируют транслокацию транскрипционного ядерного фактора каппа — би (NF- κ B) и последующую регуляцию экспрессии цитокинов. Липополисахариды грамотрицательных бактерий *A. actinomycetemcomitans* и *F. nucleatum* проявляют свои биологические функции, взаимодействуя с TLR-4, а ЛПС *P. gingivalis*, пептидогликан и тейхоевые кислоты клеточной стенки грамположительных бактерий *S. gordonii* — TLR-2. Фимбрии *P. gingivalis* также могут активировать TLR-4, а гингипаины — через протеазоактивированные рецепторы (PAR). Более того, бактерии с инвазивным потенциалом *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *F. nucleatum* могут активировать цитозольные NOD. Комбинированный эффект этих взаимодействий может быть связан, хотя бы частично, со специфичностью ответа эпителиальных клеток на бактерии полости рта. При этом пародонтопатогенные виды бактерий индуцируют мощный воспалительный ответ, который в дальнейшем специализируется в соответствии со своими специфическими механизмами вирулентности, в то время как комменсалы индуцируют минимальный воспалительный ответ.

Все пародонтопатогены «красного комплекса» способны синергично колонизировать десневые эпителиальные клетки. Отмечена тенденция совместной локализации *P. gingivalis* и *T. denticola*. При отсутствии пародонтопатогенов «красного комплекса» десневой эпителий колонизируют

стрептококки, преимущественно *S. oralis*. Исходя из этого антагонизма, авторы полагают, что бактерии «красного комплекса» могут регулировать вирулентность биопленки, играющей роль в патогенезе пародонтита [453]. По данным С. С. Афанасьева с соавт. (2005) интерлейкины и интерфероны способны реагировать непосредственно с микробами, изменяя скорость их роста и биологические свойства, в том числе чувствительность к антибактериальным препаратам. Так, установлено, что TNF- α и IFN- γ повышали чувствительность штаммов *S. aureus*, *Enterobacter cloacae* и *E. coli* к использованным антибиотикам (бензилпенициллин, тетрациклин), а IFN- α 2, наоборот, снижал чувствительность этих бактерий к антибиотикам, то есть провоцировал устойчивость, блокируя даже совместное действие TNF- α и IFN- γ [9]

R. A. McLaughlin и A. J. Hoogewerf (2006) [340] представили доказательства того, что биопленки и планктонные бактерии по-разному реагируют на химические медиаторы. Так, биопленки *S. aureus* ATCC, обработанные 2 ng/mL IL-1 β в течение 6 часов, содержали в 2,5 раза больше клеток, чем необработанные биопленки. В планктонных культурах увеличения роста бактерий не наблюдалось. С помощью проточной цитометрии было показано, что IL-1 β связывался с 63% клеток биопленки, но только с 11% планктонных клеток. Авторы считают, что бактерии в биопленке ускользают от защитных реакций организма человека, размножаясь более быстро при выделении медиаторов воспаления активированными протективными клетками.

Staphylococcus aureus вызывают стойкие инфекции и формируют резистентные биопленки. Механизмы устойчивости биопленок к защитным реакциям организма могут включать изменения в экспрессии генов, которые обеспечивают реактивность к химическим медиаторам. Так как биопленки более похожи на рост *in vivo* и участвуют в формировании стойких инфекций, можно предположить, что биопленки, но не планктонные клетки, должны были отвечать на цитокины. Авторы представили доказательства того, что биопленки и планктонные бактерии по-разному реагируют на химические медиаторы, и

считают, что бактерии в биопленке ускользают от защитных реакций организма человека, размножаясь более быстро при выделении медиаторов воспаления активированными защитными клетками организма хозяина.

Как свидетельствуют работы последних лет, весьма важную роль в развитии хронической инфекционной патологии играют Toll-like-рецепторы (TLR) и их экспрессия. С помощью методик транскриптомного анализа установлено, что бактерии пародонтопатогенной группы индуцируют как бы «общее ядро» генов, которые регулируются разными путями, но кодируют воспалительный ответ, причем вариабельные участки генов могут быть связаны с специфическими клеточными ответами на патогены [294].

Два ключевых компонента пародонтальной биопленки представляют классический пример Th1-Th2 цитокинового антагонизма: HagB *P. gingivalis* запускают TLR4 (Th1 — опосредованный ответ), а BspA *T. forsythia* связываются с TLR2 (Th2 — ответ) [222, 353, 456]. По отдельности эти ответы могли бы быть полярными иммунными реакциями по отношению к особым субпопуляциям Т-лимфоцитов; одновременно они могли бы провоцировать иммунный паралич. Хотя эти механизмы четко различаются, общим признаком как опухолей, так и микробных биопленок является персистенция, устойчивая к терапевтическим мероприятиям [307].

В отношении других пародонтопатогенов показано, что *F. nucleatum* индуцируют Th3 (sIgA)- и Th1 (IFN γ и IgG1)-доминантные иммунные ответы, а *T. denticola* — Th1 (IFN γ и IgG1)-доминантные ответы. У больных ХП нарушена секреция IFN γ , при этом уровни IFN γ , индуцированные Td92 отрицательно коррелировали с деструкцией тканей пародонта [422]. V. Swaminathan с соавт. (2013) [442] показали, что стимуляция TLR-2 и TLR-4 специфическими лигандами индуцирует секрецию цитокинов с различной кинетикой и увеличивает экспрессию mRNA TLR-2 и TLR-4.

В серии элегантных экспериментов Т. Маекава с соавт. (2014) [327] показали, что *P. gingivalis* ингибирует киллинг бактерий нейтрофилами и в то же

время поддерживает сильный цитокиновый провоспалительный ответ. Эти процессы сопровождаются коактивацией TLR2 и C5aR в нейтрофилах. Важно отметить, что данная работа дает доказательства, хотя бы на мышинной модели, того, что активация P13K *P. gingivalis* не только усиливает собственную резистентность к фагоцитозу, но и другого представителя дентальной биопленки (ассоцианта) — *Fusobacterium nucleatum*. Более того, уже *in vivo* показано, что активация TLR2, C5aR и P13K может действительно оказывать вклад в увеличение общей микробной нагрузки, согласующейся с мнением о том, что *P. gingivalis* манипулирует этими клеточными ответами, чтобы изменить всё микробное сообщество. Эти данные представляют убедительное подтверждение, по крайней мере, на механистическом уровне, представления о том, что *P. gingivalis* взаимодействуют с организмом хозяина и могут создавать дисбионтное микробное сообщество в полости рта [185].

Также были выявлены этапные взаимодействия, обусловленные анаэробным пародонтопатогеном *P. gingivalis*: 1 — *P. gingivalis* деградирует MyD88 и препятствует киллингу нейтрофилами; 2 — *P. gingivalis* активирует P13K, который блокирует фагоцитоз и усиливает воспаление; 3 — взаимодействие между рецепторами комплемента C5aR и TLR2. Все перечисленные взаимодействия в итоге защищают *P. gingivalis* и бактерий-ассоциантов, провоцируя развитие дисбиоза.

Таким образом, *Porphyromonas gingivalis* могут нарушать иммунитет организма хозяина, ремоделируя нормальную симбионтную микрофлору в дисбионтное, провоцирующее заболевание состояние. Однако такие патогены также используют воспалительные процессы для существования в дисбиотических условиях. Каким образом эти бактерии избегают иммунитета при воспалении, пока непонятно. *P. gingivalis* ремоделирует микрофлору полости рта при участии комплемента. [185, 293]

1.7. Резюме

Представленные данные, полученные рядом зарубежных и отечественных исследователей, позволяют выделить пародонтопатогенные виды 1 порядка («красный комплекс») и 2 порядка («оранжевый» и частично «желтый комплекс»), а также ряд видов, встречающихся в полости рта постоянно, но количество которых резко возрастает при развитии пародонтита. К сожалению, пока отсутствует единая теория, объясняющая их роль в микроэкологии полости рта при заболевании и в его отсутствие; тем не менее в настоящем обзоре были представлены и обобщены наиболее принятые модели воспалительных заболеваний пародонта, основанные на взаимодействии бактерий-возбудителей и их симбионтов с организмом хозяина.

К пародонтопатогенам 1 порядка следует относить *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia*, для которых доказана возможность распространения в человеческой популяции по типу экзогенного инфекционного агента и выраженная тенденция к внутриклеточному паразитизму в десневом эпителии и тканях пародонта.

К пародонтопатогенам 2 порядка относятся грамотрицательные анаэробные бактерии: *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Wollinella recta*, а также грамположительные — *Streptococcus intermedius*, *Parvimonas micra*, некоторые представители рода *Actinomyces*.

Пародонтопатогенные бактерии, защищенные матриксом биопленки, несомненно, являются одним из важнейших депо генов и плазмид резистентности к современным антибактериальным препаратам, что требует изучения механизмов резистентности и разработки тестов для их определения [83, 94, 110].

При определении показаний для антибактериальной терапии и выборе антибиотика следует учитывать, что естественные модификации фенотипа микробных биопленок делают их резистентными к антибиотикам, а их матрица делает их резистентными к молекулам антимикробных веществ и воздействию

клеток, мобилизуемых организмом хозяина [83, 187, 303, 336]. Повышенное использование внедряемых в организм на постоянной основе медицинских приспособлений повысило вероятность стойких, связанных с установкой имплантатов инфекций, возбудители которых однозначно являются штаммами, образующими биопленки, и часто микроорганизмами (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Porphyromonas*, *Pseudomonas*, *Candida*), которые от природы резистентны к многим антибиотикам.

Как следует из представленного обзора литературы, бактерии являются несомненным основным этиологическим фактором, однако дальнейшее повреждение пародонтальных тканей и резорбция альвеолярной кости происходят за счет молекулярных факторов воспаления — цитокинов в ответ на внедрение патогенных бактерий [223]. Цитокины являются мощными (функционирующими в наномолярных концентрациях), избыточными (многие цитокины индуцируют один и тот же ответ), плейотропными (отдельные цитокины индуцируют множественные реакции) веществами, действующими локально между соседними клетками. Они могут индуцировать синергичный (усиливая) или антагонистический (ослабляя) биологический ответ. Считается, что ответ хозяина, опосредованный цитокинами, играет существенную роль в разрушении соединительной и костной ткани при пародонтите [106, 453].

В настоящее время усилия исследователей направлены на изучение связей характера микробиоты и различных вариантов иммунного ответа организма хозяина, включая реакции на уровне тканей (транскрипционные механизмы на уровне десневых тканей, протеомные и цитокиновые профили) [294]. В частности, это показано для основных провоспалительных цитокинов при заболеваниях пародонта у представителей славянского и коренного населения жителей Дагестана [5]. Это согласуется с данными об этнической гетерогенности распространения серотипов *A. actinomycetemcomitans* [297]. Также известны литературные данные о том, что механическое удаление зубного налета приводило к снижению содержания IL-17 в десневой жидкости у китайцев, больных ХП, при этом уровни IFN- γ и IL-10 оставались неизменными. У

индейцев IL-17 в десневой жидкости в аналогичной ситуации не выявляли. О. А. Зориной с соавт. [36] при конструировании тест-систем для молекулярногенетического картирования SNP (single nucleotide polymorphisms) с использованием принципа «примыкающих зондов» у 171 больного агрессивным пародонтитом установлено, что ген, кодирующий рецептор лептина LEPR в позиции rs1137101, может опосредованно влиять на восприимчивость индивидуума к пародонтопатогенам и, таким образом, способствует развитию агрессивных форм пародонтита.

По всей видимости, важнейшим фактором, роль которого всё еще недостаточно изучена при заболеваниях пародонта, является включение в ответ на пародонтопатогенную биопленку компонентов врожденного иммунитета, в частности, Toll-like-рецепторов [330]. Именно активация TLR приводит к синтезу провоспалительных цитокинов. При этом ключевым событием является синтез цитокинов IL-1, IL-6, TNF- α и хемокинов, стимулирующих последующие события в развитии воспалительных реакций, обеспечивающих включение цитокинового каскада в виде всеерного расширения активации различных типов клеток (лейкоциты и лимфоциты, дендритные клетки, натуральные киллеры, фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки) [40, 84, 106].

В нашем обзоре представлены данные о существовании различий в направленности и выраженности иммунного ответа на биопленки, состоящие из патогенных или резидентных видов микробов в процессе их контакта с эпителиальными клетками. Хотя, как патогены, так и резиденты оказывают влияние на экспрессию и выделение хемокинов и цитокинов, патогены индуцируют более выраженную экспрессию и их секрецию эпителиальными клетками. Ведущими факторами развития воспаления при участии пародонтопатогенных бактерий являются молекулярные агенты врожденного иммунитета — цитокины и клеточные рецепторы TLR, изучение взаимосвязи которых с составом биопленки пародонта мы провели в иммунологической части нашей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн и объекты диссертационного исследования

Для выполнения цели и задач диссертационной работы мы провели изучение результатов клинического и лабораторного обследования 920 человек — пациентов пародонтологического (стоматологического) профиля за период времени с 2009 по 2015 г. Из них методом случайной выборки были рандомизированы 300 больных с воспалительными заболеваниями пародонта (хронический пародонтит, хронический катаральный гингивит, кандидассоциированный пародонтит) в возрасте от 18 до 59 лет (мужчин — 147, женщин — 153). Давность заболевания — от 3-х до 10-и лет (в среднем — 4,8 года). В контрольную группу включены 70 человек с интактным (здоровым) пародонтом и аналогичными гендерными характеристиками.

Все обратившиеся проживали в Москве или Московской области и давали информированное согласие на приеме у врача-стоматолога на проведение клинических и клинико-лабораторных исследований.

Клиническую часть исследования мы осуществляли в Клинико-диагностическом центре и Центре челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» при консультации Заслуженного врача Российской Федерации, доктора медицинских наук профессора С. Д. Арутюнова.

Лабораторную и экспериментальную части исследования проводили в лаборатории молекулярно-биологических исследований отдела фундаментальных исследований НИМСИ и лаборатории анаэробных инфекций кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии названного университета при консультации Заслуженного работника высшей школы Российской Федерации, доктора медицинских наук профессора В. Н. Царева.

Клиническая часть работы включала верификацию диагноза, согласно МКБ 10 по данным клинико-лабораторного обследования пациентов, включая выявление генетических маркеров бактерий пародонтопатогенных видов в исследуемом материале от пациентов (содержимом пародонтальных карманов), изучение чувствительности выделенных возбудителей к антибиотикам и генетических маркеров резистентности, а также изучение факторов врожденного иммунитета у обследованных людей, что позволило обосновать новые подходы к назначению антибактериальной и иммуностропной терапии соответственно.

Методическую основу экспериментальной части исследования составило сопоставление данных моделирования микробной биопленки с использованием современных методов микроскопии (сканирующей электронной, зондовой лазерной атомно-силовой), оценки микробной адгезии *in vitro* как начального этапа колонизации и оценки структуры биопленки в организме пациента.

Критерии включения в исследование:

пациенты обоих полов (мужчины, женщины), возраст 18–59 лет, верифицированные диагнозы по МКБ 10: **K05.31** — хронический (генерализованный) пародонтит (легкая, средняя, тяжелая степени), **K05.10** хронический (простой маргинальный) гингивит, **K05.38** — кандидассоциированный пародонтит (уточненный по этиологии хронический пародонтит); при отсутствии предшествующего лечения не менее 6 месяцев.

Критерии исключения из исследования:

другие воспалительные или дегенеративные заболевания полости рта, в частности острый гингивит, локализованные формы пародонтита, патологические виды прикуса, беременность, послеродовой период, наличие съемных ортопедических конструкций.

Критерии невключения в исследование:

возраст до 18 или более 60 лет, наличие острых воспалительных заболеваний или обострений хронических сопутствующих соматических заболеваний, а также соматических заболеваний в стадии декомпенсации, онкологических заболеваний.

По результатам сбора анамнеза, анкетирования, выяснения жалоб пациентов, объективного клинического, рентгенологического и комплексного лабораторного исследования мы сформировали следующие основные группы:

1 группа — пациенты с диагнозом «**хронический пародонтит**» — **ХП** (210 человек):

1а — с легкой степенью хронического пародонтита

(ХПЛ) — 70 человек;

1б — со средней степенью хронического пародонтита

(ХПС) — 70 человек;

1в — с тяжелой степенью хронического пародонтита

(ХПТ) — 70 человек;

2 группа — пациенты с диагнозом «**хронический гингивит**» — **ХГ** (50 человек);

3 группа — пациенты с диагнозом «**кандида-ассоциированный пародонтит**» — **КАП** (40 человек);

4 группа — **контрольная** — 70 человек со здоровым (интактным) пародонтом.

Данные о распределении обследованных пациентов по возрасту, гендерным параметрам, параметрам длительности и степени тяжести заболевания представлены в таблице 4. По данным анкетирования и сбора анамнеза, у значительной части пациентов (52–83%, в зависимости от группы) установлено наличие сопутствующих соматических заболеваний (таблица 5). Наиболее часто по результатам анкетирования мы выявляли патологию пищеварительного тракта (хронический гастрит, хронический неспецифический колит, хронический холецистит, язвенную болезнь желудка): в пределах от 72,8 (у 51 пациента) среди пациентов группы 1а (с ХПЛ) до 55,7% (у 39 пациентов) среди пациентов группы 1в (с ХПТ), причем частота патологии пищеварительной системы у больных группы 1в оказалась достоверно ниже, чем у больных группы 1а.

Таблица 4

Характеристика обследуемых групп пациентов по гендерным параметрам и степени тяжести болезней пародонта

Группа	Подгруппа	Степень тяжести пародонтита	Обследовано людей			Возраст		
			Всего	Мужчин	Женщин	Средний	Мин.	Макс.
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1-я: хронический пародонтит (ХП)	1а	ХПЛ — легкая	70	32	38	35,9 ± 2,4	18	49
	1б	ХПС — средняя	70	28	42	33,4 ± 2,0	18	56
	1в	ХПТ — тяжелая	70	36	34	43,7 ± 3,2	37	59
2-я: хронический гингивит (ХГ)	2	ХГ	50	26	24	29,4 ± 2,3	18	45
3-я: кандида-ассоциированный пародонтит (КАП)	3	КАП	40	25	15	31,4 ± 3,6	18	49
4-я: контрольная	4	-	70	38	32	26,9 ± 2,1	18	57
Итого:		-	370	185	185	31,5 ± 5,2	18	59
В том числе с патологией пародонта		-	300	147	153	32,4 ± 5,6	18	59

Таблица 5

Структура сопутствующих соматических заболеваний в группах сравнения

Группа Сопутствующие заболевания	Количество пациентов по группам					
	1а (ХПЛ) n — %	1б (ХПС) n — %	1в (ХПТ) n — %	группа 1 (всего ХП) n — %	группа 2 (ХГ) n — %	группа 3 (КАП) n — %
Пищеварительной системы	51 — 72,8	40 — 57,1	39 — 55,7*	130—61,9	24 — 48,0**	25 — 62,5#
Кардиоваскулярной системы	15 — 21,4	19 — 27,1	18 — 25,7	52 — 24,8	5 — 10,0**	10 — 25,0 #
Иммунопатология и аллергия	15 — 21,4	12 — 17,1	16 — 22,8	43 — 20,5	6 — 12,0	11 — 27,5 #
Респираторной системы	2 — 2,9	4 — 5,7	6 — 8,6	12 — 5,7	0 — 0	3 — 7,5
Костно-суставной системы	0 — 0	3 — 4,2	6 — 8,4	9 — 4,3	2 — 4,0	1 — 2,5
Урогенитальной системы	0 — 0	0 — 0	5 — 7,1	5 — 2,3	0 — 0	1 — 2,5
Эндокринной системы (диабет II типа)	0 — 0	1 — 1,4	2 — 2,8	3 — 1,4	0 — 0	0 — 0
Сочетанная патология 2–3 систем	27 — 38,6	20 — 28,6	28 — 40,0	75 — 35,7	3 — 6,0**	11–27,5 #
Без патологии других органов	13 — 18,6	12 — 17,1	9 — 12,8	34 — 16,2	24 — 48,0	14–35,0
Всего пациентов с сочетанной патологией по группам	57 — 81,4	58 — 82,9	61 — 87,2	176 — 83,8	26 — 52,0	26–65,0

* — различия статистически достоверны по сравнению с группой 1а;

** — различия статистически достоверны по сравнению с группой 1;

— различия статистически достоверны по сравнению с группой 2.

При ХГ частота патологии пищеварительной системы была достоверно ниже, чем при ХП, и составляла 48% (24 пациента), а при кандидассоциированном пародонтите (КАП) — 62% (25 пациентов) и статистически не отличалась от ХП, но была достоверно выше, чем при ХГ ($\chi^2_{\text{кор.}} = 4,48$, $p = 0,034$).

Патология сердца и сосудов (ХИБС, гипертоническая болезнь) встречалась примерно с одинаковой частотой среди обследованных пациентов с ХП (от 21,4 до 27,1%), аналогично — у больных КАП (25,0%) и примерно в 2 раза реже — у пациентов с ХГ (10,0%) человек.

Таким образом, установлено, что частота заболеваний сердечно-сосудистой системы у больных хроническим катаральным гингивитом была статистически достоверно значимо в 2,5 раза меньше, чем у больных ХП и КАП ($\chi^2_{\text{кор.}} = 5,04$, $p = 0,023$).

Отягченный аллергический анамнез установлен по данным анкетирования и опроса пациентов у 15 человек группы 1а (21,4%), 12 пациентов группы 1б (17,1%), 18 человек группы 1в (25,7%), то есть всего у 43 человек с ХП (20,5%), несколько ниже — у больных ХГ (12,0%) и примерно в 2 раза чаще — у пациентов с КАП (27,5%), причем разница была достоверной по сравнению с ХГ, но не с ХП.

Принципиальных различий частоты заболеваний системы органов дыхания, опорно-двигательной, мочеполовой и эндокринной в группах сравнения не выявлено. Частота сопутствующих заболеваний перечисленных систем была незначительной и составляла от 0 до 8,6% (единичные случаи).

Сочетанную соматическую патологию 2 и более систем органов диагностировали у 27 больных группы 1а (38,6%), у 20 — группы 1б (28,6%), у 28 — группы 1в (40,0%), а всего при ХП — у 75 пациентов, что составило 35,7%. Сочетанную соматическую патологию выявляли достоверно реже у больных ХГ (3 человека), что составило 6,0%. Напротив, статистически достоверно чаще, чем при ХГ (примерно в 4,5 раза), наблюдали сочетанную патологию нескольких систем органов при КАП (у 11 человек), что составило 27,5%.

Совсем не выявлено сопутствующей соматической патологии у 34 человек с ХП (16,2%), 24 пациентов с ХГ (48,0%) и 14 больных КАП (35,0%), при этом достоверные различия по группам также не выявлены.

2.2. Методы клинического обследования пациентов

Клинико-лабораторное обследование пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта было выполнено с учетом требований МКБ 10, Государственного стандарта и методических рекомендаций по обследованию стоматологических пациентов с заболеваниями пародонта, основанных на выявлении состояния гигиены полости рта, выраженности воспалительной реакции, рецессии десны, деструкции пародонта и резорбции кости зубных альвеол [17, 111].

При опросе пациентов в первую очередь выявляли жалобы на болезненность и кровоточивость десен, ощущение дискомфорта, подвижность зубов, образование десневых карманов, задержку пищи в них, выясняли анамнестические данные, определяли длительность заболевания, характер проводимого лечения и его эффективность.

Большинство пациентов с ХП и КАП предъявляли типичные для данной патологии жалобы:

- воспаление, болезненные ощущения и кровоточивость десен (особенно при чистке зубов и приеме жесткой пищи) (80%);
- образование десневых карманов и задержку пищи между зубами после еды (75%);
- ощущение подвижности зубов и изменение положения зубов в зубном ряду (75%);
- обнажение пришеечной области корней зубов, повышенную чувствительность к холодной и горячей пище, сладкому, кислому и др. вкусовым раздражителям (30%);

- прогрессирующую потерю зубов (50%);
- плохое пережевывание пищи (50%);
- неприятный запах во рту и при выдыхании (15%);
- гнойные выделения из десневых карманов (12%);
- жжение языка или десен было характерно для больных КАП (12%).

При ХГ по данным проведенного нами анкетирования на первое место выходили жалобы на неприятные ощущения со стороны десен, иногда болезненность десневых сосочков, покраснение и отечность края десны.

Диагноз обычно ставили при обращении пациента к врачу-стоматологу по поводу кариеса зубов или необходимости протезирования. Реже причиной обращения были типичные пародонтологические жалобы. Многие пациенты вообще не предъявляли жалоб.

Длительность заболевания при ХПЛ в среднем составила 4,8 года, около 9 лет — у пациентов с ХПС и ХПТ с сезонными периодическими обострениями. Практически во всех случаях обострение заболевания пародонта наблюдались 2–3 раза за год. Всем пациентам ранее была проведена традиционное пародонтологическое лечение: удаление мягких (зубной налет) и твердых (зубной камень) отложений, профессиональная гигиена (по показаниям — кюретаж пародонтальных карманов), а также противовоспалительная и антибактериальная терапия.

При осмотре полости рта выявляли признаки первичного или вторичного кариеса зубов и его осложнений почти у 100% пациентов, о чём свидетельствовало обнаружение кариозных полостей или полостей и частично разрушенных пломб. Определялись обильные наддесневые и поддесневые зубные отложения, чаще (у 75% пациентов) на нижних резцах (оральная поверхность), верхних молярах (вестибулярная поверхность), нижних молярах (язычная поверхность). Аномалии положения зубов выявлены у половины пациентов (50%), травматические узлы — у 40%.

Также наблюдались различные виды патологии прикуса, которые могли способствовать развитию патологии пародонта (28% пациентов). Со стороны мягких тканей выявлено: аномалии положения уздечки верхней губы (низкое прикрепление) — у 6%, уздечки нижней губы (высокое прикрепление) — у 24%, мелкое преддверие (полости рта) — у 16%. Признаки незначительного увеличения регионарных лимфоузлов, их болезненность выявлены у 32% пациентов с хроническими воспалительными процессами в тканях пародонта.

Обследование пациентов с заболеваниями пародонта включало: определение нозологической формы, степени тяжести (легкая, средняя, тяжелая), характера течения заболевания (обострение, ремиссия); выявление возможных факторов (общих и местных), которые могли способствовать развитию воспалительного процесса в пародонте. Как известно, традиционную основу объективных клинических параметров составляет индексная оценка состояния тканей пародонта, которая включает определение и расчет следующих общепринятых индексов [17, 81, 111]:

1. Упрощенного индекса гигиены ИГ (индекса Green — Vermillion).
2. Папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (ПМА) (индекса С. Parma).
3. Модифицированного индекса кровоточивости ИК (индекса Mulleman).
4. Пародонтального индекса ПИ (индекса A. Russel).
5. Определение глубины пародонтальных карманов ПК (пуговчатым зондом).
6. Определение патологической подвижности зубов (по Д. А. Энтину).
7. Проведение рентгенологического исследования (ортопантомограммы)

Учитывая, что индексная оценка состояния тканей пародонта, как известно, является международным стандартом мониторинга развития патологии пародонта и контроля эффективности различных методов лечения, в своем исследовании мы проводили анализ взаимосвязей и возможных корреляций между индексными оценками и микробиологическими, а также иммунологическими параметрами и выявленными нарушениями этих

параметров.

2.3. Характеристика стоматологических материалов

Для проведения данного исследования были выбраны наиболее распространенные в медицинской практике полимерные пластмассы для производства съемных зубных протезов и шинирования зубов на основе полиакриловых пластмасс марки «Фторакс» (Украина) и Temp Basic A1 95H16 (ZirkonZhan, Италия), сплав диоксида циркония (ZirkonZhan, Италия) состава ZrO_2 — 95,0%, Y_2O_3 — 4,0%, Al_2O_3 — < 1,0%, SiO_2 — 0,02%, Fe_2O_3 — 0,01%, Na_2O — 0,04%.

При исследовании решали две основные задачи:

1. Оценка первичной микробной адгезии тест-штаммов и дальнейшее формирование микробной биопленки;
2. Оценка колонизации шин из данных материалов, установленных пациентам для лечения заболеваний пародонта.

2.4. Характеристика штаммов микроорганизмов

Клинические изоляты грамотрицательных и грамположительных бактерий (*P. aeruginosa*, *S. aureus*), как наиболее значимые микроорганизмы в развитии различных воспалительных процессов, были выбраны для изучения процессов взаимодействия микроорганизмов с образцами пластмасс.

Для изучения адгезии и моделирования биопленки анаэробных бактерий использовали штаммы — клинические изоляты следующих видов бактерий: *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* (пародонтопатогенные виды 1 порядка), *Prevotella intermedia* и *Fusobacterium nucleatum* (пародонтопатогенные виды 2 порядка), *Streptococcus sanguinis*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* (представители резидентной микробиоты полости

рта), а также дрожжевых грибов *Candida albicans*.

В контрольных экспериментах использовали референтные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Candida albicans* NCTC 885-653 и *Candida Krusei* ATCC 24408.

Для модели экспериментального пародонтита у крыс в качестве кандидатного пробиотика использовали референтные штаммы *Veillonella parvula* ATCCTM 10790, *Veillonella dispar* 585/3, *Streptococcus salivarius* ATCC^R 13419 и *Streptococcus salivarius* K12.

2.5. Методы микроскопического исследования

2.5.1. Световая и иммунолюминесцентная микроскопия

Световую микроскопию осуществляли на исследовательском стереомикроскопе (для изучения колоний микроорганизмов, выросших на питательных средах) и микроскопе ECLIPSE 50i (Nicon, Япония) при использовании иммерсионного объектива. Данная микроскопическая техника позволяла проводить фотосъемку препаратов исследуемого материала (мазков чистых культур, колоний, содержимого пародонтального кармана и биопленок) на цифровую камеру, входящую в комплект микроскопа.

Для иммунологических исследований использовали люминесцентную микроскопию на данном микроскопе. В качестве исследуемого материала брали десневую жидкость и смывы из пародонтального кармана с помощью изотонического раствора хлорида натрия. Для идентификации клеточных рецепторов CD282 (TLR-2) / CD284 (TLR-4) использовали соответствующие моноклональные антитела меченные FITC. После фиксации параформальдегидом готовые препараты исследовали на микроскопе ECLIPSE 50i (Nicon, Япония) с увеличением в 1000 раз. Документировали свечение на цифровую камеру микроскопа.

2.5.2. Сканирующая электронная микроскопия

После инкубации образцы фиксировали 10%-ным раствором нейтрального формалина. Следует отметить, что в процессе подготовки образцов не применяли традиционное для СЭМ обезвоживание спиртами или ацетоном. Отсутствие дегидратации образцов позволило сохранить их нативную структуру и в частности — структуру экзоклеточного матрикса биопленок, на 90% состоящего из воды [256].

Поверхность образцов из полиакрила изучали также с использованием сканирующего электронного дулучевого микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума, при ускоряющих напряжениях 5 и ЮкУ, с предварительным напылением золотом (999) в установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc. USA).

2.5.3 Просвечивающая трансмиссионная электронная микроскопия

Для оценки морфофункционального состояния бактерий, длительно находившихся на поверхности искусственных материалов, было проведено ультраструктурное исследование соскобов биопленки. Образцы были приготовлены по общепринятой методике для исследования методом ультратонких срезов и проанализированы в просвечивающем электронном микроскопе JEM 100B (JEOL Japan).

Оценка жизнеспособности бактерий, сформировавших биопленку на сроках 1,5 и 3 мес., была проведена посредством посева бактериального налета с поверхности пластмасс в питательный бульон и на агаризованную среду LB (Luria-Bertani broth).

2.5.4. Сканирующая зондовая атомно-силовая микроскопия

В данной работе для исследований методом АСМ использовали зондовую нанолабораторию «Интегра Прима» (ЗАО «НТ-МДТ», Россия). Для получения изображения рельефа был использован метод полуконтактной сканирующей зондовой микроскопии [43, 56, 146]. Данный метод основан на взаимодействии с поверхностью колеблющегося на резонансной частоте кантиливера (лазерной иглы) с частотой несколько сотен кГц. При использовании данного метода контактное давление кантиливера на поверхность существенно меньше по сравнению с контактными методами [20]. Это позволяет проводить измерения на мягких и легко разрушающихся материалах (таблица 6).

Таблица 6

Основные характеристики зондового атомно-силового микроскопа и режимов работы при проведении экспериментального исследования

Параметры	Значения
Размер образца	до 100 мм — по диаметру, до 15 мм — по высоте
Масса образца	до 300 г
XY позиционирование образца	5 × 5 мм
Поле сканирования — X × Y × Z	100 × 100 × 10 мкм
Нелинейность с датчиками обратной связи (XY)	0,15%
Уровень шумов Z: СКВ в полосе 1000 Гц	0,06 нм ÷ 0,07 нм
Уровень шумов XY: СКВ в полосе 200 Гц	от 0,1 нм до ≤ 0,2 нм

2.6. Методы бактериологического исследования

2.6.1. Взятие материала для исследования

Материал забирали из десневой борозды или пародонтального кармана натошак, перед утренней чисткой зубов. В предшествующий период (2 месяца) исключалось применение каких-либо антибактериальных

химиотерапевтических препаратов или антисептических полосканий, ирригаторов. Для взятия материала использовали стандартный стерильный бумажный эндодонтический штифт (файл № 30), который помещали в десневую борозду или карман на 30 сек для сорбции жидкой части, а затем переносили в пробирку типа Errendorff с 0,5 мл полужидкой транспортной среды Эймса или Стюарта. Транспортировку проводили в специальных термоконтейнерах при температуре не выше -4°C в течение 12 часов (как правило, 3–4 часа).

2.6.2. Выделение чистых культур и их идентификация

Для количественного 4-секторного посева использовали методику по Мельникову — Царёву на 5%-ном кровяном гемин-агаре (5 мкг/мл гемина, 0,1 мкг/мл менадиона). Посевы в обязательном порядке помещали в анаэростаты (Himedia), заполняемые бескислородной газовой смесью стандартного состава (80% — азот, 10% — углекислый газ, 10% — водород). Редукцию остаточного кислорода осуществляли предварительно прогретым в сухожаровом шкафу (180°C , 60 мин) палладиевым катализатором. Последующий подсчет колоний после стандартного культивирования (в течение 7 суток при 37°C) проводили бинокулярным исследовательским стереомикроскопом (Nicon, Япония). Микробное число (результаты количественного исследования) выражали через колониеобразующие единицы — КОЕ/мл, или их десятичный логарифм.

При проведении культурального исследования и последующей идентификации выделенных чистых культур руководствовались общепринятыми правилами клинической анаэробной микробиологии, используя принятые алгоритмы [94, 101, 204].

Для идентификации выделенных культур использовали комплекс морфологических, культуральных, биохимических, хемотаксономических признаков, а при необходимости — ПЦР и РНК-профиль. Определение видовой принадлежности чистых культур анаэробных бактерий, микроаэрофильных стрептококков и грамотрицательных бактерий на основе оценки биохимических

свойств проводили также с использованием диагностических наборов API (Франция) и Roche (Германия).

2.6.3. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Для контроля фенотипа чувствительности к антибактериальным препаратам использовали традиционный диско-диффузионный метод Кирби — Бауэра, для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) исследуемых препаратов — кассетный микрометод [89]. Собственную модификацию данного метода применяли для определения чувствительности к антибиотикам однородных и смешанных биопленок в условиях текучих сред.

Проведение исследования для определения чувствительного фенотипа осуществляли по стандартному протоколу диско-диффузионного метода. Выполняли посев исследуемой культуры «газоном» при концентрации взвеси по стандарту мутности MacFarland 10^8 КОЕ/мл. Использовали стандартный агар для определения чувствительности фирмы Himedia Labs (Индия), для анаэробных бактерий — с 5% крови и 10 мг/л гемина. Затем на поверхность посева накладывали стандартные диски с антибиотиками, используя автоматический диспенсер фирмы Himedia Labs (Индия) и пластиковые чашки диаметром 90 и 100 мм. Учет результатов проводили после инкубации в термостате при 37 °C 24 час (для анаэробов — в анаэроостате до 7 суток). Для быстрого учета результатов и документирования полученных данных использовали автоматический счетчик колоний Scan 500 (Interscience) с компьютерным сопровождением регистрации данных.

При использовании диско-диффузионного и кассетного микрометодов для регистрации данных применяли также исследовательский стереомикроскоп (Nikon).

2.7. Изучение первичной микробной адгезии *in vitro*

Моделирование процесса первичной адгезии микроорганизмов к образцам полимеров и сплавов, используемых в стоматологии (для шинирования зубных рядов), проводили со штаммами микробов, относящихся к пародонтопатогенным видам, которые были выделены из пародонтальных карманов у больных пародонтитом: *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis*, а также дрожжевых грибов *Candida albicans*.

Указанные исследования выполнялись нами в бактериологической лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А. И. Евдокимова (разрешение главного государственного санитарного врача № 77.01.16.000. М.015177.11.09, г. Москва от 18.11.2009).

Идентификацию выделенных штаммов проводили с использованием протокола, рекомендованного для анаэробной бактериологической лаборатории с применением тест-систем API 20 A и API 20 Strep фирмы «БиоМерье» (Франция), а также по генетическим маркерам с помощью полимеразной цепной реакции [59, 102].

Для проведения методики оценки первичной адгезии идентичные исследуемые образцы стоматологических материалов размером 1 × 1 см помещали в чашку Петри; затем на поверхность наносили 100 мкл взвеси суточной культуры микроорганизмов тест-штаммов (рис. 2). Исходная густота взвеси бактерий составляла 10⁸ КОЕ/мл (0,5 ЕД по стандарту мутности McFarland); грибов — 10⁶ КОЕ/мл. Далее алгоритм действий соответствовал п. 2.6.2.

Процедура постановки эксперимента соответствовала стандартному протоколу [23, 48, 66] с незначительными модификациями, которые заключались в следующем. Для удаления не прилипших бактерий или дрожжей вначале образцы трижды отмывали в 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. Затем каждый образец помещали в отдельную пластиковую камеру, содержащую 1 мл стерильной питательной среды АС. Далее

пластиковые камеры с исследуемыми образцами обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне Ultra-Est-M (НПФ «Геософт», Россия) при частоте 60 кГц в течение 10 мин, что позволяло «снять» и перевести во взвешенное состояние те микробные клетки, которые вступили в первичную адгезию с поверхностью стоматологического материала (рис. 3).

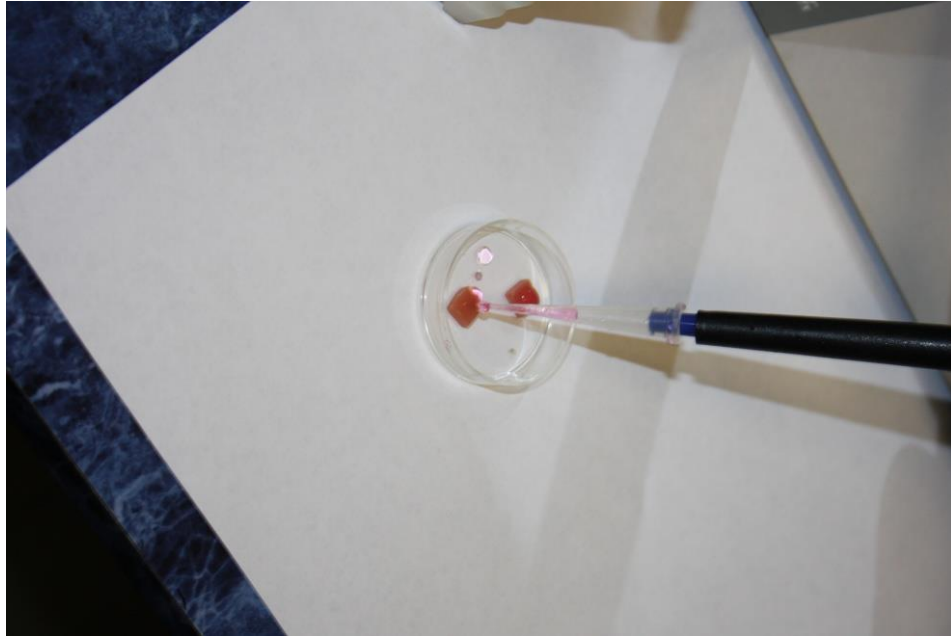


Рис. 2. Нанесение взвеси тест-культуры на образцы стоматологической пластмассы для шинирования зубных рядов



Рис. 3. Обработка образца стоматологической пластмассы с тест-культурой в ультразвуковой ванночке UltraEst-M («Геософт», РФ)

Затем из полученного смыва с образцов с помощью автоматической микропипетки проводили посев 100 мкл на 5%-ный кровяной гемин-агар на основе Columbia. Распределение материала проводили по поверхности питательной среды с помощью стерильной платиновой петли. Для исследования адгезии дрожжевых грибов использовали плотную среду Сабуро.

Полученные колонии подсчитывали и изучали с помощью исследовательского стереомикроскопа (Nikon, Япония) и на основании определения десятичного логарифма рассчитывали индекс первичной адгезии для каждого образца материала/тест-штамма по формуле, предложенной В. Н. Царёвым [23]:

$$Ia = IgA/IgN,$$

где ***Ia*** — индекс первичной адгезии; ***A*** — количество бактерий, прилипших к образцу; ***N*** — количество бактерий в смыве с образца.

2.8. Модель формирования микробной биопленки *in vitro*

Для формирования **однородной (моно-) биопленки** использовали традиционную методику моделирования биопленки на твердой подложке из акриловой пластмассы в прогрессивно истощающейся среде [309, 310] в нашей модификации, разработанной совместно с Л. В. Диденко в 2015 г. [25].

Динамика процесса взаимодействия микроорганизмов с полимерными материалами была изучена с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы полимеров (пластины размером 1 × 1 см) помещали в питательный LB-бульон (Luria-Bertani broth), в который предварительно засевали культуру бактерий в концентрации 10⁶/мл. Инкубацию образцов проводили при температуре 37 °С в течение 1, 2, 7 и 14 суток, а также в более отдаленные сроки — через 1,5 и 3 месяца. При инкубации образцов дополнительного внесения питательной среды не

производили, и таким образом стимулировали процесс образования биопленки в прогрессивно истощающейся среде [310].

Для формирования **смешанных биопленок**, особенно требовательных к субстратам, и облигатно-анаэробных видов микробов мы использовали модификацию методики, впервые предложенной R. Peuyala в 2011 — 2013 гг. [383, 384, 385], согласно которой предлагается культивировать пародонтопатогенные виды на монослое эпителиальных клеток *in vitro*, которые предварительно колонизировали оральными стрептококками (*Streptococcus mitis*). Затем к ним добавляли взвесь представителей промежуточных колонизаторов десны — фузобактерий и далее — пародонтопатогенные виды («сэндвич»). В литературе описано получение биопленок с использованием «сэндвич»-техники для 5–7 и даже 10 видов микробов [138, 139, 238, 345, 383, 399].

Мы моделировали *in vitro* трехкомпонентную биопленку — *Streptococcus sanguinis* + *Fusobacterium nucleatum/periodonticum* + *Porphyromonas gingivalis*. Учитывая, что биопленки в естественных условиях (природных биоценозов и в организме) образуются в условиях текучих сред, а микроорганизмы пародонтопатогенной группы являются анаэробами, мы поставили своей задачей воспроизведение движения жидкой питательной среды при одновременном создании анаэробных условий, что потребовало использования специальной техники культивирования (см. гл. 3).

2.9. Экспериментальная модель пародонтита *in vivo* на лабораторных животных (крысах)

Для проведения исследования мы использовали модель лигатурного пародонтита у крыс, которых после развития воспалительного процесса в десне поили взвесью эубиотических штаммов вейллонелл и стрептококков. Эксперименты проведены на 18 крысах Вистар (самцы) весом 220–250 граммов.

У всех животных под гексеналовым наркозом воспроизводили пародонтит путем связывания шелковой лигатуры в области шейки нижних резцов [18]. Через 14 дней, когда в области пародонта развился воспалительный процесс, лигатуру удаляли и крыс разделили на 2 группы: контрольную и опытную. В контрольной группе животные получали обычную водопроводную воду. В опытной группе в воду добавляли эубиотическую микрофлору анаэробно-микроаэрофильной группы — смесь референтных штаммов *Veillonella parvula* + *Streptococcus salivarius* (V+S). Густота взвеси обоих видов бактерий для колонизации составляла 10^8 КОЕ/мл в питательной среде АС (Oxoid).

В обеих группах исследовали микробную колонизацию слизистой оболочки десны для выяснения возможности колонизации, а также ее продолжительности после завершения приёма эубиотической взвеси V+S.

Крыс, взятых в эксперимент, обследовали бактериологическим методом с использованием техники анаэробного культивирования. Материал забирали из зоны предполагаемого наложения лигатуры (фоновые данные) в транспортную среду Стюарта, доставляли в лабораторию и выполняли количественный посев по Гольду на 5% кровяной агар с гемином. Чашки Петри с посевами инкубировали в анаэроостате 7 суток при 37 °С. До и после снятия лигатуры на 10-е и 20-е сутки у крыс обеих групп проводили исследование состава основных представителей микрофлоры в гнойном содержимом из очага воспаления с использованием бактериологического метода и техники анаэробного культивирования.

2.10. Прямое белковое профилирование штаммов анаэробных бактерий с помощью масс-спектрометрии 16S-рибосомальных белков

Для проведения масс-спектрометрического анализа использовали ионизационную пролетную MALDI-TOF спектрометрию на масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Метод использован для подтверждения идентичности кандидатных пробиотических штаммов *Veillonella parvula* и

Streptococcus salivarius в эксперименте.

При проведении исследований использовали параметры работы аппаратуры: линейный режим, частота импульсов — 10 Гц, детекция положительно заряженных ионов при ускоряющем напряжении — 20 кВ, с напряжением накапливающего электрода — 18,6 кВ, время задержки экстракции — 350 нсек.

Для получения результата каждый из образцов вносили в три ячейки планшета и регистрировали конечный спектр (500 имп. лазера), который получали при суммировании 10 одиночных спектров по 50 имп. лазера. Для внешней калибровки использовали точные значения масс известных белков *E. coli* DH5@. Анализ полученных спектров проводился автоматически в программе flexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия).

2.11. Определение генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий и грибов кандиды с помощью мультиплексной ПЦР

Методика проведения полимеразной цепной реакции соответствовала медицинской технологии ФС № 2006/043-У, утвержденной федеральной службой «Росздравнадзор», которая включает следующие основные этапы.

2.11.1. Взятие образцов материала для ПЦР

Перед взятием материала у пациента наддесневые отложения (зубной налет) удаляли с помощью стерильных кюреток, а место отбора образца осушали стерильным ватным шариком.

Для взятия материала использовали стандартный стерильный бумажный эндодонтический штифт (файл № 30), который помещали на 30 сек. в десневую борозду или в наиболее глубокий участок ПК таким образом, чтобы был исключен контакт со слизистой оболочкой, поверхностью корня или коронки зуба. Далее штифт с сорбированным материалом вносили в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия в стерильной пластиковой пробирке

типа Eppendorff, Перемешивали содержимое пробирки, удаляли зонд [59].

Транспортировку проводили в специальных термоконтейнерах при температуре не выше -4°C в течение 12 ч (как правило, 3–4 ч).

2.11.2. Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали ускоренную пробоподготовку с набором реагентов НПФ «Генлаб» (РФ) согласно инструкции производителя.

2.11.3. Амплификация ДНК

При проведении ПЦР использовали две системы: «МультиДент-5» («ГенЛаб», Россия), которая позволяет выявить генетические маркеры трех пародонтопатогенных видов 1-го порядка (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*), и двух — 2-го порядка (*Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*) и MicroIDent+ (6 видов 2-го порядка, включая *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*).

Для проведения ПЦР исходную ДНК-полимеразу разводили соответствующим буфером до конечной активности 1 ед/мкл и аккуратно перемешивали пипетированием. В полипропиленовые пробирки емкостью 500 мкл помещали реакционную смесь — по 19 мкл и разведенную ДНК-полимеразу — по 1 мкл. Чтобы предотвратить испарение реакционной смеси, на пробки осторожно наслаивали вазелиновое масло в количестве 25 мкл.

В пробирку с отрицательным контролем (маркировка ОК) помещали 5 мкл ОК (под масло). В пробирку с положительным контролем (маркировка ПК) помещали 5 мкл ПК (под масло). В остальные пробирки (№ 1, 2, 3 ...) помещали ДНК, выделенную из исследуемого материала по 5 мкл (под масло).

Пробирки с пробами размещали в программируемом термостате (амплификатор «Терцик МС-2», производитель «ДНК-технология», г. Москва),

который был предварительно прогрет до температуры +95 °С, и далее проводили амплификацию при стандартном режиме «Матрица»:

- денатурацию осуществляли при +95 °С в течение 120 сек, 1 цикл;
- далее денатурацию осуществляли при +95 °С в течение 30 сек, отжиг проводился при +60 °С в течение 30 сек, синтез — при +72 °С в течение 40 сек, 33 цикла;
- синтез на конечной стадии проводили при +72 °С в течение 240 сек, 1 цикл.

2.11.4. Детекция продуктов амплификации

Для детекции клонированных образцов ДНК использовали гель-электрофорез в 1,6% агарозном геле при окрашивании этидием бромидом (Комплект для анализа продуктов ПЦР, НПФ «ГенЛаб»).

Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета с навеской буфера для электрофореза переносили в коническую колбу и добавляли 2000 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивали до полного растворения порошка. Приготовление агарозного геля проводили следующим образом: в термостойкую колбу добавляли 100 мл буфера для электрофореза и вносили содержимое одного пакета с агарозой (1,6 г). Расплавляли агарозу при нагревании на электрической плитке, добавляли 5 мкл этидиума бромида, осторожно перемешивали содержимое колбы равномерными вращательными движениями. Расплавленную агарозу охлаждали при комнатной температуре примерно до температуры +65 °С. Устанавливали гребенку на платформу для заливки гелей и заливали расплавленную агарозу в платформу так, чтобы толщина геля составляла примерно 4 мм. После застывания агарозы заливали поверхность геля буфером для электрофореза, осторожно вынимали гребенку, платформу с гелем переносили из ванночки в электрофоретическую камеру и заполняли ее буфером для электрофореза. В соответствующие лунки агарозного геля под буферный раствор вносили по 14 мкл амплифицированных образцов и проводили электрофорез при напряжении 120 V в течение 25–30 мин.

Электрофорез прекращали после того, как краска для электрофореза голубого цвета (ксиленцианол) отходила от старта не менее чем на 2 см, а краска желтого цвета (оранж G) — не менее чем на 7 см.

Для просмотра и фотографирования гелей использовали ультрафиолетовый трансиллюминатор TCP-25 M (Vilber Lourmat, Франция) с длиной волны 312 нм. В положительном контрольном образце определялось 5 светящихся полос розового цвета, размером 1000 п. н., 745 п. н., 512 п. н., 360 п. н., 197 п. н., соответственно фрагментам геномов *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*; в отрицательном контрольном образце эти полосы отсутствовали. В исследуемых образцах при положительном результате ПЦР определялось от одной до пяти светящихся полос, расположенных соответственно размеру генома на том же уровне, что и полосы в положительном контроле.

2.11.5 Обратная гибридизация ДНК

При определении пародонтопатогенов 2-го порядка использовали методику обратной гибридизации ДНК с помощью коммерческой системы Micro-IDent®plus (Hain Diagnostika, Германия). Перед проведением реакции нагревали встряхиваемую водяную баню и растворы реагентов 2 и 3 до 45 °С, все остальные растворы (кроме конъюгата) — до комнатной температуры.

После проведения реакции проявление цвета останавливали с помощью ополаскивания полосок, на которых осуществляли реакцию, бидистиллированной водой. После высушивания полосок на бумажном полотенце считывали результаты, пользуясь специальной картой считывания. Хранение проявленных полосок осуществляли в темноте.

Регистрацию результатов осуществляли следующим образом. Маркерную линию, расположенную на нижнем конце полоски, совмещали с черной линией в выемке карты считывания (рис. 4).

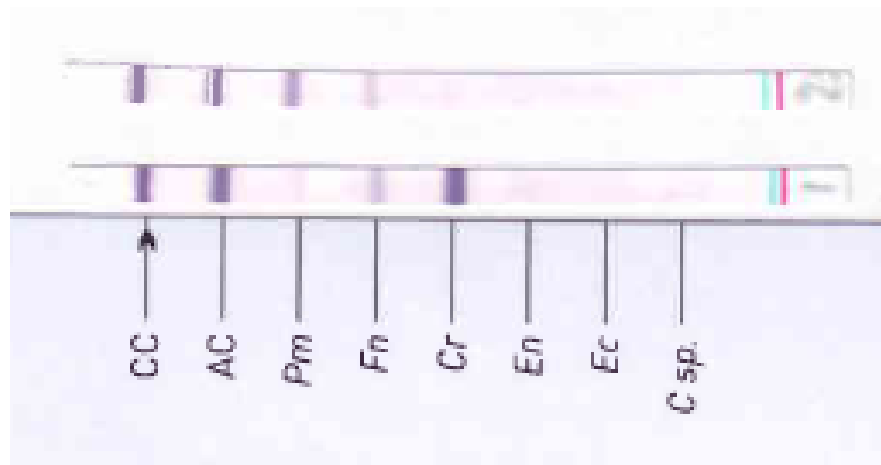


Рис. 4. Шаблон и результаты реакции обратной гибридизации

Обозначения: *Pm* — *P. micros*, *Fn* — *F. nucleatum / periodonticum*, *Cr* — *C. rectus*,
En — *E. nodatum*, *Ec* — *E. corrodens*,
C. sp. — *Capnocytophaga spp.* (*S.gingivalis*, *C.ochracea*, *C.sputigena*).

На каждой полоске присутствуют несколько реакционных зон, включая: контроль конъюгата (CC) – для подтверждения эффективности связывания конъюгата и реакции с субстратом (эта зона должна быть окрашена) и универсальный контроль (AC) – эта зона показывает, была ли ДНК очищена и амплифицирована.

2.12. Определение генетических маркеров резистентности к антибиотикам с помощью ПЦР

2.12.1. Взятие исследуемого материала и выделение ДНК проводили аналогично п. 2.11.1. или непосредственно из колоний микроорганизмов.

2.12.2. Идентификация ДНК с помощью ПЦР

Выявление устойчивости микробов к антибиотикам проводили с помощью наборов реактивов в комплектации OneStep производства НПФ «Литех» для обнаружения генетически обусловленной устойчивости микроорганизмов к антибиотикам методом ПЦР.

В образцах из пародонтальных карманов проводили идентификацию генов хромосомных участков *Mec*, *VanA*, *VanB*, *Clx-m*, *Erm*, *Tet*. Гены плазмид *Qnr A* и *B* определяли с помощью наборов реагентов НПФ «Генлаб» (Москва).

ДНК из исследуемого материала выделяли с помощью реагента ДНК-экспресс НПФ «Литех» (Москва). В пробирки с реактивом вносили по 100 мкл анализируемого материала и тщательно перемешивали на вортексе в течение 10 сек. Инкубировали пробирки в течение 20 мин в твердотельном термостате при 98 °С. Центрифугировали при 12 000 g при комнатной температуре в течение 30 сек. Супернатант использовали в качестве образца ДНК для постановки амплификации.

В пробирки с 20 мкл рабочей амплификационной смеси под слой масла вносили по 5 мкл образца ДНК из обработанной анализируемой пробы. В пробирку для положительных контрольных образцов вносили по 5 мкл положительного контрольного образца ДНК, а в пробирку с отрицательным контролем — разбавитель (5 мкл).

Анализируемые пробы помещали в прогретый термоциклер (амплификатор «Терцик МС-2», производитель «ДНК-технология», г. Москва) и осуществляли амплификацию по программам: 93°, пауза; 93°, 30 сек, 59°, 30 сек, 72°, 30 сек (35 циклов) на наличие генов — маркеров резистентности к цефалоспорином СТХ-М или 94°, пауза; 94°, 1 мин 30 сек (1 цикл); 94°, 10 сек, 64°, 10 сек, 72°, 40 сек (40 циклов); 72°, 2 мин (1 цикл) — к карбапенемам VIM, NDM, OXA-48; цефалоспорином *Mec A*; ванкомицину и тейкопланину *Van A* и *Van B*.

2.12.3. Детекция ДНК методом электрофореза

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза (в 2% агарозном геле). Для просмотра и фотографирования гелей использовали трансиллюминатор ТСП-25 М (Vilber Lourmat, Франция) с длиной волны излучения 312 нм.

В случае положительного контроля и при наличии в пробе гена-маркера должно быть видно две светящиеся полосы (таблица 7).

Таблица 7

**Перечень антибиотиков и размер генетических
продуктов при амплификации ДНК (п. н.)**

Ген резистентности к антибиотику:	Размеры фрагментов, п. н.	
	Положительный контроль	Внутренний контроль
Карбапенемам VIM	315	788
Карбапенемам NDM	303	788
Карбапенемам OXA-48	315	788
Цефалоспорином CTX-M	495	220
Цефалоспорином MecA	450	788
Гликопептидам: ванкомицину и тейкопланину VanA	256	788
Ванкомицину VanB	427	788

В отрицательном контрольном образце может присутствовать полоса внутреннего контроля, свидетельствующая о наличии в пробе ДНК.

Для документирования полученных результатов гели фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете цифровой видеокамерой, соединенной с компьютером (программное обеспечение Gel Imager, позволяющее анализировать видеоизображение).

2.13. Иммуноферментный анализ (твердофазный метод)

2.13.1. Иммуноферментный анализ содержания антител к грибам рода *Candida* в сыворотке крови

Исследуемым материалом являлась сыворотка венозной крови пациентов. Использовали готовые тест-системы НПФ «ГенЛаб» (РФ), содержащие реагенты для выявления IgM и IgG антител к *Candida albicans*, IgM и IgG антител к *Candida*

Krusei и IgG антител к родовому АГ дрожжевых грибов *Candida*. Для определения оптической плотности использовали многоканальный фотометр Multiscan (США), длина волны 492 нм (регистрацию проводили не позднее 10 мин с момента окончания реакции). Результаты исследований выражали в индексах иммуноферментной реакции (I, ЕД ИФА), рассчитываемых по формуле:

$$I = (E_{ан}/E_0) \times 100\%,$$

где $E_{ан}$ — величина оптической плотности анализируемой сыворотки; E_0 — величина оптической плотности сыворотки контрольного пула.

2.13.2. Иммуноферментный анализ содержания интерлейкинов в сыворотке крови и десневой жидкости

Определение цитокинов в сыворотке крови (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-17A и INF- γ) выполняли с использованием иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200 Readers (США). Содержание IL-1 β определяли набором реагентов А-8766 ИФА-БЕСТ, IL-6 — А-8767 ИФА-БЕСТ, IL-8 — А-8768 ИФА-БЕСТ и TNF- α — А-8756 альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ (НПФ «Вектор Бест», Россия). Количество IL-17A и INF- γ определяли с помощью набора реактивов HUMAN IL-17A (Nucult Biotech, Нидерланды)

Известно, что провоспалительные цитокины являются продуктами активированных макрофагов и определяются в сыворотке крови здоровых людей в очень низких концентрациях и с невысокой частотой выявления. Так, по данным Л. В. Ковальчука с соавт. [41], концентрация ИЛ-1 β у 40% здоровых лиц в среднем составляет около 12 пг/мл, а ФНО- α у 5% — 5 пг/мл.

Концентрацию цитокинов в десневой жидкости или содержимом пародонтального кармана (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-17A и INF- γ) определяли аналогичным образом, используя набор реактивов HUMAN IL-17A (Nucult Biotech, Нидерланды) и наборы производства «Вектор-Бест» (Россия).

Десневую жидкость (экссудат пародонтального кармана) отбирали с помощью бумажных эндодонтических штифтов стандартного размера (№ 30). Объем десневой жидкости определяли по разнице весов бумажного штифта до и после пропитывания по О. А. Ганковской [21].

Приготовление образцов

Эндодонтические бумажные штифты, пропитанные десневой жидкостью, помещали в стерильную пластиковую пробирку типа Eppendorf, содержащую 0,5 мл физиологического раствора. Перемешивали на вортексе в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 4 °С при 1500 об./мин. Супернатант переносили в полипропиленовые пробирки. Выделенные образцы хранили при –20 °С или использовали в постановке реакции. Перед постановкой реакции образцы выдерживали при комнатной температуре (18–25 °С), аккуратно перемешивали, избегая пенообразования, и разводили в 2000 раз.

Далее проводили постановку реакции по стандартной схеме. Для оценки результатов ИФА использовали иммуноферментный анализатора Stat Fax мод. 3200 Readers (США), 450 нм. Регистрацию проводили в течение 30 минут после остановки реакции.

Для интерпретации результатов рассчитывали среднюю абсорбцию у каждого дубликата стандартов, контролей и образцов. Допустимыми значениями отклонения в параллелях считались не более чем на 15% от соответствующих средних значений. В этом случае результат считали подозрительным и образец подвергали повторному исследованию.

2.13.3. Иммуноферментный анализ содержания дефензинов HNP 1-3 в сыворотке крови и десневой жидкости

Для определения HNP 1-3 в плазме периферической крови, выделенной из локтевой вены, и десневой жидкости, взятой в области зубодесневой борозды или пародонтальных карманов зубов 16, 25, 36 и 45 с помощью бумажных эндодонтических штифтов стандартного размера (№ 30), использовали

твердофазный метод ИФА с набором реагентов HUMAN HNP 1-3 (Nycult Biotech, Нидерланды) . Для определения объема десневой жидкости рассчитывали разницу веса бумажного штифта до и после сорбции жидкости десневой борозды или экссудата пародонтального кармана (за 30 секунд).

2.14. Определение количества лейкоцитов периферической крови и десневой жидкости

Для количественного определения лейкоцитов и определения лейкоцитарной формулы использовали традиционную методику подсчета в камере Горяева и мазке крови при окраске по Романовскому.

2.15. Определение функциональной активности нейтрофилов

Определение функциональной активности лейкоцитов осуществляли в периферической крови и десневой жидкости, используя методику выделения «оронейтрофилов». Для оценки функциональной активности применяли традиционный метод фагоцитоза латекса, опсонизированного иммуноглобулином IgG.

2.16. Иммунофенотипирование лейкоцитов и идентификация Toll-like-рецепторов на клетках десневой жидкости

В качестве исследуемого материала брали десневую жидкость и смывы из пародонтального кармана с помощью изотонического раствора хлорида натрия. Для идентификации клеточных рецепторов CD282 (TLR-2) / CD284 (TLR-4) использовали соответствующие моноклональные АТ, меченные FITC. После фиксации параформальдегидом готовые препараты исследовали в микроскопе ECLIPSE 50i (Nicon, Япония) с увеличением в 1000 раз. Документировали свечение на цифровую камеру микроскопа.

Для определения фенотипа лейкоцитов периферической крови использовали метод проточной лазерной цитофлуориметрии [84, 317]. Для этого в пробах смешивали 100 мкл венозной крови и 10 мкл АТ, меченных

флюоресцентными многоцветными красителями, против TLR2 (TLR2 IgG1 — FITC), CD14 — PE, CD45 — PerCP, CD19 — APC, CD3 — AF700 или TLR4 (TLR4 IgG1 — FITC) и CD14 — PE, CD45 — PerCP, CD19 — APC, CD3 — AF700. В пробы с отрицательным контролем добавляли АТ мыши, меченные FITC (IgG1 — FITC), а также АТ, меченные PE, PerCP, APC и AlexaFluor 700. Инкубировали 30 минут в темноте при температуре +4 °С. Для удаления эритроцитов использовали лизирующий буфер FACSlyse (BDBioscience) в количестве 2,0 мл (10 мин при комнатной температуре, в темноте). Затем проводили центрифугирование (500 g, 5 мин). Супернатант удаляли. После добавления к осадку (осажденным клеткам) 2,0 мл фосфатно-солевого буфера проводили отмывание клеточной взвеси центрифугированием дважды, после чего лейкоциты ресуспендировали и добавляли 0,5 мл фиксирующего буфера FACS CellFix (BD Bioscience).

Полученные пробы использовали для исследования на проточном цитометре FACSCanto 2, определяя экспрессию TLR2 и TLR4 на основных субпопуляциях Т-лимфоцитов (CD3⁺-Лф), В-лимфоцитов (CD19⁺-Лф), моноцитах (CD14⁺-Мн) и гранулоцитах (CD45^{dim}-Нф).

2.17. Статистические методы и критерии

В исследовании были использованы следующие статистические методы и критерии.

2.17.1. Диаграмма квантилей (Q-Q plot), позволяющая провести визуальную проверку нормальности распределения для всех наблюдений [46]. Соответственно наблюдениям можно построить диаграмму, на которой абсцисса *i*-й точки равна *i*-й порядковой статистике, ордината *i*-й точки — значению в *i*/*n* обратной функции стандартного нормального закона (*n* — размер выборки). В случае верности предположения о нормальности функции все точки должны хорошо укладываться в виде прямой линии.

2.17.2. Критерий Манна — Уитни позволял проверить однородность двух групп наблюдений и определить сумму рангов (порядковых номеров) наблюдений второй группы по отношению к первой в вариационном ряду [88]. Как метод непараметрической статистики (альтернатива параметрическому критерию t Стьюдента) использовался нами, когда не выполнялось предположение о нормальности распределения.

2.17.3. Критерий хи-квадрат использовали при проверке независимости признаков путем построения таблицы сопряженности признаков [46].

2.17.4. Двусторонний критерий Фишера использовали в тех случаях, когда в группе сравнения оказалось менее 5 наблюдений [88].

2.17.5. Величину относительного риска (RR) применяли для выявления наличия ассоциаций (взаимосвязей) исследуемых факторов с клиническими признаками. При этом вычисляли для него 95%-ный доверительный интервал (ДИ) и осуществляли проверку достоверности (p) отличия RR с использованием точного двустороннего теста Фишера для четырехпольных таблиц с поправкой на количество выявленных вариаций (p_{cor}) по методу Бонферони [127].

Все расчеты проводили с помощью пакетов SPSS v15 for Windows и STATISTICA 7.0. В таблицах и рисунках, представленных в нашей работе, значения N соответствует количество пациентов в группах сравнения, n — частота (встречаемости), % — относительная частота (доля от общего количества выборки), df — число степеней свободы, p — вероятность справедливости нулевой гипотезы, *, **, # — статистически достоверные отличия между сравниваемыми группами.

ГЛАВА 3.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

3.1. Экспериментальная модель формирования микробной биопленки in vitro

Динамика процесса взаимодействия микроорганизмов с полимерными материалами была изучена с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на моделях тест-штаммов грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosae*) по описанной выше методике (глава 2). Для оценки морфофункционального состояния бактерий, длительно находившихся на поверхности искусственных материалов, также было проведено ультраструктурное исследование соскобов биопленки с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM 100B (JEOL Japan).

В результате проведенного исследования для всех изученных образцов были установлены общие закономерности взаимодействия микроорганизмов с поверхностью пластмасс и процессы, связанные с формированием очагов бактериальной персистенции в искусственных материалах.

Поэтапно процесс взаимодействия микроорганизмов с поверхностью акриловых пластмасс может быть представлен следующим образом.

Первый этап — образование безмикробной пленки. На сканограммах образование безмикробной пленки соответствует появлению участков более высокой электронной плотности (рис. 5а, 5б). Данный этап является чрезвычайно важным для последующей успешной адгезии бактерий к пластмассам. Безмикробная пленка, состоящая из продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и компонентов питательной среды, меняет заряд поверхности с отрицательного на положительный, тем самым

обеспечивая отрицательно заряженным бактериям прикрепление к поверхности за счет сил электростатического взаимодействия [279].

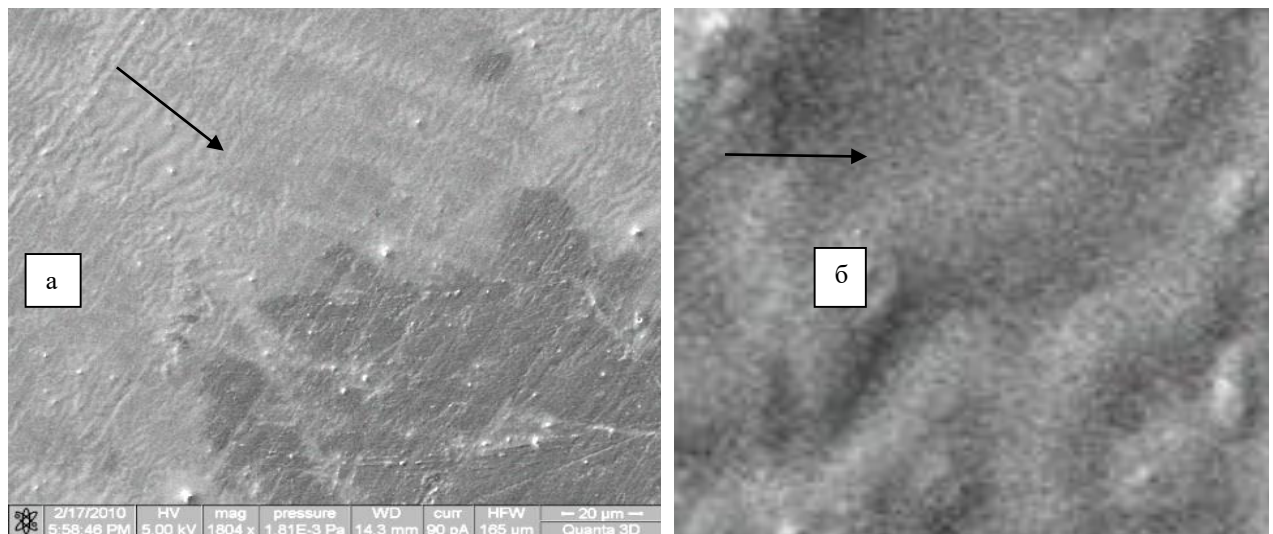


Рис. 5. Образование безмикробной пленки (а), ячеистое строение безмикробной пленки при большем увеличении (б) 24 часа инкубации

Второй этап — адгезия одиночных бактерий к поверхности (рис. 6а, 10а). Наиболее интенсивно бактерии адгезируются в области дефектов, образовавшихся при механической обработке материала. На ранних сроках инкубации (24 час) синегнойная палочка, у которой хорошо развит жгутиковый аппарат, адгезируется лучше, чем безжгутиковый стафилококк (рис. 6б, 10б).

Жгутики состоят из сократительных белков-флагеллинов, включающих спиральные нити толщиной 10–20 нм, крючок и базальное тело, что в совокупности обозначают как жгутиковый мотор, который обеспечивает движение бактерий к источнику питания, на поверхности которого могут быть особые химические соединения — аттрактанты [194]. Перитрихиальные жгутики осуществляют поступательное движение и «роение» клеток, а полярные могут обеспечивать и движение бактерий по поверхности [1]. У безжгутиковых бактерий реализация адгезии происходит посредством увеличения экспрессии поверхностных адгезинов

(белок Вар и экзополисахариды (PIA или PNAG), которые обеспечивают адгезию к субстрату и последующие взаимодействия между клетками [255,309].

На третьем этапе происходит образование микроколоний (деление и объединение бактериальных клеток в единую структуру). На этом этапе можно было видеть начало синтеза экзоклеточного матрикса, который объединяет бактерии и является облигатным признаком формирования биопленки (рис. 7а, 10в).

Четвертый этап — формирование зрелых биопленок с массивным экзоклеточным матриксом (рис. 7б, 8а, 8б, 10в).

Экзоклеточный матрикс, как правило, представлен гомо- и гетерополисахаридами, уроновыми кислотами, аминосохарами и их сополимерами, белками, нуклеиновыми кислотами, липополисахаридами, различными минералами (кальций, фосфор и в микродозах — магний, калий и натрий). Он выполняет защитную функцию и участвует в формировании смешанных биопленок, одновременно препятствуя диффузии бактерицидных агентов и действию различных повреждающих физических факторов, таких как облучение ультрафиолетовым спектром, изменение рН, осмотическое давление, температурный режим, высыхание [53, 183, 229, 264, 440].

Как видно на представленной фотографии, полученной с помощью СЭМ, от зрелых биопленок отшнуровывались особые структуры — номады, состоящие из бактерий, окруженных матриксом (рис. 7а). Кроме номад, на поверхности биопленок были видны бактерии с четкими контурами без покрытия массивным экзоклеточным матриксом. (рис. 7б). Очевидно, что номады и поверхностно локализованные бактерии обеспечивают популяции распространение в окружающей среде.

При длительной инкубации (1,5 и 3 мес.) синегнойная палочка и золотистый стафилококк находились на поверхности полимерных пластмасс в массивных биопленках. Биопленки могли фрагментарно

отслаиваться от поверхности и растрескиваться, при этом внутри биопленки визуализировались морфологически сохранные бактерии (рис. 8а, 8б). Возможно, растрескивание биопленки, так же как и номады, обеспечивает выход из нее жизнеспособных бактерий.

При длительной колонизации бактериями поверхности изученных полимеров происходит формирование дополнительных дефектов поверхности и увеличение объема ранее существовавших. Биодеструктивные изменения в пластмассах возникают в результате действия бактериальных эстераз (ферментов, расщепляющих эфирные связи полимеров) и продуктов их жизнедеятельности, в частности органических кислот [72, 269].

По-видимому, в дефектах пластмасс бактериальные биопленки способны к длительному сохранению, поскольку надежно защищены от агрессивного воздействия внешней среды (механического удаления, воздействия антибактериальных препаратов). В связи с этим можно обоснованно утверждать, что образованные на полимерных материалах биопленки обеспечивают длительную персистенцию патогенных для человека возбудителей, потенциально являясь очагами хронической инфекции. Следует отметить, что в реальной клинической ситуации наличие биопленок в полости рта, в состав которых может входить патогенная микрофлора, создает угрозу развития воспалительных процессов не только локального порядка, но и для всего организма в целом. Это связано с возможной миграцией защищенных экзополиматриком жизнеспособных бактерий в желудочно-кишечный и дыхательный тракты при глотании и вдыхании, а также диссеминации гематогенным и лимфогенным путем.

Анализ ультратонких срезов соскобов с поверхности пластмасс показал, что на ранних сроках инкубации до 14 суток в препарате были представлены в основном бактерии с сохраненной структурой, типичной для вегетативных форм бактерий, и незначительное количество форм

бактерий с дефектной клеточной стенкой (ДКС). С увеличением сроков инкубации в препаратах соотношение форм бактерий смещалось в сторону увеличения форм с ДКС, но сохранялись и бактерии в типичной вегетативной форме с признаками деления.

На основе этих данных можно заключить, что бактерии в формирующихся биопленках сохраняют жизнеспособные клетки, как в вегетативной форме, так и в формах с ДКС, способных к реверсии в типичные вегетативные формы.

Следует отметить и наличие лизированных бактерий в биопленках (рис 9а, 9б).

По существующим представлениям наличие лизированных бактерий в биопленке может быть результатом так называемого каннибализма или аутофагии. Аутофагические модели были описаны на молекулярном уровне у многих бактерий при нехватке питательных веществ в среде обитания. Некоторые бактерии в колонии начинают выделять в окружающую среду токсины, направленные на уничтожение тех бактерий в той же популяции, которые не производят антитоксины [227].

Продукция бактериями токсинов и антитоксинов рассматривается как фактор их персистенции в стрессовых для бактериальной популяции условиях [131].

Данные электронно-микроскопического исследования, свидетельствующие о морфофункциональной сохранности и соответственно жизнеспособности бактерий при длительном их нахождении на поверхности пластмасс в составе биопленок, были подтверждены бактериологически. Посев соскоба с поверхности биопленок пластмасс спустя 1.5 и 3 мес. инкубации показал наличие жизнеспособных бактерий в биопленках, образовывавших колонии.

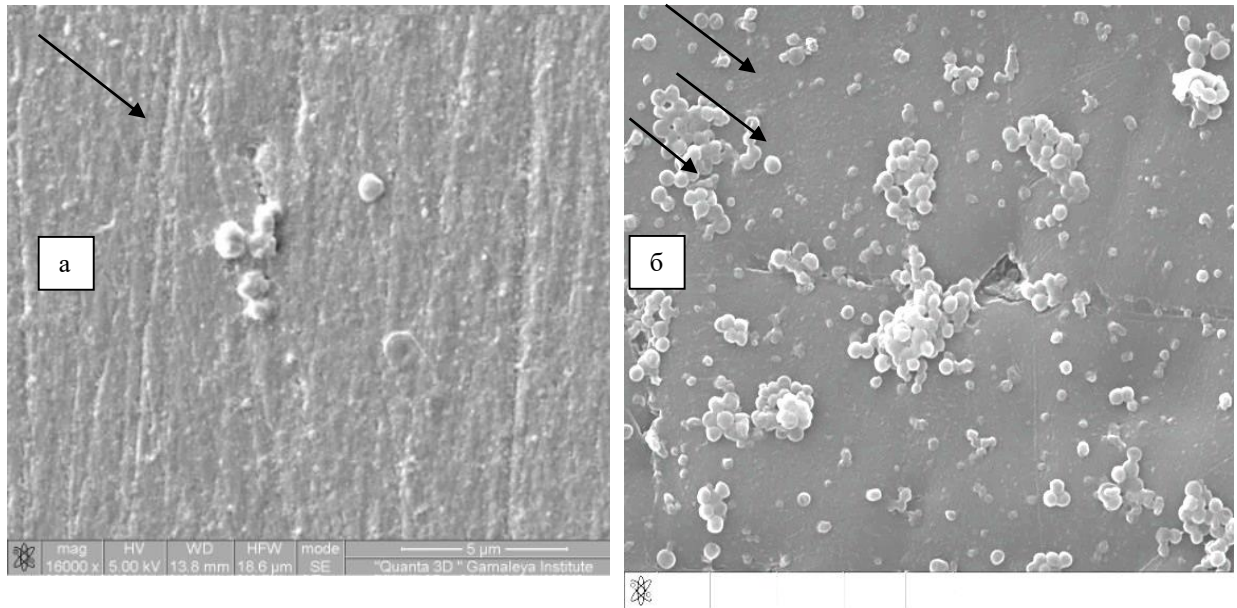


Рис. 6. Адгезия стафилококка и образование микроколоний через 24 часа (а) и 48 часов инкубации (б)

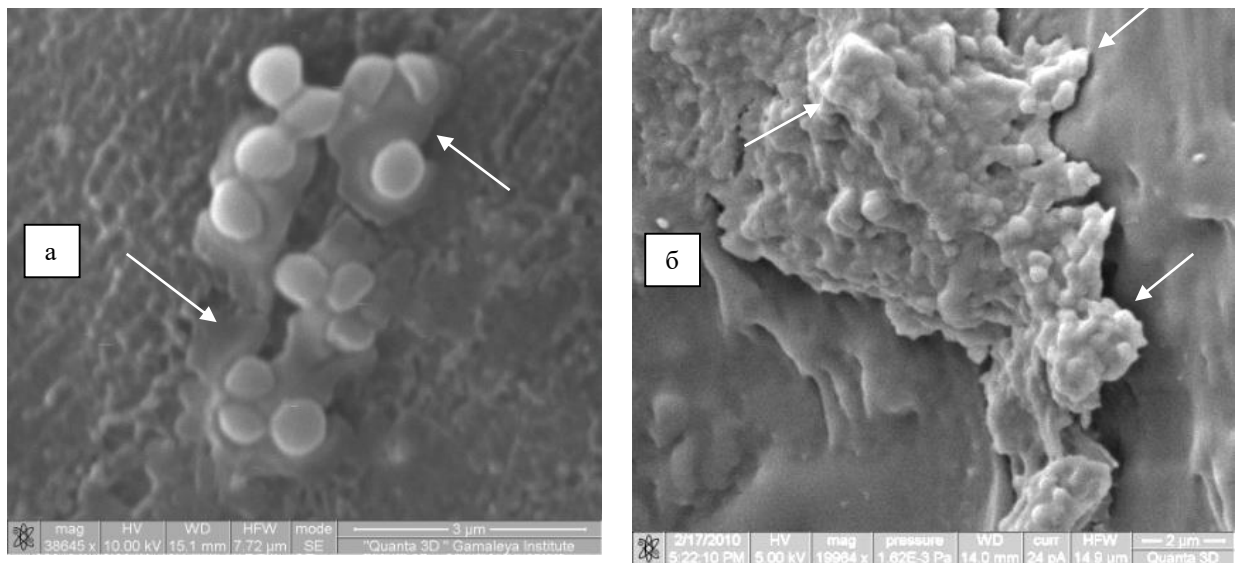
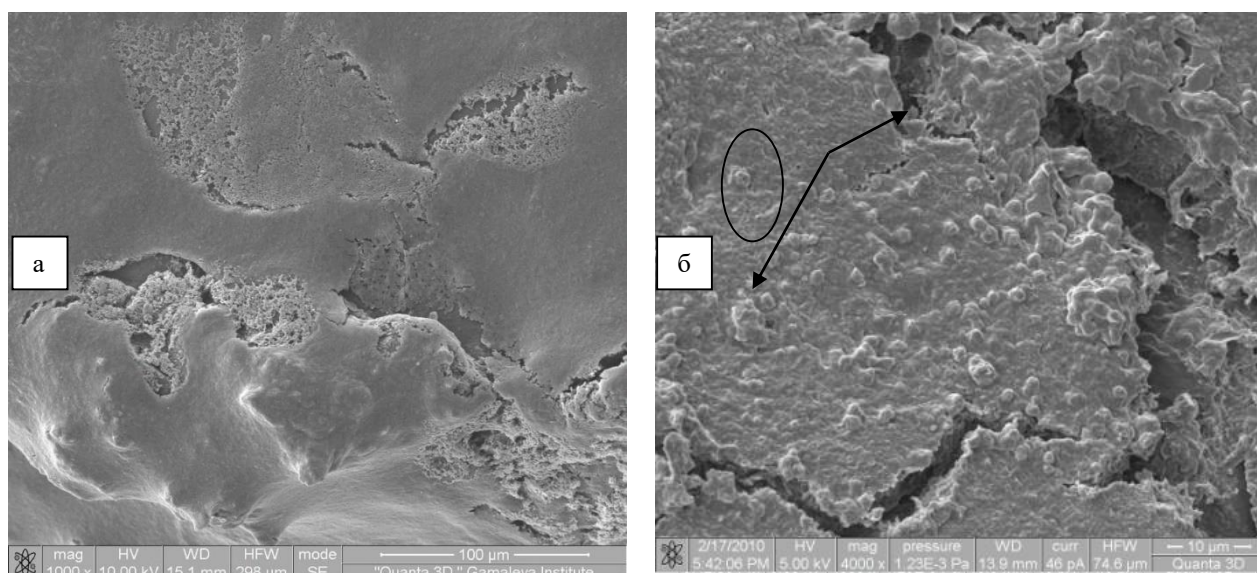


Рис. 7. Начало синтеза экзоклеточного матрикса↑ (а), зрелая биопленка с номадами ↑ (б)



**Рис. 8. Биопленка на поверхности пластмассы, 3 мес инкубации (а)
Растрескивание биопленки ↑, бактерии на поверхности ○ (б)**

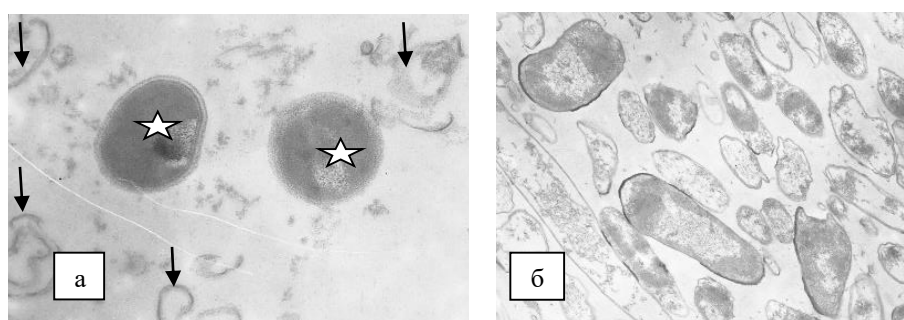
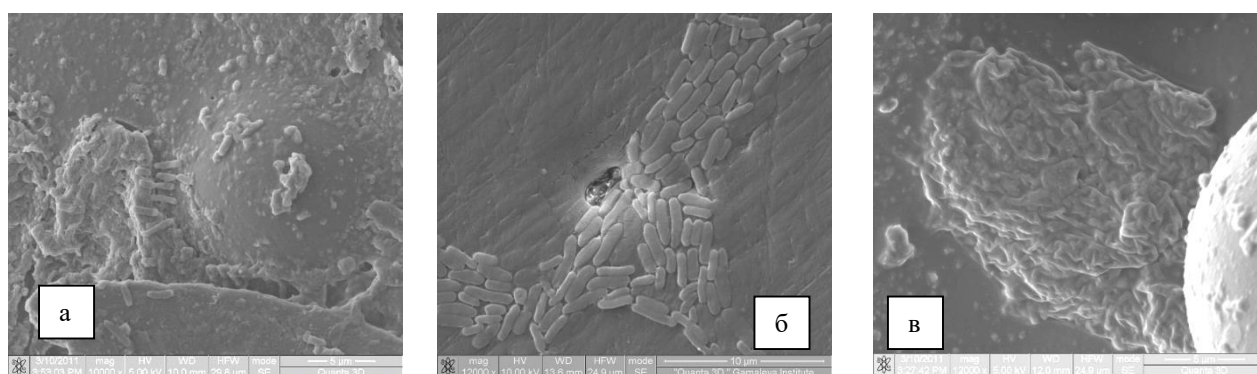


Рис. 9. Ультратонкие срезы: *S. aureus* (а), *P. aeruginosa* (б) — вегетативные клетки ☆, детрит ↑ 3 мес. инкубации

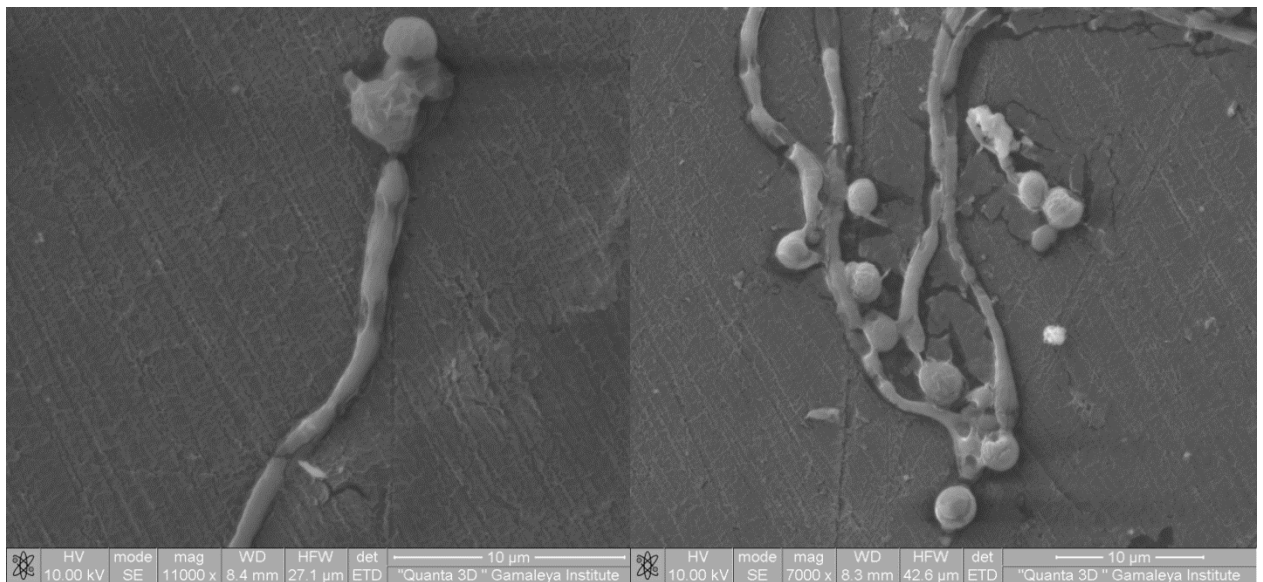


а — адгезия

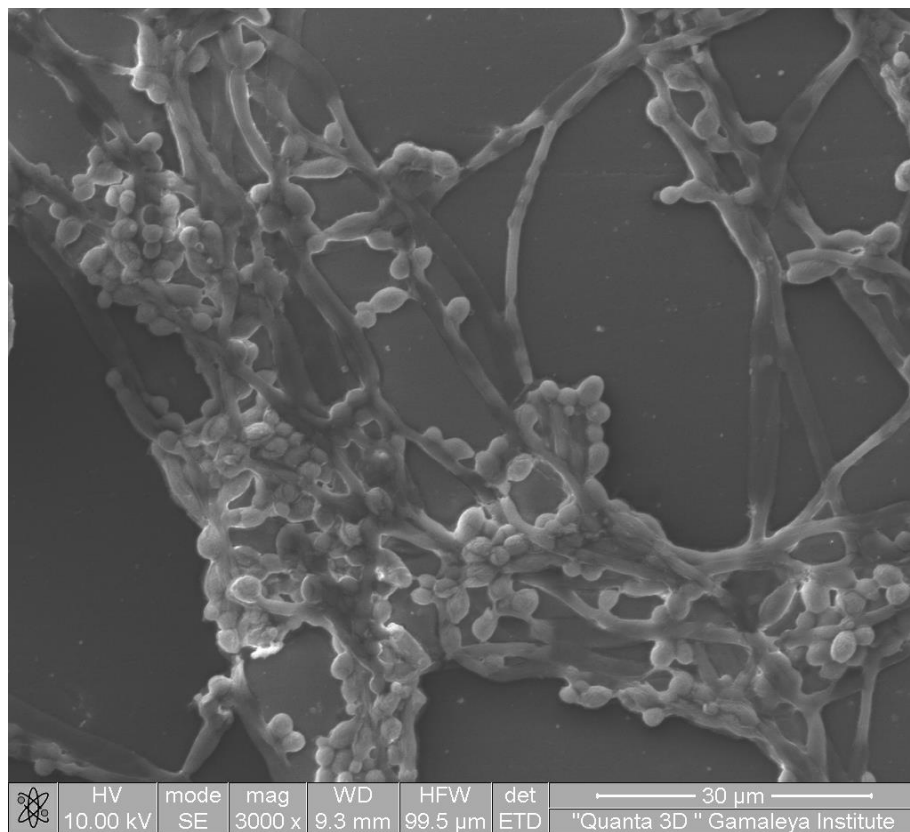
б — микроколонии

в — зрелая биопленка

Рис. 10. Этапы формирования биопленки *P. aeruginosa*



а — адгезия и ростовая трубка; б — микроколонии и бластоспоры



в — зрелая биопленка со сформированным псевдомицелием

Рис. 11. Этапы формирования биопленки *C. albicans*

На рис. 11 представлены этапы формирования биопленки дрожжевыми грибами *Candida albicans*, которые, на наш взгляд, отражают общие закономерности, выявленные у бактерий.

В эксперименте со штаммами дрожжевых грибов *Candida albicans* после адгезии на субстрате происходило образование ростовой трубки (11а), затем появлялись дочерние дрожжевые клетки — бластоспоры и нитевидные элементы, окруженные экзополимерным матриксом, хорошо различимым при большом увеличении (11б).

Особенностью этого процесса у дрожжевых грибов (эукариотов), в отличие от бактерий (прокариотов), является активное формирование псевдомицелия, который достаточно прочно связан с продуцируемыми полисахаридными компонентами матрикса (11в).

В известных моделях для получения **смешанных биопленок**, особенно требовательных к субстратам, и облигатно-анаэробных видов, которые были описаны R. Peuyala и другими зарубежными исследователями рекомендован принцип «сэндвич»-техники [138, 139, 238, 345, 383, 384, 385, 399]. На монослой эпителиальных клеток *in vitro* проводили посев так называемых «ранних колонизаторов», в качестве которых использовали микроаэрофильные стрептококки с высокими адгезивными свойствами — *Streptococcus mitis* или *Streptococcus oralis*. Затем к ним добавляли представителей «промежуточных колонизаторов» десны — фузобактерии — и далее — представителей пародонтопатогенных видов («сэндвич»).

Для решения задачи создания смешанной биопленки мы предложили сочетание методики «сэндвич» на твердой подложке с созданием искусственного тока жидкости в анаэробных условиях. Это позволяло моделировать такие важнейшие условия формирования природных биопленок, как влияние текучих сред и дефицит кислорода. В связи с этим мы использовали специальное оборудование — орбитальные шейкеры-инкубаторы, в которые помещали микроанаэростаты для выделения анаэробных видов (рис. 12).

Для получения биопленок в аэробных условиях было достаточно использовать шейкер-термостат для триацетатных или пластиковых кассет, в которых далее выращивали биопленки (рис. 13).



Рис. 12. Шейкер-инкубатор с установленным анаэроостатом для культивирования биопленок анаэробов в условиях текучей среды



Рис. 13. Шейкер-термостат с фиксированной пластиковой кассетой для культивирования биопленок аэробов в условиях текучей среды

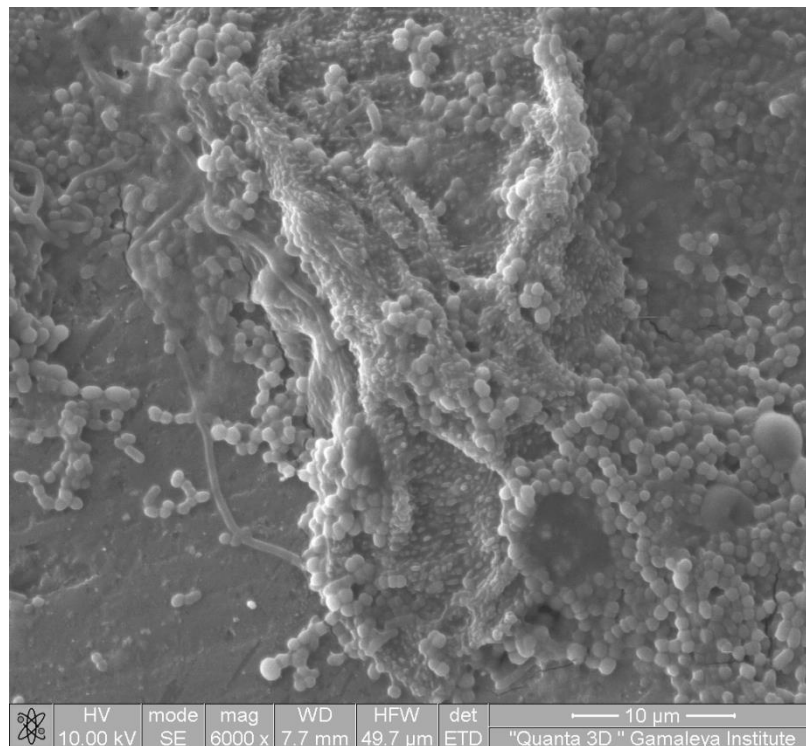


Рис. 14. Смоделированная сэндвич-био пленка на твердой акриловой подложке (*S. sanguinis*+*F. nucleatum*+*P.gingivalis*). СЭМ. Ув. 6000× раз

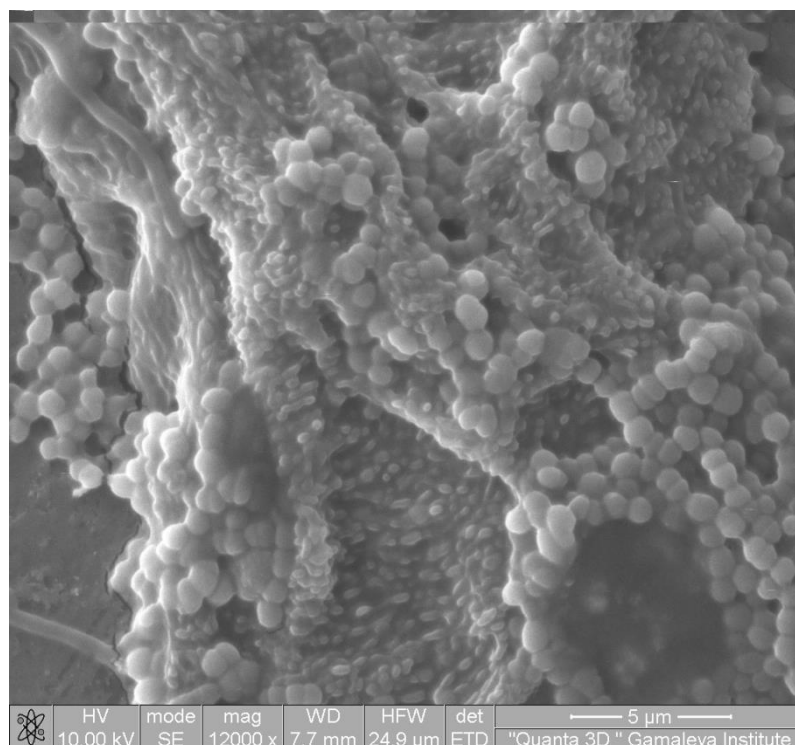


Рис. 15. Смоделированная сэндвич-био пленка на твердой акриловой подложке (*S. sanguinis*+*F. nucleatum*+*P.gingivalis*). СЭМ. Ув. 12 000× раз

Для получения смешанной биопленки в анаэробных условиях в лунки пластиковой полиакриловой кассеты (или триацетатной) помещали взвесь «раннего колонизатора» — *Streptococcus sanguinis* (10^9 КОЕ/мл), которую выращивали в течение 24 ч в среде АС (с гемином и менадионом). В качестве «промежуточного колонизатора» к ней добавляли взвесь *Fusobacterium nucleatum* (10^6 КОЕ/мл), после чего культивирование продолжали еще в течение 48 ч. На следующем этапе добавляли взвесь *Porphyromonas gingivalis* в максимально возможной концентрации (10^6 – 10^9 КОЕ/мл). Культивирование проводили до 5 суток в тех же условиях (анаэробноз, шейкер, 37 °C).

Полученные образцы биопленки на твердой подложке (полиакрилат, триацетат) использовали для СЭМ (см. главу 2). В результате проведенных экспериментов получена смешанная сэндвич-биопленка, представленная относительно послойно расположенными *Streptococcus sanguinis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, которая исследована нами при различном увеличении СЭМ (рис. 14, 15).

Данные микроскопического исследования, свидетельствующие о морфологической целостности и, соответственно, о жизнеспособности бактерий при длительном их нахождении на поверхности пластмасс в составе биопленок, также были подтверждены культуральным методом. Посев соскоба с поверхности биопленок пластмасс показал наличие жизнеспособных бактерий в биопленках на протяжении 1–1,5 мес. Наблюдения, в зависимости от объема взятой питательной среды для культивирования (рис. 16).



Рис. 16. Контрольный высев материала смоделированной биопленки на 5% кровяной гемин-агар. Видны пигментированные колонии *P. gingivalis*, непигментированные — *F. nucleatum*, *S. sanguinis*

Одним из важнейших факторов реализации процесса адгезии, по данным представленного нами обзора литературы, является шероховатость поверхности субстрата, на котором далее формируется биопленка. Учитывая, что различные ортопедические конструкции из пластмасс используются врачами-стоматологами для изготовления шин, удерживающих зубной ряд в процессе комплексного лечения пародонтита, а также для протезирования пациентов с дефектами зубного ряда, мы считали необходимым изучить особенности шероховатости поверхности с помощью атомно-силовой микроскопии.

3.2. Сравнительное изучение поверхности образцов стоматологических полимерных материалов и первичной адгезии в эксперименте *in vitro*

Особенности поверхности исследуемых материалов (гомогенность, шероховатость поверхности) изучены с помощью сканирующего атомно-силового микроскопа (типа «Aist-NT», Россия).

Для параллельного изучения первичной адгезии микроорганизмов (специфического прилипания к поверхности конструкционного материала для последующей колонизации и формирования биоплёнки) из исследуемого стоматологического материала — пластмассы типа «Полиметилметакрилат» — мы изготавливали пластины площадью 1 см², которые подвергали различным типам обработки с последующей отмывкой в дистиллированной (стерильной) воде. Перед постановкой теста первичной адгезии пластины облучали в ультрафиолетовом спектре и помещали для хранения в стерильные чашки Петри.

Для экспериментальной части работы мы использовали следующие образцы:

- 1) обработанные фрезой без полировки (контроль);
- 2) полированные в условиях зуботехнической лаборатории;
- 3) полированные в кабинете врача-стоматолога.

Сводные результаты по измерению шероховатости поверхности сравниваемых образцов исследуемого материала с применением атомно-силовой микроскопии приведены в таблице 8. Параметры шероховатости определяли по полученным изображениям поверхностей, при размере поля микроскопии 50 × 50 мкм.

С помощью атомно-силовой микроскопии установлено, что полированные образцы имеют на порядок меньшую шероховатость, чем образцы после фрезеровки. Поверхность всех образцов неоднородна, и параметры шероховатости поверхности на различных участках образца могут сильно отличаться, что отражается в измеренном стандартном отклонении.

На образцах после фрезеровки имеются неровности с определенным направлением, которое задается алгоритмом обработки образца и формой рабочей части фрезы. На полированных образцах на поверхности имеются неровности в виде выступающих частиц, которые могут быть связаны с плохим отводом продуктов износа при полировке или прилипанием частиц полировочной смеси к образцу. Наличие данных частиц приводит к увеличению разницы между среднеарифметической и среднеквадратичной шероховатостью.

Таблица 8

Параметры шероховатости поверхности образцов полиметилметакрилата с разными способами обработки (полировки)

Параметры	Обычная фрезеровка (контроль)	Полировка в зуботехнической лаборатории	Полировка в стоматологическом кабинете
Ra, нм	1270 ± 820	76 ± 47*	110 ± 64*
Rms, нм	1480 ± 880	125 ± 70*	166 ± 88*
Rz, нм	3830 ± 1140	920 ± 380*	990 ± 600*

Примечания:

В таблице указаны средние значения и после символа «±» — стандартное отклонение для данного значения.

* Различия достоверно ниже, чем в столбце «Контроль» ($P < 0,05$); достоверных различий между группами с полировкой нет.

Более детальное изучение образцов при атомно-силовой микрокопии (АСМ) показало, что в *образцах с «обычной» фрезеровкой* (рис. 17, 18) имеются глубокие канавки глубиной порядка 10 мкм и шагом около сотни микрометров. Поверхность канавки на дне и на склоне имеет микрорельеф с невысокой шероховатостью. Микрорельеф состоит из неровностей, которые имеют то же направление, что и канавка. Вероятно, данные неровности отражают форму фрезы, использованной для данного образца.

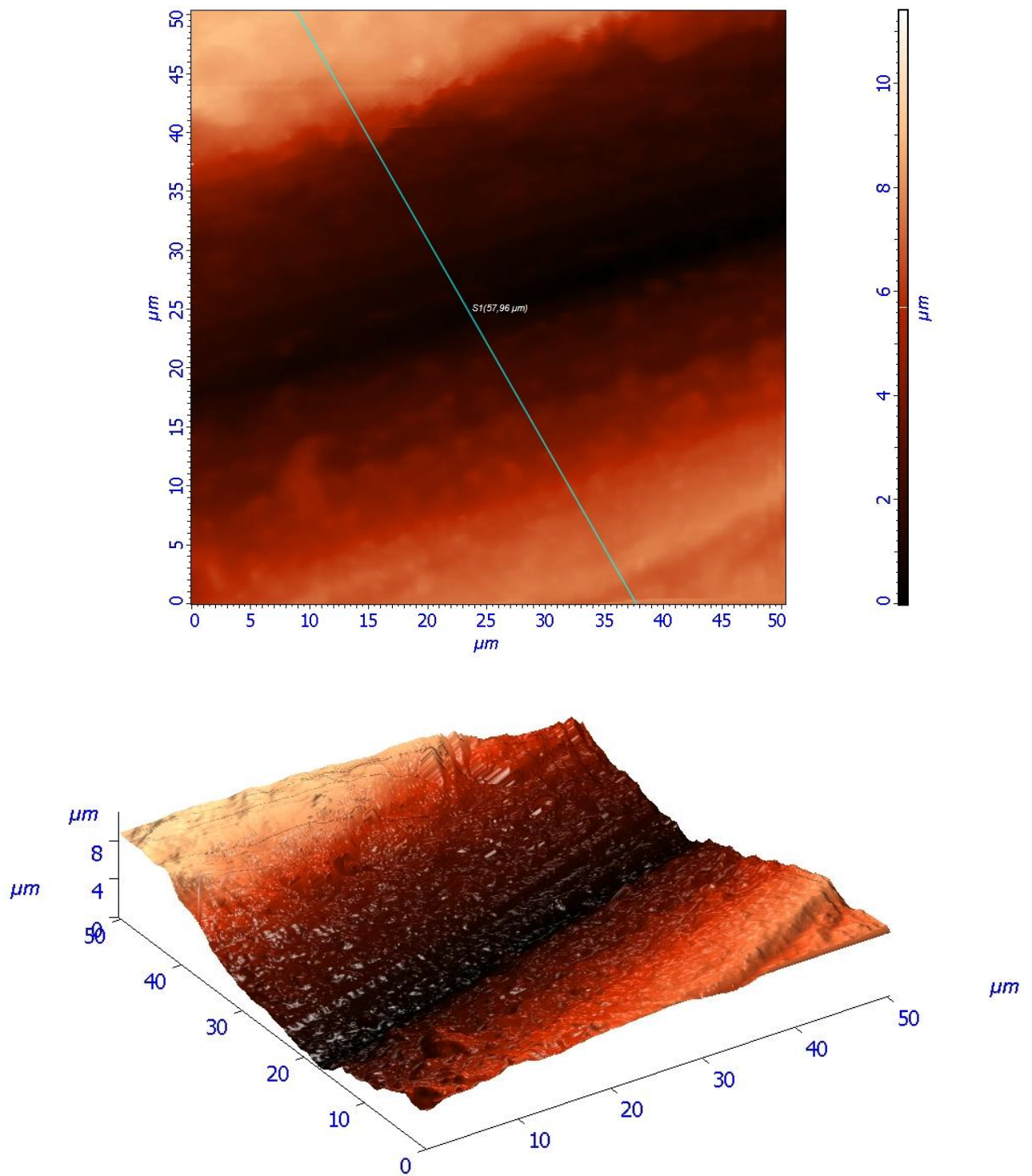


Рис. 17. Двумерное и соответствующее трехмерное представление рельефа поверхности образца после фрезеровки «обычной». Крайне высокий уровень шероховатости виден по оси ординат при шкале до 8 мкм. АСМ изображение

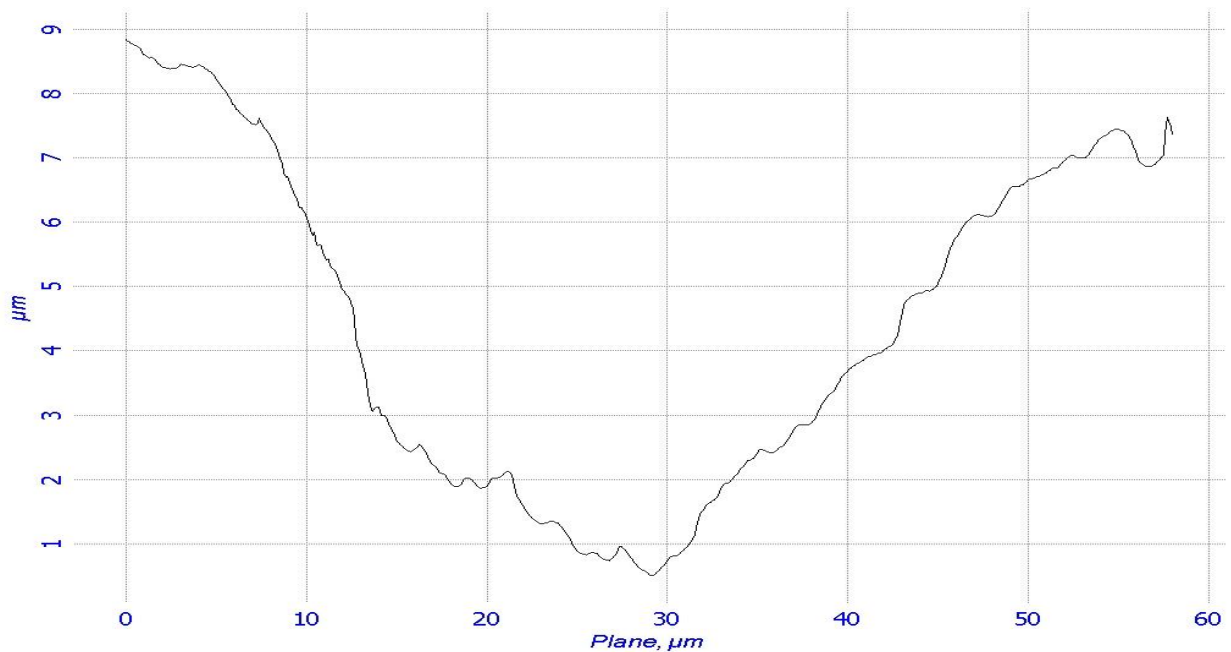


Рис. 18. Профиль сечения рельефа поверхности образца после фрезеровки «обычной». Параметры шероховатости: $R_a = 1270 \pm 820$ нм, $R_{ms} = 1480 \pm 880$ нм, $R_z = 3830 \pm 1140$ нм

Вероятно, дополнительная финишная обработка (очистка) поверхности может значительно уменьшить измеряемую шероховатость образцов за счет удаления выступов, представляющих собой одиночные частицы или их агломераты. Очевидно, что все эти факторы могут влиять на уровень первичной адгезии микроорганизмов при их контакте с данным видом базисного полимера (пластмассы) и последующее формирование микробной биоплёнки в клинических условиях и ее «агрессивность» для слизистой оболочки полости рта и пародонта.

Полученные нами цифровые данные, характеризующие первичную адгезию представителей пародонтопатогенной микрофлоры полости рта и дрожжевых грибов к образцам стоматологического материала с разными типами полировки, представлены в таблице 9.

Как видно из представленных данных, для базисного стоматологического материала «Полиметилметакрилат» отмечались принципиальные различия первичной адгезии бактериальной (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Streptococcus sanguis*) и грибковой (*Candida albicans*) микрофлоры, в том числе и в зависимости от способа полировки. В целом индексы адгезии к контрольным образцам после фрезеровки «обычной» соответствовали среднему уровню первичной адгезии, описанному ранее для анаэробных пародонтопатогенов (0,32–0,52) и дрожжевых грибов кандиды (0,59) и высокому уровню — для стрептококков (0,94) [7, 44, 99].

Различия по способам полировки также были нами отмечены, и в ряде случаев они были статистически достоверны, что соответствовало результатам, полученным с помощью атомно-силовой микроскопии.

Таблица 9

Индексы первичной адгезии анаэробных бактерий и дрожжевых грибов *in vitro* к исследуемым полимерным образцам с разной методикой полировки (I_a — индекс адгезии)

Образцы Штаммы	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Candida albicans</i>
Полировка в зуботехни- ческой лаборатории	0,43 ± 0,03*	0,22 ± 0,02**	0,90 ± 0,04	0,49 ± 0,03*
Полировка в кабинете врача- стоматолога	0,45 ± 0,03*	0,28 ± 0,02*	0,93 ± 0,04	0,51 ± 0,03*
Фреза, без полировки (контроль)	0,52 ± 0,02	0,32 ± 0,02*	0,94 ± 0,04	0,59 ± 0,03

Примечания:

* — показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с контрольными образцами (P < 0,05);

** — показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с другими опытными образцами (P < 0,05).

Хотя мы и наблюдали несколько иную картину в отношении образцов материала, обработанных разными способами (полированных), но общая закономерность, выявленная с контрольными образцами, сохранялась: более

низкий уровень адгезии отмечен у штамма фузобактерий, средний (умеренный) — у порфиромонас и грибов кандида, самый высокий — у микроаэрофильных стрептококков.

При исследовании адгезии тест-штаммов к образцам, *полированным в зуботехнической лаборатории*, отмеченная закономерность была аналогичной (рис. 19, 20). Индекс адгезии анаэробов и грибов составил от 0,22 (фузобактерии) до 0,49 (кандида). Более высокий уровень первичной адгезии продемонстрировали лишь микроаэрофильные стрептококки ($0,90 \pm 0,04$, $P < 0,05$ как по сравнению с контролем, так и по сравнению с другими видами полировки).

При атомно-силовой микроскопии отмечено, что на полированных образцах отсутствуют микронные неровности, характерные для фрезерованных образцов, то есть поверхность становится менее шероховатой. Однако на образцах, полированных в лаборатории, видны полосы от полировки глубиной в несколько десятков нанометров и шагом несколько микрометров. На поверхности присутствуют частицы, принимающие форму острых выступов — зазубрин на АСМ-изображении. Частицы собраны в агломераты и неоднородно распределены по поверхности образца. Данные частицы могут являться продуктами износа материала образца или частицами полировочной смеси. Такие частицы часто имеют невысокое сцепление с подложкой и легко отделяются от поверхности при слабом механическом взаимодействии.

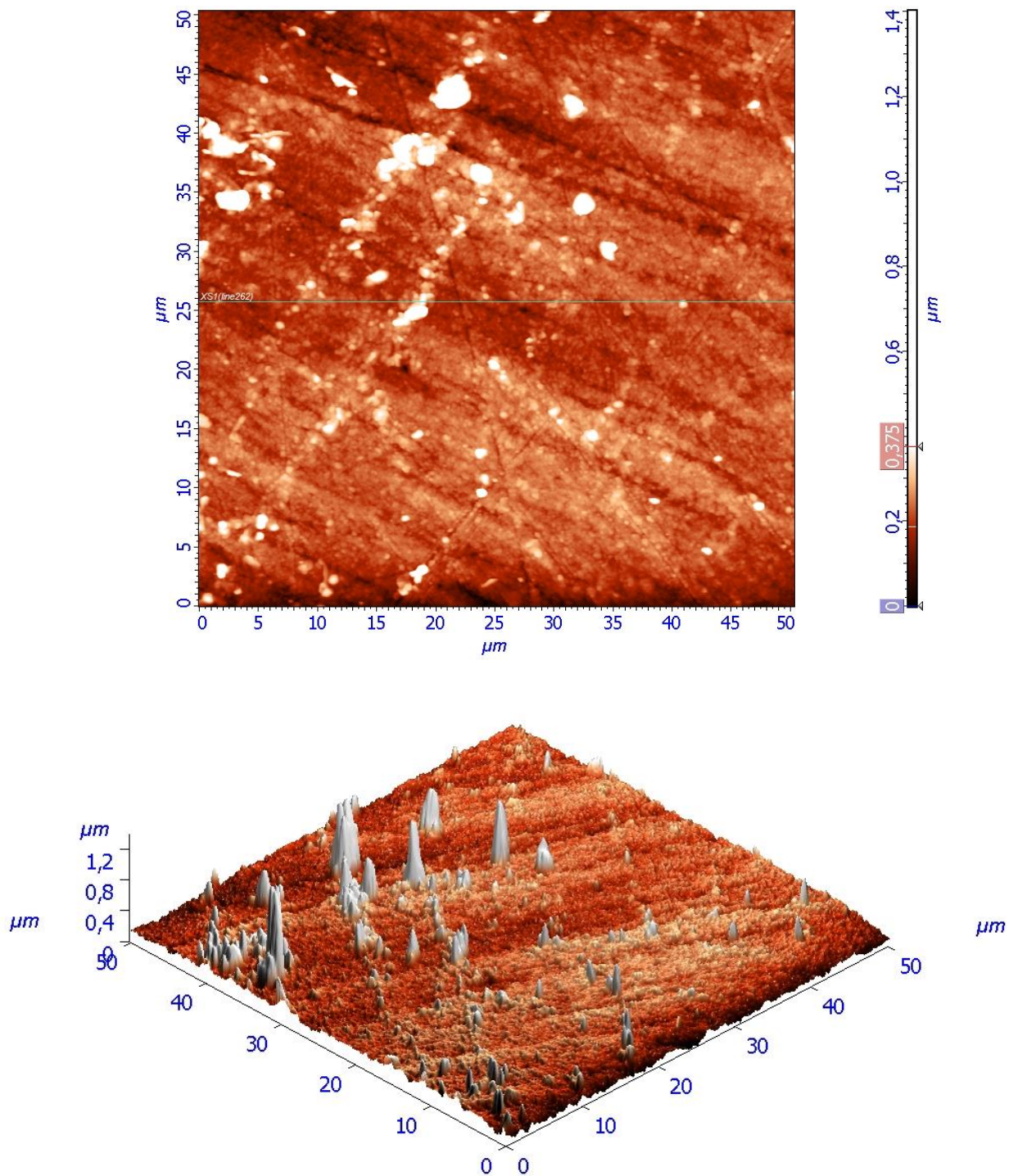


Рис. 19. Двумерное и соответствующее трехмерное представление рельефа поверхности образца полированного в лаборатории. Шероховатость поверхности выявляется при использовании высокого разрешения — по оси ординат шкала до 1,2 мкм. АСМ изображение

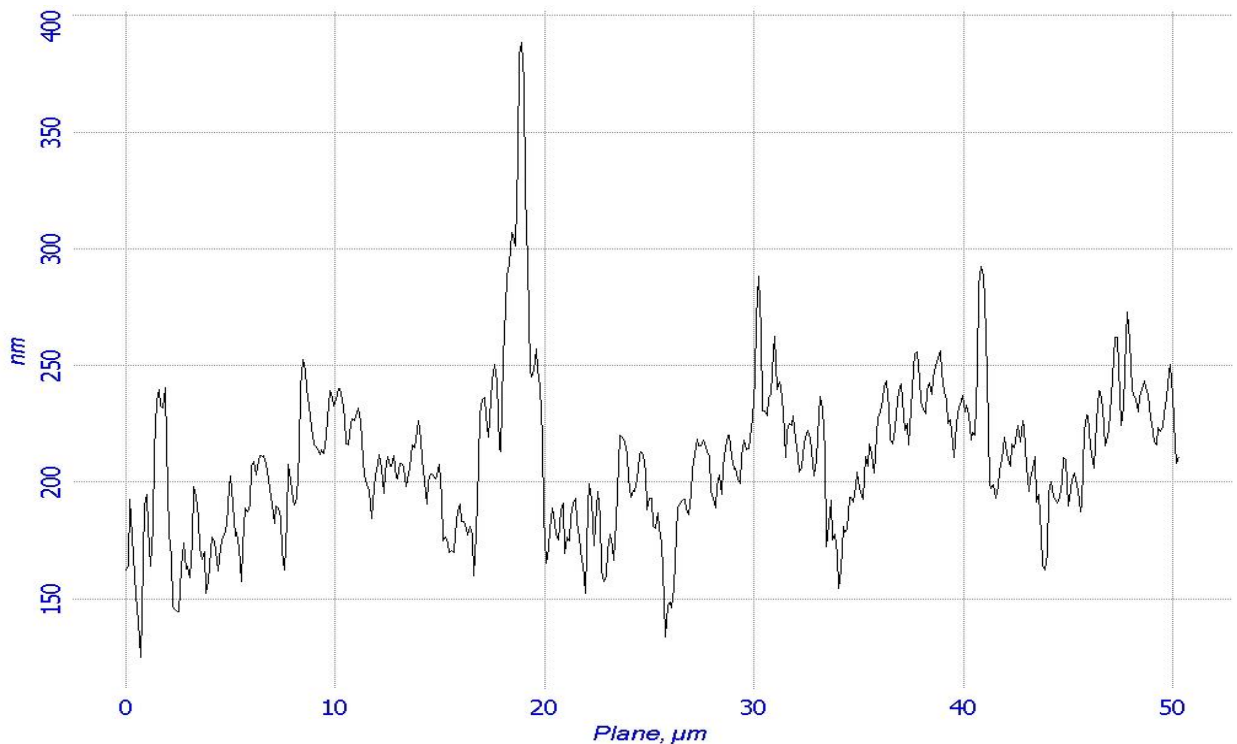


Рис. 20. Профиль сечения рельефа поверхности образца полированного в лаборатории. Параметры шероховатости: $R_a = 76 \pm 47$ нм, $R_{ms} = 125 \pm 70$ нм, $R_z = 920 \pm 380$ нм

При исследовании адгезии тест-штаммов к образцам, *полированным в условиях стоматологического кабинета*, отмечались некоторые отличия от контрольных фрезерованных образцов (рис. 21, 22).

Так, только у фузобактерий адгезия была низкой (0,28). Индекс адгезии анаэробов и грибов был умеренным и составил от 0,45 (порфиромонас) до 0,51 (кандида). Уровень адгезии микроаэрофильных стрептококков вообще был крайне высоким и не отличался от контрольных (неполированных) образцов ($0,94 \pm 0,04$; $P > 0,05$).

На образцах, полированных в клинике, не видно полос полировки, имеются одиночные частицы подобно тем, что наблюдались на всех полированных образцах. Значительных агломератов не наблюдается. Перепад высот неровностей на поверхности образцов достигает сотни нанометров, что является наибольшим значением среди полированных образцов.

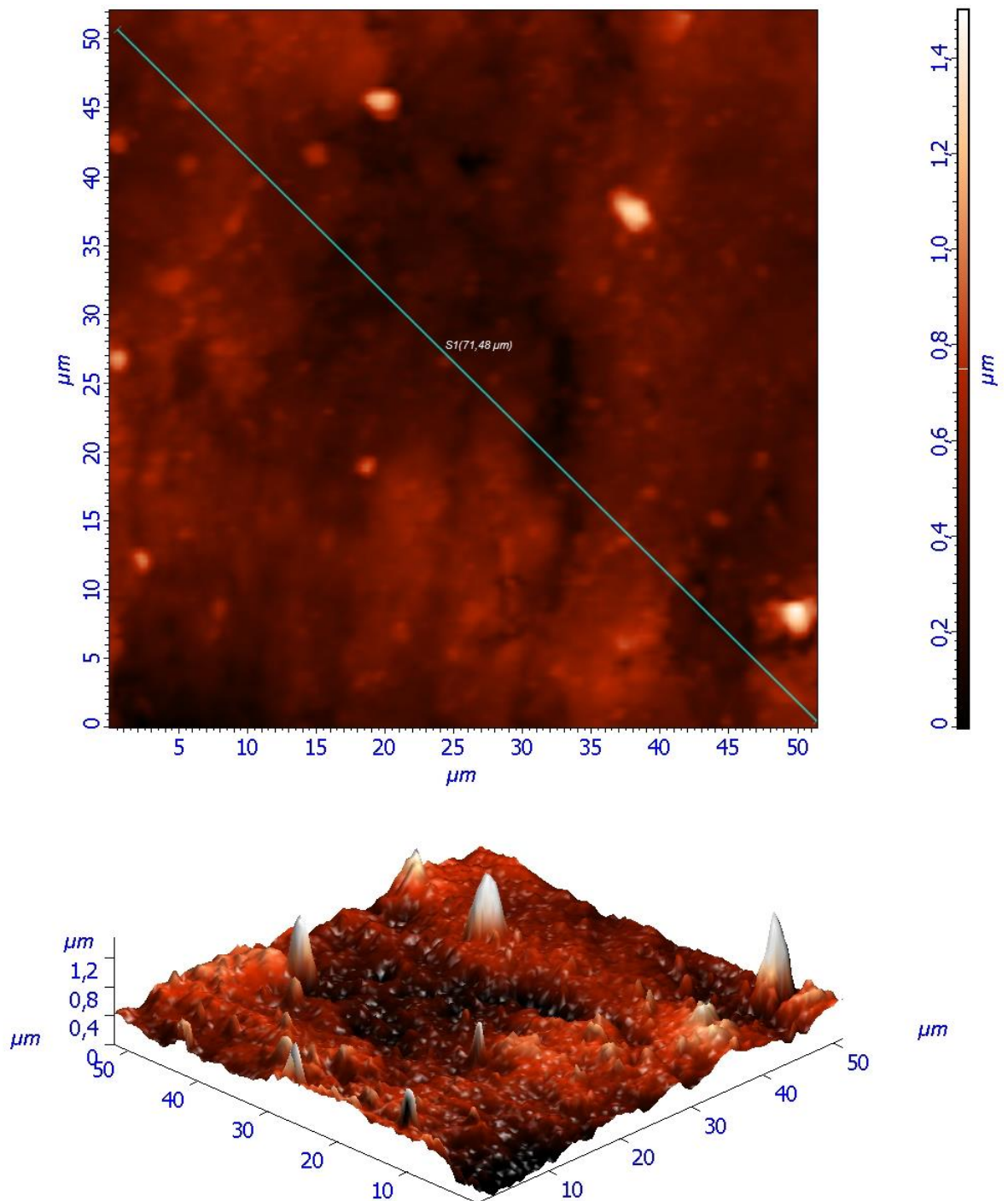


Рис. 21. Двумерное и соответствующее трехмерное представление рельефа поверхности образца, полированного в кабинете врача-стоматолога. Шероховатость поверхности более выражена при высоком разрешении — по оси ординат шкала 1,2 мкм. АСМ изображение

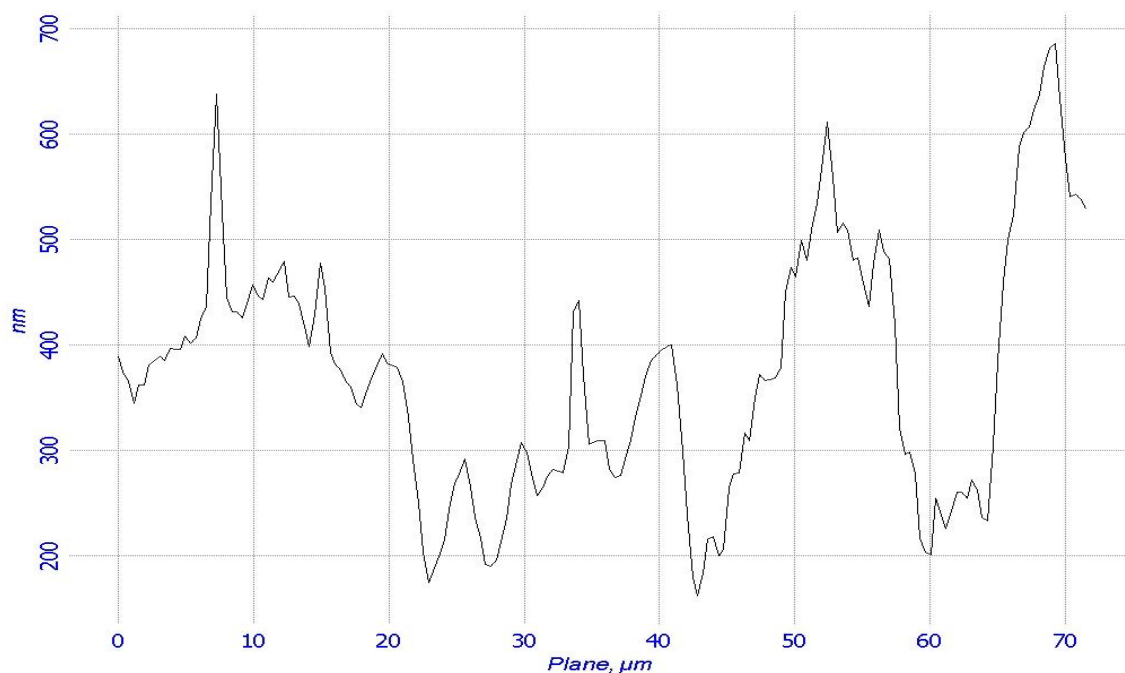


Рис. 22. Профиль сечения рельефа поверхности образца, полированного в кабинете врача-стоматолога. Параметры шероховатости: $R_a = 110 \pm 64$ нм, $R_{ms} = 166 \pm 88$ нм, $R_z = 990 \pm 600$ нм

На рис. 23, 24, 25 представлены результаты исследования биопленки, формирующейся на образцах из актиномицетов *Actinomyces israelii* и дрожжевых грибов *Candida albicans*. При использовании СЭМ псевдомицелия грибов кандиды четко виден полимерный матрикс биопленки.

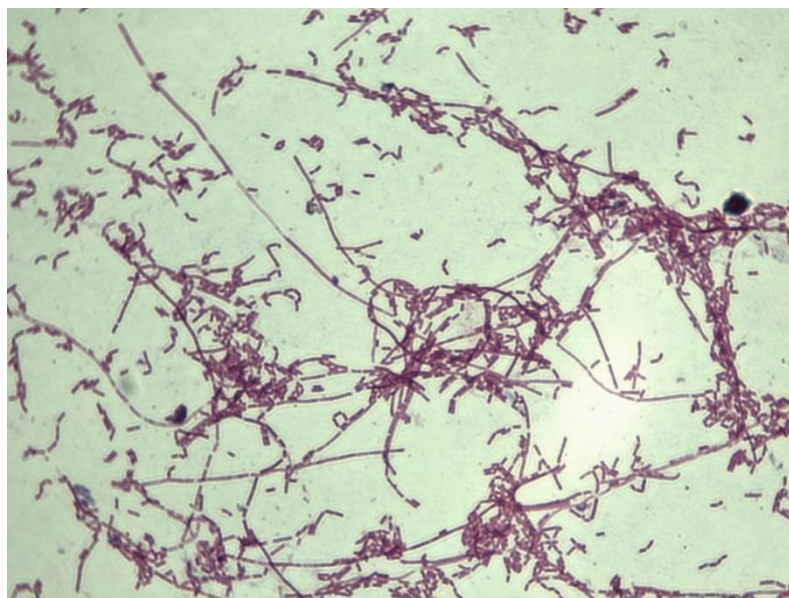


Рис. 23. Мицелиальные элементы *Actinomyces israelii* при оценке первичной адгезии на поверхности образца оксида титана. Окраска по Граму

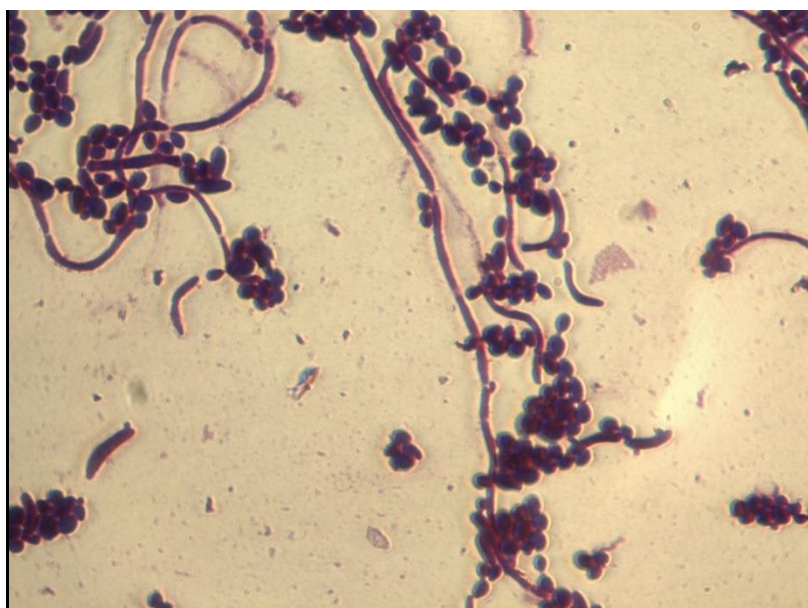


Рис. 24. Псевдомицелий и бластоспоры *Candida albicans* при оценке первичной адгезии на поверхности полимера для протезирования. Световая микроскопия под иммерсией. 90×. Окраска по Грамму

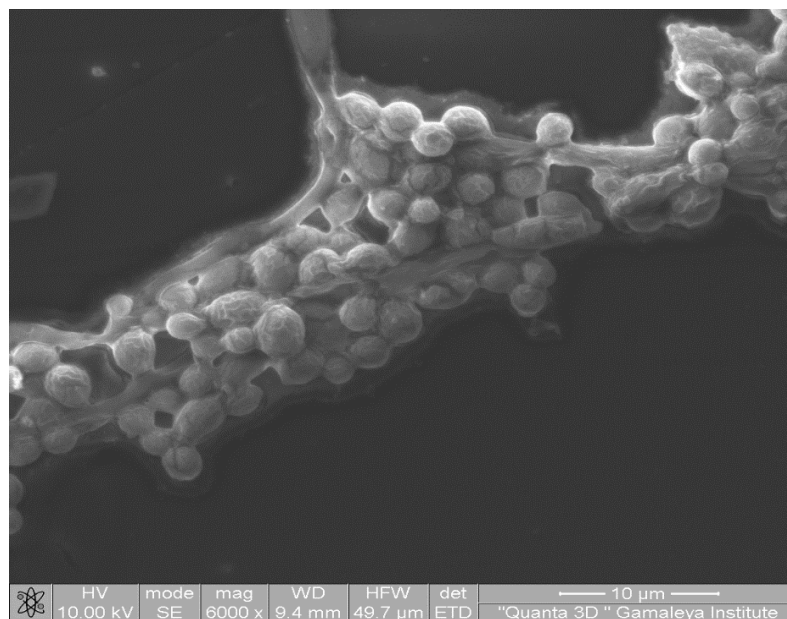
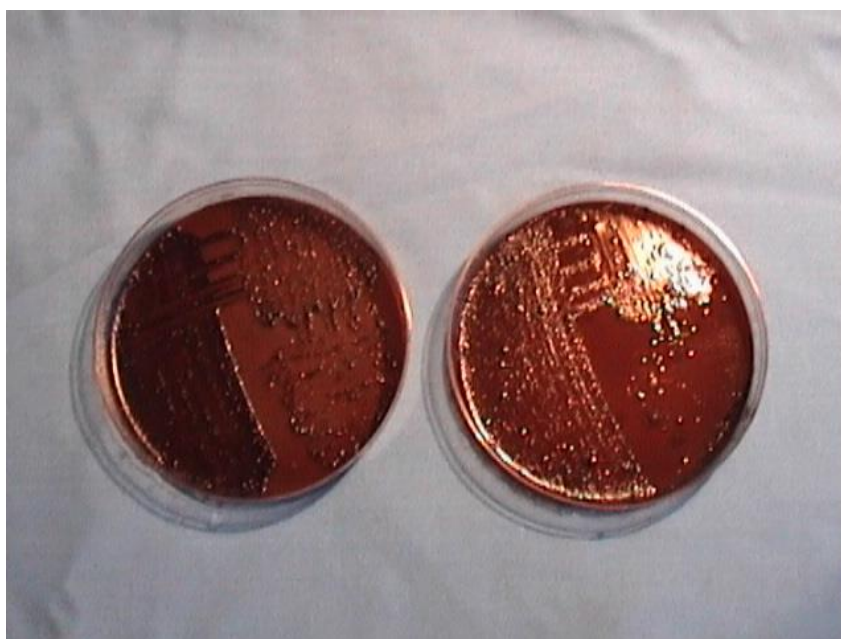


Рис. 25. Псевдомицелий и бластоспоры *Candida albicans* при оценке первичной адгезии на поверхности полимера для протезирования. Сканирующая электронная микроскопия. 7000×

На рис. 26а, б и 27а, б демонстрируются количественные различия при оценке результатов первичной адгезии *Prevotella intermedia* и *Streptococcus sanguinis* в зависимости от вида используемого стоматологического материала (пластмасса, оксид титана, оксид циркония).



а

б

Рис. 26. Результаты исследования первичной адгезии *Prevotella intermedia* к полимерному материалу для протезирования: а — до полировки ($30 \cdot 10^7$ КОЕ/мл), б — после полировки ($10 \cdot 10^7$ КОЕ/мл)



а

б

в

Рис. 27. Различия в степени первичной адгезии *Streptococcus sanguinis* (контроль) к образцам из разных материалов: а — полимер ($1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл); б — оксид титана ($5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл); в — оксид циркония ($2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл)

Описанная выше микроскопическая картина, по-видимому, может привести к формированию массивной биопленки в клинических условиях и обусловить повреждение слизистой оболочки полости рта и пародонта токсинами и

ферментами пародонтопатогенных бактерий и грибов кандида [7, 44, 99].

Следовательно, можно заключить, что образцы акриловых пластмасс, предназначенных для изготовления шинирующих и протезных конструкций, обладают различной степенью выраженности микробной адгезии представителей пародонтопатогенной микрофлоры и грибов кандида, которая зависит от способа полировки, что, соответственно, определяет различия колонизационной резистентности к формированию микробной биопленки при использовании полимера в клинических условиях.

3.3. Математическая модель для прогнозирования интегральной микробной адгезии пародонтопатогенных бактерий

Индекс адгезии (adhesion index) I широко используется при исследовании адгезии бактерий к поверхности материалов [23].

По определению, он равен частному от деления десятичного логарифма числа прилипших бактерий A к десятичному логарифму количества бактерий взвеси N :

$$I = \frac{\lg A}{\lg N}. \quad (1)$$

Формуле (1) можно придать другой вид $I = \log_N A$ или $A = N^I$.

Определенный таким образом индекс адгезии пропорционален логарифму числа прилипших бактерий, и это существенно облегчает его восприятие как некоторого интегрального показателя, поскольку применение логарифмической шкалы всегда оказывает «сглаживающее» действие на наблюдаемую переменную (рис. 28). В этом случае исследователь избавляется от необходимости оперировать с большими числами.

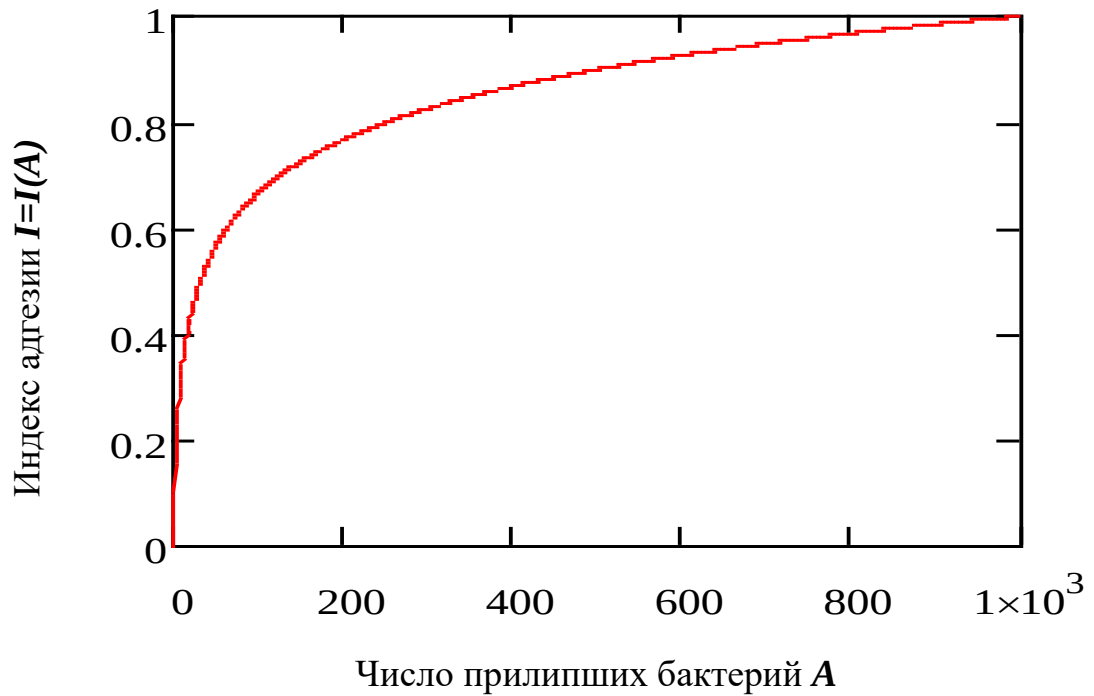


Рис. 28. График зависимости индекса адгезии $I = I(A)$ от числа прилипших бактерий A . $N = 10^3$

Кроме того, наличие в знаменателе логарифма общего числа бактерий, использованных при посеве, нормирует индекс. Например, если $A = N$ (все бактерии прилипли к поверхности), то индекс адгезии равен 1 . В остальных случаях $A < N$ и $0 < I < 1$ (рис. 1). Таким образом, присутствие логарифма общего числа бактерий в знаменателе делает индекс (1) еще более наглядным.

Пусть в исследованиях адгезии различных бактерий к поверхности материалов использовали n тест-культур разных видов, относящихся к пародонтопатогенной группе (далее тест-культур). Индекс адгезии i -й тест-культуры, нанесенной на образец, равен по определению частному от деления десятичного логарифма числа прилипших бактерий A_i к десятичному логарифму количества бактерий взвеси N_i :

$$I_i = \frac{\lg A_i}{\lg N_i}, \quad (2)$$

где i — номер тест-культуры, $i = 1, \dots, n$.

При сравнительных испытаниях часто возникает необходимость получить среднее значение индекса, чтобы оценить интегральный потенциал используемых в эксперименте пародонтопатогенных видов (значения индекса в целом). Однако мы не встречали в литературе описаний процедур, по которым нужно производить подсчет усредненных значений индекса.

Вопрос сводится к следующему: на каком этапе нужно осуществить суммирование (это всегда необходимо для усреднения): после применения расчетной формулы индекса (2) или до?

В первом случае получаем формулу:

$$I_{\text{ср.культ.}} = \frac{I_1 + \dots + I_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n I_i}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{\lg A_i}{\lg N_i}}{n}, \quad (3)$$

во втором —

$$I_{\text{ср.бакт.}} = \frac{\lg(A_1 + \dots + A_n)}{\lg(N_1 + \dots + N_n)} = \frac{\lg(\sum_{i=1}^n A_i)}{\lg(\sum_{i=1}^n N_i)}. \quad (4)$$

Во втором случае найдем число прилипших бактерий сорта i :

$$A_i = 10^{I_i \cdot \lg N_i} = (10^{\lg N_i})^{I_i} = N_i^{I_i}. \quad (5)$$

Тогда для всех культур:

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = N_1^{I_1} + \dots + N_n^{I_n} = \sum_{i=1}^n N_i^{I_i}. \quad (6)$$

Отсюда, исходя из (2), индекс адгезии, усредненный по бактериям:

$$I_{\text{ср.бакт.}} = \frac{\lg(N_1^{I_1} + \dots + N_n^{I_n})}{\lg(N_1 + \dots + N_n)} = \frac{\lg \sum_{i=1}^n N_i^{I_i}}{\lg \sum_{i=1}^n N_i}. \quad (7)$$

Если число бактерий взвеси каждой культуры одинаково

($N_1 = \dots = N_n = N$), выведенная формула немного упрощается:

$$I_{cp} = \frac{\lg(N^{I_1} + \dots + N^{I_n})}{\lg(N + \dots + N)} = \frac{\lg(N^{I_1} + \dots + N^{I_n})}{\lg nN} = \frac{\lg \sum_{i=1}^n N^{I_i}}{\lg nN}. \quad (8)$$

Проверим формулу (3), а также (7) в случае, если $I_1 = \dots = I_n = I$ и $N_1 = \dots = N_n = N$. Тогда понятно, что средний индекс адгезии равен $I_{cp} = I$.

Формула (3) дает:

$$I_{cp.культ.} = \frac{I_1 + \dots + I_n}{n} = \frac{I + \dots + I}{n} = \frac{nI}{n} = I.$$

Аналогично, по формуле (7):

$$I_{cp.бакт.} = \frac{\lg(N^I + \dots + N^I)}{\lg(N + \dots + N)} = \frac{\lg N^I \cdot n}{\lg Nn} = \frac{I \cdot \lg Nn}{\lg Nn} = I,$$

что и требовалось доказать.

Графики, основанные на применении подходов (3) и (7), использованных для определения средних индексов адгезии $I_{cp.культ.}$ и $I_{cp.бакт.}$, тоже не выявляют существенных различий (рис. 29а, б).

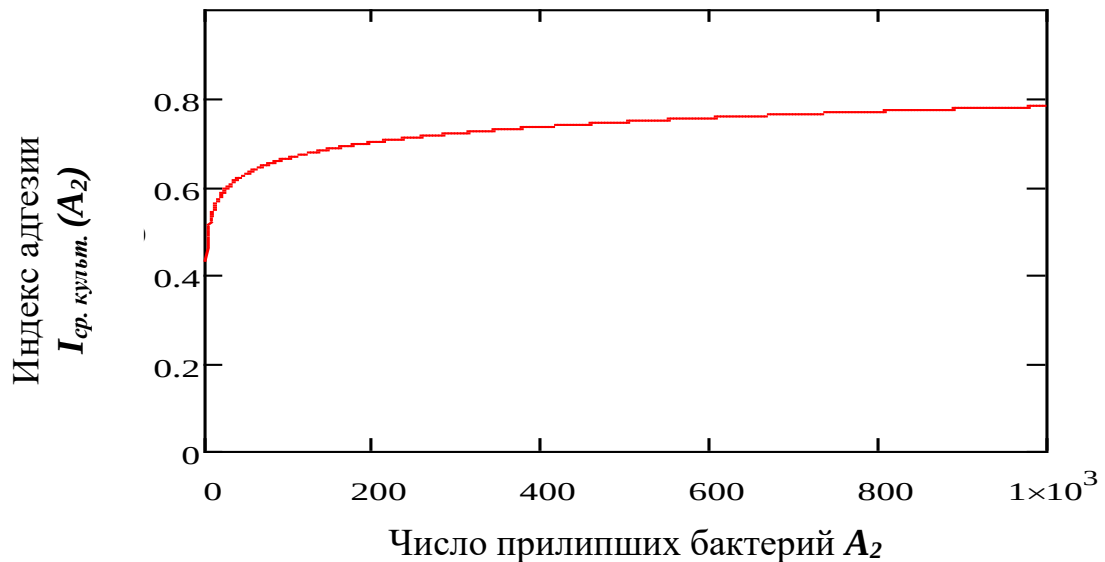


Рис. 29 (а). Графики зависимостей $I_{cp.культ.}(A_2) = \frac{\lg A_1 + \lg A_2}{2}$

$$N_1 = 10^3, N_2 = 2 \cdot 10^3 \text{ и } A_1 = 4 \cdot 10^2.$$

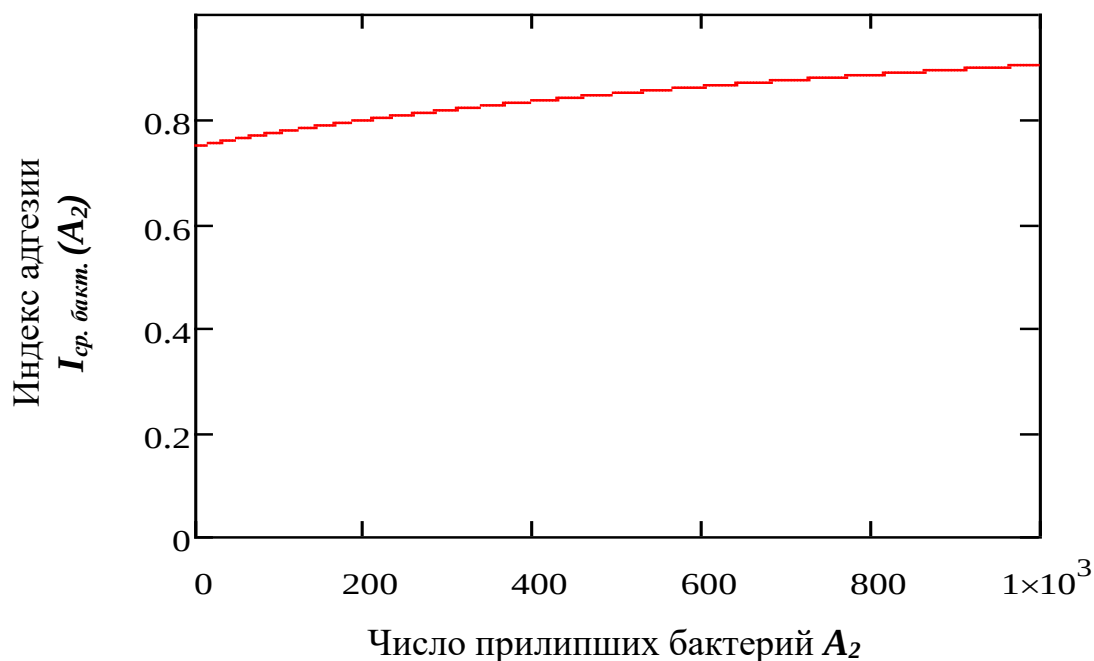


Рис. 29 (б). Графики зависимостей $I_{ср.,бакт.}(A_2) = \frac{\lg(A_1 + A_2)}{\lg(N_1 + N_2)}$

$$N_1 = 10^3, N_2 = 2 \cdot 10^3 \text{ и } A_1 = 4 \cdot 10^2.$$

Пример 1. В исследованиях адгезии микроорганизмов к поверхности полиметилметакрилата использовали 2 культуры: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis*. При этом при контрольном посеве 1-й культуры получено 10^6 бактерий, а 2-й — $2 \cdot 10^6$. В первом случае к поверхности прилипло $0,3 \cdot 10^6$, а во 2-м — $0,25 \cdot 10^6$ бактерий. Необходимо найти средние величины индекса адгезии по тест-культурам пародонтопатогенных микроорганизмов в целом, что позволит интегрально оценить адгезивную активность пародонтопатогенных бактерий на данном материале.

Нетрудно подсчитать в соответствии с (2) индексы адгезии тест-культур разных видов по отдельности:

$$I_1 = \frac{\lg 0,3 \cdot 10^6}{\lg 10^6} = \frac{5,48}{6} = 0,913, \quad I_2 = \frac{\lg 0,25 \cdot 10^6}{\lg (2 \cdot 10^6)} = \frac{5,40}{6,30} = 0,857,$$

а также среднее арифметическое значение по формуле (3):

$$I_{\text{ср.культ.}} = \frac{I_1 + I_2}{2} = 0,885.$$

Применение же формулы (7) дает:

$$I_{\text{ср.бакт.}} = \frac{\lg(N_1^{I_1} + N_2^{I_2})}{\lg(N_1 + N_2)} = \frac{\lg[(10^6)^{0,91} + (2 \cdot 10^6)^{0,86}]}{\lg(10^6 + 2 \cdot 10^6)} = 0,886.$$

Различие в значениях индексов составило всего

$$\frac{|I_{\text{ср.бакт.}} - I_{\text{ср.культ.}}|}{I_{\text{ср.культ.}}} \cdot 100\% = 0,17\%, \text{ что вполне приемлемо для культуральных}$$

микробиологических исследований.

Пример 2. В исследованиях адгезии микроорганизмов к поверхности диоксида циркония использовали дрожжевые грибы *Candida albicans* и *Cadida Krusei*. При этом контрольный посев грибов составил 10^8 КОЕ/мл и 10^6 КОЕ/мл соответственно. В первом случае к поверхности прилипло $0,95 \cdot 10^4$, а во 2-м — $4 \cdot 10^4$ бластоспор гриба. Необходимо найти средний индекс адгезии по тест-штаммам грибов, что позволит дать интегральную оценку их адгезивной активности на данном материале.

Аналогично примеру 1 найдем $I_{\text{бакт.}} = 0,622$, $I_{\text{гриб.}} = 0,767$,

$$I_{\text{ср.груп.}} = 0,695, \quad I_{\text{ср.микроорг.}} = 0,641 \quad \text{и} \quad \frac{|I_{\text{ср.микроорг.}} - I_{\text{ср.груп.}}|}{I_{\text{ср.груп.}}} \cdot 100\% = 7,73\%. \quad \text{То}$$

есть при $N_2 \neq N_1$ различия в подходах (3) и (7) уже существенны.

Применение представленных формул (3) и (7) при $N_1 = N_2$ (N_1 и N_2 одного порядка) дает схожие результаты. В других случаях (N_1 и N_2 разных порядков) использование формулы (3) является более предпочтительным.

Коэффициент корреляции r между данными факторами в нашем исследовании составил 0,61 при ошибке репрезентативности 0,94, что

позволяет судить о наличии корреляционной связи средней силы между рассматриваемыми факторами — изменениями параметров шероховатости образцов из исследованных материалов и индексом адгезии к поверхности образцов пародонтопатогенных бактерий и дрожжевых грибов рода *Candida*.

3.4. Характеристика микробной колонизации шин из полимерных материалов, предложенных для лечения хронического пародонтита

В основу данной клинико-лабораторной части нашей работы положен микробиологический мониторинг, заключающийся в обследовании в динамике пациентов с шинами, изготовленными из полимерных стоматологических материалов и/или диоксида циркония, которые были установлены для лечения ХП средней и тяжелой степени (ХПС, ХПТ) — всего 71 человека (33 мужчин и 38 женщин; возраст — от 47 до 60 лет).

В данном фрагменте исследования в зависимости от вида материала для шинирования зубного ряда мы распределили пациентов на 3 группы:

1 группа — 25 пациентов — из диоксида циркония («Конмед», Россия);

2 группа — 24 пациента — из полиметилметакрилата «Бесцветный» (Россия);

3 группа — 22 пациента — из полиакриловой пластмассы «горячей» полимеризации «Фторакс» (Украина) в качестве контрольной.

Микробиологический мониторинг осуществляли в 2 этапа:

1 этап — выбор материала для изготовления шин зубного ряда с помощью теста первичной адгезии со штаммами резидентных и пародонтопатогенных микроорганизмов;

2 этап — установка шин зубного ряда у пациентов и оценка колонизации в динамике исследования на протяжении 1 года.

На 1 этапе исследования осуществляли подбор оптимального стоматологического материала для шин на основе анализа результатов

первичной адгезии к изучаемым полимерам и сплавам этиологически значимых представителей микробной флоры, включая дрожжевые грибы *Candida* [95, 98]. Методика описана в главе 2, а основные этапы проиллюстрированы на рис. 30. и 31.



Рис. 30. Нанесение взвеси тест-штамма *S. sanguinis* на образцы стоматологических материалов (диоксид циркония, метилметакрилат, полиакрил «Фторакс») для исследования первичной адгезии

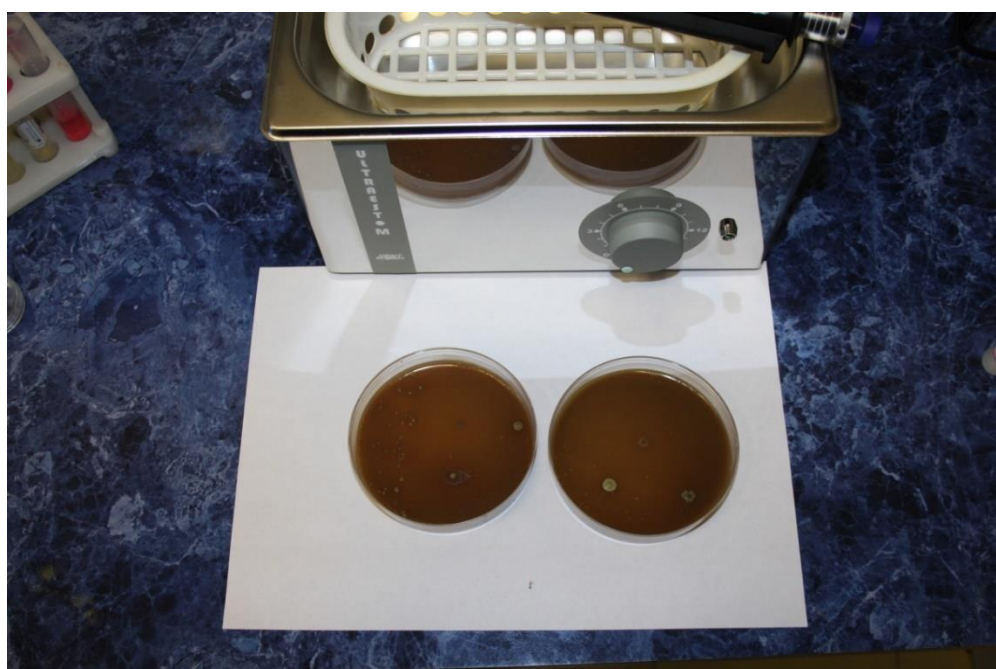


Рис. 31. Учет результатов первичной адгезии тест-штамма *S. sanguinis* на образце метилметакрилата (слева) и диоксида циркония (справа)

Результаты сравнительной оценки первичной адгезии резидентных бактерий к полированным образцам стоматологических материалов из металлов (диоксид циркония) и акриловых полимеров, используемых при протезировании зубного ряда, представлены в таблице 10.

Таблица 10

Результаты изучения адгезии резидентных бактерий полости рта к исследуемым образцам стоматологических материалов для шинирования зубного ряда в эксперименте *in vitro* (I_a — индекс адгезии)

Образцы Штаммы	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Veillonella parvula</i>
Диоксид циркония	$0,50 \pm 0,03$ **	$0,40 \pm 0,02$ **	—	$0,45 \pm 0,04$ **	—
Метилмет-акрилат	$0,72 \pm 0,05$ *	$0,64 \pm 0,03$ *	—	$0,70 \pm 0,04$ *	—
Фторакс (контроль)	$0,94 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,03$

Обозначения:

* показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с образцами в контроле ($P < 0,05$);

** показатель адгезии достоверно ниже по сравнению со всеми образцами ($P < 0,05$);

+ показатель адгезии достоверно выше по сравнению с образцами в контроле ($P < 0,05$).

Наиболее высокая адгезивная способность отмечена у микроаэрофильных стрептококков — *Streptococcus sanguinis* и *Streptococcus mutans*. Индекс адгезии I_a *Streptococcus sanguinis* был крайне высоким и составлял $0,94 \pm 0,04$ — к фтораксу; был достоверно ниже, но также достаточно высокий, к метилметакрилату ($0,72 \pm 0,05$), а минимальный I_a зарегистрирован к диоксиду циркония — $0,50 \pm 0,03$ ($P < 0,05$). I_a *Streptococcus mutans* был подвержен той же тенденции и составлял $0,91 \pm 0,04$, $0,64 \pm 0,03$, $0,40 \pm 0,02$ для фторакса, полиметилметакрилата и диоксида циркония соответственно.

Из прочих представителей резидентной микрофлоры средний уровень адгезии к фтораксу продемонстрировали энтерококки, актиномицеты и вейллонеллы — $0,68 \pm 0,02$, $0,64 \pm 0,05$ и $0,52 \pm 0,03$ соответственно. Адгезия актиномицетов к метилметакрилату достоверно не отличалась от таковой к фтораксу, а к диоксиду циркония была существенно ниже — $0,45 \pm 0,04$ ($P < 0,05$).

Результаты сравнительной оценки первичной адгезии бактерий пародонтопатогенной группы к полированным образцам стоматологических материалов из металлов (диоксид циркония) и акриловых полимеров, используемых при протезировании зубного ряда, представлены в таблице 11.

Таблица 11

Результаты изучения адгезии пародонтопатогенных бактерий полости рта к исследуемым образцам стоматологических материалов для шинирования зубного ряда в эксперименте *in vitro* (I_a — индекс адгезии)

Образцы Штаммы	<i>Aggregatibacter actinomycetem.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Fusobacterium periyodonticum</i>	<i>Candida albicans</i>
Диоксид циркония	0 **	0,47 $\pm$ 0,04 **	0,41 $\pm$ 0,04 **	0,31 $\pm$ 0,04 **	0,50 $\pm$ 0,04 **
Метилмет- акрилат	0 **	0,66 $\pm$ 0,04 *	0,61 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,05 *	0,67 $\pm$ 0,04
Фторакс (контроль)	0,35 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,04

Обозначения:

* — показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с образцами в контроле ($P < 0,05$);

** — показатель адгезии достоверно ниже по сравнению со всеми образцами ($P < 0,05$);

+ — показатель адгезии достоверно выше по сравнению с образцами в контроле ($P < 0,05$).

Адгезивная способность разных штаммов пародонтопатогенных бактерий существенно различалась — от низкой до высокой. В частности, такой весьма вирулентный пародонтопатогенный вид 1 порядка, как *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, не обладал адгезией к диоксиду циркония и метилметакрилату. Адгезия *A. actinomycetemcomitans* к фтораксу была относительно низкой, но, видимо, достаточной для формирования биопленки и колонизации поверхности данным видом микробов, так как I_a составлял $0,35 \pm 0,04$.

Представители других пародонтопатогенных видов группы бактероидов, а также фузобактерии обладали высоко выраженными адгезивными свойствами, особенно к акриловым пластмассам. Так, пародонтопатогенный вид 1 порядка *Porphyromonas gingivalis* продемонстрировал крайне высокий I_a к фтораксу ($0,82$

$\pm 0,04$), достоверно ниже — к метилметакрилату ($0,66 \pm 0,04$), и значительно ниже — к диоксиду циркония ($0,41 \pm 0,04$). У пародонтопатогенного вида 2 порядка *Prevotella intermedia* I_a к образцам из фторакса и метилметакрилата I_a также был достаточно высоким и статистически достоверно не различался ($0,60 \pm 0,03$ и $0,61 \pm 0,04$ соответственно). К образцам из диоксида циркония, напротив, I_a характеризовался достоверно низким уровнем адгезии данного тест-штамма — $0,41 \pm 0,04$ ($P < 0,05$).

Сходная картина адгезии наблюдалась нами у пародонтопатогенного вида 2 порядка — *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, причём обращала на себя внимание низкий I_a к диоксиду циркония — $0,31 \pm 0,04$ ($P < 0,05$).

Менее выраженные различия адгезивной способности отмечены у дрожжевых грибов *Candida albicans* — I_a варьировал на умеренных значениях от $0,67 \pm 0,04$ у метилметакрилата до $0,50 \pm 0,04$ у диоксида циркония ($P < 0,05$).

Таким образом, представленные результаты указывают на существенные статистически достоверные различия значений индексов адгезии, что может зависеть как от видовой принадлежности микроорганизмов, так и от способа обработки (полировки) материала и характера материала (полимер, сплав и пр.).

При проведении клинико-лабораторных исследований мы учитывали, что степень микробной колонизации шинирующих конструкций и состояние гигиены полости рта в целом характеризует **микробное число (общая микробная обсемененность)** поверхности конструкции.

В связи с этим оценку микробной колонизации шин, установленных пациентам, проводили в динамике: на 3-и, 7-е и 15-е сутки после того, как была установлена шинирующая конструкция, а затем — через 3, 6 и 12 месяцев в соответствии с существующими рекомендациями.

Взятие материала при проведении культурального исследования осуществлялось с помощью стандартного сорбирующего тампона с

поверхности шины в зоне соприкосновения конструкции и слизистой оболочки. Это позволило дать интегральную оценку состояния биопленки не только на поверхности шины, но и на слизистой оболочке полости рта. Из этой же зоны стандартным сорбирующим штифтом забирали материал для ПЦР-диагностики.

Мониторинг микробной колонизации в ранние сроки на 3-и, 7-е и 15-е сутки с момента установки шинирующих конструкций представлен в таблице 12.

Таблица 12

Особенности микробной колонизации шинирующих конструкций из разных типов материалов в первые две недели (микробное число, КОЕ)

Сроки исследования	Полиакрилат Фторакс (К)	Метилмет- акрилат	Диоксид циркония	Вероятность различий
3-и сутки	$4 \times 10^7 \pm 10^2$	$5 \times 10^5 \pm 10^2$	$1 \times 10^4 \pm 10^2$ *	$P < 0,05$ **
7-е сутки	$2 \times 10^8 \pm 10^2$	$1 \times 10^6 \pm 10^1$	$1 \times 10^5 \pm 10^2$ *	$P > 0,05$ **
15-е сутки	$1 \times 10^9 \pm 10^1$ $P < 0,05$ +	$1 \times 10^7 \pm 10^2$ $P < 0,05$ +	$2 \times 10^5 \pm 10^2$ *	$P < 0,05$ **

Обозначения:

* — снижение достоверно по сравнению с контролем (столбец 1);

** — снижение достоверно по сравнению со всеми столбцами;

+ — повышение достоверно по сравнению со всеми строками.

Через 3 суток у пациентов отмечался умеренный уровень микробной обсемененности на акриловых материалах от 10^5 до 10^7 КОЕ. Исключение составлял диоксид циркония, микробное число на котором было в 100 раз ниже по сравнению с фтораксом и в 50 раз — по сравнению с метилметакрилатом ($P < 0,05$).

На 7-е сутки происходила стабилизация уровня обсемененности на уровне от 10^5 до 10^6 КОЕ для диоксида циркония и метилметакрилата, что свидетельствует о качественной и количественной стабилизации образующейся биопленки. Достоверно более высокий уровень колонизации отмечался на шинах из фторакса — $2 \times 10^8 (\pm 10^2)$ КОЕ ($P < 0,05$).

К 15-м суткам происходила окончательная стабилизация микробной биопленки шинирующих конструкций, причем уровень обсемененности полиакрилатов — 10^{7-9} КОЕ — был существенно выше (10 тыс. раз) в отличие от диоксида циркония — 10^5 КОЕ ($P < 0,05$). Такая картина соответствует известным данным литературы [74, 91].

Таким образом, на основании результатов проведенных микробиологических и молекулярно-биологических исследований можно сделать заключение, что биопленка на полиакриловых материалах, которая содержит значительное число пародонтопатогенных видов, является более агрессивной, чем на сплаве циркония.

Статистически достоверную разницу уровней количественной обсемененности мы получили также и при контрольных исследованиях на 3-м, 6-м и 12-м месяце исследования, что указывает на биодеструктивное действие микробной биопленки и постепенное разрушение шинирующей конструкции [3] (таблица 13).

Таблица 13

**Количественные параметры обсемененности шин из разных
конструкционных материалов в отдаленные сроки
(микробное число, КОЕ)**

Сроки исследования	Полиакрилат фторакс	Метилмет-акрилат	Диоксид циркония	Вероятность различий
Через 3 месяца	$1 \times 10^8 \pm 10^2$	$2 \times 10^7 \pm 10^2$	$2 \times 10^5 \pm 10^2$ *	$P < 0,05$ **
Через 6 месяцев	$2 \times 10^9 \pm 10^2$	$5 \times 10^8 \pm 10^2$	$1 \times 10^5 \pm 10^2$ *	$P < 0,05$ **
Через 12 месяцев	$1 \times 10^{10} \pm 10^2$ $P < 0,05$ +	$9 \times 10^9 \pm 10^2$ $P < 0,05$ +	$2 \times 10^6 \pm 10^2$ * $P > 0,05$	$P < 0,05$ **

Обозначения:

* — снижение достоверно по сравнению с контролем (столбец 1);

** — снижение достоверно по сравнению со всеми столбцами;

+ — повышение достоверно по сравнению со всеми строками.

Так, если через 3 месяца показатели микробной обсемененности полиакрилатов находились на высоком уровне 10^{7-8} КОЕ и статистически не

различались, то на 6-й и 12-й месяцы наблюдения микробная обсемененность конструкций увеличивалась примерно на порядок, что соответствовало времени изнашивания полиакриловых протезов (шин). На конструкциях наблюдали появление грязно-серого налета, участков темной (чаще коричневого цвета) пигментации, признаков коррозии и деформации поверхности (рис. 32, 33).

В то же время шины из диоксида циркония продемонстрировали стабильность показателя микробной обсемененности в пределах 10^{5-6} КОЕ, что соответствовало их механической прочности и позволяло продолжить эксплуатацию, в то время как шины из полиакриловых пластмасс подлежали замене.

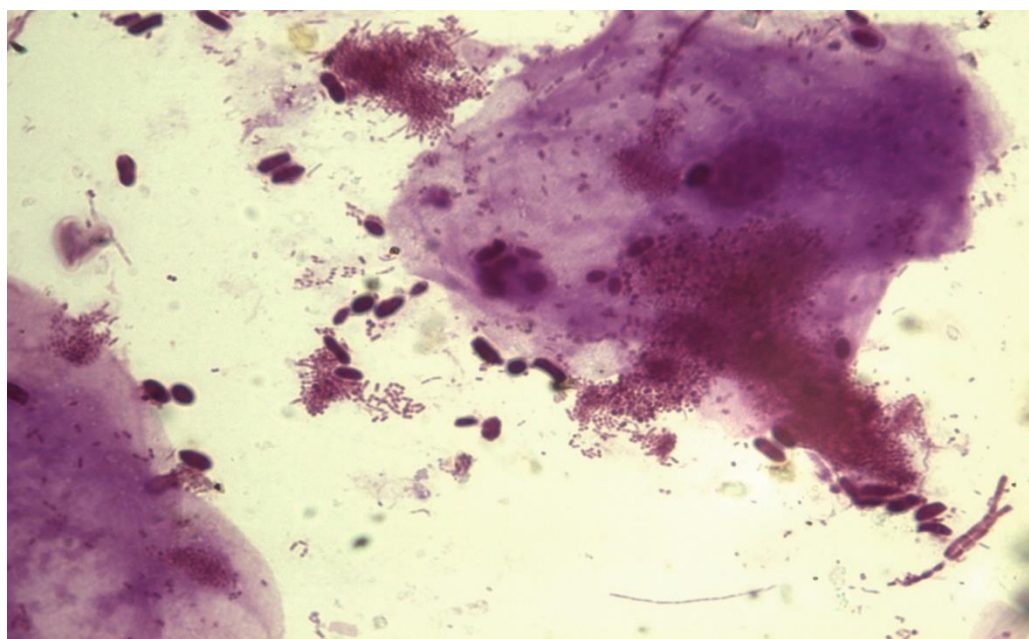


Рис. 32. Выраженная бактериальная колонизация акриловой конструкции. Адгезия клеток дрожжеподобных грибов *Candida* и представителей бактериальной ассоциации полости рта на слущенных эпителиальных клетках. Объектив 100×. Окраска по Граму

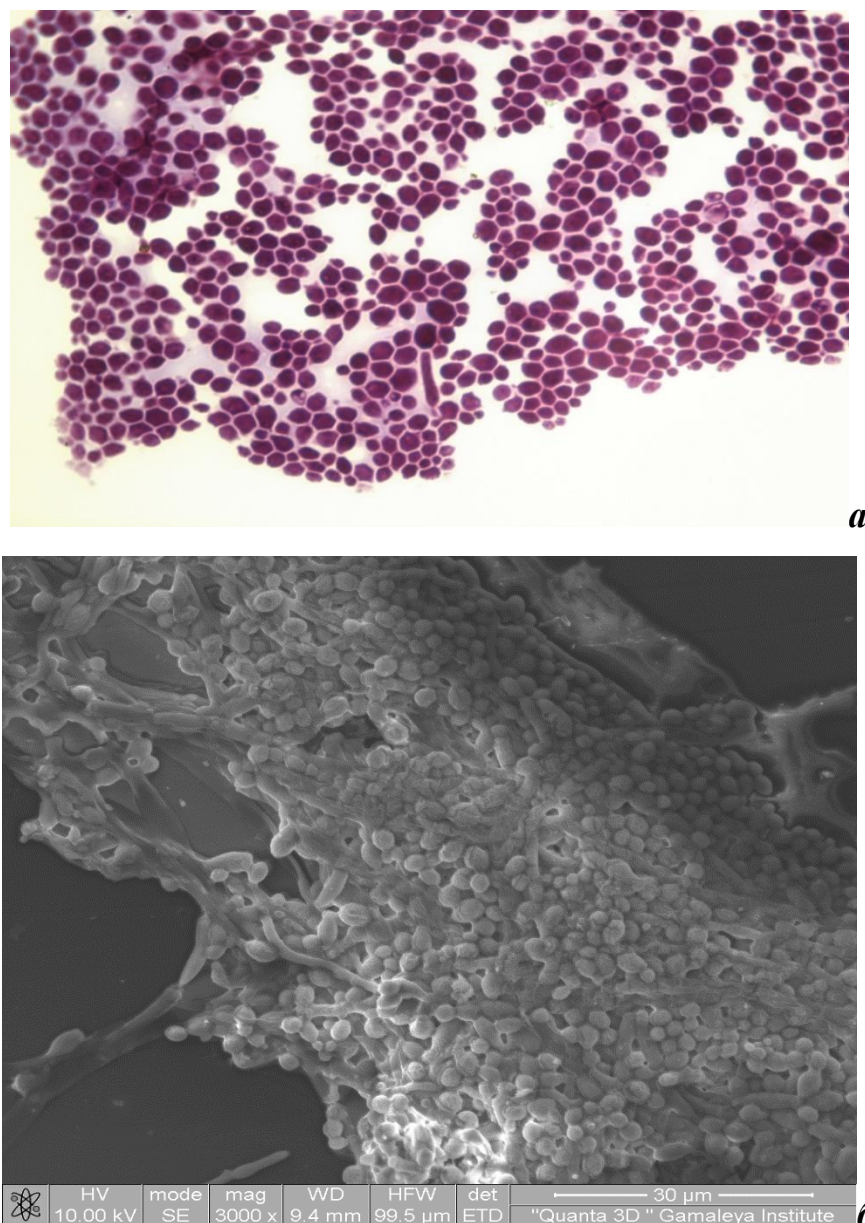


Рис. 33. Краевая часть биоплёнки *Candida albicans* с элементами псевдомицелия (ростовая трубка) на акриловой конструкции.
а) Иммерсионная микроскопия. Объектив 100×. Окраска по Граму.
б) СЭМ. Увеличение 3000×

В результате клинико-лабораторного исследования установлено, что изученные конструкционные материалы принципиально не оказывают отрицательного действия на адгезию резидентных видов, обеспечивая колонизацию важнейших представителей резидентной стабилизирующей микрофлоры. Однако полиакриловые пластмассы, в отличие от диоксида циркония, создают условия для колонизации пародонтопатогенных видов, что может способствовать развитию воспалительных процессов. Это

подтверждается результатами проведенного нами мониторинга колонизации шин из данных материалов у конкретных пациентов на протяжении года.

Следовательно, можно заключить, что оценка первичной адгезии микробиоты полости рта и последующей микробной колонизации у пациентов в клинических условиях позволяет рекомендовать диоксид циркония в качестве оптимального конструкционного материала для применения в группах риска при хроническом гингивите, хроническом пародонтите, кандидо-ассоциированном пародонтите.

3.5. Экспериментальное обоснование применения пробиотических штаммов для колонизации пародонта на крысиной модели воспаления пародонта *in vivo*

Известно, что в развитии патологии пародонта особую роль играют патогены, способные к колонизации тканей десны и внутриклеточному паразитированию в них, особенно при наличии генетической предрасположенности по ряду аллелей DR и DQ HLA генов человека [62, 446].

Поэтому при комплексном лечении пародонтита, помимо гигиенических мероприятий и профессиональной чистки зубов, важнейшим компонентом считаются уничтожение пародонтопатогенной флоры с помощью антибактериальных препаратов и нейтрализация последствий воздействия токсинов и ферментов возбудителей на окружающие ткани [81, 89, 93, 265, 348].

Торпидные или устойчивые к терапии формы пародонтита существенно затрудняют лечение данной патологии и зависят от длительной персистенции пародонтопатогенных видов, которые способны к внутриклеточному паразитизму, антигенной мимикрии и генетическим рекомбинациям с резидентными бактериями, имеющими гены резистентности к антибиотикам. Последнее определяется существенными сдвигами в составе микробиоценоза полости рта, развитием диспропорции стабилизирующих и агрессивных микробных видов, как вследствие прогрессирования самой патологии, так и в

результате интенсивного антибактериального лечения по показаниям, приводящего к дисбиозу [69]. Поэтому методы диагностики и лечения данного заболевания, безусловно, требуют дальнейшей разработки.

В связи с этим при комплексном лечении пародонтита всё большее внимание уделяют применению препаратов — пробиотиков и эубиотиков, которые способствуют укреплению колонизационной резистентности организма человека [19, 26, 45, 75, 78]. В отечественной и зарубежной литературе описаны попытки применения лактококков и лактобактерий для лечения пародонтита и профилактики рецидивов, основанные на использовании принципа микробного антагонизма [104, 157, 441].

К стабилизирующей микрофлоре полости рта относятся также вейлонеллы (*Veillonella parvula*) и слюнные стрептококки (*Streptococcus salivarius*), однако их эффективность при воспалительных заболеваниях в пародонте не изучена [93], что и послужило основанием для проведения данного экспериментального исследования.

Для проведения исследования мы использовали модель лигатурного пародонтита у крыс, которых после развития воспалительного процесса в десне поили взвесью эубиотических штаммов вейллонелл (рис. 34) и стрептококков (рис. 35).

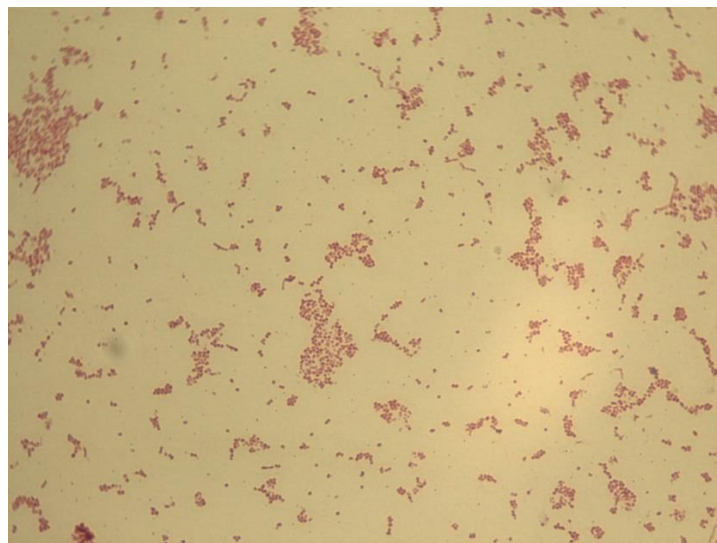


Рис. 34. Взвесь *Veillonella parvula* в среде АС 10^8 CFU/ml (ув. 90×10)

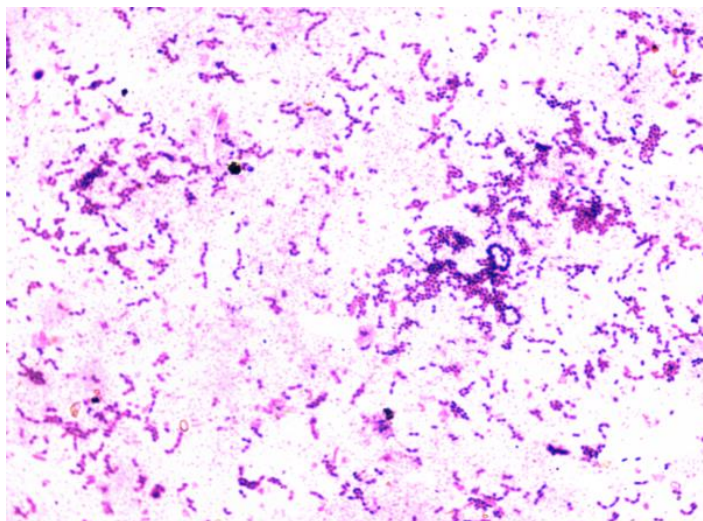


Рис. 35. Взвесь *Streptococcus salivarius* в среде АС 10^8 CFU/ml (ув. 90×10)

В обеих группах исследовали микробную колонизацию слизистой оболочки десны для выяснения возможности колонизации, а также ее продолжительности после завершения приема эубиотической взвеси V+S .

Крыс, взятых в эксперимент, обследовали бактериологическим методом с использованием техники анаэробного культивирования. Материал забирали из зоны предполагаемого наложения лигатуры (фоновые данные) в транспортную среду Стюарта, доставляли в лабораторию и выполняли количественный посев по Гольду на 5%-ный кровяной агар с геминном. Чашки Петри с посевами инкубировали в анаэроостате 7 суток при 37 °С. До и после снятия лигатуры на 10-е и 20-е сутки у крыс обеих групп проводили исследование состава основных представителей микрофлоры в гнойном отделяемом из очага воспаления с использованием бактериологического метода и техники анаэробного культивирования.

Далее проводили контрольные бактериологические исследования на 10-е и 20-е сутки, как в опытной, так и в контрольной группах. На 20-е сутки прекращали прием экспериментального препарата V+S, после чего на 28-е сутки проводили контроль колонизации исследуемыми штаммами.

Животных выводили из опыта, используя гексеналовый наркоз после завершения серии экспериментов, выделяли нижние челюсти, фиксировали их в

10%-ном растворе формальдегида, осуществляли декальцинирование в трилоне Б по стандартной методике и заливали целлоидином. Для проведения световой микроскопии готовили срезы 7–8 мкм, которые окрашивали для цитоморфологического исследования (гематоксилин/эозин).

Микробную обсемененность слизистой оболочки выражали через десятичный логарифм колониеобразующих единиц на 1 тампон (КОЕ). Результаты исследований обрабатывали методом вариационной статистики с определением вероятности различий P (за достоверную разницу принимали значения $P < 0,05$).

Результаты исследования представлены в таблице 14, из которой видно, что логарифмическое микробное число слизистой десны у крыс до начала эксперимента составляло $7,0 \pm 0,3$, причем доминировали (в 100% случаев) стафилококки и энтерококки ($5,5 \pm 0,3$). Интересующие нас с точки зрения последующей колонизации виды *S. salivarius* и *V. parvula* определены у 20% животных в количестве 4,0. При исследовании материала из области воспаления десны (гнойного экссудата) определяли смешанную флору, представленную кокковидными и нитевидными формами бактерий (рис. 36).

На фоне лигатурного пародонтита обсемененность и представительство стафило-энтерококковой ассоциации достоверно не изменилось. Ни у одного животного не выделены *V. parvula*, и только у одного — *S. salivarius* в количестве 5,0. Пародонтопатогенные виды группы превотелл и порфиромонад не выявлены.

Через 10 суток эксперимента по колонизации животных опытной группы установлено следующее. Уровень индигенной микрофлоры достоверно снизился до $5,0 \pm 0,3$. Это свидетельствует об улучшении гигиенического состояния полости рта животных. Изменился также качественный состав флоры. Исчезли стафилококки, а энтерококк выделяли у 100% животных в количестве $5,0 \pm 0,4$. (рис. 37). Увеличились количество и частота обнаружения колонизирующей флоры: *S. salivarius* выделяли у 80% животных, а *V. parvula* — у 20% в количестве 4,5–4,0.

Таблица 14

**Результаты эксперимента in vivo по микробной колонизации
пародонта у крыс с лигатурным пародонтитом**

Сроки исследования колонизации пародонта	Индигенная флора	Условно- патогенная флора: <i>Enterococcus</i> + <i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>salivarius</i>	<i>Veillonella</i> <i>parvula</i>
	KOE / % lg KOE _{±m}	KOE / % lg KOE _{±m}	KOE / % lg KOE _{±m}	KOE / % lg KOE _{±m}
До исследования	10 ⁷ – 100% 7,0 ± 0,3	10 ⁵ – 100% 5,5 ± 0,5	10 ⁴ – 20% 4,0 ± 0,5	10 ⁴ – 20% 4,0
Лигатурный пародонтит	10 ⁷ – 100% 7,0 ± 0,4	10 ⁶ – 100% 6,5 ± 0,4	10 ⁵ – 10% 5,0	0 — 0
Колонизация, 10 суток	10 ⁵ – 100% 5,0 ± 0,3	10 ⁵ – 100%* 5,0 ± 0,3*	10 ⁵ – 80% 4,5 ± 0,4	10 ⁴ – 20% 4,0
Контроль, 10 суток	10 ⁵ – 100% 4,5 ± 0,4	10 ⁵ – 100% 5,0 ± 0,4	10 ³ – 20% 3,0 ± 0,5	10 ³ – 10% 3,0
Колонизация, 20 суток	10 ³ – 100% 3,0 ± 0,5	10 ³ – 100% 3,0 ± 0,3*	10 ³ – 60% 3,3 ± 0,3	10 ³ – 80% 3,2 ± 0,5
Контроль, 20 суток	10 ³ – 100% 3,0 ± 0,5	10 ⁶ – 100% 6,0 ± 0,5	0 — 0	10 ² – 10% 2,0
Колонизация, 28 суток	10 ⁴ – 100% 4,0 ± 0,5	10 ³ – 100% 3,0 ± 0,3*	10 ³ – 40% 3,0 ± 0,5	10 ³ – 60% 3,0 ± 0,5
Контроль, 28 суток	10 ⁵ – 100% 4,0 ± 0,5	10 ⁴ – 100% 4,0 ± 0,3*	0 — 0	10 ² – 20% 2,0

* — без *Staphylococcus* в составе ассоциации.

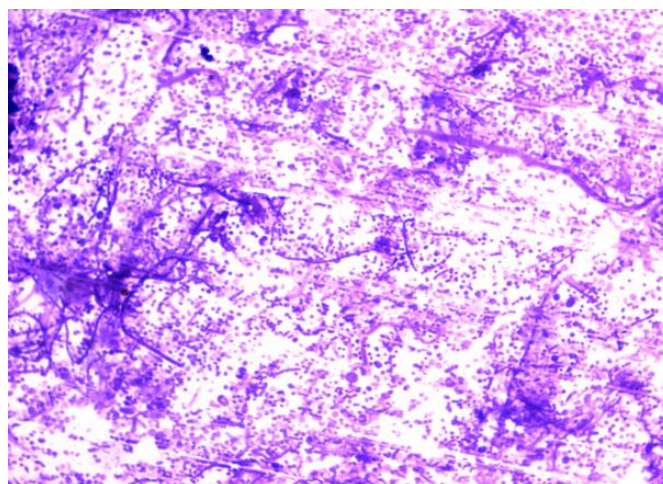


Рис. 36. Смешанная флора в мазке из воспалительного очага в пародонте у крысы с лигатурным пародонтитом на 10-й день (ув. 90 × 10)

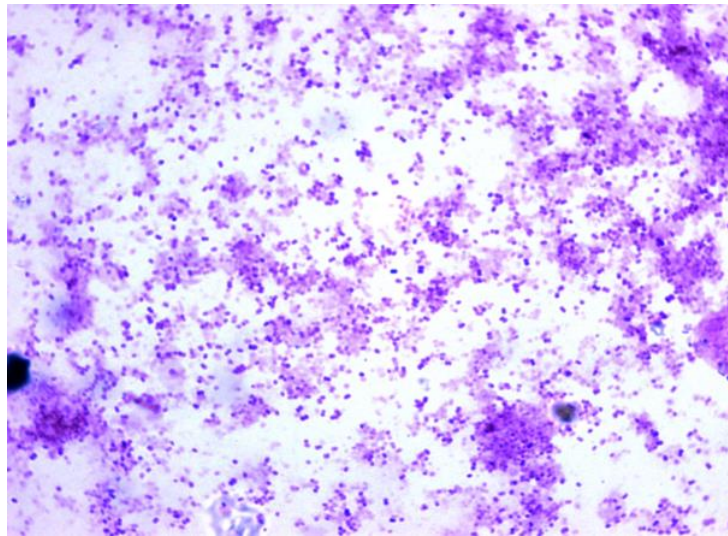


Рис. 37. Энтерококки в мазке из воспалительного очага в пародонте у крысы с лигатурным пародонтитом на 20-й день (ув. 90 × 10)

В контрольной группе уровень индигенной флоры был аналогичным, но стафило-энтерококковая ассоциация выделялась у 100% животных. *S. salivarius* и *V. parvula* определяли как единичные находки в количестве 3,0.

Через 20 суток эксперимента по колонизации животных опытной группы уровень индигенной флоры был минимальным — $3,0 \pm 0,5$, что подтверждало хорошее гигиеническое состояние полости рта животных. Стафилококки не выделялись в значимых количествах, а энтерококки составляли $3,0 \pm 0,3$ у 100% животных. Колонизирующую флору — *S. salivarius* выделяли у 60% животных, а *V. parvula* — напротив, у предельно большого числа крыс — 80% в количестве 3,3 и 3,2 соответственно. В контрольной группе уровень индигенной флоры был достоверно выше (на 3 порядка!), стафило-энтерококковая ассоциация выделялась у 100% животных, также в значительном количестве ($6,0 \pm 0,5$). *S. Salivarius* не выделялся, а *V. parvula* выявили у одного животного в низком количестве (2,0).

Для оценки стабильности колонизации слизистой экспериментальной микробной взвесью V+S проводили исследование колонизации на 28-е сутки. В опытной группе сохранялся низкий уровень колонизации индигенной флорой

без стафилококков ($4,0 \pm 0,5$). Энтерококки выделяли у 100% животных в количестве $3,0 \pm 0,4$. Колонизирующая флора сохранялась у значительной части животных — *S. salivarius* у 40%, а *V. parvula* — у 60% животных на уровне 3,0. В контрольной группе также отмечено снижение обсемененности (видимо, связанное с регрессом воспалительного процесса в пародонте) до $5,0 \pm 0,5$, однако доминировала стафило-энтерококковая ассоциация. Индигенные *V. parvula* выявлены у единичных животных, а *S. salivarius* не определялся.

Контроль колонизации кандидатными пробиотическими штаммами проводили с помощью масс-спектрометрии по белковому профилю выделенных культур, что позволило подтвердить на молекулярном уровне персистенцию именно кандидатных штаммов стрептококков и вейлонелл (рис. 38).

В то же время одновременно были выделены штаммы вейлонелл, имеющих иной белковый профиль (рис. 39).

Контроль за стоянием тканей воспалительного очага выполняли с помощью цитоморфологических исследований (световая микроскопия под иммерсией, окраска по Романовскому, $90 \times$). При этом были получены следующие результаты.

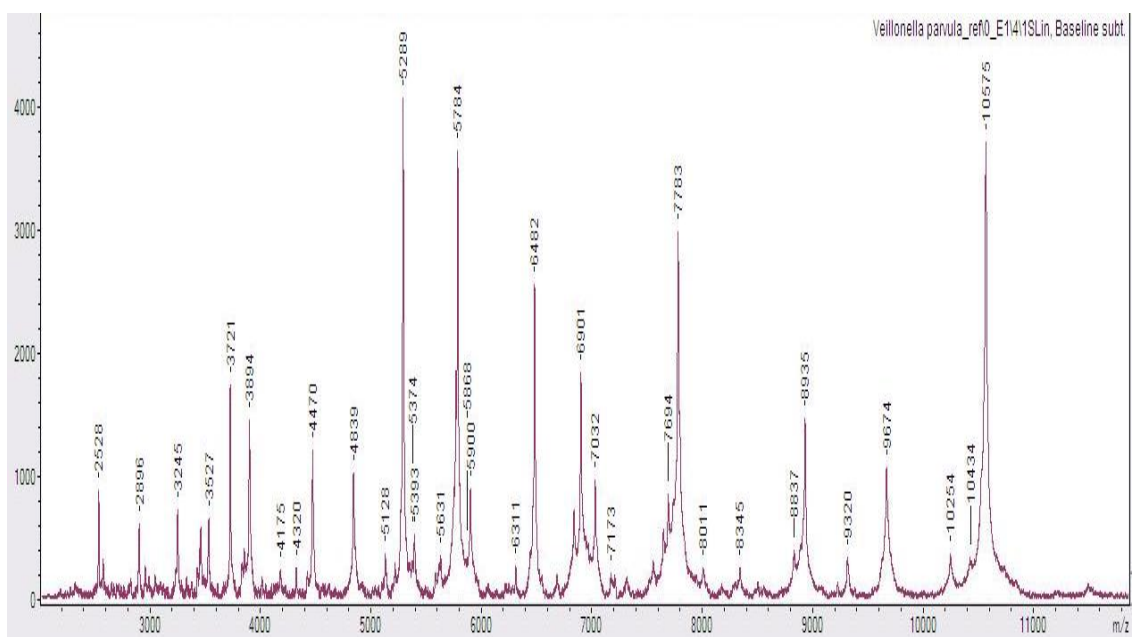


Рис. 38. Белковый спектр кандидатного пробиотического штамма *Veillonella parvula*, выделенного на 28-е сутки у крысы с моделью лигатурного пародонтита

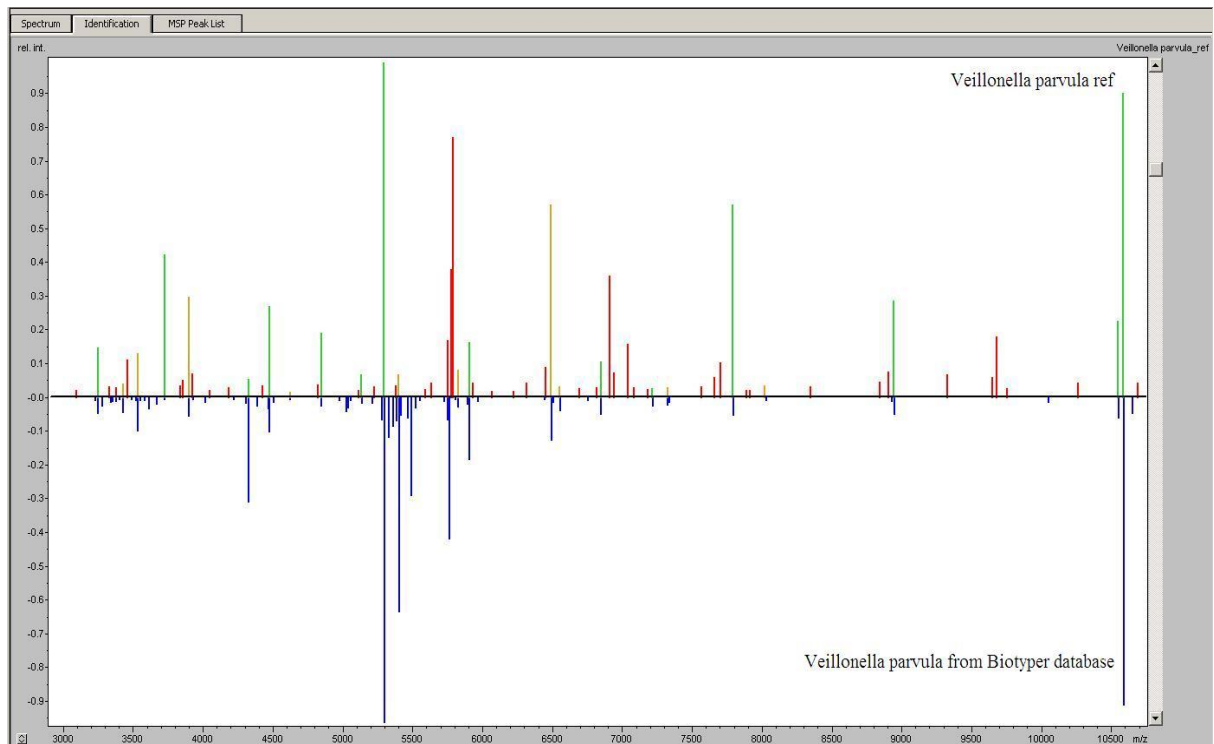


Рис. 39. Несовпадение белкового спектра двух штаммов вейлонелл *V. parvula*, выделенных у крысы на 28-е сутки эксперимента, — кандидатного и «дикого» штаммов

Контрольная группа. Через 10 дней после снятия лигатуры в пришеечной зоне обнаруживались выраженные воспалительные изменения, которые сопровождалось массивным инфильтратом, состоящим в основном из сегментоядерных лейкоцитов и макрофагов. Как и в зоне инфильтрата, так и в прилежащих к нему участках обнаруживались деструктивные изменения, особенно в пришеечной части периодонта и в расположенной здесь костной ткани. Они проявлялись в резорбтивных процессах при участии остеокластов, которые располагались в лакунах, тесно контактируя с костной тканью.

Степень выраженности резорбции варьировала. В зоне воспалительных изменений эпителий десны выглядел утолщенным, вместо рогового слоя обнаруживались явления паракератоза. Нижняя поверхность эпителия имела сосочки, глубоко внедряющиеся в подлежащую соединительную ткань. Как правило, эпителиальное прикрепление было нарушено с образованием десневого кармана. В некоторых случаях отмечены явления некроза, затрагивавшие как ткани десны, так и костную ткань альвеолы. В зоне некроза ткани имели

однородный вид, клеточные элементы в кости отсутствовали.

Эти изменения затрагивали области, непосредственно граничащие с десневым карманом. В одном случае при резком распаде тканей десны некротизированные костные фрагменты оказывались лежащими на поверхности. В то же время в глубоких отделах периодонта, расположенных ближе к верхушке корня, воспалительные изменения были значительно слабее. Это же относилось и к деструкции костной ткани.

На 20-е сутки опыта, как и в предыдущем сроке, в пришеечной зоне сохранялась выраженная воспалительная реакция. Воспалительный инфильтрат состоял из сегментоядерных лейкоцитов, макрофагов и молодых фибробластов. Расположенный здесь эпителий десны по-прежнему был утолщен с явлениями паракератоза на поверхности. Эпителиальное прикрепление во всех случаях нарушено, а расположенный здесь эпителий обнаруживал тенденцию к погружному росту. Эпителиальные сосочки глубоко внедрялись в подлежащую соединительную ткань. Особенно причудливые ветвления эпителиальных сосочков отмечались в зоне десневого кармана. Сама ткань, лежащая в области десневого кармана, напоминала грануляционную ткань. Пучки коллагеновых волокон частично разрушены, а сохранившиеся структуры разрыхлены. Окраска коллагеновых волокон не изменена. Костная ткань несла следы резорбтивных процессов, хотя по сравнению с предыдущим сроком, здесь наряду с остеокластами встречались и базофильные остеобласты. Они располагались по периферии сохранившихся костных фрагментов. Находившиеся здесь остециты приобретали базофилию цитоплазмы, напоминая молодые клетки остеобластического ряда. Отмечено расширение каналов остеонов с появлением в них остеобластов.

В зоне расположения остеобластов увеличивалось содержание кровеносных сосудов. В некоторых случаях в верхней части костной перегородки сохранялись явления некроза с характерными изменениями.

Через 30 суток опыта в пришеечной зоне интенсивность воспалительного процесса несколько уменьшилась. Клетки воспалительного инфильтрата

располагались отдельными участками, разделенные пучками утолщенных коллагеновых волокон. Сами волокна имели бледно-розовую окраску, пласт эпителия десны утолщен, в его поверхностных слоях по-прежнему обнаруживались явления паракератоза. Эпителиальное прикрепление, как и в предыдущие сроки, было нарушено с образованием десневого кармана. Эпителий, лежащий в его зоне, образует врастание в виде клина, внедряющегося в расположенную здесь соединительную ткань. Костная ткань обнаруживала проявления репаративных изменений, что выражалось в наличии на поверхности кости остеобластов с базофильной цитоплазмой. Здесь же обнаруживались участки новообразованной кости с расположенными в ней остеоцитами. Эти участки, как правило, были связаны с сохранившимися фрагментами костной ткани. Иногда они имели вид костных балочек, окруженных остеобластами. Промежутки между этими балочками были заполнены рыхлой тканью, напоминающей грануляционную ткань. Здесь же, в зоне восстановления кости, встречались и многоядерные остеокласты, лежащие в лакунах. Некротических изменений в костной ткани альвеолы не обнаруживалось. По своей окраске и строению она соответствовала пластинчатой кости с наличием типичных остеонов. Новообразование молодой костной ткани шло не только с поверхности костных фрагментов, но и со стороны расширенных каналов остеонов, в которых обнаруживались остеобласты. Как и в предыдущих сроках, все указанные изменения затрагивали пародонт верхней трети корня. Ниже находились участки, которые сохраняли свою структуру. В основном здесь отмечалось некоторое увеличение клеточных элементов фибробластного ряда. В периапикальной зоне в некоторых случаях имело место утолщение пучков коллагеновых волокон.

Опытная группа. На 10-е сутки у подопытных животных отмечались изменения в пришеечной зоне, которые проявлялись в виде воспалительной реакции с образованием инфильтрата, носившего локальный характер. В основном он имел вид скоплений клеточных элементов, расположенных между пучками коллагеновых волокон десневой группы. В состав инфильтрата входили

сегментоядерные лейкоциты и молодые фибробласты. Волокна, лежащие в зоне воспаления, разрыхлены, часть из них разрушена. Пласт эпителия утолщен, эпителиальное прикрепление, как правило, было нарушено с образованием десневого кармана. При сравнении с контрольной группой данного срока деструктивные процессы и видимые изменения в области десневого кармана были выражены слабее. Погружной рост эпителия проявлялся в виде незначительного врастания в подлежащую соединительную ткань утолщенного пласта эпителия. Костная ткань в области вершины альвеолы была резорбирована. Здесь обнаруживались многоядерные остеокласты наряду с участками резорбции кости, а также балочки новообразованной костной ткани, окруженные базофильными остеобластами. Практически не наблюдались некротические изменения в кости. Кость альвеолы сохраняла свои тинкториальные свойства и структуру, характерную для пластинчатой кости. Промежутки между костными балочками были заполнены рыхлой соединительной тканью, сращенной с краями костных фрагментов. Преобладающими клеточными элементами здесь являлись фибробласты различной степени зрелости. В участках периодонта, лежащих ниже дна десневого кармана, изменения ограничивались увеличением клеточных элементов и расширением кровеносных сосудов. Здесь же отмечалось появление остеобластов, расположенных по границе костной альвеолы с периодонтитом.

На 20-е сутки опыта у животных этой группы в пришеечной области сохранялся локальный воспалительный процесс, который по своему характеру не отличался какими-либо особенностями. В основном он затрагивал слизистую оболочку прилегающей к зубу десны, располагаясь между волокнами, лежащими здесь участка периодонта. В десне воспалительная реакция обнаруживалась на ограниченном фрагменте, непосредственно примыкающем к десневому карману. Пласт расположенного здесь эпителия, как и в предыдущем сроке, был утолщен с наличием в его поверхностных слоях явлений паракератоза. Нижние слои эпителия образовывали ветвящиеся эпителиальные сосочки, локализующиеся преимущественно вблизи десневого кармана. При оценке эпителиального

прикрепления отмечались незначительные нарушения без выраженного погруженного роста. Характерно, что зона, где отмечались изменения, ограничивалась участком непосредственно связанным с воспалением.

По сравнению с животными контрольной группы, воспалительный процесс отличался меньшей степенью выраженности деструктивных изменений. В основном они затрагивали находящиеся непосредственно в зоне воспаления коллагеновые волокна. Здесь располагались клетки, характеризующиеся гетероморфизмом, причем сегментоядерные лейкоциты локализовались преимущественно непосредственно в десневом кармане. За пределами зоны, связанной с десневым карманом, количество клеточных элементов заметно уменьшалось. Десневой карман имел вид узкого щелевидного промежутка между пришеечной частью корня и эпителием десны. Массивного обнажения подлежащих тканей, которые имели место у животных контрольной группы, здесь не наблюдалось. В пришеечной части периодонта пучки коллагеновых волокон были разрыхлены за счет расположенных клеток воспалительного инфильтрата. Состав клеточного инфильтрата к этому сроку претерпевал изменения, его основную часть образовали макрофаги и молодые фибробласты. Между ними отмечались тонкие пучки коллагеновых волокон. Костная ткань альвеолы обнаруживала выраженные репаративные процессы. Здесь находились базофильные остеобласты, непосредственно прилегающие к участкам кости альвеолы. В некоторых случаях мы встречали балочки, построенные из молодой костной ткани. Изменений некротического типа в данной группе у животных не наблюдали ни в одном случае. Новообразованная костная ткань формировалась и со стороны расширенных каналов остеонов.

На 30-е сутки опыта у животных опытной группы преобладали репаративные процессы. Толщина эпителия, прилежащая к десневому карману, заметно уменьшилась. Эпителиальные сосочки эпителия десны в основном были короткими и мало чем отличались от таковых в нормальном эпителии десны. Эпителиальное прикрепление нарушено, однако пласт эпителия достаточно плотно прилежал к пришеечной части зуба. В расположенной здесь подлежащей

соединительной ткани обнаруживались остаточные явления воспаления. Волокнистые структуры в основном имели характерную окраску и расположение. В одном случае отмечалось увеличение волокнистых структур в пришеечной зоне. За пределами зоны травмы ткани десны полностью восстанавливали свою структуру. В костной ткани альвеолы также отмечена активная репаративная регенерация. Остеобласты располагаются на периферии костных структур. Здесь же отмечено образование костных балочек, которые утолщались, и между ними появлялись анастомозы. Между костными балочками располагались гиперемизированные кровеносные сосуды, расположенные в рыхлой ткани, богатой клеточными элементами. В некоторых случаях костные балочки почти сливались между собой. Наряду с регенерацией отмечены также процессы перестройки костной ткани и восстановления типичной пластинчатой кости.

Следовательно, проведенный на животных эксперимент позволил констатировать, что в результате колонизации резидентными штаммами *S. salivarius* и *V. parvula* наблюдались благоприятные изменения в составе микробиоценоза слизистой оболочки полости рта у крыс, которые выражались в полной элиминации стафилококков (при сохранности популяции энтерококков), снижении общей микробной обсемененности. Эти данные свидетельствуют об улучшении гигиенического состояния полости рта и благоприятном влиянии на развитие воспалительного процесса в пародонте, так как у животных опытной группы, получавших экспериментальную взвесь V+S, наблюдалась более выраженная и быстрая регрессия признаков воспаления пародонта, подтвержденная нами при патоморфологическом исследовании.

Таким образом, взвесь резидентных штаммов вейллонелл и слюнных стрептококков может рассматриваться как перспективная основа для создания принципиально нового биопрепарата-эубиотика — с целью стабилизации микробиоценоза полости рта при комплексном лечении больных хроническим генерализованным пародонтитом.

ГЛАВА 4.
РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ:
ОЦЕНКА АССОЦИАЦИЙ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ ВИДОВ
И ИХ ВЗАИМОСВЯЗИ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

4.1. Результаты объективного клинического обследования пациентов с
индексной оценкой состояния тканей пародонта

Одним из основных симптомов заболеваний пародонта является воспаление десен, характеризующееся гиперемией, цианозом, отеком, сопровождающееся неудовлетворительным гигиеническим состоянием полости рта (рис. 40а, б).

Для оценки состояния зубных рядов также учитывали наличие мягких зубных отложений и зубного камня, зубов с кариозными полостями и дефектами некариозного происхождения, наличие физиологической или патологической стираемости, качество пломб (на контактных и пришеечной поверхностях зубов), состояние прикуса, наличие и качество зубных протезов, окклюзию.



Рис. 40 (а). Клиническая картина ХПТ в фазе обострения
(фронтальная проекция)



**Рис. 40 (б). Клиническая картина ХПТ в фазе обострения
(боковая проекция)**



**Рис. 41. Клиническая картина ХПЛ
(мелкое преддверие полости рта)**

Данные объективного клинического обследования пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта представлены на рис. 41–44, которые демонстрируют наличие воспаления на фоне таких местных факторов риска, как глубина преддверия рта (рис. 41), состояние десневого края, деформация зубных рядов, скученность зубов (рис. 42), нарушений окклюзии (рис. 43, рис. 44). Установлено, что у 49 из 300 обследованных пациентов (16,3%) было мелкое преддверие рта (глубина менее 5 мм), у 115 (61,6%) — среднее (в

пределах от 8 до 10 мм), у 66 (22%) — глубокое (более 10 мм). Деформации зубных рядов были выявлены у 38 (12,6%), скученность зубов — у 48 (16%), тремы и диастемы, веерообразное расхождение фронтальной группы зубов и (др.) — у 32 (10,7%) пациентов. Формирование клиновидных дефектов отмечено у 42 пациентов (14%). В целом наличие данных факторов риска не могло объяснить наличие воспалительного заболевания пародонта у 215 пациентов, то есть у большинства обследованных (71,7%).



**Рис. 42. Клиническая картина ХПС
(скученность зубов фронтальной группы на нижней челюсти)
(фронтальная и боковая проекции)**

У всех пациентов при анкетировании регистрировали нарушение окклюзионного взаимоотношения зубных рядов, наличие травматической окклюзии (первичной, вторичной), вследствие которой возникала функциональная перегрузка пародонта. Рентгенологическое исследование при первичной травматической окклюзии, обусловленной бруксизмом, ятрогенными факторами (пломбирование зубов, протезирование) выявляло очаговые неравномерные уплотнения и разрежения костной ткани; признаки остеосклероза, гиперцементоза, иногда — ложные гранулемы, неравномерное, асимметричное расширение периодонтальной щели, признаки резорбции альвеолярной кости и атрофии костной ткани альвеолярного гребня в отдельных

участках зубного ряда (рис. 43).

Вторичная травматическая окклюзия нередко сопровождалась повышенной стираемостью зубов у 26 пациентов (8,7%), деформацией зубных рядов, сколами эмали зуба и пломб в отдельных случаях (рис. 44).

Гнойное отделяемое из ПК и выраженную кровоточивость десен (при измерении глубины ПК пуговчатым зондом) отмечали более, чем у 1/3 % пациентов (32,6%). У такого же количества пациентов выявляли ретракцию края десны на небной поверхности зубов (чаще в области зубов 26, 36).



Рис. 43. Резорбция альвеолярной кости при ХПС в области отдельных зубов (на фоне первичной травматической окклюзии)



Рис. 44. Клиническая картина ХПС (на фоне травматической окклюзии)

Для оценки степени выраженности воспалительного процесса в тканях пародонта, состояния гигиены рта использовали общепринятые индексные оценки состояния тканей пародонта: ПМА, ИК, ПИ, а также результаты замеров глубины пародонтальных карманов.

Учитывая, что частоты распределения этих значений у обследованных пациентов не подчиняются нормальному распределению, для статистической обработки данных использовали методы непараметрической статистики. Результаты статистической обработки данных выражали в виде средней арифметической (М), медианы (Ме), минимального (Мин.) и максимального (Макс.) значений, 25-го и 75-го перцентилей, для N — количества обследованных индивидуумов. За статистически достоверную разницу данных принимали значения при $p < 0,05$.

Степень выраженности воспалительной реакции у пациентов определяли с помощью индекса ПМА (таблица 15).

Таблица 15

Результаты сравнительного анализа индексов ПМА у пациентов с заболеваниями пародонта и в контрольной группе, %

Группа	М	Ме	25- й процен тиль	75-й процен тиль	Мин.	Макс.	N
Контрольная	0,05	0	0	0	0	2,08	70
1а	51,29	50,67	44,56	57,43	43,70	61,17	70
1б	62,27	62,34	58,29	65,48	55,99	70,29	70
1в	70,57	70,44	68,58	72,45	66,91	74,90	70
2	47,23	46,82	40,67	53,76	39,50	55,76	50
3	59,87	58,60	56,84	64,67	52,40	60,60	40

У пациентов контрольной группы признаки воспалительного процесса десен отсутствовали. Во всех остальных группах мы наблюдали признаки воспалительного процесса в пародонте разной степени выраженности, которые

возрастали с увеличением тяжести заболевания. Так, у пациентов группы 1а — 50% средних значений (медиана и интерквартильный размах) — 50,7 (44,6; 57,4)%, группы 1б — 62,3 (58,3; 65,5)% и группы 1в — 70,4 (68,6; 72,5)% формировали непересекающиеся подмножества.

При расчете критерия Манна — Уитни оказалось, что средние показатели индекса ПМА в перечисленных подгруппах статистически различались между собой ($p = 0,001$).

Индексы ПМА у больных с гингивитом (группа 2) составляли — 46,8 (40,7; 53,8) % — статистически достоверно не отличались от значений у больных ХПЛ, у больных КАП (группа 3) — 58,6 (56,8; 64,7)% и соответствовали значениям больных ХПС, то есть были тождественны.

Следующим обязательным критерием для постановки диагноза и определения прогноза заболевания пародонта является показатель кровоточивости из пародонтального кармана/десневой борозды — в нашем исследовании использовали модифицированный индекс кровоточивости (SBI), который определяется с помощью зонда.

Было установлено, что значения SBI достоверно увеличивались соответственно степени тяжести заболевания (таблица 16). Медиана индекса кровоточивости 38,6 (35,2; 43,5)% у пациентов группы 1а в 3 раза превышала этот показатель в контрольной группе — 11,6 (10,4; 13,3)%. У пациентов 1б группы она была выше, чем у пациентов 1а в 1,4 раза — 54,4 (50,4; 61,9)% и в 4,7 раза выше, чем в контроле. Близкие значения были характерны и для пациентов группы 1в — 56,3 (50,1; 60,4)%.

Средние показатели индекса кровоточивости (SBI) в 1б и 1в группах статистически достоверно отличались от значений в группе 1а ($p_{M-U} = 0,001$). Следует отметить, что в отличие от ПМА, индекс кровоточивости при зондировании у больных КАП — 62,1 (60,9; 68,4)% был статистически достоверно выше, чем у больных ХП всех степеней тяжести ($p_{M-U} = 0,001$). Средние показатели SBI у пациентов с гингивитом были на уровне значений у больных ХПЛ — 36,5 (32,8; 44,6)%.

Таблица 16

Результаты сравнительного анализа индексов кровоточивости SBI у пациентов при зондировании и в контрольной группе, %

Группа	М	Ме	25-й процентиль	75-й процентиль	Мин.	Макс.	N
Контрольная	11,87	11,65	10,43	13,25	7,80	15,40	70
1а	40,26	38,6	35,22	43,50	33,40	52,30	70
1б	56,68	54,44	50,36	61,88	44,20	72,20	70
1в	55,34	56,25	50,10	60,43	45,10	65,40	70
2	38,67	36,48	32,82	44,62	30,68	51,80	50
3	64,65	62,12	60,86	68,44	56,24	74,60	40

По глубине пародонтальных карманов мы определяли степень деструкции кости альвеолярных отростков.

Медиана и 50% значений глубины пародонтальных карманов у пациентов 1а группы, равные 3,0 (3,0; 3,5) мм, 1б группы — 5,0 (2,5; 5,2) мм и 1в — 6,0 (5,5; 6,6) мм, статистически достоверно значимо отличались от контрольных значений — 1,1 (0,9; 1,3) мм, а также между собой при $p_{M-U} = 0,001$. Средние показатели глубины пародонтальных карманов у пациентов с КАП — 5,06 (4,6; 5,9) мм — незначительно отличались от значений у больных ХПС, а у больных катаральным гингивитом — 2,7 (2,8; 3,3) мм — от величин в группе больных ХПЛ (таблица 17).

Средние значения ПИ (медиана и интерквартильный размах) 3,99 (3,97; 4,03) баллов у пациентов 1а группы значительно отличались от нормы (таблица 18). У пациентов 1б группы они были выше, чем у пациентов 1а группы в 1,22 раза — 4,87 (4,56; 5,11) баллов, а у больных 1в группы — в 1,6 раза: 6,43 (6,31; 6,50) баллов и в 1,3 раза, по сравнению с группой 1а при статистически достоверной разнице ($p_{M-U} = 0,001$). Как и в случае с другими индексными оценками у больных ХГ, средние значения ПИ — 3,80 (3,28; 4,08) баллов — соответствовали величинам при ХПЛ, а у больных КАП — 5,14 (4,86; 5,64)

баллов — показателям больных ХПС.

Только в контрольной группе обследованных нами людей был отмечен оптимальный уровень гигиены.

Таблица 17

Результаты сравнительного анализа глубины пародонтального кармана (ПК) у пациентов с заболеваниями пародонта и в контрольной группе,

мм

Группа	М	Ме	25-й процент иль	75-й процент иль	Мин.	Макс .	N
Контроль ная	1,13	1,10	0,90	1,30	0	2,0	70
1а	3,05	3,00	3,00	3,50	2,0	4,0	70
1б	4,84	5,00	2,50	5,20	2,5	6,4	70
1в	6,35	6,00	5,50	6,62	4,0	7,0	70
2	2,85	2,65	2,80	3,30	2,0	4,0	50
3	5,24	5,06	4,58	5,86	4,15	6,5	40

Таблица 18

Результаты сравнительного анализа значений пародонтального индекса ПИ у пациентов с заболеваниями пародонта и в контрольной группе (в

баллах)

Группа	М	Ме	25-й процен тиль	75-й процент иль	Мин.	Макс .	N
Контроль ная	0	0	0	0	0	0,06	70
1а	4,00	3,99	3,97	4,03	3,90	4,09	70
1б	4,82	4,87	4,56	5,11	4,26	5,26	70
1в	6,41	6,43	6,31	6,50	6,16	6,60	70
2	3,40	3,80	3,28	4,08	3,25	4,16	50
3	5,02	5,14	4,86	5,64	4,60	5,80	40

При клиническом обследовании людей контрольной группы, как следует из представленных таблиц, не было выявлено каких-либо объективных

признаков воспаления и деструкции тканей пародонта. В результате рентгенологического исследования (ортопантомограмма) резорбтивные изменения в ткани альвеолярного отростка также не были выявлены. Уровень гигиены был удовлетворительным (ИГ — $0,3 \pm 0,2$). Прочие индексы соответствовали пределам нормы: ПМА — 0,05, SBI — 11,87, ПК — 1,13 мм, ПИ — 0.

Таким образом, у больных с воспалительными заболеваниями пародонта по сравнению с пациентами контрольной группы по данным индексных оценок основных клинических стоматологических показателей получена база данных, которые свидетельствовали о распространении и выраженности воспалительных реакций и признаков деструкции тканей пародонта у пациентов с разными формами и степенью тяжести заболевания. Это, в свою очередь, позволило нам в дальнейшем проанализировать полученную базу данных с точки зрения выявления возможных взаимосвязей с микробиологическими и иммунологическими параметрами.

4.2. Сравнительная микробиологическая характеристика пациентов по нозологическим формам (хронический гингивит, хронический пародонтит, кандида-ассоциированный пародонтит)

Известно, что воспалительные заболевания тканей пародонта связаны с распространением пародонтопатогенной и изменением качественного и количественного состава представителей резидентной микрофлоры [57, 100, 136, 139, 167, 242, 410].

Поэтому, используя возможности сканирующей электронной микроскопии, мы провели цитоморфологические исследования состава поддесневой биопленки при разных нозологических формах воспалительных заболеваний пародонта и у пациентов контрольной группы.

4.2.1. Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта в норме

Основное содержание данного фрагмента исследования состояло в оценке цитоморфологической картины смешанной биопленки пародонта пациентов с интактным пародонтом (условно здоровые) и основными нозологическими формами воспалительных заболеваний пародонта по данным различных видов микроскопического исследования.

Микроскопическая характеристика биопленки интактного пародонта представлена на рис. 45а, б и в.

На рис. 45а при увеличении 200× представлен общий вид смешанной микробной биопленки, которая структурирована. Отчетливо видны отверстия, выполняющие дренажную функцию, тяжи, укрепляющие матрикс, при данном увеличении слабо прослеживаются контуры бактерий, прикрытые мантией.

На рис. 45б при увеличении 100× виден разрыв пролиферирующей биопленки с выходом микробной массы в виде бугра. Подобные образования, которые формируются при росте однородной биопленки, получили название «монады». Они представляют собой способ пролиферации микробного сообщества и выхода его за пределы первоначальной локализации. Очевидно, что этот механизм имеет место и в случае смешанной биопленки в клинических условиях.

На рис. 45в при большом увеличении (16 000×) видна поверхность смешанной биопленки интактного пародонта. Отчетливо видны контуры микробных клеток под мантией (кокки и палочковидные или бациллярные клетки). Величина клеточных элементов микробной биомассы составляет примерно от 250 до 850 нм для кокковидных и палочковидных форм соответственно.

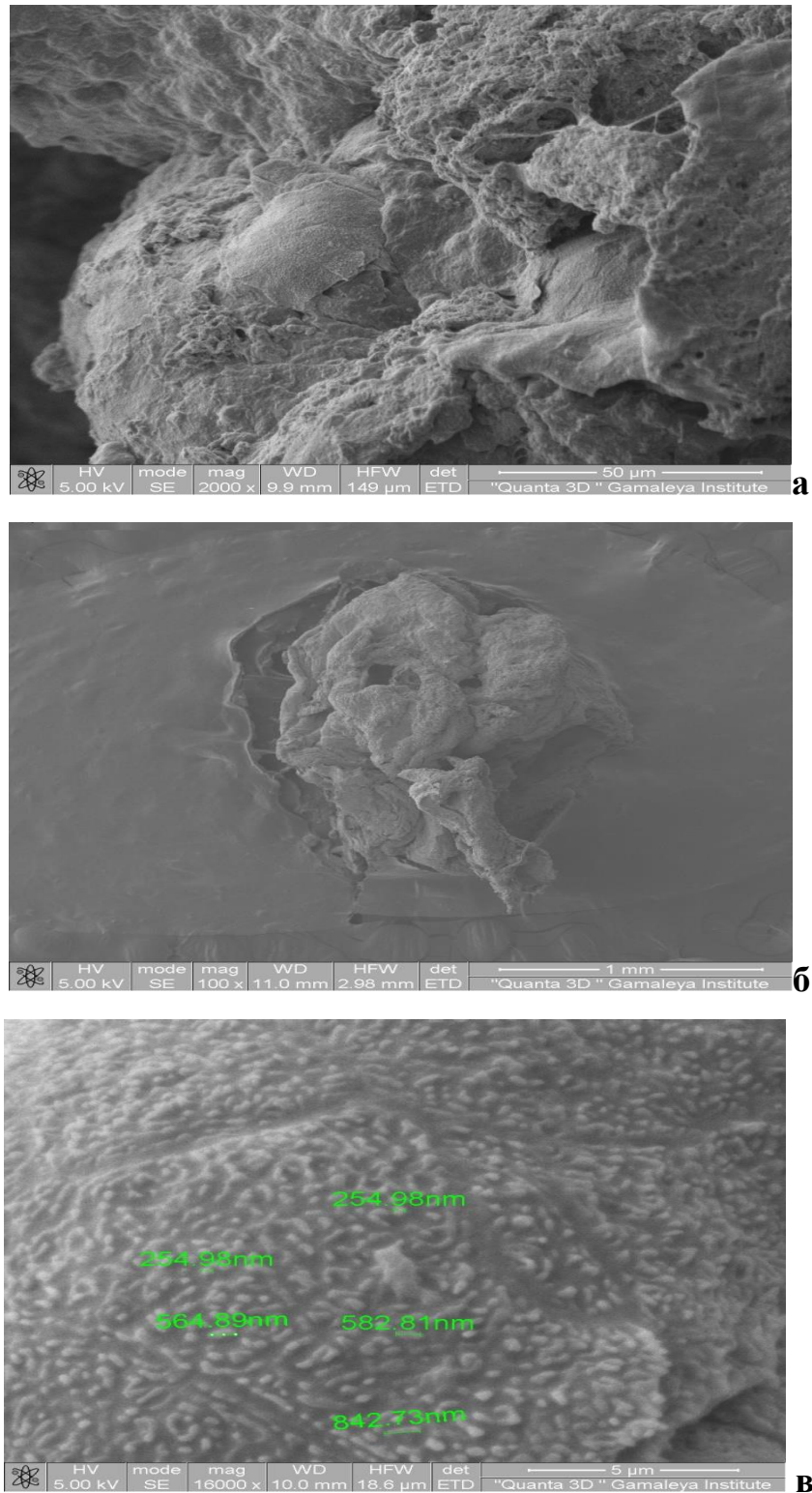


Рис. 45. Общий вид биопленки интактного пародонта.

А — видны холмообразные скопления симбионтов и отверстия, выполняющие дренажную функцию. 200×.

Б. Проллиферирующая биопленка интактного пародонта. Виден разрыв мантии с выростом микробной биомассы. 100×.

В. Поверхность смешанной биопленки интактного пародонта. Видны контуры бактерий под мантией. Указаны размеры структурных компонентов. 16 000×.

4.2.2. Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта при хроническом гингивите

Известно, что при хроническом (катаральном) гингивите наблюдаются воспалительная инфильтрация и отек слизистой десны (пародонта), а микробный состав представлен преимущественно альфа- и бета-гемолитическими микроаэрофильными стрептококками, что наиболее полно отражено в исследовании И. М. Шишкиной (2007) [108].

Нам удалось получить электронно-микроскопическую картину смешанной биопленки слизистой оболочки десен при катаральном гингивите (рис. 46). На представленной фотографии (6000×) видно доминирование кокковых форм с четкой морфологической картиной стрептококков и единичных клеток сахаромисетов.

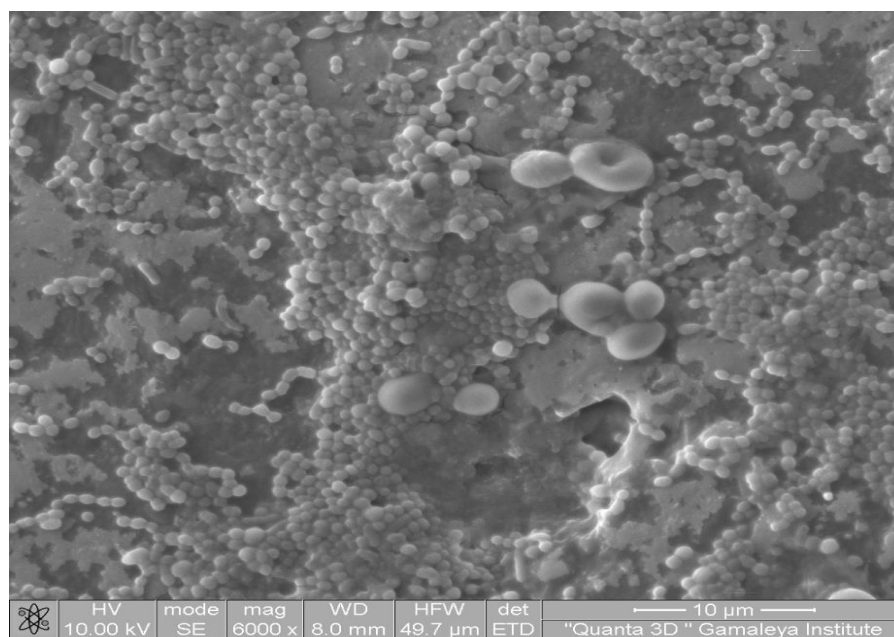


Рис. 46. Фрагмент смешанной биопленки (преимущественно кокковый морфологический вариант) при хроническом катаральном гингивите. 6000×

4.2.3 Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта при хроническом пародонтите

Принципиально иную картину мы наблюдали при хроническом пародонтите (рис. 47). При увеличении 6000× отмечается наличие как кокковых, так и палочковидных или бактериоидных форм, главным образом за счет представителей родов пародонтопатогенных бактерий *Porphyromonas*, *Prevotella*.

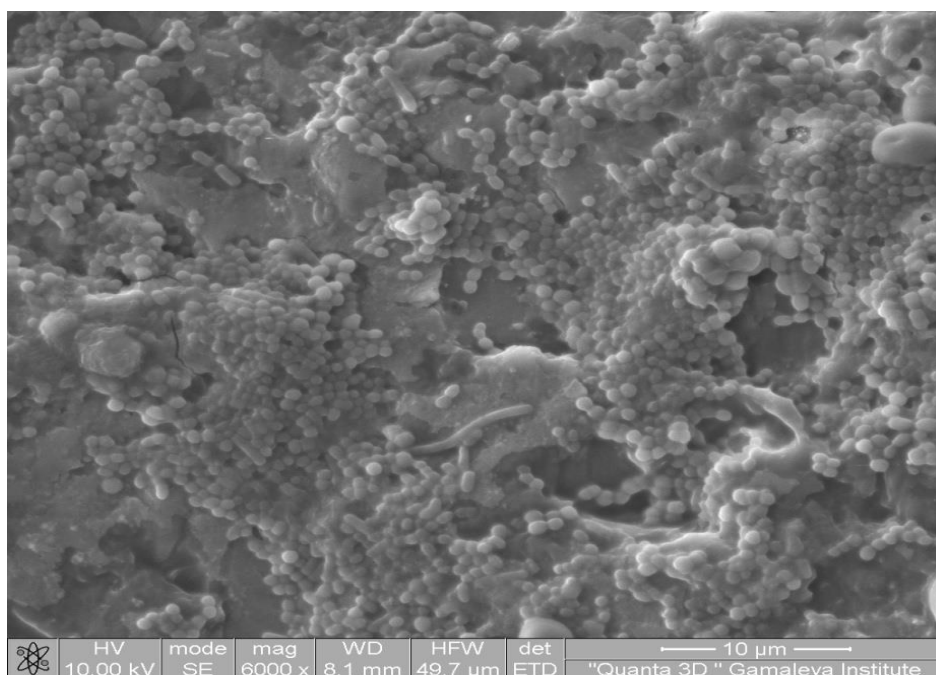


Рис. 47. Фрагмент смешанной биопленки (преимущественно бактериоидный морфологический вариант) при хроническом пародонтите. 6000×

При использовании трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 48) можно отметить особенности строения грамположительных кокков и грамотрицательных бактериоидных форм, а также извитых (трепонемы), которые позволяют провести их ориентировочную идентификацию. Представленный на фотографиях клеточный состав характерен для представителей пародонтопатогенных видов бактерий, относящихся к родам *Porphyromonas*, *Prevotella* и *Treponema*.

Микрофлора содержимого пародонтального кармана по данным трансмиссионной электронной микроскопии

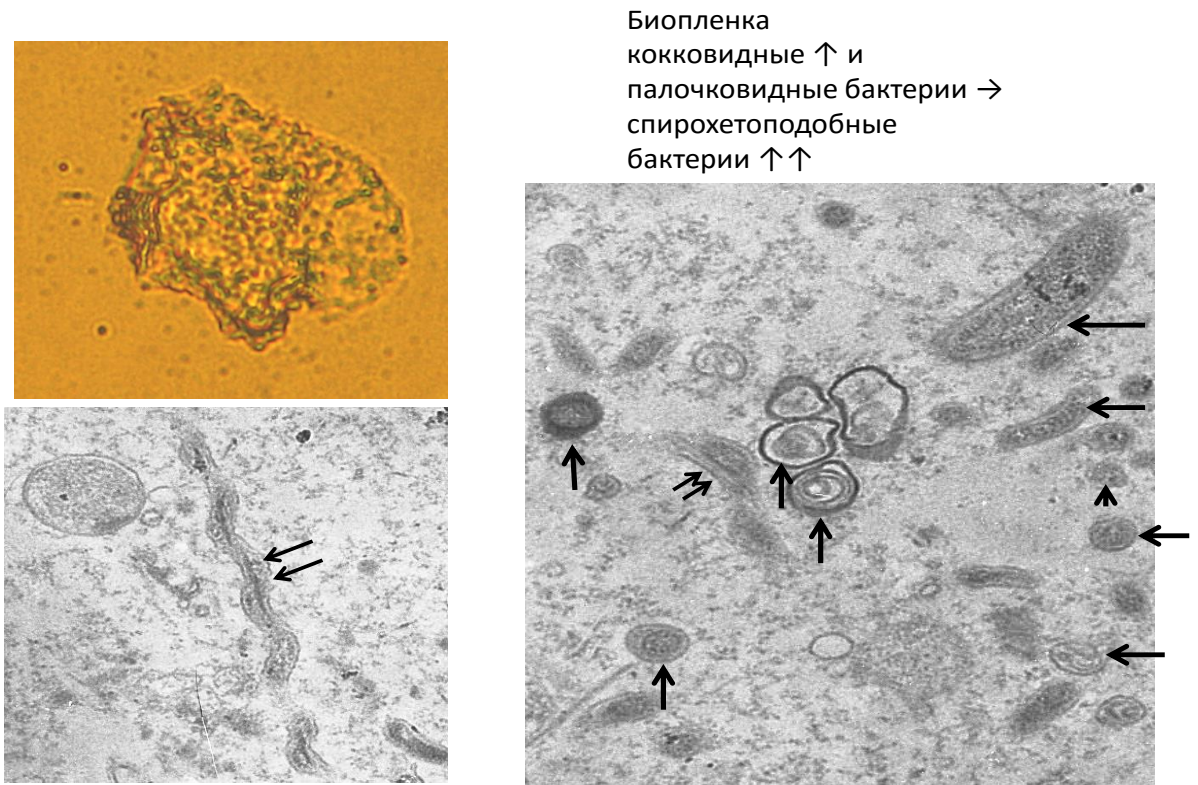


Рис. 48. Микробный состав биопленки при хроническом пародонтите по данным световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

Обозначения:

- 1 — верхний левый квадрант — общий вид фрагмента биопленки при световой микроскопии;
2 — нижний левый квадрант — трепонема *T. denticola*;
3 — правое поле — палочковидные (бактероидные) и кокковые формы. Видны различия между пептидогликановым слоем грам⁺ — кокков и стенкой грам⁻ бактерий.

4.2.4 Микроскопическая характеристика смешанной микробной биопленки пародонта при кандида-ассоциированном пародонтите

При кандида-ассоциированном пародонтите структура биопленки отличалась доминированием дрожжевых грибов *Candida*. При большом увеличении (12 000×) на фотографии, сделанной с помощью сканирующего электронного микроскопа, видны фрагменты биопленки, заключенные в мантию (рис. 49). Клеточный состав представляет собой типичные бластоспоры гриба *Candida albicans*.

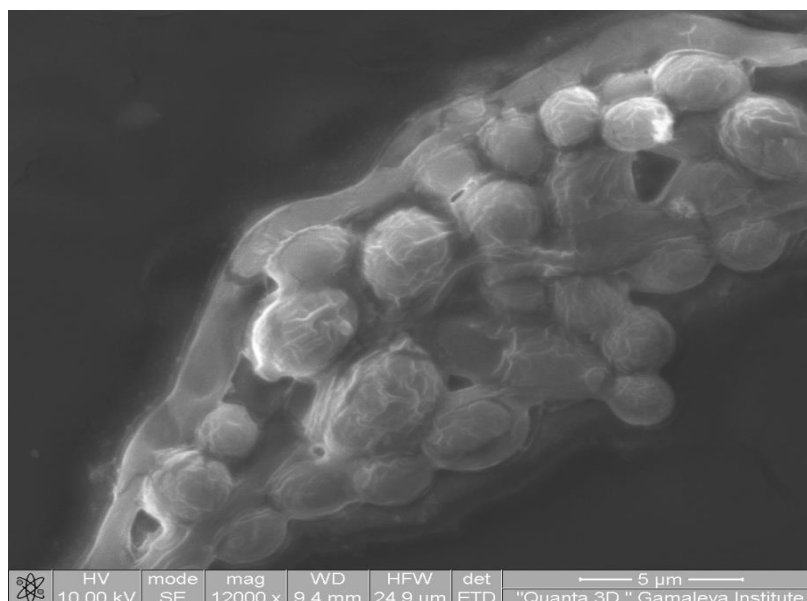


Рис. 49. Фрагмент биопленки дрожжевых грибов *Candida albicans* из пародонтального кармана при кандидо-ассоциированном пародонтите. 12 000×

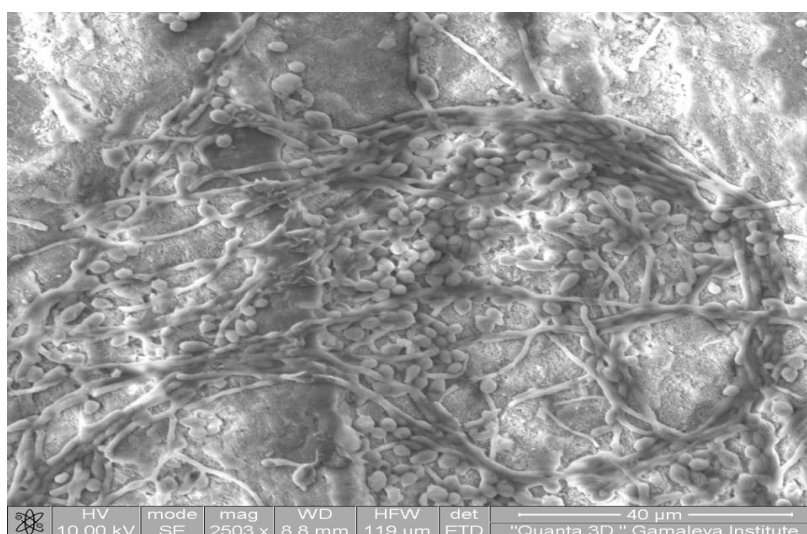


Рис. 50. Биопленка дрожжевых грибов рода *Candida albicans* на слизистой пародонта при кандидо-ассоциированном пародонтите. 2500×

На рис. 50 при увеличении 2500× видна типичная биопленка с мантией, покрывающая фрагменты псевдомицелия грибов *Candida albicans*. В пользу видовой принадлежности данного штамма говорит наличие единичных хламидоспор на концах нитей псевдомицелия.

4.3. Результаты исследования биопленки на наличие молекулярных маркеров пародонтопатогенных бактерий

С помощью молекулярно-биологических методов мы исследовали содержание пародонтопатогенных видов бактерий в области зубодесневой борозды и пародонтальных карманов у обследованных пациентов. При идентификации пародонтопатогенных видов бактерий мы использовали отечественную рабочую классификацию, предложенную В. Н. Царёвым с соавт. (2011), предполагающую выделение пародонтопатогенных видов 1 и 2 порядка в зависимости от их приоритетной значимости в развитии патологии пародонта (вертикальная и горизонтальная передача инфекционного агента, внутриклеточный паразитизм, высокий уровень выработки токсинов).

Соответственно, объектом нашего исследования явилось определение генетических маркеров трех пародонтопатогенных видов 1 порядка (*Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella (Bacteroides) forsythia*), что соответствует «красному комплексу», а также 2 порядка (*Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* и др.), что соответствует «оранжевому» и «желтому комплексу» по классификации Sohransky [431].

Относительная частота выявления всех исследованных нами видов пародонтопатогенов 1 порядка у больных с воспалительными заболеваниями тканей пародонта и людей контрольной группы статистически достоверно отличались друг от друга, $p = 0,0001$. Так, только у 4 (5,7%) из 70 человек со здоровым пародонтом с помощью системы «Мультидент-5» была выявлена ДНК *A. actinomycetemcomitans* (A. a.) и *P. intermedia* (P. i.), у 6 (8,6%) человек — *T. forsythia* (T.f.), у 3 (4,3%) — *T. denticola* (T. d.). *P. gingivalis* (P. g.) в норме не идентифицировали (рис. 51).

Частота выявления этих видов бактерий у больных катаральным гингивитом была в 1,4–5,0 раз выше, чем у представителей контрольной группы. Так, ДНК *P. intermedia* и *P. gingivalis* определили у 5 (10,0%) человек, *T. denticola* — у 3 (6,0%), *A. actinomycetemcomitans* — у 4 (8,0%) и чаще всего *T. forsythia* —

у 18 (36,0%) пациентов. При этом статистически достоверная разница была установлена в частоте определения *T. forsythia* ($\chi^2_{\text{кор.}} = 13,7$, $p = 0,0001$) и *P. gingivalis* ($\chi^2_{\text{кор.}} = 7,3$, $p = 0,007$).

Принципиально иная картина получена у пациентов с хроническим пародонтитом. Из 210 больных ХП ДНК *P. intermedia* выявили у 112 (53,3%) человек, *T. denticola* — у 126 (60,0%), *T. forsythia* — у 155 (73,8%), *A. actinomycetemcomitans* — 100 (47,6%) и *P. gingivalis* — у 136 (64,8%) пациентов.

При заболевании КАП частота выявления пародонтопатогенов была статистически достоверно в 5–30 раз выше, чем у людей со здоровым пародонтом, но в 1,34–1,99 раза ниже, за исключением *A. actinomycetemcomitans*, чем у больных ХП. Так, ДНК *P. intermedia* выявили у 12 (30,0%) человек, *T. denticola* — у 15 (37,5%), *T. forsythia* — у 22 (55,0%), *A. actinomycetemcomitans* — у 17 (41,5%) и *P. gingivalis* — у 13 (32,5%) пациентов.

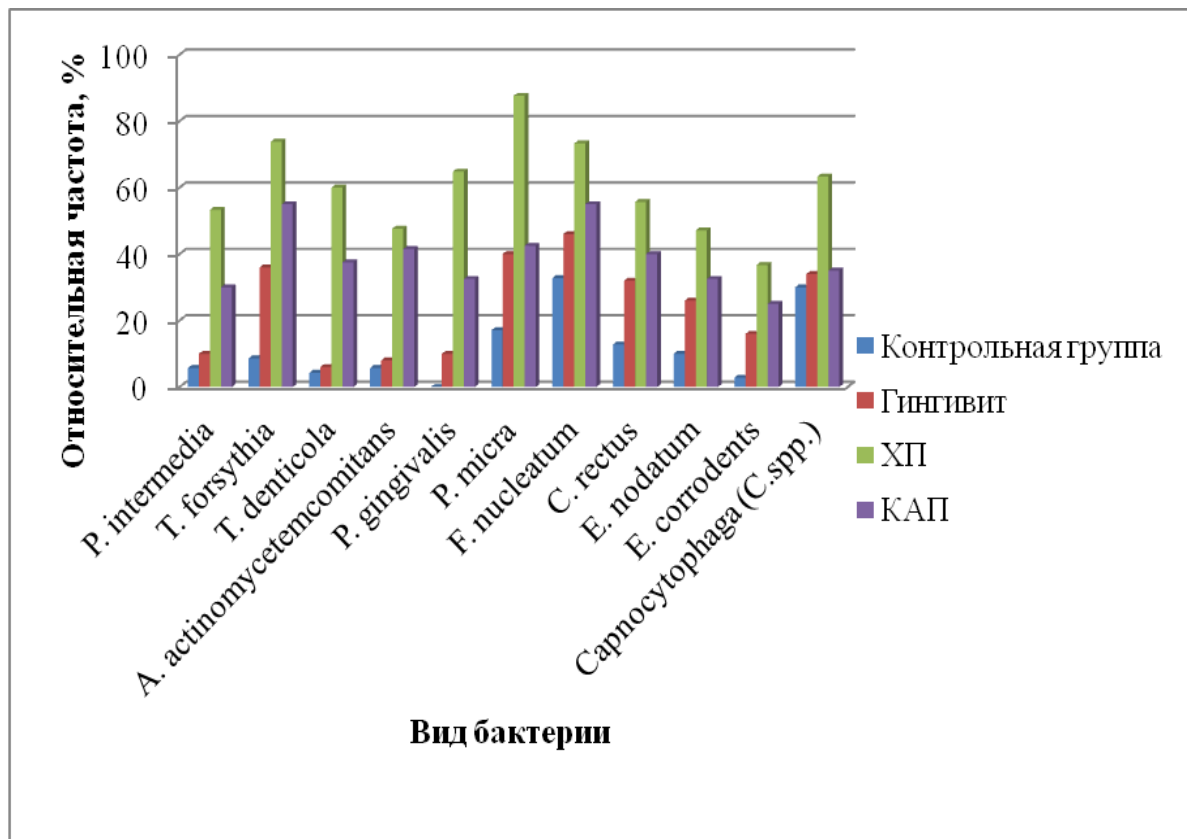


Рис. 51. Относительная частота выявления ДНК пародонтопатогенов 1 и 2 порядков в области зубодесневой борозды у обследованных пациентов

С помощью системы Micro-IDent®plus (Hain Lifescience, Германия) мы идентифицировали содержание прочих пародонтопатогенов 2 порядка в области зубодесневой борозды. У представителей контрольной группы ДНК *P. micra* выявили в 12 (17,1%) образцах, *C. rectus* — в 9 (12,8%), *E. nodatum* — в 7 (10,0%), *E. corrodents* — в 2 (2,8%), *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — у 21 (30,0%) и чаще всего *F. nucleatum* — в 23 (32,8%) образцах. При ХГ ДНК *P. micra* определили у 20 (40,0%), *C. rectus* — у 16 (32,0%), *E. nodatum* — у 13 (26,0%) человек, то есть статистически достоверно чаще в 2,3–2,6 раза, чем у людей со здоровым пародонтом; *E. corrodents* в 5,7 раза чаще — у 8 (16,0%) человек. ДНК *F. nucleatum* выявили у 23 (46,0%) больных КГ, *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — у 17 (34,0%) человек. По сравнению с контрольной группой, разница статистически не достоверна. Частота носительства пародонтопатогенов 2 порядка у больных ХП и КАП была статистически достоверно выше, чем у здоровых людей и больных КГ, за исключением *P. micra*, которую выявили у 17 (42,5%) больных КАП, практически с одинаковой частотой как у больных с КГ.

Итак, у 184 (87,6%) больных ХП выявили *P. micra*, *F. nucleatum* — у 154 (73,3%), *C. rectus* — у 117 (55,7%), *E. nodatum* — у 99 (47,1%), *E. corrodents* — у 77 (36,7%) и *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — у 133 (63,3%) человек. *F. nucleatum* идентифицировали у 22 (55,0%) больных КАП, *C. rectus* — у 16 (40,0%), *E. nodatum* — у 13 (32,5%), *E. corrodents* — у 10 (25,0%) и *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — у 14 (35,0%) пациентов.

Таким образом, все выявленные нами виды пародонтопатогенных бактерий чаще всего встречались в области зубодесневой борозды у больных ХП. В таблице 19 представлены значения разницы частот встречаемости пародонтопатогенов у пациентов разных групп относительно больных ХП.

**Коэффициент снижения частоты идентификации
пародонтопатогенных видов микробов в группах пациентов относительно
больных ХП**

Показатель	Группа		
	контрольная	гингивит	КАП
<i>P. intermedia</i>	9,35*	5,33*	1,78*
<i>T. forsythia</i>	8,58*	2,05*	1,34*
<i>T. denticola</i>	13,95*	10,0*	1,6*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	8,35*	5,95*	1,15
<i>P. gingivalis</i>	64,8*	6,48*	1,99*
<i>P. micra</i>	5,12*	2,19*	2,06*
<i>F. nucleatum</i>	2,23*	1,59*	1,33*
<i>C. rectus</i>	4,35*	1,74*	1,39
<i>E. nodatum</i>	4,71*	1,81*	1,45
<i>E. corrodens</i>	13,1*	2,29*	1,47
<i>Capnocytophaga</i> (C.spp.)	2,11*	1,86*	1,81*

Примечание: * — статистически достоверно значимая разница по сравнению с группой больных ХП.

Следует отметить, что у каждого больного ХП выявлено от одного до трех пародонтопатогенных видов 1 порядка, нередко в ассоциации с видами 2 порядка, поэтому мы отдельно анализировали частоту ассоциаций наиболее вирулентных видов 1–2 порядка, определяемых с помощью отечественной системы «МультиДент-5» (ассоциации 1 порядка) и менее вирулентных видов 2 порядка, определяемых системой MicroIDentPlus (ассоциации 2 порядка). Оказалось, что у 53 (75,7%) индивидуумов контрольной группы в области зубодесневой борозды не было выявлено ни одного из исследуемых нами видов пародонтопатогенов 1 порядка, у 14 (20,0%) — один вид и у 3 (4,3%) человек было выявлено два вида пародонтопатогенов (рис. 52).

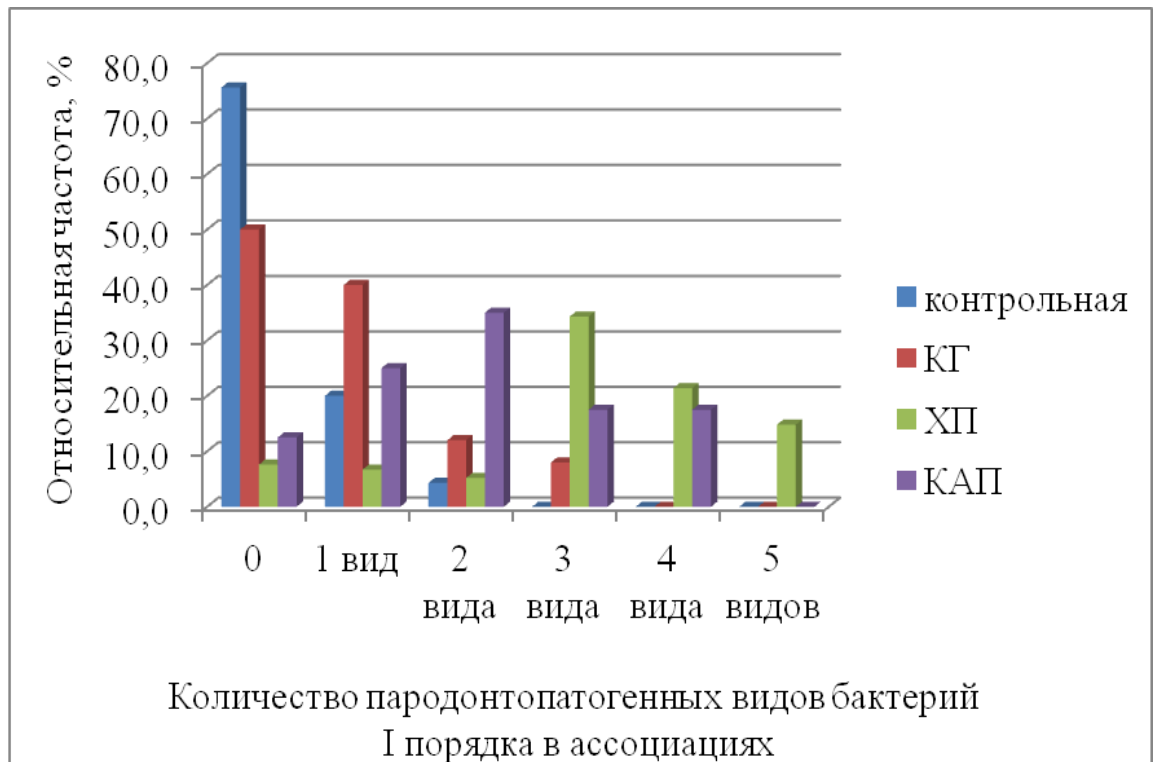


Рис. 52. Относительная частота встречаемости пародонтопатогенных видов микробов 1 порядка в ассоциациях у обследованных пациентов, %

Половина больных гингивитом не имела пародонтопатогенов в исследуемых участках, у 20 (40,0%) человек был выявлен только один вид микробов, у 6 (12,0%) — два вида и у 4 (8,0%) человек три вида пародонтопатогенов в ассоциациях. Только у 16 (7,6%) больных ХП не было выявлено ни одного вида микробов. Один вид пародонтопатогенов был определен у 14 (6,7%) пациентов, два вида — у 32 (15,2%), три вида — у 72 (34,3%), четыре вида микробов — у 45 (21,4%) и пять видов — у 31 (14,8%) человека. При заболевании КАП 5 (12,5%) человек не имели пародонтопатогенов, у 10 (25,0%) пациентов был выявлен один вид, 14 (35,0%) — два вида, по 7 (17,5%) человек имели 3–4 вида пародонтопатогенов в ассоциациях, пять видов не выявили ни у одного человека (рис. 52).

Таким образом, у 55% пациентов с катаральным гингивитом, 63% больных кандида-ассоциированным пародонтитом и 70% с хроническим пародонтитом были выявлены ассоциации 2–4 видов пародонтопатогенов 1 порядка.

4.4. Сравнительная характеристика состава пародонтопатогенов в биопленке и десневой жидкости

В настоящее время имеются литературные данные о том, что пародонтопатогенные бактерии обладают способностью к формированию биопленок. Ранее мы изучали микрофлору десневой жидкости в качестве фактора риска развития воспалительных заболеваний тканей пародонта. Для этого отбирали исследуемый материал, предварительно удалив наддесневые отложения (супрагингивальную бляшку) стерильными кюретками и осушив место отбора образца с помощью стерильного шарика ваты. Используя пару стерильных пинцетов, вводили стерильный бумажный зонд в десневой желобок (пародонтальный карман) так, чтобы исключить контакт со слизистой, поверхностью эмали или коронкой зуба, затем опускали до основания слизистой на 20–30 секунд, чтобы штифт пропитался десневой жидкостью в количестве, достаточном для определения микробов с помощью ПЦР.

Предположив, что при данном способе забора можно частично потерять материал из исходной биопленки, мы решили проверить эту гипотезу, изучив состав пародонтопатогенной микрофлоры как в десневой жидкости, так и из частично разрушенной микробной биопленки, отбирая по возможности всё содержимое пародонтального кармана.

Мы оценили состав пародонтопатогенной микробиоты в исходной биопленке и десневой жидкости у пациентов с ХП легкой (группа 1а), средней (группа 1б), тяжелой (группа 1в) степенями тяжести и кандидассоциированным пародонтитом (группа 3).

Было установлено, что в десневой жидкости большинство пародонтопатогенных видов бактерий как 1, так и 2 порядка определяли реже, чем в частично разрушенной биопленке. Так, в биопленке была выявлена ДНК *T. forsythia* у 48 (69%), а в десневой жидкости — у 35 (50,0%) больных ХПЛ; *A. actinomycetemcomitans* — у 29 (41%) и 17 (24,3%); *P. gingivalis* — у 38 (54%) и 26 (37%); *T. denticola* — у 37 (53%) и 25 (36%); *P. micra* — у 52 (74%) и 36 (51%); *F. nucleatum* — у 45 (64%) и 37 (53 %); *E. nodatum* — у 24 (34%) и 12 (17%); *E.*

corrodents — у 22 (31%) и 11 (16%); *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — у 39 (56%) и 23 (33%) человек соответственно. То есть в материале из биопленки данные виды бактерий выявляли статистически достоверно чаще, чем в десневой жидкости, на 11–23%. ДНК *P. intermedia* определили в 30 (43%) образцах из биопленки и 21 (30%) из десневой жидкости; *C. rectus* — в 33 (47%) и 23 (33%) образцах соответственно, но разница была статистически не достоверной (таблица 20).

Таблица 20

Частота определения пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биопленки и десневой жидкости у больных ХПЛ, n (%)

Показатель	Группа 1а		Разница, %	χ^2	p
	Биопленка	Десневая жидкость			
<i>P. intermedia</i>	30 (42,9)	21 (30,0)	12,9	2,5	0,114
<i>T. forsythia</i>	48 (68,6)	35 (50,0)	18,6	5,0	0,025*
<i>T. denticola</i>	37 (52,9)	25 (35,7)	17,2	4,17	0,041*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	29 (41,4)	17 (24,3)	17,1	4,66	0,031*
<i>P. gingivalis</i>	38 (54,3)	26 (37,1)	17,2	4,14	0,042*
Нет микробов	9 (12,9)	12 (17,1)	4,2	0,504	0,478
Число пародонтопатогенных видов I порядка в комбинациях					
1 вид	8 (11,4)	24 (34,3)	23,1	0,504	0,478
2 вида	13 (18,6)	14 (20,0)	1,4	0,046	0,830
3 вида	20 (28,6)	11 (15,7)	12,9	3,360	0,067
4 вида	12 (17,1)	6 (8,6)	8,5	2,300	0,130
5 видов	8 (11,4)	3 (4,3)	7,1	2,470	0,116
<i>P. micra</i>	52 (74,3)	36 (51,4)	22,9	7,83	0,005*
<i>F. nucleatum</i>	45 (64,3)	37 (52,9)	11,4	6,8	0,009*
<i>C. rectus</i>	33 (47,1)	23 (32,9)	14,3	2,98	0,084
<i>E. nodatum</i>	24 (34,3)	12 (17,1)	17,1	5,38	0,020*
<i>E. corrodens</i>	22 (31,4)	11 (15,7)	15,7	4,80	0,029*
<i>Capnocytophaga</i> (<i>C.spp.</i>)	39 (55,7)	23 (32,9)	22,9	7,41	0,006*

Примечание: * — статистически достоверно значимая разница

Из таблицы также видно, что у 12 (17%) пациентов 1а группы в образцах из десневой жидкости пародонтопатогенные виды бактерий 1 порядка отсутствовали. Один вид был выявлен у 24 (34%) больных, 14 (20%) человек имели по два вида пародонтопатогенов, 11 (16%) — три вида, 6 (9%) — четыре вида и только 3 (4%) человека — пять видов наиболее вирулентных видов патогенов. Таким образом, в десневой жидкости пациентов с ХПЛ в 54% случаев определяли один или два вида пародонтопатогенов в ассоциациях, в 28% случаев — от трех до пяти видов пародонтопатогенов 1 порядка.

В 9 (13%) образцах из биопленки пародонтопатогенов I порядка не было выделено, в 8 (11%) образцах был выделен один вид, в 13 (19%) — два, в 20 (29%) образцах — три, в 12 (17%) — четыре и в 8 (11%) образцах — пять видов пародонтопатогенов. При этом разница в частоте выявления пародонтопатогенов 1 порядка в образцах из биопленки и десневой жидкости была статистически не достоверна. Но суммарно доля людей, у которых в исследуемом материале определяли 1–2 пародонтопатогенных вида бактерий 1 порядка, статистически достоверно уменьшилась до 30%, а по 3–5 видов — увеличилась до 57% ($\chi^2_{\text{кор.}} = 11,7$, $p = 0,001$).

Такая же тенденция была отмечена у пациентов с ХПС (таблица 21). Так, ДНК *P. intermedia* идентифицировали в 39 (56%) образцах из биопленки и 26 (37%) из десневой жидкости; *T. denticola* — в 42 (60%) и 30 (43%); *P. gingivalis* — 45 (64%) и 33 (47%); *P. micra* — 64 (91) и 42 (60%); *E. corrodents* — 26 (37%) и 14 (20%); *Carnocytophaga (C. spp.)* — 44 (63%) и 28 (40%); соответственно, при этом частота выявления данных видов микробов была статистически достоверно выше в образцах из биопленки на 17,1–31,4%, чем в десневой жидкости. Остальные изучаемые нами виды микробов выявляли также чаще на 10–14% в исследуемом материале из биопленок, но разница была статистически не достоверной. Так, ДНК *T. forsythia* у представителей группы 1б выявили в 52 (74%) образцах из биопленок и 43 (61%) из десневой жидкости; *A. actinomycetemcomitans* — из 32 (46%) и 24 (35%); *F. nucleatum* — в 51 (73%) и 41 (59%); *C. rectus* — в 37 (53%) и 30 (43); *E. nodatum* — в 30 (43) и 22 (31%)

СООТВЕТСТВЕННО.

Таблица 21

Частота встречаемости пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биопленки и десневой жидкости у больных ХПС, n (%)

Показатель	Группа 1б		Разница, %	χ^2	p
	Биопленка	Десневая жидкость			
<i>P. intermedia</i>	39 (55,7)	26 (37,1)	18,6	4,85	0,028*
<i>T. forsythia</i>	52 (74,3)	43 (61,4)	12,9	2,65	0,103
<i>T. denticola</i>	42 (60,0)	30 (42,9)	17,1	4,12	0,042*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	32 (45,7)	24 (34,8)	10,9	1,98	0,168
<i>P. gingivalis</i>	45 (64,3)	33 (47,1)	17,2	4,17	0,041*
Нет микробов	5 (7,1)	7 (10,0)	2,9	0,365	0,546
Число пародонтопатогенных видов 1 порядка в комбинациях					
1 вид	4 (5,7)	18 (25,7)	20,0	10,6	0,001*
2 вида	12 (17,1)	19 (27,1)	10,0	2,03	0,154
3 вида	24 (34,3)	12 (17,1)	17,2	5,38	0,020*
4 вида	15 (21,4)	8 (11,4)	10,0	2,55	0,110
5 видов	10 (14,3)	6 (8,5)	5,8	1,13	0,288
<i>P. micra</i>	64 (91,4)	42 (60,0)	31,4	18,8	0,0001*
<i>F. nucleatum</i>	51 (72,9)	41 (58,6)	14,3	3,17	0,075
<i>C. rectus</i>	37 (52,9)	30 (42,9)	10,0	1,4	0,236
<i>E. nodatum</i>	30 (42,9)	22 (31,4)	11,4	1,96	0,162
<i>E. corrodens</i>	26 (37,1)	14 (20,0)	17,1	5,04	0,025*
<i>Capnocytophaga (C. spp.)</i>	44 (62,9)	28 (40,0)	22,9	7,32	0,007*

Примечание: * — статистически достоверно значимая разница

При этом у 7 (10%) пациентов 1б группы в образцах из десневой жидкости и 5 (7%) из биопленки пародонтопатогенные виды бактерий I порядка отсутствовали. Один вид был выявлен у 18 (26%) больных в десневой жидкости и статистически достоверно в 4,5 раза реже: у 4 (6%) человек в биопленке. По два вида пародонтопатогенов определили у 19 (27%) человек в десневой

жидкости и 12 (17%) человек — в биопленке. Три вида в ассоциации определили у 12 (17%) человек в десневой жидкости и статистически достоверно в два раза чаще — в образцах из биопленки ($\chi^2_{\text{кор.}} = 5,38$, $p = 0,020$). По четыре вида пародонтопатогенов определили у 8 (11%) человек в десневой жидкости и у 15 (21%) пациентов — в материале из биопленки. По пять видов наиболее вирулентных видов пародонтопатогенов выявили у 6 (9%) человек в десневой жидкости и у 10 (14%) — в биопленке.

Таким образом, в десневой жидкости пациентов с ХПС в 53% случаев определяли один или два вида пародонтопатогенов в ассоциациях, в 37% случаев — от 3 до 5 видов пародонтопатогенов I порядка. В 23% образцов из биопленки выявляли по 1–2 вида пародонтопатогенов, то есть в 2,3 раза реже, в 70% образцов — по 3–5 видов пародонтопатогенов I порядка, то есть в 1,9 раза чаще, чем в десневой жидкости ($\chi^2_{\text{кор.}} = 34,3$, $\eta = 3$, $p = 0,0001$).

В группе больных ХПТ ДНК *P. intermedia* выявили у 43 (61%) человек в биопленке и 31 (44%) человека — в десневой жидкости; *T. forsythia* — у 55 (79%) и 39 (56%); *P. gingivalis* — у 53 (76%) и 41 (59%); *P. micra* — у 68 (97%) и 56 (80%); *E. nodatum* — у 45 (64%) и 29 (41%); *Capnocytophaga (C.spp.)* — у 49 (70%) и 41 (59%) человек, соответственно (таблица 22). Разница в частоте выявления этих видов микробов из различных биологических материалов составляла 17–23% и была статистически достоверной. Немного меньше (7–13%) и статистически не достоверной была разница в частоте встречаемости остальных видов бактерий: *T. denticola* определили в 47 (67%) образцах из биопленки и 42 (60%) из десневой жидкости; *A. actinomycetemcomitans* — 39 (56%) и 32 (46%); *F. nucleatum* — 59 (84%) и 52 (74%); *C. rectus* — 48 (69%) и 39 (56%); *E. corrodents* — 29 (41%) и 23 (33%) образцах.

У 6 (9%) пациентов 1в группы в десневой жидкости пародонтопатогенные виды бактерий 1 порядка отсутствовали. Один вид был выявлен у 10 (10%) больных, 14 (20%) человек имели по два вида пародонтопатогенов, 21 (30,0%) пациент имел три вида, 11 (16%) — четыре вида и 8 (11%) человек — пять видов пародонтопатогенов.

Таблица 22

Частота выявлений пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биопленки и десневой жидкости у больных ХПТ, n (%)

Показатель	Группа 1в		Разница, %	χ^2	p
	Биопленка	Десневая жидкость			
<i>P. intermedia</i>	43 (61,4)	31 (44,3)	17,1	4,12	0,042*
<i>T. forsythia</i>	55 (78,6)	39 (55,7)	22,9	8,29	0,004*
<i>T. denticola</i>	47 (67,1)	42 (60,0)	7,1	0,771	0,380
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	39 (55,7)	32 (45,7)	10,0	1,40	0,237
<i>P. gingivalis</i>	53 (75,7)	41 (58,5)	17,2	4,66	0,031*
Нет микробов	2 (2,9)	6 (8,6)	5,7	2,12	0,145
Число пародонтопатогенных видов 1 порядка в комбинациях					
1 вид	2 (2,9)	10 (10,0)	7,1	5,83	0,016*
2 вида	7 (10,0)	14 (20,0)	10,0	2,75	0,098
3 вида	28 (40,0)	21 (30,0)	10,0	1,54	0,215
4 вида	18 (25,7)	11 (15,7)	10,0	2,13	0,144
5 видов	13 (18,6)	8 (11,4)	7,2	1,40	0,237
<i>P. micra</i>	68 (97,1)	56 (80,0)	17,1	10,20	0,001*
<i>F. nucleatum</i>	59 (84,3)	52 (74,3)	10,0	2,13	0,144
<i>C. rectus</i>	48 (68,6)	39 (55,7)	12,9	2,46	0,117
<i>E. nodatum</i>	45 (64,3)	29 (41,4)	22,9	14,80	0,0001*
<i>E. corrodents</i>	29 (41,4)	23 (32,9)	8,6	1,10	0,294
<i>Capnocytophaga (C.spp.)</i>	49 (70,0)	41 (58,6)	22,9	8,09	0,004*

Примечание: * — статистически достоверно значимая разница

В 2 (3%) образцах из биопленки пародонтопатогенов I порядка не было выделено, еще в 2 (3%) образцах был выделен один вид, в 7 (10%) — два, в 28 (40%) образцах — три, в 18 (26%) — четыре и в 13 (19%) образцах — пять видов пародонтопатогенов. Только в случае определения одного вида пародонтопатогенов в исследуемых образцах биопленки и десневой жидкости разница была статистически значимо достоверна ($\chi^2_{\text{кор.}} = 5,83$, $\eta = 1$, $p = 0,016$).

Итак, в десневой жидкости пациентов с ХПТ в 30% случаев определяли 1–2 вида пародонтопатогенов в ассоциациях, в 57% случаев — от 3 до 5 видов

пародонтопатогенов 1 порядка. В 13% образцов из биопленки выявляли по 1–2 вида пародонтопатогенов, то есть в 2,3 раза реже, в 84% образцов — по 3–5 видов пародонтопатогенов 1 порядка, то есть в 1,5 раза чаще, чем в десневой жидкости ($\chi^2_{\text{кор.}} = 79,2$, $\eta = 3$, $p = 0,0001$).

В целом у всех обследованных пациентов с ХП было отмечено, что частота выявления всех изучаемых нами пародонтопатогенных видов бактерий в биопленке из пародонтальных карманов статистически достоверно выше, чем в десневой жидкости, на 12–24%. Так, *T. forsythia* определили у 155 (74%) человек в биопленке и только у 117 (56%) пациентов в десневой жидкости; *A. actinomycetemcomitans* — у 100 (48%) и 73 (35%); *P. gingivalis* — у 136 (65%) и 100 (48%); *P. intermedia* — у 112 (53%) и 78 (37%); *T. denticola* — у 126 (60%) и 97 (46%); *P. micra* — у 184 (88%) и 134 (64%); *F. nucleatum* — у 154 (73%) и 129 (61%); *C. rectus* — у 117 (56%) и 93 (44%); *E. nodatum* — у 99 (47%) и 64 (31%); *E. corrodents* — у 77 (37%) и 48 (23%); *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — у 133 (63%) и 92 (44%) человек соответственно (таблица 23).

При этом у 25 (12%) пациентов с ХП в десневой жидкости пародонтопатогенные виды бактерий 1 порядка отсутствовали. Один вид был выявлен у 52 (25%) больных, 47 (22%) человек имели по два вида пародонтопатогенов, 44 (21%) пациент имел три вида, 25 (12%) — четыре вида и 25 (12%) человек — пять видов пародонтопатогенов. Таким образом, в десневой жидкости пациентов с ХП в 47% случаев определяли один или два вида пародонтопатогенов в ассоциациях, в 43% случаев — от трех до пяти видов пародонтопатогенов I порядка.

У 16 (8%) человек в образцах из биопленки пародонтопатогены 1 порядка не были выделены, у 14 (7%) был выделен один вид, у 32 (15%) — два, у 72 (34%) образцах — три, у 45 (21%) — четыре и у 31 (15%) человека — пять видов пародонтопатогенов. Только в случае определения в двух видов пародонтопатогенов в исследуемых образцах биопленки и десневой жидкости разница была статистически не достоверна.

Таким образом, при ХП в материале из биопленки в 22% случаев определяли 1–2 вида пародонтопатогенов в ассоциациях, то есть в 2 раза реже, чем в десневой жидкости, а в 70% случаев — от 3 до 5 видов пародонтопатогенов 1 порядка, то есть почти в 2 раза чаще, чем в десневой жидкости ($\chi^2_{\text{кор.}} = 102,0$, $n = 3$, $p = 0,0001$).

Таблица 23

Частота встречаемости пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биопленки и десневой жидкости у больных ХП, n (%)

Показатель	ХП		Разница, %	χ^2	p
	Биопленка	Десневая жидкость			
<i>P. intermedia</i>	112 (53,3)	78 (37,1)	16,2	8,46	0,004*
<i>T. forsythia</i>	155 (73,8)	117 (55,7)	18,1	15,1	0,0001*
<i>T. denticola</i>	126 (60,0)	97 (46,2)	13,8	8,04	0,005*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	100 (47,6)	73 (34,8)	12,8	7,17	0,007*
<i>P. gingivalis</i>	136 (64,8)	100 (47,6)	17,2	12,5	0,0001*
Нет микробов	16 (7,6)	25 (11,9)	4,3	2,67	0,102
Число пародонтопатогенных видов 1 порядка в комбинациях					
1 вид	14 (6,7)	52 (24,8)	18,1	28,0	0,0001*
2 вида	32 (15,2)	47 (22,4)	7,2	3,51	0,061
3 вида	72 (34,3)	44 (20,9)	13,4	9,34	0,002*
4 вида	45 (21,4)	25 (11,9)	10,5	6,86	0,002*
5 видов	31 (14,8)	17 (8,1)	6,7	5,36	0,021*
<i>P. micra</i>	184 (87,6)	134 (63,8)	23,8	32,40	0,0001*
<i>F. nucleatum</i>	154 (73,3)	129 (61,4)	11,9	6,77	0,009*
<i>C. rectus</i>	117 (55,7)	93 (44,3)	11,4	5,49	0,019*
<i>E. nodatum</i>	99 (47,1)	64 (30,5)	16,7	12,3	0,0001*
<i>E. corrodens</i>	77 (36,7)	48 (22,9)	13,8	9,58	0,001*
<i>Capnocytophaga</i> (C.spp.)	133 (63,3)	92 (43,8)	19,5	19,60	0,0001*

Примечание: * — статистически достоверно значимая разница

При этом частота выявления пародонтопатогенных видов бактерий увеличивалась в зависимости от степени тяжести пародонтита. Так, у пациентов 1а группы (ХПЛ) пародонтопатогены 1 порядка определяли в десневой жидкости в 4–8 раз, а *P. gingivalis* (не выявляемую у здоровых людей) — приблизительно в 37 раз, и пародонтопатогены 2 порядка — в 2–6 раз чаще, чем у людей со здоровым пародонтом. С учетом микрофлоры в биопленке пародонтального кармана эта разница была еще значительнее: частота определения пародонтопатогенов 1 порядка была в 8–12 раз выше, *P. gingivalis* — в 54 раза, пародонтопатогенов 2 порядка — в 2–11 раз, чем в контрольной группе (рис. 53).

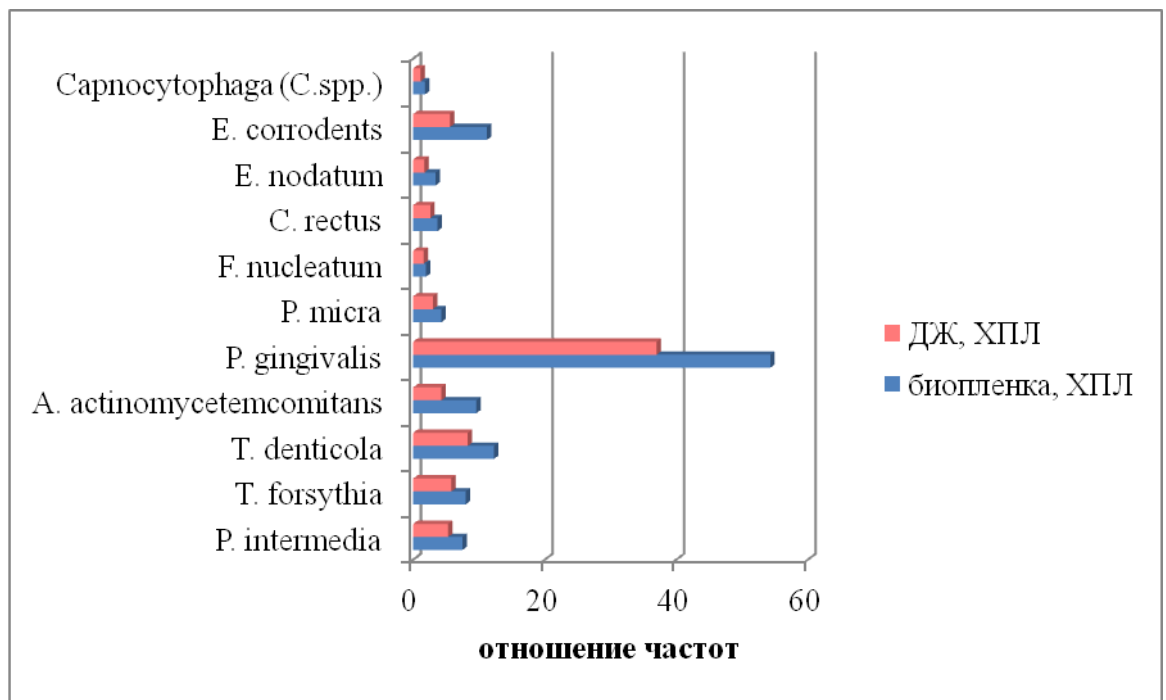


Рис. 53. Отношение частот встречаемости пародонтопатогенных видов микробов I и II порядков у больных ХПЛ и людей со здоровым пародонтом

У пациентов 1б группы (ХПС) пародонтопатогены 1 порядка в десневой жидкости определяли в 4–8 раз, *P. gingivalis* — в 47 раз и пародонтопатогены II порядка — в 1,3–6,5 раза чаще, чем у людей со здоровым пародонтом. В биопленке, соответственно, пародонтопатогены 1 порядка выявляли в 8–14 раз, *P. gingivalis* — в 64 и пародонтопатогены 2 порядка — в 2–14 раз чаще, чем в контроле (рис. 54).

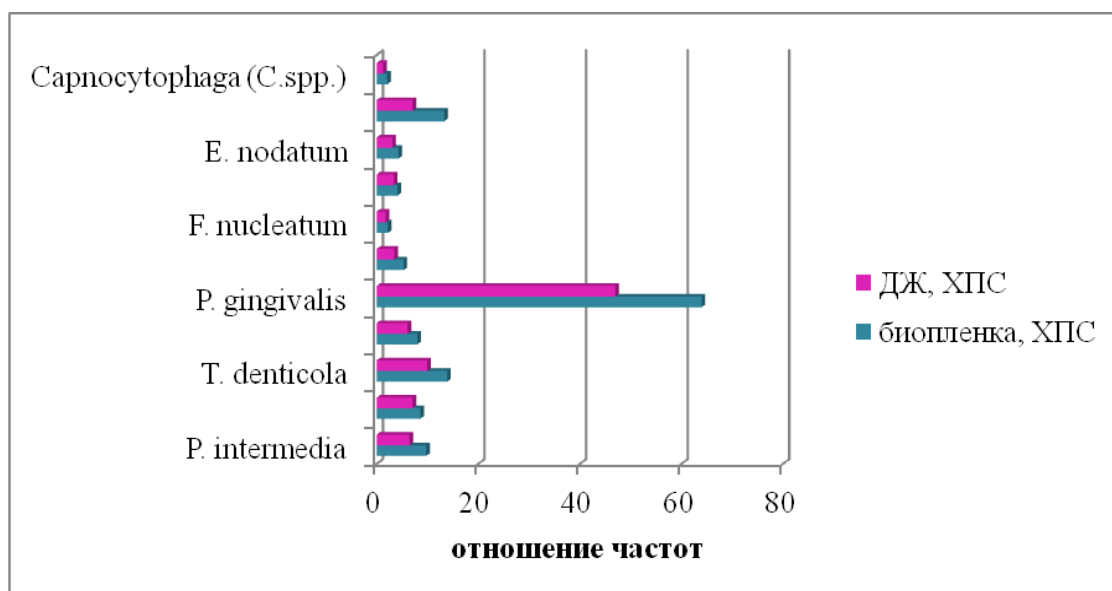


Рис. 54. Отношение частот встречаемости пародонтопатогенных видов микробов I и II порядков у больных ХПС и людей со здоровым пародонтом

В десневой жидкости пациентов 1в группы (ХПТ) пародонтопатогены 1 порядка определяли в 7–14 раз чаще, *P. gingivalis* — в 59 раз, пародонтопатогены 2 порядка — в 2–12 раз чаще, чем у здоровых людей. В биопленке пародонтопатогенные виды 1 порядка идентифицировали в 2–15 раз, *P. gingivalis* — в 75 раз и пародонтопатогены 2 порядка — в 2–15 раз чаще, чем у людей контрольной группы (рис. 55.).

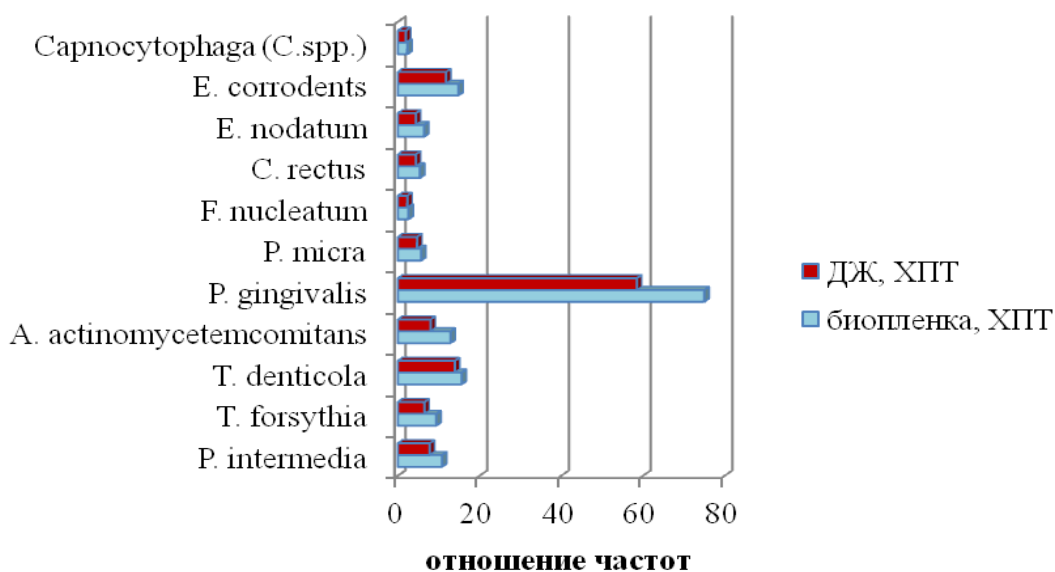


Рис. 55. Отношение частоты встречаемости пародонтопатогенных видов микробов 1 и 2 порядков у больных ХПТ и людей со здоровым пародонтом

При кандидата-ассоциированном пародонтите ДНК *T. forsythia* выявили у 13 (33%) человек в десневой жидкости и у 22 (55%) пациентов в материале из биопленок, то есть, на 23% чаще ($\chi^2_{\text{кор.}} = 4,11$, $\eta = 1$, $p = 0,043$). *T. denticola* идентифицировали в 9 (23%) образцах из десневой жидкости и в 15 (38%) — из биопленок, разница относительной частоты (15%) была статистически не достоверна. Разница относительной частоты выявления ДНК *P. gingivalis* в 8% между 10 (25%) случаями в десневой жидкости и 13 (33%) в биопленке была также статистически не достоверной. *P. intermedia* определили в десневой жидкости у 7 (18%) человек, а в биопленке — у 12 (30%) человек, при этом разница в относительной частоте идентификации составила 13% ($p < 0,05$). *A. actinomycetemcomitans* выявили у 8 (20%) человек в десневой жидкости и у 17 (42%) в биопленке, что составило 22% разницы при $p = 0,032$. *P. micra* определили у 12 (30%) человек в десневой жидкости и у 17 (43%) — в биопленке; *C. rectus* — в 10 (25%) и 16 (40%) образцов; *E. nodatum* — в 6 (15%) и 13 (33%); *E. corrodens* — в 6 (15%) и 10 (25%); *Capnocytophaga* (*C. spp.*) — в 11 (28%) и 14 (35%) образцах. Для этих видов микробов разница в относительной частоте выявления из десневой жидкости и биопленки составила от 8 до 15% и была статистически не достоверной. Достоверность различий в 23% ($p = 0,043$) наблюдалась в частоте выявления *F. nucleatum* — у 13 (33%) человек в десневой жидкости и у 22 (55%) в биопленке. В десневой жидкости у 13 (33%) пациентов ДНК пародонтопатогенов 1 типа не была идентифицирована, в биопленке — у 5 (13%), но была выявлена ДНК *C. albicans* в обоих типах исследуемого материала. Один вид пародонтопатогенов 1 типа был определен у 17 (43%) человек в десневой жидкости и статистически достоверно реже — у 10 (25%) человек в биопленке; два вида — у 15 (38%) человек в десневой жидкости, у 14 (35%) пациентов — в биопленке. По три или четыре вида в ассоциации выделили у 7 (18%) человек в биопленке, но не в десневой жидкости. Пять видов пародонтопатогенов не определили ни у одного человека (таблица 24).

Таблица 24

Частота встречаемости пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биопленки и десневой жидкости у больных КАП, n (%)

Показатель	КАП		Разница, %	χ^2	p
	Биопленка	Десневая жидкость			
<i>P. intermedia</i>	12 (30,0)	7 (17,5)	12,5	1,73	0,189
<i>T. forsythia</i>	22 (55,0)	13 (32,5)	22,5	4,11	0,043*
<i>T. denticola</i>	15 (37,5)	9 (22,5)	15,0	0,952	0,329
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	17 (41,5)	8 (20,0)	21,5	4,71	0,03*
<i>P. gingivalis</i>	13 (32,5)	10 (25,0)	7,5	0,549	0,459
Нет микробов	5 (12,5)	13 (32,5)	20,0	4,59	0,032*
Число пародонтопатогенных видов 1 порядка в комбинациях					
1 вид	10 (25,0)	17 (42,5)	17,5	4,38	0,036*
2 вида	14 (35,0)	15 (37,5)	2,5	0,054	0,816
3 вида	7 (17,5)	0	17,5	7,67	0,006*
4 вида	7 (17,5)	0	17,5	7,67	0,006*
5 видов	0	0	0		
<i>P. micra</i>	17 (42,5)	12 (30,0)	12,5	1,99	0,158
<i>F. nucleatum</i>	22 (55,0)	13 (32,5)	22,5	4,11	0,043
<i>C. rectus</i>	16 (40,0)	10 (25,0)	15,0	3,24	0,072
<i>E. nodatum</i>	13 (32,5)	6 (15,0)	17,5	3,38	0,066
<i>E. corrodents</i>	10 (25,0)	6 (15,0)	10,0	2,25	0,134
<i>Capnocytophaga (C. spp.)</i>	14 (35,0)	11 (27,5)	7,5	1,32	0,251

Примечание: * — статистически достоверно значимая разница

Таким образом, у больных КАП ДНК пародонтопатогенов 1 и 2 порядков определяли реже как в десневой жидкости, так и содержимом биопленки, чем при ХП.

4.5. Результаты исследования резистентности к антибактериальным препаратам штаммов биопленкопродуцирующих и культивируемых пародонтопатогенных бактерий

Проведенные нами исследования позволили сформировать группу штаммов — клинических изолятов, у которых проведено исследование фенотипических и генотипических признаков устойчивости к антибактериальным препаратам. В эту группу были включены штаммы биопленкопродуцирующих представителей микрофлоры пародонтального кармана — *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также пародонтопатогенных видов 1 порядка — *P. gingivalis*, *T. forsythia* и 2 порядка — *P. micra*, *P. intermedia*. Способность к формированию биопленки данными штаммами была проверена с помощью сканирующей электронной микроскопии при проведении разработанного нами способа получения биопленки в микрокассетах (см. гл. 3).

Общее количество штаммов, выделенных из пародонтального кармана у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта и подвергнутых молекулярно-биологическому исследованию, составило 66. Из них было 30 штаммов резидентной микрофлоры и 36 — пародонтопатогенных видов 1 и 2 порядка.

Результаты исследования представлены ниже и документированы в виде фотографий электрофореграмм.

Как свидетельствуют представленные данные, нам удалось выявить генетические маркеры резистентности к бета-лактамам (СТХ-М и МесА к цефалоспорином), включая карбапенемы (VIM и NDM, но не OXA-48), а также к гликопептидам (VanA и VanB), макролидам (Erm), тетрациклинам (Tet) и плазмиды Qnr (A, B) — к фторхинолонам.

Наиболее часто у представителей резидентной микрофлоры полости рта выявляли ген **СТХ-М-2**, ответственный за резистентность к цефалоспорином-1

(1-го типа) (рис. 56).

Он выявлен у *S. sanguis* (2 штамма), *S. salivarius* (1 штамм), *Staphylococcus spp.* (2 штамма), *E. faecalis* (1 штамм), *K. pneumoniae* (1 штамм), *V. parvula* (1 штамм), то есть у 8 из 30 исследованных штаммов, что составило 26,6%. Среди пародонтопатогенных видов ген **CTX-M-2** выявлен у *T. forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), *P. intermedia* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (2 штамма), то есть в 6 из 36 исследованных штаммов, что составило 16,7%. Различия в 1,6 раза были статистически достоверны ($p = 0,026$).

Другой ген, контролирующей резистентность к цефалоспорином, — **Mec-1** (рис. 57А) — выявляли реже: у *S. sanguis* (2 штамма) и *S. aureus* (1 штамм), то есть у 3 из 30 штаммов (частота 10%), а у пародонтопатогенных видов — *T. forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), то есть у 2 из 36 (частота 5,5). Различия почти в 2 раза также были статистически достоверны ($p = 0,031$).

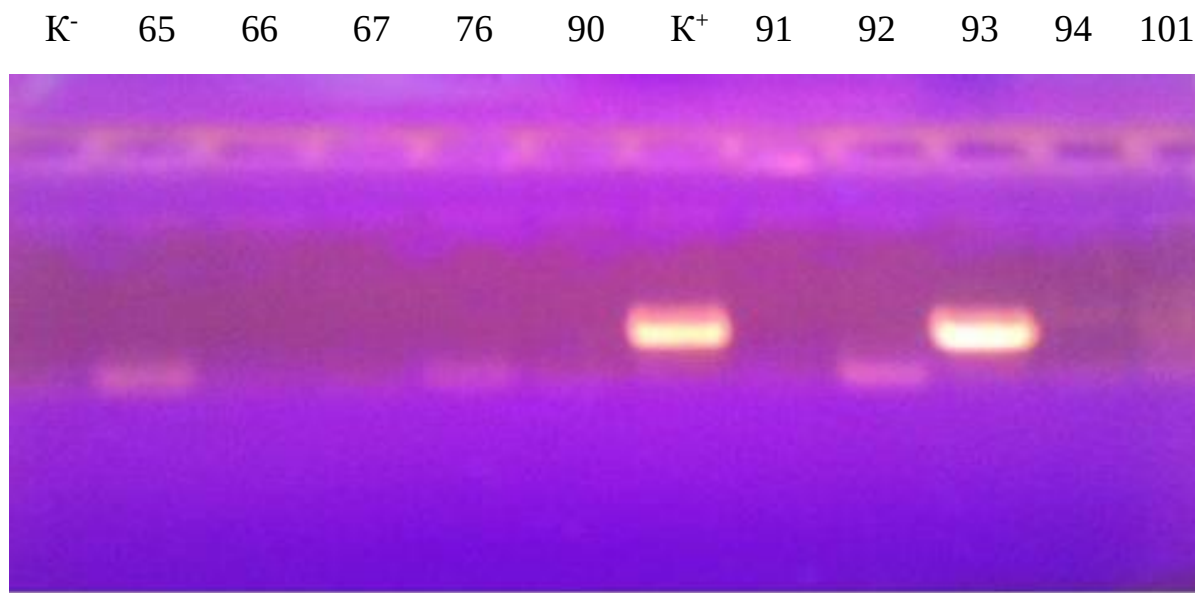


Рис. 56. Ген резистентности CTX-M-2 к цефалоспорином -1

Обозначения:

93 — *E. faecalis* CTX-M-2+

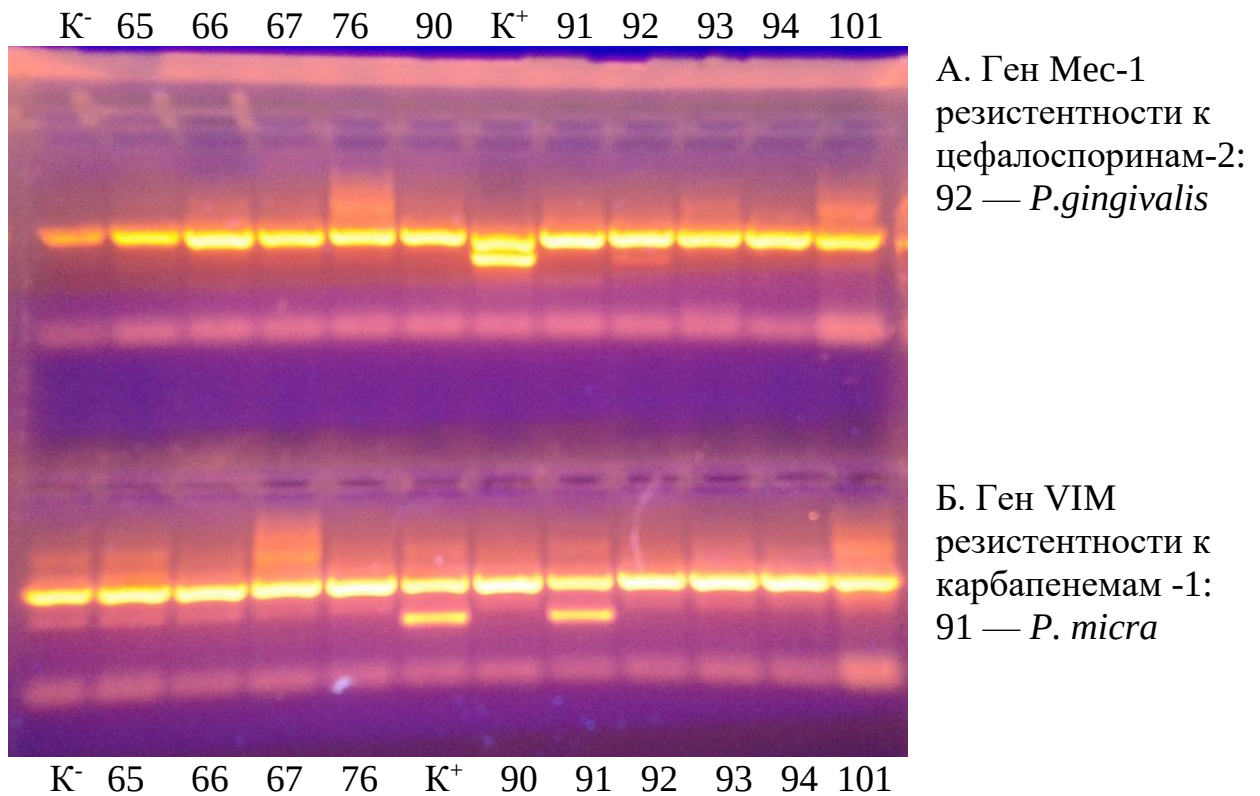


Рис. 57. Ген резистентности Мес-1 к цефалоспорином-2 (А) и VIM — к карбапенемам-1 (В)

Как известно, более высокий уровень устойчивости возбудителей связан с генами резистентности к карбапенемам, которые можно разделить на несколько групп. Так, ген **VIM** (рис. 57Б) был выявлен у 1 штамма *Pseudomonas aeruginosae* (частота для резидентной флоры — 3,3%) и 1 штамма *P. micra* (частота для пародонтопатогенной флоры — 2,8%).

Другой ген, кодирующий резистентность к карбапенемам 2 типа, — **NDM** (рис. 58) — выявлен у 1 штамма *K. pneumoniae* (частота для резидентной флоры — 3,3%) и ни в одном случае — у пародонтопатогенных бактерий.

И, наконец, третий ген этой группы — **OXA-48** — не выявлен ни в одном случае (рис. 59). Таким образом, обсуждая устойчивость к карбапенемам, можно сделать заключение о единичных находках генов резистентности.

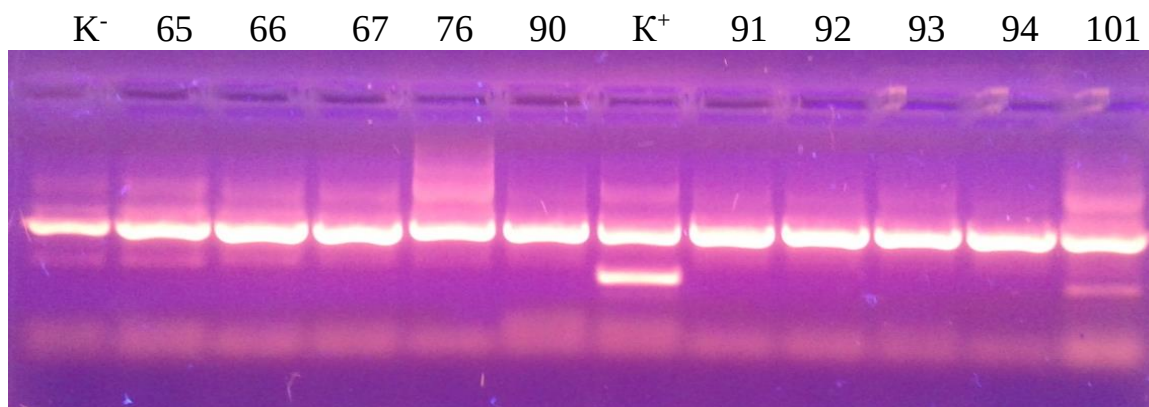


Рис.58. Ген резистентности NDM к карбопенемам-2

Обозначения:

101 — *K.pneumoniae* NDM+.

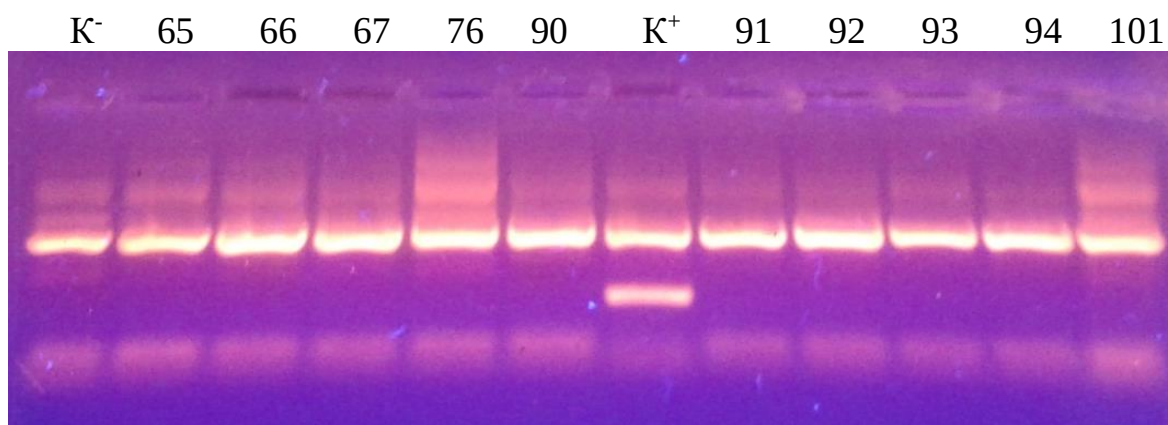


Рис. 59 Ген резистентности OXA-48 к карбопенемам-3.

Отрицательный результат ПЦР (контроль положительный).

Резистентность к гликопептидным антибиотикам (ванкомицину, тейкопланину) кодируется генами **VanA** и **VanB** (рис. 60). Среди резидентной флоры выявлен 1 штамм *E. faecalis* с геном VanB, кодирующим устойчивость энтерококков к ванкомицину (частота 3,3%). Среди пародонтопатогенных видов данный ген не обнаружен, но выявлен 1 штамм *P. intermedia* с геном **VanA**, кодирующим расширенный спектр как против ванкомицина, так и против гликопептидного препарата нового поколения — тейкопланина (частота 3,3%).

Таким образом, обсуждая устойчивость к гликопептидам, можно сделать заключение о единичных находках генов резистентности.

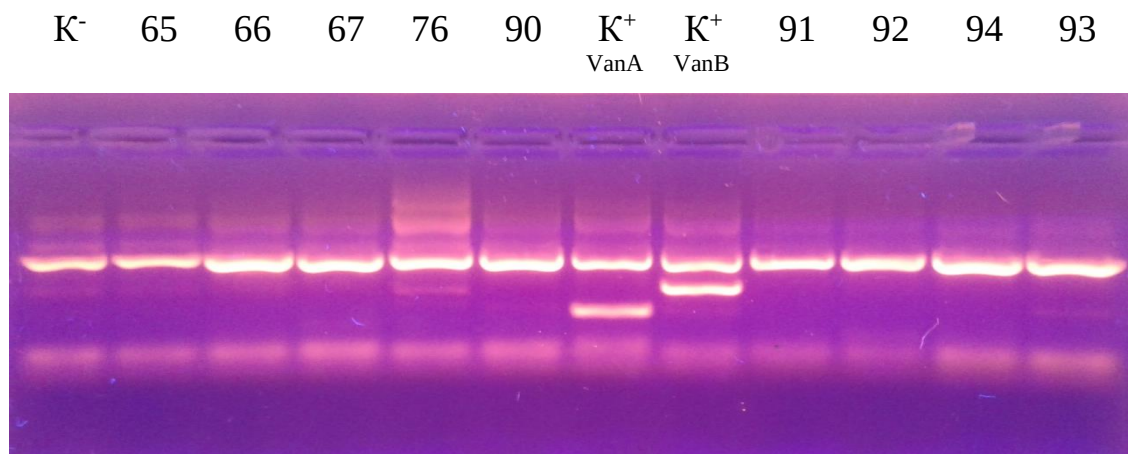


Рис. 60. Гены резистентности VanA и VanB к гликопептидам

Обозначения:

76 — *E. faecalis* **VanB**⁺;

93 — *P. intermedia* **VanA**⁺.

Ген **Erm**, кодирующий резистентность к макролидам, был выявлен у 5 штаммов резидентной флоры из 30 и у *S. sanguis* (1 штамм), *S. salivarius* (1 штамм), *S. aureus* (1 штамм), *Enterococcus faecalis* (1 штамм), *Klebsiella pneumonia* (1 штамм), то есть с частотой 16,6%. У пародонтопатогенов несколько реже — *P. gingivalis* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (2 штамма), то есть с частотой 11,1%. Различия в 1,5 раза были статистически достоверны ($p = 0,05$).

Ген **Tet**, кодирующий резистентность к тетрациклинам, был выявлен у 7 штаммов резидентной флоры из 30: у *S. sanguis* (1 штамм), *S. epidermidis* (1 штамм), *S. aureus* (1 штамм), *Klebsiella pneumonia* (1 штамм), *Pseudomonas aeruginosae* (1 штамм), *Veillonella parvula* (2 штамма), то есть с частотой 23,3%. У пародонтопатогенов несколько реже — у 4 штаммов: *Tannerella forsythia* (1 штамм), *P. gingivalis* (1 штамм), *P. micra* (1 штамм), *S. intermedius* (1 штамм), то есть с частотой 11,1%. Различия в 2 раза были статистически достоверны ($p = 0,025$).

Плазмидная резистентность к фторхинолонам **QnrB** (но не **QnrA**, **QnrS**) выявлена у 4 штаммов резидентных бактерий: у *S. sanguis* (2 штамма), *Klebsiella pneumonia* (1 штамм), *Veillonella parvula* (1 штамм), то есть с частотой 13,3% , в то время как среди пародонтопатогенных видов — только в 2 случаях: *P.*

gingivalis (1 штамм), *S. intermedius* (1 штамм), то есть с частотой 5,5%. Различия более чем в 2 раза были статистически достоверны ($p = 0,025$).

Примечательно, что, среди выделенных нами культур были штаммы с множественной резистентностью к антибиотикам: *Klebsiella pneumonia* — к 5, *S. aureus*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis* — к 4, *Enterococcus faecalis*, *S. intermedius* — к 3 препаратам. Причем частота выявления штаммов с множественной устойчивостью среди резидентных видов составила 13,3% (4 штамма), а пародонтопатогенных — 5,5% (2 штамма). Различия почти в 2,5 раза были статистически достоверны ($p = 0,025$).

Основное содержание дальнейшего исследования в этом направлении состояло в сравнении результатов фенотипического определения резистентности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом и детекции соответствующих генов резистентности с помощью ПЦР, что позволило проследить связь между частотой встречаемости отдельных генетических маркеров резистентности и результатами стандартного метода определения чувствительности у микроорганизмов, формирующих биопленки десен (пародонтальных карманов) при воспалительных заболеваниях пародонта.

Для этого использовали следующие диски: метронидазол, линкомицин, метициллин (ампициллин), амоксициллин + клавуланат натрия, спирамицин (эритромицин), ванкомицин, тетрациклин (доксикаклин), имепенем, ципро- и моксифлоксацин (таблица 25).

Очевидно, что наиболее часто применяемые (за последние 20–30 лет) в стоматологической практике препараты — метронидазол и линкомицин — продемонстрировали самое высокое число устойчивых штаммов — 52,3 и 22,7% соответственно, причем чувствительных к метронидазолу штаммов было в 3,9 раза меньше, чем устойчивых, а для линкомицина это соотношение приближалось к 1:1.

Таблица 25

**Частота выделения резистентных и чувствительных штаммов
пародонтопатогенных бактерий (абсолютное число штаммов, %)**

Диски с препаратами	Частота резистентных штаммов-R (кол-во / %)		Частота чувствительных штаммов-S (кол-во / %)		Соотно- шениеR/S
Метронидазол	23	52,3	6	13,6	3,9**
Линкомицин	10	22,7	12	27,3	0,8
Метициллин	5	11,4	27	61,4	0,2*
Амоксиклав	1	2,3	40	90,9	0,03*
Спирамицин	6	13,6	24	54,5	0,3*
Ванкомицин	10	22,7	28	63,6	0,4*
Доксициклин	2	4,6	37	81,8	0,06*
Имепенем	2	2,3	41	95,5	0,02*
Ципрофлоксацин	6	13,6	28	63,6	0,2*
Моксифлоксацин	2	4,6	30	68,2	0,07*

Обозначения:

** — показатель резистентных штаммов достоверно выше, чем чувствительных;

* — показатель резистентных штаммов достоверно ниже, чем чувствительных.

Количество метициллин-резистентных штаммов составило 11,4%, что коррелировало с выявлением генов резистентности **CTX-M-2** у 16,7% штаммов ($r = 0,789$; $p = 0,032$). При использовании беталактамазо-защищенных препаратов (амоксиклав) показатель резистентных штаммов снижался до 2,3%, что коррелировало с выявлением гена резистентности **Mec-1** у 5,5% штаммов ($r = 0,648$; $p = 0,022$).

Резистентность к карбопенемам (имепенем) выявлена только у 2,3% штаммов, а ген **VIM** — у 2,8%, то есть показана высокая прямая корреляционная зависимость ($r = 0,799$; $p = 0,01$).

Резистентность к макролидам (спирамицин) выявлена у 13,6% штаммов, а ген **Erm** — у 11,1% штаммов, то есть также показана высокая прямая корреляционная зависимость ($r = 0,764$; $p = 0,01$).

Резистентность к тетрациклинам (доксциклин) выявлена только у 4,6% штаммов, а ген **Tet** — у 11,1% штаммов, то есть статистически достоверная корреляционная зависимость не выявлена ($r = 0,234$; $p = 0,052$).

Резистентность к гликопептидам (ванкомицин) выявлена у 13,6% штаммов, а гены **VanA** и **VanB** — у 3,3% штаммов, то есть корреляционная зависимость также не выявлена ($r = 0,242$; $p = 0,056$).

Резистентность к фторхинолонам разных поколений — ципрофлоксацину и моксифлоксацину — выявлена у 13,6 и 4,6% штаммов соответственно, а плазмиды **QnrB** — у 5,5% штаммов, при этом установлена прямая высокая корреляционная зависимость для моксифлоксацина ($r = 0,785$; $p = 0,01$).

Таким образом, для большинства изученных антибактериальных препаратов (беталактамы, карбапенемы, макролиды, фторхинолоны) установлена достоверная взаимосвязь между наличием генов, кодирующих резистентность, и результатами фенотипического метода определения чувствительности. Случаи ее отсутствия (тетрациклины, гликопептиды) могут быть объяснены наличием дополнительных генетических маркеров резистентности, которые не учитывались в нашем исследовании, так как помимо генов **Tet**, **VanA** и **VanB**, отвечающих за устойчивость к данным антибиотикам, возможно ее кодирование другими хромосомными генами и плазмидами.

Полученные данные позволяют сделать заключение о предпочтительном использовании ряда препаратов в комплексном лечении заболеваний пародонта. На наш взгляд, к ним могут быть отнесены те антибиотики внутриклеточного действия, к которым определена минимальная частота выявления генетических механизмов резистентности: макролиды, тетрациклины и фторхинолоны. Применение препаратов этих групп показано не только в качестве терапии в острой фазе заболевания, но и в фазе ремиссии, в качестве профилактических курсов. Что касается других групп антибактериальных препаратов с низкой

частотой выявления генов резистентности (бета-лактамазозащищенные препараты, карбапенемы, ванкомицин), то их целесообразно применять исключительно в период обострения пародонтита, так как они не обладают способностью проникать внутриклеточно. Применение таких препаратов желательно проводить в виде ступенчатой терапии, причем второй ступенью назначать пациенту антибактериальный препарат внутриклеточного действия.

Предложенное обоснование позволит оптимизировать существующие схемы применения антибактериальных препаратов в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта, которое в настоящее время, к сожалению, проводится эмпирически и потому дает кратковременный эффект.

ГЛАВА 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

Биопленки оказывают значительный вклад в формирование бактериальной резистентности к антибиотикам и факторам врожденного иммунитета организма хозяина.

При интерпретации результатов выявления биопленкообразующих бактерий нужно учитывать, что на процессы образования биопленок *in vivo* влияют факторы организма человека [27, 28, 53, 61, 100, 173, 178, 201].

Вместе с тем данные о влиянии биопленкообразования на устойчивость бактерий к различным эффекторам иммунитета организма человека пока немногочисленны и противоречивы [315, 317, 343, 375, 458, 465]. Это определяет актуальность исследований, направленных на изучение взаимосвязи между указанными свойствами.

5.1. Количественный состав популяций лейкоцитов периферической крови

Распространение бактериальных и грибковых инфекций зависит от многих факторов, в том числе от постоянного роста иммунокомпроментированных людей. Особенно не защищены пациенты с дефектами количественного содержания и функционирования нейтрофилов, клеточно-опосредованного иммунитета, метаболической дисфункцией и исключительного возраста. Риск инфицирования увеличивается при использовании широкого спектра антибиотиков и цитотоксической химиотерапии.

ПМЯЛ являются основными клетками врожденного иммунитета, которые уничтожают инфекционных патогенов.

У обследованных нами пациентов мы оценили количественный состав

популяций лейкоцитов в периферической крови (таблица 26).

Было показано, что средние величины количества лейкоцитов в периферической крови при ХП различных степеней тяжести мало различаются между собой и от значений у практически здоровых людей. Однако у больных ХГ они были статистически достоверно значимо ниже, чем у здоровых людей, больных ХП легкой и средней степенью тяжести. Еще меньше были средние количества лейкоцитов у больных КАП.

Так, средние значения процентного содержания нейтрофилов у пациентов с легкой ($57,75 \pm 0,51\%$), средней ($59,25 \pm 2,15\%$) и тяжелой ($60,21 \pm 1,63\%$) степенями ХП, а также у больных ХГ ($56,31 \pm 1,67\%$) и КАП ($55,80 \pm 1,23\%$) были ниже значений у представителей контрольной группы ($68,23 \pm 1,57\%$), $p < 0,05$. Наблюдалось также снижение абсолютного количества нейтрофилов, как общих, так и разных морфотипов (сегментоядерных, палочкоядерных). При этом разница средних значений содержания общих Нф по сравнению с контрольной группой ($5,30 \pm 0,35$ млрд/л) была статистически достоверна у пациентов 1б ($3,81 \pm 0,48$ млрд/л), 1в ($4,24 \pm 0,38$ млрд/л) групп и КАП ($4,36 \pm 0,58$ млрд/л); сегментоядерных Нф — у пациентов 1б ($1,84 \pm 0,19$ млрд/л) и 1в ($1,68 \pm 0,35$ млрд/л) против $3,75 \pm 1,75$ млрд/л у здоровых людей; палочкоядерных Нф — у больных 1б группы ($0,08 \pm 0,01$ млрд/л) относительно нормы ($0,17 \pm 0,07$ млрд/л).

Абсолютное и относительное число базофилов у пациентов всех обследованных групп с ХП было примерно в 3,5 раза выше числа базофилов в контрольной группе ($p < 0,05$).

Количество эозинофилов, напротив, было существенно ниже, чем у пациентов контрольной группы, за исключением больных КАП ($p < 0,05$).

Относительное содержание лимфоцитов в периферической крови пациентов всех обследованных групп с ХП было в 1,15–1,30 раза выше, а у больных КАП в 1,42 раза выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), однако достоверная разница по абсолютным значениям отсутствовала.

Относительное число моноцитов было приблизительно в 1,2 раза выше у пациентов 1б и 1в групп по сравнению с контрольной группой.

Таблица 26

Количество лейкоцитов в периферической крови пациентов в группах сравнения с воспалительными заболеваниями пародонта и в контрольной группе (с интактным пародонтом) ($M \pm \Delta$)

	Группа					
Показатель количества в % и абс.	Контрольная	1а	1б	1в	2	3
Лейкоцитов	7,72 $\pm$ 0,48	7,81 $\pm$ 0,61	7,33 $\pm$ 0,61	7,12 $\pm$ 0,44	6,71 $\pm$ 0,52*	5,85 $\pm$ 0,58*
Лимфоцитов, %	28,33 $\pm$ 1,21	37,00 $\pm$ 0,96*	35,00 $\pm$ 2,45*	32,60 $\pm$ 1,42*	35,46 $\pm$ 0,58*	39,62 $\pm$ 2,43*
абс., млрд/л	2,31 $\pm$ 0,17	2,15 $\pm$ 0,22	2,11 $\pm$ 0,25	2,16 $\pm$ 0,21	2,27 $\pm$ 0,26	2,45 $\pm$ 0,18
Нейтрофилов, %	69,3 $\pm$ 1,57	57,6 $\pm$ 0,51*	60,1 $\pm$ 2,15*	61,5 $\pm$ 1,63*	55,5 $\pm$ 1,67*	57,80 $\pm$ 1,23*
Общих абс., млрд/л	5,30 $\pm$ 0,35	5,38 $\pm$ 0,61	3,81 $\pm$ 0,48*	4,24 $\pm$ 0,38*	5,08 $\pm$ 0,42	4,36 $\pm$ 0,58*
Сегментоядерн., %	52,38 $\pm$ 3,48	54,75 $\pm$ 0,47	48,42 $\pm$ 5,05	44,38 $\pm$ 2,46*	47,06 $\pm$ 0,64*	47,64 $\pm$ 1,31*
абс., млрд/л	3,75 $\pm$ 1,75	2,94 $\pm$ 0,03	1,84 $\pm$ 0,19*	1,68 $\pm$ 0,35*	3,24 $\pm$ 0,36	2,39 $\pm$ 0,21
Палочкоядерн., %	1,95 $\pm$ 0,85	3,00 $\pm$ 0,32	2,05 $\pm$ 0,25*	2,45 $\pm$ 0,36	3,24 $\pm$ 0,36*	2,87 $\pm$ 0,26
абс., млрд/л	0,18 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01*	0,13 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,03
Базофилов, %	0,52 $\pm$ 0,25	2,05 $\pm$ 0,42*	1,52 $\pm$ 0,16*	1,89 $\pm$ 0,45*	2,25 $\pm$ 0,34*	1,33 $\pm$ 0,17*
абс., млрд/л	0,032 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02*	0,09 $\pm$ 0,02*	0,12 $\pm$ 0,02*	0,14 $\pm$ 0,03*	0,08 $\pm$ 0,02*
Эозинофилов, %	2,76 $\pm$ 0,74	0,26 $\pm$ 0,11*	0,67 $\pm$ 0,01*	0,86 $\pm$ 0,11*	1,84 $\pm$ 0,38	1,47 $\pm$ 0,51*
Абс., млрд/л	0,16 $\pm$ 0,05	0,014 $\pm$ 0,05*	0,023 $\pm$ 0,01*	0,05 $\pm$ 0,01*	0,11 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,03*
Моноцитов, %	4,47 $\pm$ 0,64	5,05 $\pm$ 0,50	5,28 $\pm$ 0,11 *	5,45 $\pm$ 0,17 *	5,43 $\pm$ 0,35	6,36 $\pm$ 1,12 *
абс., млрд/л	0,34 $\pm$ 0,043	0,31 $\pm$ 0,026	0,28 $\pm$ 0,028	0,33 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,03*

Примечание: * — различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой (при $p < 0,05$).

В то время как абсолютное количество моноцитов у пациентов разных групп достоверно не различалось. Только при КАП как относительное, так и абсолютное количество моноцитов оказалось в 1,4 раза выше по сравнению с контрольной группой (что было статистически достоверно).

Многие авторы считают, что при выходе из кровотока в очаг воспаления у лейкоцитов меняется экспрессия генов и фенотипа [27, 29, 30, 53, 77, 96, 106, 178, 201, 275, 375, 396]. Поэтому мы оценили содержание ПМЯЛ в смывах из полости рта (рис. 61).

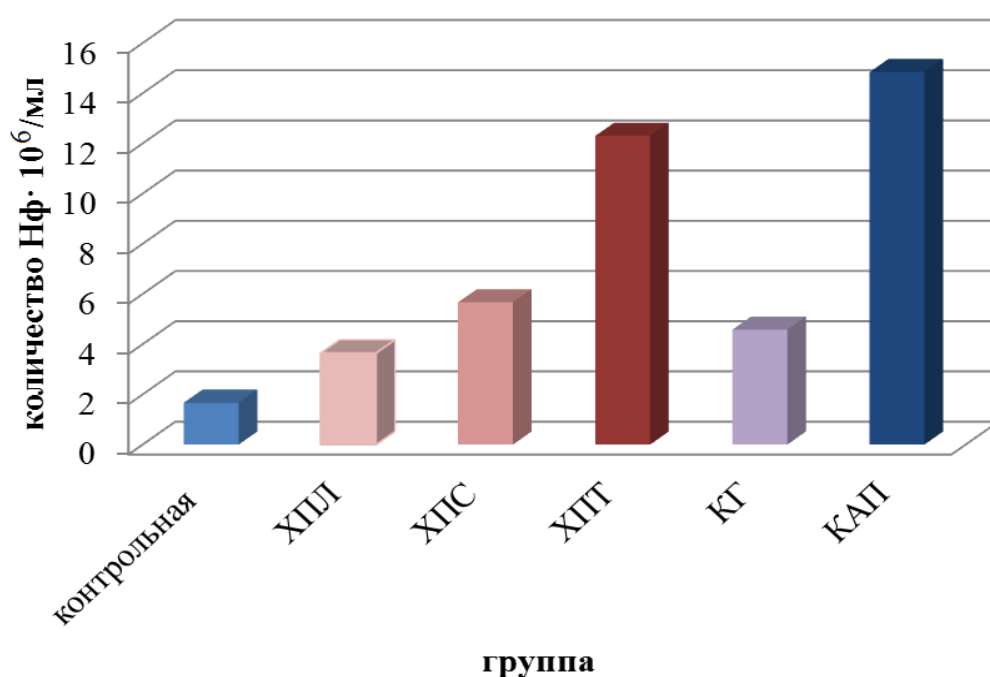


Рис. 61. Средние значения содержания «оронейтрофилов»

Было установлено, что у представителей контрольной группы выделяли от $1,01 \cdot 10^6$ до $2,33 \cdot 10^6$ Нф на 1 мл. У пациентов с воспалительными заболеваниями полости рта содержание Нф в смывах из полости рта было статистически достоверно выше. Так у больных ХГ их содержание составило $3,3 \cdot 10^6$ – $5,9 \cdot 10^6$ Нф на 1 мл, ХПЛ — $3,1 \cdot 10^6$ – $4,2 \cdot 10^6$ Нф на 1 мл, ХПС — $5,0 \cdot 10^6$ – $6,3 \cdot 10^6$ Нф на 1 мл, ХПТ $9,8 \cdot 10^6$ – $14,8 \cdot 10^6$ Нф на 1 мл, у больных КАП — $12,2 \cdot 10^6$ – $17,5 \cdot 10^6$ Нф на 1 мл. При этом разница в содержании Нф у больных с различной степенью тяжести пародонтита также была статистически достоверно значимой.

5.2. Функциональная активность нейтрофилов в периферической крови и полости рта

Оценку функциональной активности лейкоцитов использовали методику фагоцитоза *in vitro* с латексом опсонизированным IgG. Оказалось, что у людей со здоровым пародонтом доля фагоцитирующих лейкоцитов периферической крови была больше, чем у пациентов с воспалительными заболеваниями тканей пародонта (таблица 27). Так, фагоцитарный показатель, соответствующий проценту фагоцитирующих клеток, был равен $82,00 \pm 15,00\%$ у представителей контрольной группы, $67,50 \pm 1,33\%$ – у пациентов с ХПЛ ($p > 0,05$), в 1,35 раза меньше ($60,35 \pm 6,05\%$) – у пациентов с ХПС и в 1,4 раза меньше ($58,42 \pm 5,68\%$) – у пациентов с ХПТ ($p < 0,05$).

Количество поглощенных частиц (фагоцитарное число) у представителей контрольной группы было на уровне $7,52 \pm 2,50$ ед., а при ХПЛ – статистически достоверно меньше – в 2,1 раза ($3,55 \pm 0,10$ ед.), у пациентов с ХПС – в 2,6 раза ($2,93 \pm 0,29$ ед.) и у больных ХПТ — в 3 раза ($2,47 \pm 0,16$ ед.) меньше ($p < 0,05$).

Коэффициент активности фагоцитов в норме был равен $3,26 \pm 1,60$ ед., при ХПЛ — $2,85 \pm 0,25$ ед., ХПС — $2,37 \pm 0,26$ ед., ХПТ — $2,18 \pm 0,34$ ед., следовательно, наблюдалось незначительное снижение фагоцитарной активности в зависимости от степени тяжести пародонтита, однако, оно было статистически недостоверным.

В то же время доля фагоцитирующих нейтрофилов из смывов полости рта была статистически достоверно ниже у пациентов всех обследованных групп, чем лейкоцитов периферической крови: в 3 раза у людей со здоровым пародонтом, в 1,7 раза — у больных ХПЛ, в 1,4 раза — у больных ХПС, в 1,1 раза — у больных ХПТ, в 1,6 раза — у больных ХГ и 1,2 раза — у больных КАП (таблица 28). При этом у представителей контрольной группы она составила $25,71 \pm 1,43\%$, что в 1,5 раза меньше, чем у пациентов с ХПЛ ($39,32 \pm 1,63\%$). Процент фагоцитирующих оронейтрофилов ($43,50 \pm 2,12\%$) у больных ХПС был в 1,7 раза больше, чем в контрольной группе, а у больных ХПТ — еще в 1,2 раза больше ($50,44 \pm 3,72\%$).

Таблица 27

Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови у больных с воспалительными заболеваниями тканей пародонта и в контрольной группе с интактным пародонтом ($M \pm \Delta$)

Показатель	Группа					
	Контрольная	1а	1б	1в	2	3
Число фагоцитарное, ед.	7,52 $\pm$ 2,50 (5,0–10,0)	3,55 $\pm$ 0,10* (3,43–3,63)	2,93 $\pm$ 0,29* (2,62–3,20)	2,47 $\pm$ 0,16* (2,30–2,62)	3,97 $\pm$ 0,17* (3,79–4,13)	3,19 $\pm$ 0,32* (2,85–3,49)
Показатель фагоцитарный, %	82,00 $\pm$ 15,00 (65,0–95,0)	67,50 $\pm$ 1,33 (68,17–70,83)	60,35 $\pm$ 6,05* (54,28–66,38)	58,42 $\pm$ 5,68 (0,74–62,10)	65,46 $\pm$ 1,59 (64,87–68,15)	56,64 $\pm$ 3,49* (51,15–59,13)
Активность фагоцитов (коэффициент), ед.	3,26 $\pm$ 1,60 (1,60–5,00)	2,85 $\pm$ 0,25 (2,60–3,12)	2,37 $\pm$ 0,26 (2,13–2,65)	2,18 $\pm$ 0,34 (1,74–2,92)	3,04 $\pm$ 0,68 (2,36–3,72)	2,17 $\pm$ 0,38 (1,79–2,55)

Таблица 28

Фагоцитарная активность «оронейтрофилов» у больных с воспалительными заболеваниями тканей пародонта и в контрольной группе с интактным пародонтом ($M \pm \Delta$)

Показатель	Группа					
	Контрольная	1а	1б	1в	2	3
Число фагоцитарное, ед.	12,43 $\pm$ 1,13 (11,33–13,59)	9,55 $\pm$ 1,10* (8,43–10,63)	5,51 $\pm$ 0,62* (4,88–6,12)	3,58 $\pm$ 0,46* (2,90–4,02)	14,91 $\pm$ 1,50* (14,40–16,40)	16,15 $\pm$ 0,32* (15,85–16,49)
Показатель фагоцитарный, %	25,71 $\pm$ 1,43 (24,32–27,18)	39,32 $\pm$ 1,63* (37,72–40,98)	43,5 $\pm$ 2,12* (41,38–45,62)	50,44 $\pm$ 3,72* (46,70–54,14)	40,5 $\pm$ 2,50* (38,00–43,00)	48,63 $\pm$ 3,29* (45,35–51,93)
Активность фагоцитов (коэффициент), ед.	4,37 $\pm$ 1,34 (3,03–5,71)	4,06 $\pm$ 0,37 (3,69–4,43)	3,34 $\pm$ 0,27 (3,07–3,61)	3,48 $\pm$ 0,28 (3,20–3,76)	4,89 $\pm$ 0,58 (4,31–5,47)	3,37 $\pm$ 0,38 (2,99–3,75)

Таким образом, установлена статистически достоверная тенденция к снижению активности фагоцитирующих клеток при ХП, в том числе «оронеитрофилов», в наибольшей степени выраженная при увеличении степени тяжести заболевания (ХПС, ХПТ и КАП). С другой стороны, фагоцитарная активность «оронеитрофилов» во всех группах без исключения была примерно в 1,5 раза выше, чем у нейтрофилов периферической крови.

5. 3. Экспрессия лейкоцитарных эндогенных антимикробных пептидов

В настоящее время растет число исследований, свидетельствующих о том, что антимикробные пептиды (АМП) являются новой группой агентов, влияющих на биопленки [189, 190, 201].

Активация нейтрофилов при инфекционных и воспалительных процессах приводит к быстрому высвобождению дефензинов, которые затем обнаруживают во многих жидкостях организма, в том числе в плазме крови [191, 392].

Дефензины — мощные антимикробные катионные пептиды, нарушающие проницаемость мембран микробов и формирующие ионные каналы. В организме человека определяют две основные группы АМП: альфа- и бета-дефензины. Существуют четыре типа α -дефензинов (HNP 1–4), которые содержатся в азурофильных гранулах нейтрофилов. HNP 1–3 синтезируются только нейтрофилами и составляют 99% всех антимикробных пептидов данного типа. Поэтому их можно считать специфическими клеточными маркерами нейтрофилов.

В нашем исследовании проведено количественное определение антимикробных пептидов из группы α -дефензинов (HNP 1–3) в субгингивальной биопленке (десневой жидкости) и плазме периферической крови в группах сравнения.

Количество отбираемой десневой жидкости зависело от участка локализации зуба и степени воспалительных реакций в тканях пародонта. У пациентов с интактным (здоровым) пародонтом, а также страдающих

воспалительными заболеваниями пародонта, в области 1–4 зубов каждого квадранта забирали от 3–4 до 8–9 мкл. В участках 5, 6 зубов в каждом квадранте количество взятой жидкости составляло от 10 до 30 мкл в контрольной группе и от 5 до 25 мкл у больных ХП и у пациентов с КАП. Среднее количество по четырем зубам в каждом квадранте различалось незначительно у пациентов разных групп. Данные представлены в таблице 29.

Образцы исследуемого материала разводили буферным раствором в 2000 раз непосредственно перед проведением ИФА. Учет результатов проводили спектрофотометрически с помощью аппарата Stat Fax мод. 3200 Readers (США). Данные по группам сравнения представлены в таблице 30.

Таблица 29

Количество десневой жидкости, взятой у пациентов с воспалительными заболеваниями тканей пародонта и в контрольной группе ($M \pm \Delta$)

Группы сравнения	Средний объем, мкл	ДИ
Контрольная	$11,85 \pm 2,80$	9,05–14,64
1а	$12,25 \pm 3,37$	8,87–15,63
1б	$10,50 \pm 4,85$	5,65–15,34
1в	$12,05 \pm 2,40$	9,65–14,45
2	$11,35 \pm 2,16$	9,19–13,51
3	$10,88 \pm 3,96$	5,93–14,85

Таблица 30

Количество антибактериальных пептидов (α -дефензинов) в десневой жидкости у пациентов с воспалительными заболеваниями тканей пародонта и в контрольной группе ($M \pm \Delta$)

Группы сравнения	Концентрация HNP 1-3, ng/ml	ДИ, ng/ml
Контрольная	$1047,0 \pm 285,5$	761,9–1333,0
1а	$1079,0 \pm 241,0$	837,8–1320,0
1б	$5534,1 \pm 915,6^*$	4618,5–6449,7
1в	$6256,2 \pm 823,4^*$	5432,8–7079,6
2	$1596,0 \pm 253,0^*$	1343,0–1849,0
3	$3459,4 \pm 632,2^*$	2837,2–4091,6

Мы наблюдали значительные вариации содержания α -дефензинов в десневой жидкости у отдельных индивидуумов в каждой из обследованных групп пациентов. При этом содержание α -дефензинов в десневой жидкости было в 4–5 раз выше, чем в плазме периферической крови как у здоровых людей, так и у больных с воспалительными заболеваниями тканей пародонта.

Так, содержание α -дефензинов в десневой жидкости у пациентов с интактным пародонтом варьировало в диапазоне от 10 ng/ml до 4000 ng/ml, а среднее количество составляло $1047,0 \pm 285,5$ ng/ml; в группе 1а — от 1 ng/ml до 4000 ng/ml, среднее количество — $1079,0 \pm 241,0$ ng/ml; в группе 1б — от 575 ng/ml до 14000 ng/ml, среднее количество — $5534,1 \pm 915,6$ ng/ml; в группе 1в — от 5432,8 ng/ml до 7079,6 ng/ml, среднее количество — $6256,2 \pm 823,4$ ng/ml; в группе 2 — от 1343,0 ng/ml до 1849,0 ng/ml, среднее количество — $1596,0 \pm 253,0$ ng/ml и у больных группы 3 — от 2837,2 ng/ml до 4091,6 ng/ml, среднее количество — $3459,4 \pm 632,2$ ng/ml (табл. 30).

При проведенном ранжированном анализе данных установлено, что у 13 человек в контрольной группе (18,6%) концентрация α -дефензинов в десневой жидкости была меньше 100 ng/ml, еще у такого же числа респондентов (18,6%) она достигла 1000 ng/ml, еще по 22 респондента (31,4%) отличались более высоким уровнем α -дефензинов — до 2000 ng/ml и 3000 ng/ml соответственно.

В основных группах/подгруппах были получены следующие результаты (рис. 62). В группе 1а количество α -дефензинов в десневой жидкости не превышало 300 ng/ml: причем у 9 респондентов (12,8%) оно было в пределах 10 ng/ml, у 24 респондентов (34,2%) — в пределах 200 ng/ml — 300 ng/ml, у 31 респондентов (44,2%) — в пределах 1000 — 2000 ng/ml и высокое содержание α -дефензинов определяли у 5 (7,1%) — в пределах 4000 ng/ml.

В тоже время у пациентов группы 1б минимальное количество α -дефензинов в десневой жидкости составило 575 ng/ml. При этом у 33 респондентов (42,7%) оно составило 1000 — 2000 ng/ml, у 12 респондентов (12,7%) — 3000 ng/ml и у 22 респондентов (31,4%) выявлены крайне высокие показатели — от 10 000 до 14 000 ng/ml.

В группе 1в у 5 респондентов (7,1%) уровень α -дефензинов составил 200 ng/ml, у 13 респондентов (18,6%) — 201–300 ng/ml, у 18 респондентов (25,7%) — 301–1000 ng/ml, у 17 респондентов (23,8%) — 1001–2000 ng/ml, у 11 респондентов (15,7%) — 2001–3000 ng/ml и у 5 (8,6%) также определялись крайне высокие показатели содержания α -дефензинов — 4000–12000 ng/ml.

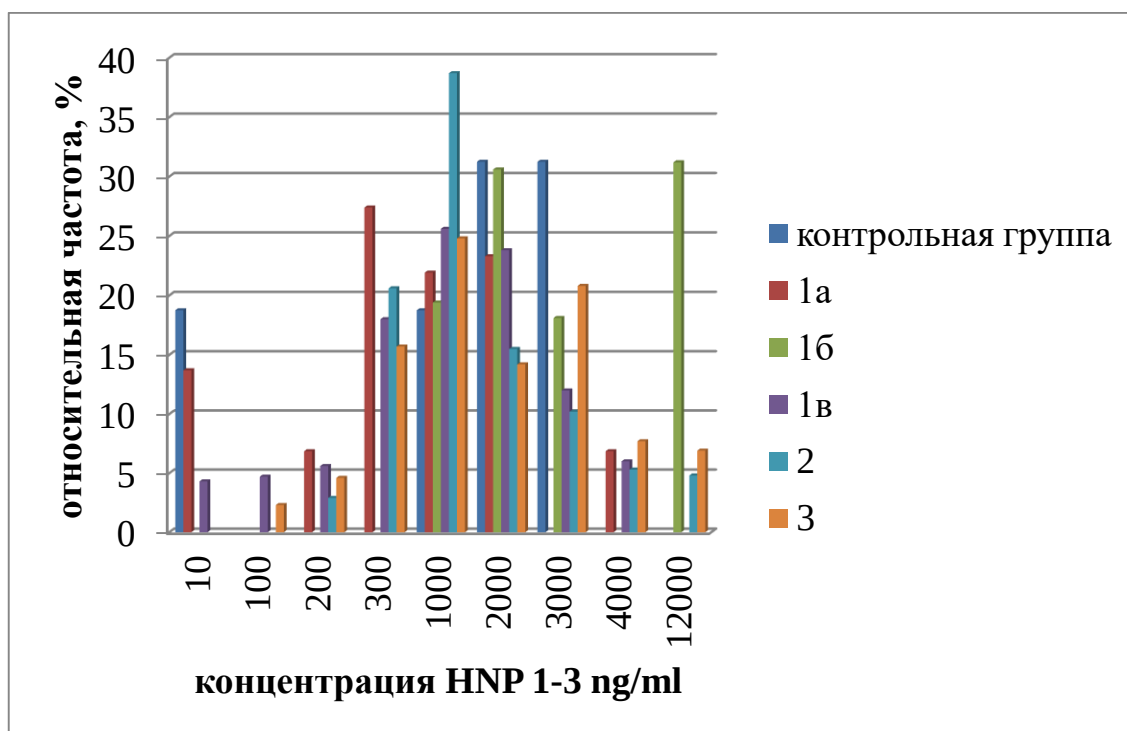


Рис. 62. Распределение пациентов по частоте обнаружения в десневой жидкости разных количественных уровней НРР 1–3, %.

У 12 респондентов (24%) с ХГ (группа 2) содержание α -дефензинов не превысило 300 ng/ml, у 19 (38%) — находилось в пределах 301 — 1000 ng/ml, у 13 (26%) — в пределах 1001 — 3000 ng/ml, у 4-х (8%) — в пределах 3001 — 4000 ng/ml, у 2-х (4%) — выявляли крайне высокие цифры до 12000 ng/ml.

У респондентов с КАП (группа 3) у 6 (15%) содержание α -дефензинов составило 300 ng/ml, причём у 10 (25%) — находилось в пределах 301 — 1000 ng/ml, у 9-и (23%) — в пределах 1001 — 2000 ng/ml, у 6-и (15%) — 2001 — 3000 ng/ml, еще у 6-и (15%) — 3001—4000 ng/ml, у 4-х (10%) — также выявляли крайне высокие цифры до 12000 ng/ml.

Таким образом, по содержанию α -дефензинов в десневой жидкости не выявлено достоверных различий у респондентов контрольной группы и группы 1а (ХПЛ), однако в других группах/подгруппах выявлена статистически достоверная тенденция к выраженному увеличению количества α -дефензинов: в 5 раз — при ХПС, в 6 раз — при ХПТ, в 3,3 раза — при КАП, и в 1,5 раза выше при ХГ по сравнению с контрольной группой (интактный пародонт).

При сопоставлении полученных данных с выявлением молекулярных маркеров пародонтопатогенных бактерий установлено, что у 14 респондентов контрольной группы (20%) с помощью ПЦР-диагностики выявлена маркерная ДНК одного пародонтопатогенного вида и у 3 респондентов (4,3%) — двух видов пародонтопатогенов. Это совпало с определением высоких уровней содержания α -дефензинов в области исследуемых нами участков зубодесневой борозды. В массиве респондентов, с отрицательным результатом ПЦР-диагностики пародонтопатогенов, среднее содержание α -дефензинов в десневой жидкости было почти в 2 раза ниже, чем в целом по группе (составляло $536,2 \pm 222,8$ ng/ml).

При ранжировании по выявленным видам пародонтопатогенов установлена умеренно выраженная корреляционная зависимость содержания α -дефензинов и определением *P. gingivalis* в пародонтальных карманах ($R = 0,596$), *T. forsythia* ($R = 0,673$), *T. denticola* ($R = 0,612$), а также числом видов пародонтопатогенной группы в ассоциациях ($R = 0,447$) и числом инфицированных участков пародонта ($R = 0,396$). Отмечены также умеренные корреляции с наличием кариозных полостей ($R = 0,506$), значениями пародонтального индекса PI ($R = 0,397$), индекса API ($R = 0,269$), величиной пародонтального кармана ($R = 0,392$) и возрастом респондента ($R = 0,412$). Показано также наличие прямой корреляции с распределением пациентов по нозологическим группам ($R = 0,447$) и наличием сопутствующих заболеваний сердечнососудистой системы ($R = 0,394$).

Умеренная отрицательная корреляция установлена между содержанием α -дефензинов в десневой жидкости, различиями по полу ($R = -0,269$) и привычкой курения ($R = -0,337$) (таблица 31).

Корреляционная матрица α -дефензинов и клинико-лабораторных показателей по группам сравнения

Переменная величина	α -дефензины в плазме крови	α -дефензины в десневой жидкости
Группа по нозологии	0,494	0,447
Возраст пациента	0,472	0,412
Глубина ПК	0,456	0,392
Индекс КПУ	-0,190	0,017
Кариес	0,449	0,506
ОHI-s	0,026	0,134
PMA	0,106	0,029
PI	0,228	0,397
API	0,187	0,269
<i>P. intermedia</i>	0,134	0,125
<i>T. forsythia</i>	0,388	0,673
<i>T. denticola</i>	0,203	0,612
<i>A. actinomycetem-comitans</i>	0,051	0,179
<i>P. gingivalis</i>	0,397	0,596
Количество видов в ассоциации	0,236	0,447
Количество инфицированных участков	0,175	0,396
Пол	-0,369	-0,269
Курение	0,167	-0,337
Сердечно-сосудистые заболевания	0,189	0,394
Заболевания ЖКТ	0,268	0,014

Примечание: в таблице представлены статистически достоверно значимые величины при $p < 0,05$, «-» — отрицательна корреляция признаков.

Нами также было установлено, что уровни α -дефензинов в плазме периферической крови были в 4–5 раз меньше, чем в десневой жидкости как у здоровых людей с интактным пародонтом, так и у больных с воспалительными заболеваниями тканей пародонта. Действительно, концентрация α -дефензинов в плазме крови практически здоровых людей с интактным пародонтом (респондентов контрольной группы) варьировала в пределах от 40 до 60 ng/ml; у респондентов с ХП группы 1а — от 30 до 150 ng/ml; группы 1б — от 50 до 1100 ng/ml, группы 1в — от 320 до 400 ng/ml, респондентов группы 2 с ХГ — от 120 до 140 ng/ml и респондентов группы 3 с КАП — от 140 до 220 ng/ml (таблица 32).

Таблица 32

Содержание α -дефензинов в плазме периферической крови ($M \pm \Delta$)

Группа	Концентрация α — дефензинов, ng/ml	ДИ
Контрольная	$50,96 \pm 8,94$	42,02–59,90
1а	$105,00 \pm 4,79^*$	100,10–109,70
1б	$260,00 \pm 55,60^*$	204,60–315,80
1в	$359,20 \pm 40,34^*$	318,86–399,54
2	$128,56 \pm 12,63^*$	115,93–141,19
3	$178,35 \pm 38,78^*$	139,57–217,13

Если в контрольной группе содержание α -дефензинов ниже 20 ng/ml выявлено у 22 респондентов (31,4%), от 20 до 50 ng/ml — у 28 респондентов (40,0%), от 51 до 100 ng/ml у 20 респондентов (28,6%), то при воспалительных заболеваниях пародонта высокий уровень α -дефензинов определялся значительно чаще.

Так, при ХПЛ у 11 респондентов (15,7%) концентрация α -дефензинов составляла от 20 до 50 ng/ml, у 8 респондентов (11,0%) — от 51 до 100 ng/ml и у большей части — у 51 респондента (72,8%) — от 101 до 150 ng/ml. При ХПС у 6 респондентов (8,6%) содержание α -дефензинов составило от 20 до 50 ng/ml, у 12 респондентов (17,1%) — от 51 до 100 ng/ml, у 23 респондентов (33,3%) — находилось в пределах 101—200 ng/ml, у 23 респондентов (33,3%) — в пределах

210 — 350 ng/ml и у 6-и респондентов (8,4%) — в пределах 357 — 1000 ng/ml. При ХПТ у 8 респондентов (11,4%) концентрация HNP 1–3 составляла 100 ng/ml, у 19 респондентов (27,1%) — от 101 до 150 ng/ml, у 24 респондентов (34,3%) — от 151 до 200 ng/ml, у 9 респондентов (12,9%) — от 201 до 350 ng/ml и у 10 респондентов (14,3%) — от 351 до 1000 ng/ml.

При ХГ уровень α -дефензинов в плазме периферической крови у 17 респондентов (33%) достигал 200 ng/ml; у 5 респондентов (10%) — 50 ng/ml; у 6 респондентов (12%) — от 51 до 100 ng/ml; у 9 респондентов (18%) — от 151 до 200 ng/ml; у 7 респондентов (14%) — от 351 до 1000 ng/ml.

При КАП уровень α -дефензинов составлял 200 ng/ml у 13 респондентов (33%); 100 ng/ml — у 6 респондентов (15%), у 8 респондентов (20%) — от 101 до 150 ng/ml; у 10 респондентов (24%) — от 201 до 350 ng/ml и у 3 респондентов (7,5%) — 1000 ng/ml (рис. 63).

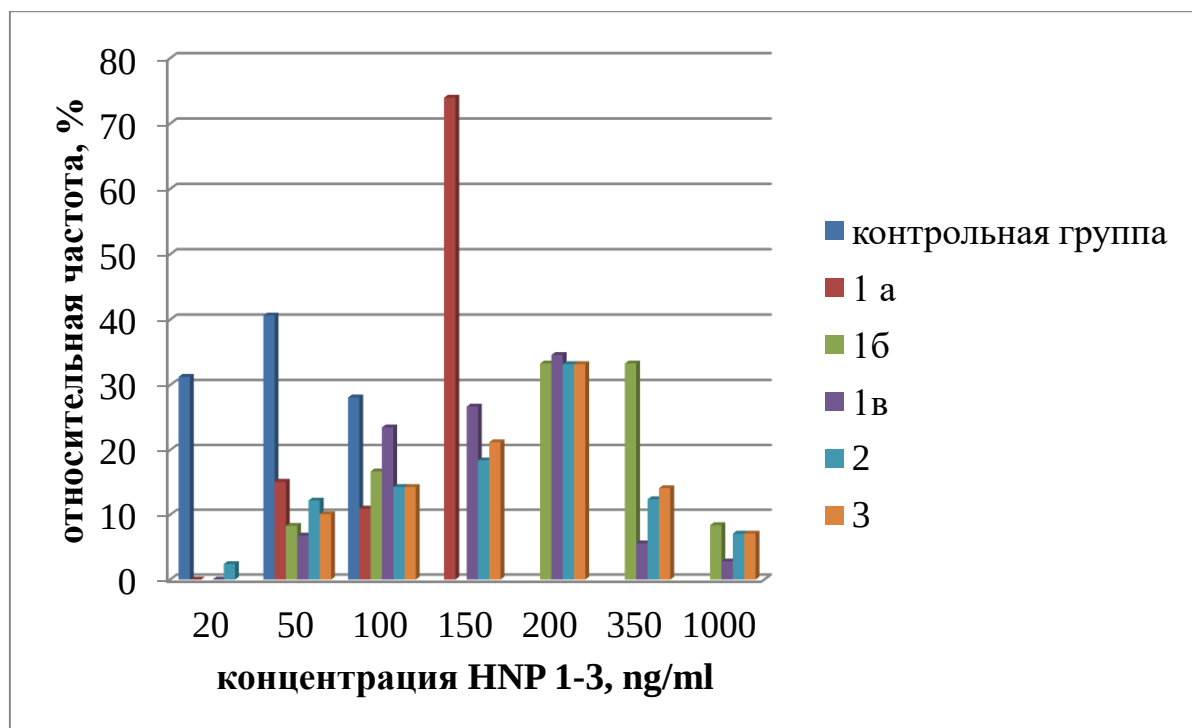


Рис. 63. Распределение пациентов по частоте обнаружения в плазме периферической крови разных количественных уровней HNP 1–3, %.

Таким образом, уровень α -дефензинов (HNP 1–3) в плазме периферической крови больных воспалительными заболеваниями тканей пародонта был статистически достоверно выше в 2–7 раз, чем у практически здоровых людей с интактным пародонтом. При этом у больных ХП уровни α -дефензинов были статистически достоверно выше в зависимости от степени тяжести пародонтита (ХПТ в 1,4 раза > ХПС в 2,5 раза > ХПЛ).

Содержание α -дефензинов (HNP 1–3) в плазме периферической крови статистически достоверно умеренно коррелировало с формой воспалительного заболевания тканей пародонта (группа) ($R = 0,494$), возрастом ($R = 0,472$) и полом пациента ($R = -0,369$), а также с величиной пародонтального кармана ($R = 0,456$), числом кариозных полостей ($R = 0,449$); слабо коррелировало с индексами API ($R = 0,187$) и индексом КПУ ($R = -0,190$). Наличие в пародонтальных карманах молекулярных маркеров бактерий пародонтопатогенной группы *P. gingivalis* ($R = 0,297$) и *T. forsythia* ($R = 0,268$) статистически достоверно умеренно коррелировало с содержанием α -дефензинов в плазме периферической крови. Слабая корреляция отмечена для *T. denticola* ($R = 0,203$) и количества видов пародонтопатогенов в ассоциациях ($R = 0,236$), а также с наличием сопутствующей патологии ЖКТ ($R = 0,268$).

Таким образом, увеличение уровня α -дефензинов (в десневой жидкости и в плазме периферической крови) может быть связано с возрастом и полом пациента, состоянием гигиены полости рта, наличием кариозных поверхностей и пародонтопатогенных видов бактерий *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, сопутствующих заболеваний и других признаков.

5.4. Экспрессия на лейкоцитах десневой жидкости рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-4

Хронический пародонтит начинается с последовательной колонизации широкого круга бактерий и сохраняется при участии иммунных воспалительных реакций, влияющих на биопленку. Распознавание микробов в значительной

степени опосредуется Toll-подобными рецепторами, которые взаимодействуют с консервативными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами. Распознавая специфические лиганды, TLR-2 и TLR-4 взаимодействуют с большинством пародонтопатогенов [52, 59, 442].

Задачей данного фрагмента нашей работы явилась оценка экспрессии Toll-подобных рецепторов на лейкоцитах десневой жидкости. В этой части исследования участвовали по 20 человек из каждой группы.

В качестве исследуемого материала мы использовали смывы десневой жидкости из ПК или зубодесневой борозды раствором Хэнкса. Клетки из осадка окрашивали антителами к CD282 (TLR-2) или CD284 (TLR-4), меченными FITC, затем фиксировали параформальдегидом. Микроскопическое исследование проводили с помощью микроскопа ECLIPSE 50i (Nicon, Япония), увеличение $\times 1000$.

Частота выявления клеток, несущих CD282 (TL-2) и CD284 (TLR-4), у пациентов контрольной группы составила $10,3 \pm 3,2\%$ и $13,6 \pm 3,4\%$, в группе пациентов с ХП в фазе обострения статистически достоверно в 3 раза ниже — $4,1 \pm 2,1\%$ и $5,7 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$), у больных ХГ — $15,1 \pm 1,9\%$ и $8,6 \pm 2,3\%$ и у пациентов с КАП $5,3 \pm 2,1\%$ и $4,6 \pm 1,9\%$.

На рис. 64 представлены клетки из десневой жидкости, экспрессирующие CD282 (TLR-2), меченные FITC. В клетках видны бледно и ярко окрашенные гранулы. При фазовом контрасте можно было наблюдать лейкоциты, выделенные из смыва ПК (рис. 65).

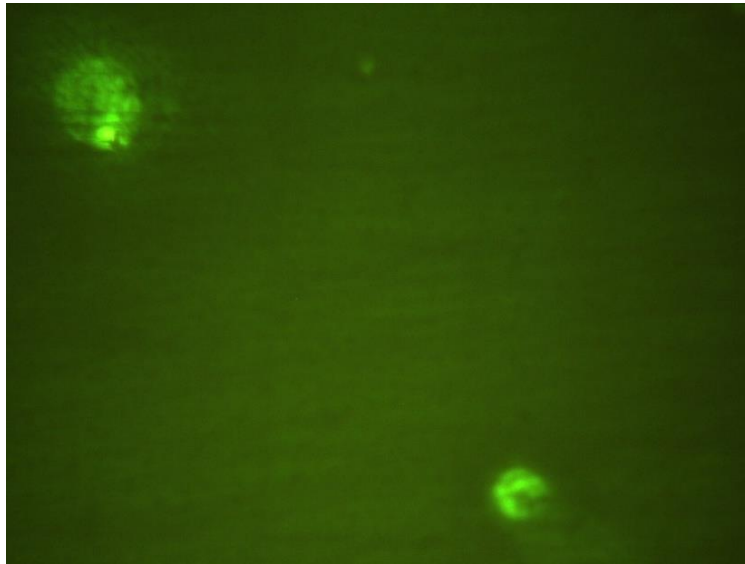


Рис. 64. Иммунофлюоресцентная микроскопия лейкоцитов из смыва ПК экспрессирующих CD282 (FITC). Увеличение $\times 1000$ раз

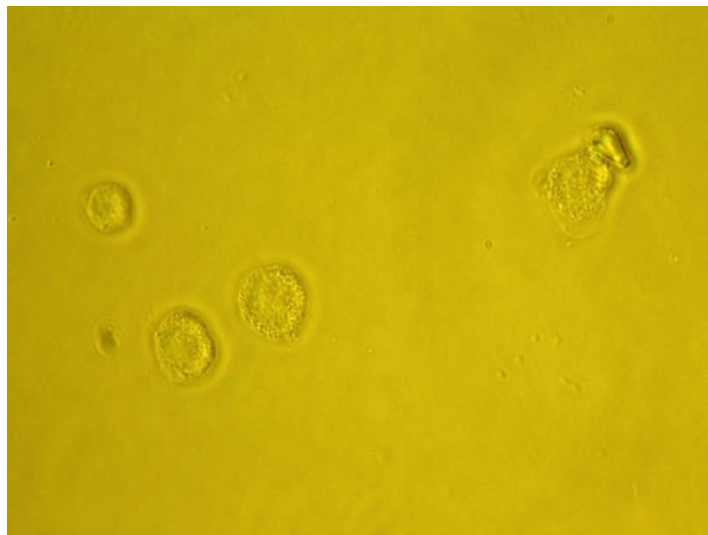


Рис. 65. Лейкоциты из смыва ПК в фазовом контрасте. Увеличение $\times 1000$ раз

На рис. 66 показаны те же лейкоциты с неярым диффузным окрашиванием CD284 (иммунофлюоресцентная микроскопия, FITC).

На рис. 67 представлены клетки с более интенсивной экспрессией CD284 — FITC (TLR-4).

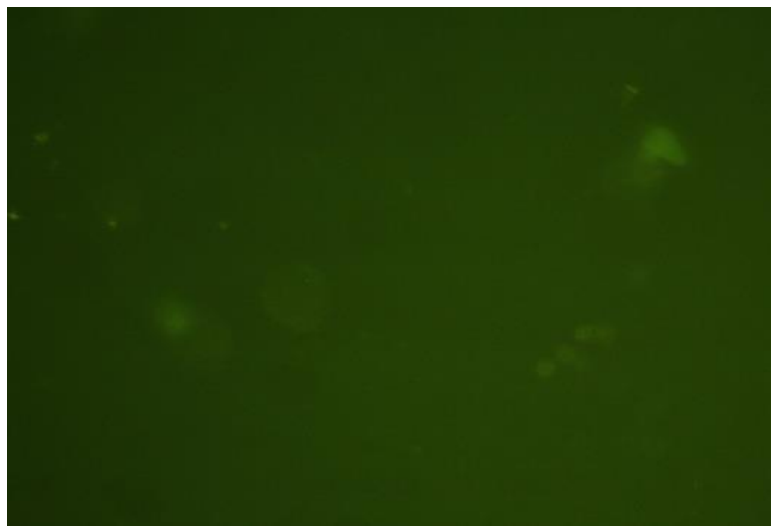


Рис. 66. Иммунофлюоресцентная микроскопия лейкоцитов из смыва ПК экспрессирующих CD284 (FITC). Увеличение $\times 1000$ раз.

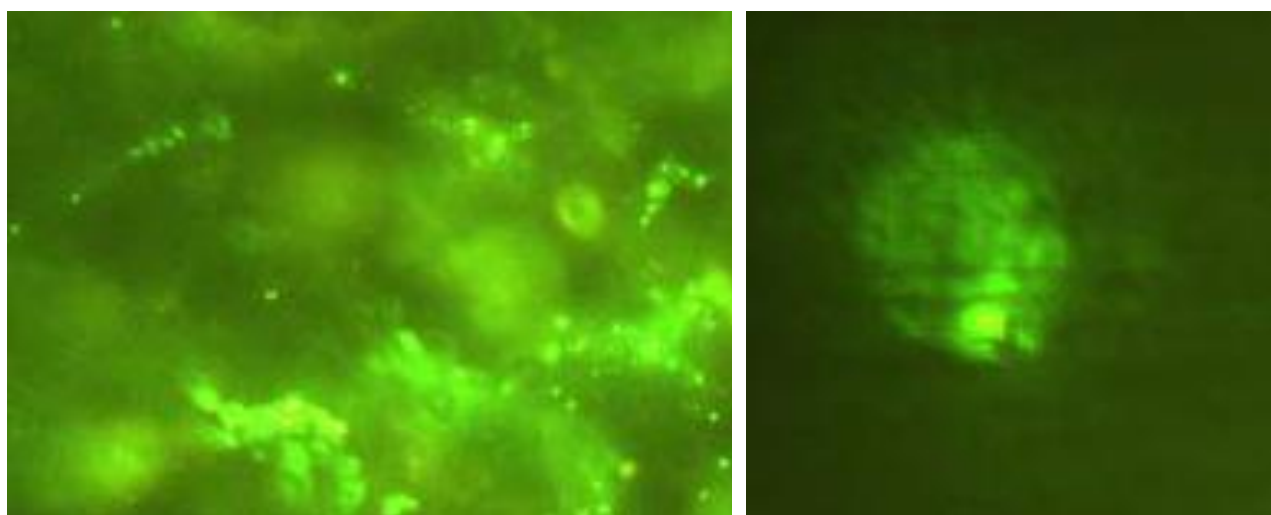


Рис. 67. Иммунофлюоресцентная микроскопия лейкоцитов смыва ПК экспрессирующих CD284 (FITC). Увеличение $\times 1000$ раз

Из смывов в области зубодесневой борозды или ПК мы выделяли по $5\text{--}10 \times 10^3$ клеток в мл — примерно на 2 порядка меньше, чем обычно требуется для иммунофенотипирования в проточном цитометре ($3,5\text{--}9,4 \times 10^6$ клеток в мл). Поэтому в последующем мы определяли наличие маркеров TLR-2 и TLR-4 на лейкоцитах венозной крови обследованных пациентов согласно стандартным методикам.

Примеры детекции рецепторов CD14 и CD282; CD3 и CD284 на клетках венозной крови — нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах демонстрируют следующие фотографии (рис. 68 и 69). Экспрессию TLR-2 отмечали на моноцитах (при двойном окрашивании CD14 и CD282), а TLR-4 — на лимфоцитах (при двойном окрашивании CD3 и CD284), однако она была очень низкой и не превышала 1%.

При выделении лейкомассы из периферической крови с 2%-ной желатина обычно происходит потеря клеток каких-либо субпопуляций. Поэтому на следующем этапе мы провели окрашивание клеток венозной крови одновременно с использованием нескольких АТ к разным популяциям лейкоцитов, которые метили разными флюоресцеинами (метками).

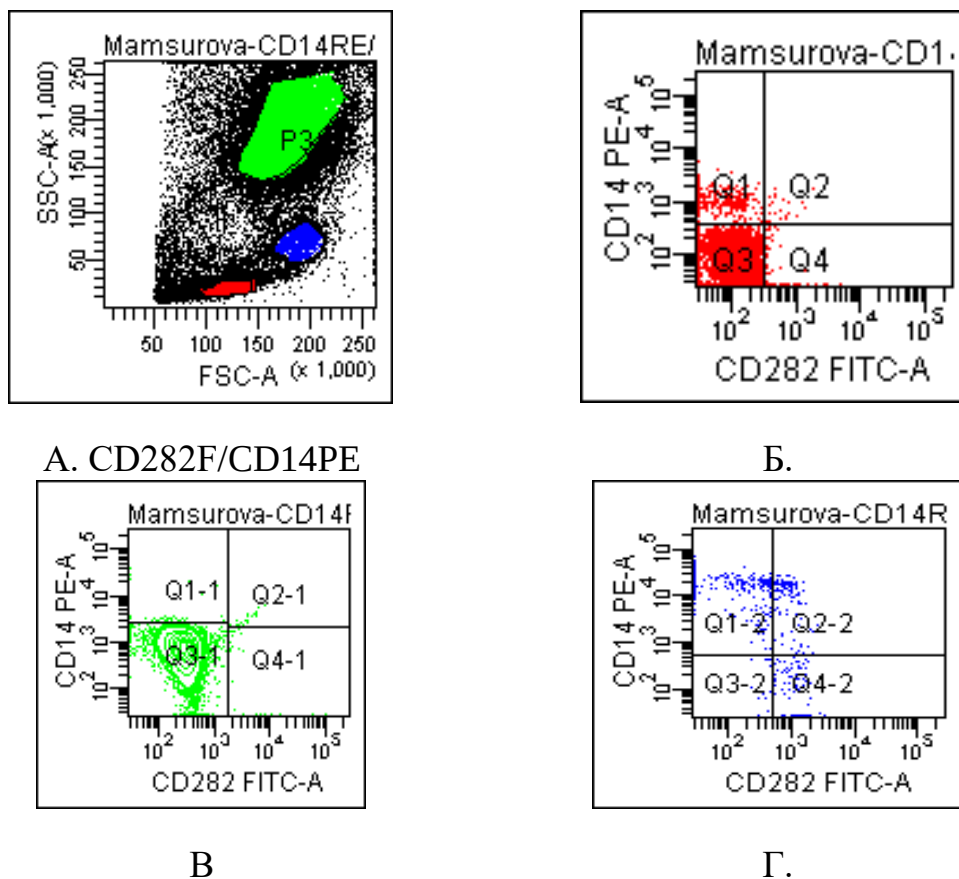


Рис. 68. Изучение экспрессии TLR-2 на лейкоцитах венозной крови

Примечание:

А. — график распределения клеток при переднем и боковом светорассеянии: зеленый цвет — нейтрофилы; красный цвет — лимфоциты; синий цвет — моноциты.

Б, В, Г — демонстрация экспрессии CD14, CD282 и CD14+, CD282 соответственно (клетки разных популяций лейкоцитов) на двумерном точечном графике (dot-plot),

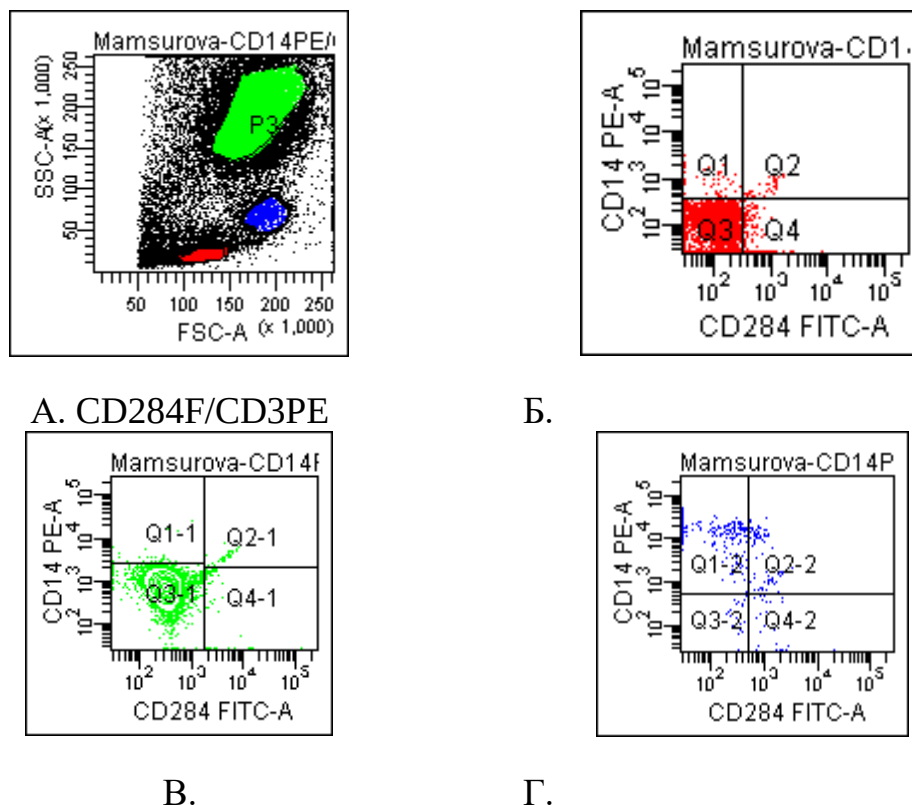


Рис. 69. Изучение экспрессии TLR-4 на лейкоцитах венозной крови

Примечание:

А. — график распределения клеток при переднем и боковом светорассеянии: зеленый цвет — нейтрофилы; красный цвет — лимфоциты; синий цвет — моноциты.

Б, В, Г — демонстрация экспрессии CD3, CD282 и CD3+CD282 соответственно (клетки разных популяций лейкоцитов) на двумерном точечном графике (dot-plot)

Тем не менее относительное число клеток, экспрессирующих молекулу CD282 (TLR-2), оказалось незначительным. Так, самый высокий уровень экспрессии маркеров CD282 (TLR-2) был на лимфоцитах людей контрольной группы $1,06 \pm 0,45\%$ (0,51–1,51%), в абсолютных значениях $24,38 \pm 10,35$ (14,03–34,73) млн. кл./литр (таблица 33).

Относительное ($0,35 \pm 0,01\%$), и абсолютное ($7,53 \pm 0,22$ млн. кл./л) число лимфоцитов, которые экспрессировали CD282, у пациентов группы 1а оказалось достоверно ниже (в 3 раза), чем в контрольной группе. У пациентов группы 1б относительное число лимфоцитов ($0,31 \pm 0,05\%$), которые экспрессировали CD282, также было в 3 раза ниже, чем в контрольной группе, а абсолютное — в 3,9 раза ($6,18 \pm 1,01$ млн кл./л). Процентное содержание лимфоцитов, несущих

рецепторы этого типа, у представителей 1в группы ($0,26 \pm 0,05\%$) было в 4 раза, а абсолютное ($5,56 \pm 0,21$ млн кл./л) — в 5,3 раза меньше, чем на лимфоцитах людей со здоровым пародонтом. У больных КАП процентное содержание CD282⁺-лимфоцитов ($0,31 \pm 0,03\%$) было ниже в 3,4 раза, а абсолютное ($7,53 \pm 0,73$ млн кл./л) — в 3,2 раза при $p < 0,05$. Тем не менее у больных ХГ процентное содержание CD282⁺-лимфоцитов ($1,46 \pm 0,25\%$) было статистически достоверно в 1,4 раза, а абсолютное количество ($32,56 \pm 5,58$ млн кл./л) — в 1,3 раза больше ($p > 0,05$), чем в контрольной группе.

Таблица 33

Оценка экспрессии молекул CD 282 (TLR 2) на лейкоцитах венозной крови в группах сравнения ($M \pm \Delta$)

Группы сравнения	Ед. измерения	Экспрессия маркера CD 282 (TLR 2)		
		Нейтрофилы	Моноциты	Лимфоциты
контрольная	%	$0,34 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,45$
	абс., млн/л	$18,31 \pm 2,32$	$2,16 \pm 0,37$	$24,38 \pm 10,35$
1а	%	$0,22 \pm 0,01^*$	$0,91 \pm 0,43$	$0,35 \pm 0,01^*$
	абс., млн/л	$6,13 \pm 0,93^*$	$2,71 \pm 1,28$	$7,53 \pm 0,22^*$
1б	%	$0,12 \pm 0,01^*$	$0,57 \pm 0,28$	$0,31 \pm 0,05^*$
	абс., млн/л	$3,17 \pm 1,03^*$	$1,61 \pm 0,79$	$6,18 \pm 1,01^*$
1в	%	$0,08 \pm 0,01^*$	$0,27 \pm 0,13^*$	$0,26 \pm 0,05^*$
	абс., млн/л	$2,87 \pm 2,03^*$	$0,89 \pm 0,40^*$	$5,56 \pm 0,21^*$
2	%	$0,44 \pm 0,05^*$	$0,85 \pm 0,09^*$	$1,46 \pm 0,25$
	абс., млн/л	$23,14 \pm 2,26^*$	$3,14 \pm 0,29^*$	$32,56 \pm 5,58$
3	%	$0,10 \pm 0,01^*$	$0,51 \pm 0,23$	$0,31 \pm 0,03^*$
	абс., млн/л	$2,98 \pm 0,93^*$	$2,09 \pm 0,94^*$	$7,53 \pm 0,73^*$

Примечание:

* — различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой (при $p < 0,05$).

Количество CD282⁺-моноцитов в венозной крови у респондентов группы 1а с ХПЛ ($0,91 \pm 0,43\%$ или $2,71 \pm 1,28$ млн/л) было в 1,3 раза выше, чем в контрольной группе ($0,65 \pm 0,11\%$ или $2,16 \pm 0,37$ млн/л), однако эти различия оказались статистически недостоверными. У респондентов группы 1б с ХПС

абсолютное ($1,61 \pm 0,79$ млн кл./л) и относительное ($0,57 \pm 0,28\%$) количество моноцитов, экспрессирующих TLR-2, было также статистически недостоверно в 1,3 раза меньше, чем у индивидуумов в контрольной группе. В группе больных 1в с ХПТ процентное ($0,27 \pm 0,13\%$) и абсолютное ($0,89 \pm 0,40$ млн кл./л) содержание CD282⁺-моноцитов было в 2,4 раза меньше, чем в контроле. При этом содержание CD282⁺-моноцитов у больных с ХПС было статистически достоверно ниже в 1,7 раз, а у больных с ХПТ — в 3,0 (процентное) и 3,4 раза (абсолютное) меньше, чем у пациентов с ХПЛ.

У больных КАП абсолютное содержание моноцитов, экспрессирующих эти рецепторы ($0,51 \pm 0,23\%$, $2,09 \pm 0,94$ млн/л), практически не отличалось от содержания у здоровых людей. При ХГ содержание в периферической крови данной субпопуляции моноцитов было в 1,3 (процентное) и 1,5 (абсолютное) раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$).

Количество нейтрофилов, которые экспрессировали CD282, оказалось существенно ниже. Так, у пациентов с интактным пародонтом (контрольная группа) эти маркеры выявлены на $0,34 \pm 0,04\%$ ($18,15 \pm 2,16$ млн/л) нейтрофилов. У пациентов группы 1а — в 1,5 раза реже ($0,22 \pm 0,01\%$, $6,13 \pm 0,93$ млн/л); у пациентов группы 1б — в 3–5 раз ($0,12 \pm 0,01\%$ и $3,17 \pm 1,03$ млн/л) меньше, и у пациентов группы 1в — в 4,3–6,3 раза ($0,08 \pm 0,01\%$ и $2,87 \pm 2,03$ млн/л) реже, по сравнению с контрольной группой. При КАП процентное содержание ($0,10 \pm 0,01\%$) CD282⁺-нейтрофилов было в 3,4 раза, а абсолютное ($4,36 \pm 0,44$ млн/л) — в 4 раза меньше, чем в норме. У больных ХГ содержание CD282⁺-нейтрофилов ($0,54 \pm 0,05\%$, $27,43 \pm 2,54$ млн/л) было статистически достоверно выше в 1,6 раза, чем у здоровых людей.

Частота распределения лейкоцитов периферической крови, которые экспрессировали CD284 (TLR-4), была аналогична описанной выше для CD282 (TLR-2), однако в группе 1а лимфоцитов с этим типом рецепторов было выявлено статистически достоверно значимо больше в 2,8 раза ($0,73 \pm 0,13\%$) и 2,6 раза ($15,69 \pm 2,79$ млн/л), чем у людей в контрольной группе ($0,26 \pm 0,12\%$, $5,98 \pm 2,76$ млн/л). В группе 1б относительное и абсолютное содержание CD284⁺-

лимфоцитов было выше ($0,56 \pm 0,14\%$ и $11,31 \pm 2,83$ млн/л), чем у людей с интактным пародонтом в 1,9 раза. Доля CD284⁺-лимфоцитов у больных 1в группы ($0,31 \pm 0,11\%$) и их абсолютное количество ($6,63 \pm 4,19$ млн/л) были в 1,2 раза больше, чем в контроле ($p > 0,05$). При этом у этих больных содержание CD284⁺-лимфоцитов было статистически достоверно меньше, чем у больных ХП легкой и средней степени тяжести. У больных КАП содержание CD284⁺-лимфоцитов ($0,39 \pm 0,12\%$, $9,48 \pm 0,86$ млн/л) было статистически достоверно выше контрольных значений в 1,6 раза. Более чем в 3 раза было CD 284⁺-лимфоцитов ($0,85 \pm 0,14\%$, $18,96 \pm 3,12$ млн/л) у пациентов с ХГ, по сравнению со здоровыми людьми и больными ХПТ и в 1,5 раза больше, чем у больных ХПС ($p < 0,05$).

Наибольшее количество CD 284⁺-моноцитов было выявлено у больных ХГ: $2,35 \pm 0,25\%$, $7,52 \pm 0,80$ млн/л, в 16 раз больше как в долевого значения, так и в абсолютных ($0,47 \pm 0,13$ млн/л) величинах по сравнению со здоровыми людьми. У пациентов с ХПЛ содержание этой субпопуляции ($2,17 \pm 0,18\%$, $6,47 \pm 0,54$ млн/л) было выше в 14 раз, чем у пациентов контрольной группы. В 13 раз выше нормы было процентное содержание моноцитов этого типа ($1,79 \pm 0,04\%$, $p < 0,05$), а абсолютное ($5,05 \pm 0,11$ млн/л) — в 11 раз у пациентов с ХПС. У больных ХПТ CD284⁺-моноцитов было больше в 4,2 раза ($0,60 \pm 0,14\%$, $1,98 \pm 0,46$ млн/л), чем у здоровых людей при $p < 0,05$. Статистически достоверное снижение содержания субпопуляции моноцитов, экспрессирующих TLR-4, было связано с увеличением степени тяжести пародонтита. Для больных КАП также было характерно повышенное в 10 раз процентное содержание CD284⁺-моноцитов ($1,36 \pm 0,14\%$) по сравнению с контролем, а абсолютного ($5,58 \pm 0,57$ млн/л) — в 12 раз.

Максимальное содержание CD284⁺-нейтрофилов было у больных с ХГ ($0,42 \pm 0,06\%$, $20,45 \pm 4,65$ млн/л). У людей со здоровым пародонтом их количество ($0,35 \pm 0,05\%$, $18,25 \pm 3,11$ млн/л) было статистически недостоверно ниже в 1,2 раза. При ХП наблюдалось снижение числа и доли этих нейтрофилов в зависимости от степени тяжести пародонтита. Так, при ХПЛ оно было в 1,2–

1,3 раза ниже ($0,27 \pm 0,07\%$, $14,79 \pm 1,78$ млн/л), $p > 0,05$. У больных ХПС абсолютное содержание CD284⁺-нейтрофилов ($8,05 \pm 2,67$ млн/л) было в 2,3 раза ниже, а доленое ($0,21 \pm 0,06\%$) — в 1,7 раза меньше при $p < 0,05$). Абсолютное количество CD284⁺-нейтрофилов ($6,35 \pm 1,75$ млн/л) у пациентов с ХПТ было в 2,9 раза меньше, а процентное ($0,17 \pm 0,05\%$) — в 2,1 раза, чем у здоровых людей. У больных КАП абсолютное содержание ($7,85 \pm 2,18$ млн/л) данной субпопуляции нейтрофилов было в 2,4 раза меньше, а процентное ($0,18 \pm 0,05\%$) — в 1,9 раза, чем у здоровых людей, $p < 0,05$ (таблица 34).

Таблица 34

Оценка экспрессии молекул CD284 (TLR-4) на лейкоцитах венозной крови в группах сравнения ($M \pm \Delta$)

Группы сравнения	Ед. измерения	Экспрессия маркера CD 284 (TLR 4)		
		Нейтрофилы	Моноциты	Лимфоциты
Контрольная	%	$0,35 \pm 0,05$	$0,14 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,12$
	абс., млн/л	$18,25 \pm 3,11$	$0,47 \pm 0,13$	$5,98 \pm 2,76$
1а	%	$0,27 \pm 0,07$	$2,17 \pm 0,18^*$	$0,73 \pm 0,13^*$
	абс., млн/л	$14,79 \pm 1,78$	$6,47 \pm 0,54^*$	$15,69 \pm 2,79^*$
1б	%	$0,21 \pm 0,06^*$	$1,79 \pm 0,04^*$	$0,56 \pm 0,14^*$
	абс., млн/л	$8,05 \pm 2,67^*$	$5,05 \pm 0,11$	$11,31 \pm 2,83^*$
1в	%	$0,17 \pm 0,05^*$	$0,60 \pm 0,14^*$	$0,31 \pm 0,11$
	абс., млн/л	$6,35 \pm 1,75^*$	$1,98 \pm 0,46^*$	$6,63 \pm 2,35$
2	%	$0,42 \pm 0,06$	$2,35 \pm 0,25^*$	$0,85 \pm 0,14^*$
	абс., млн/л	$20,45 \pm 4,65$	$7,52 \pm 0,80^*$	$18,96 \pm 3,12^*$
3	%	$0,18 \pm 0,05^*$	$1,36 \pm 0,14^*$	$0,39 \pm 0,12$
	абс., млн/л	$7,85 \pm 2,18^*$	$5,58 \pm 0,57^*$	$9,48 \pm 0,86^*$

Таким образом, можно сделать заключение, что клетки — представители основных популяций лейкоцитов (нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов), как

периферической крови, так и десневой жидкости несут на своей поверхности (экспрессируют) TLR-2 и TLR-4, которые можно выявить с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии или проточной цитометрии с моноклональными антителами к CD282- и CD284-маркерам соответственно. У пациентов с интактным пародонтом (контрольная группа) отмечен самый высокий уровень экспрессии TLR-2 на лимфоцитах, меньше — на моноцитах и самый низкий — на нейтрофилах венозной крови. Напротив, в контрольной группе было выявлено больше всего нейтрофилов, экспрессирующих TLR-4, существенно меньше — лимфоцитов и совсем мало — моноцитов.

При развитии хронического пародонтита экспрессия TLR-2, очевидно, увеличивается на моноцитах, но снижается на нейтрофилах и лимфоцитах по сравнению с контрольной группой; а экспрессия TLR-4 увеличивается не только на моноцитах, но также и на лимфоцитах, но снижается на нейтрофилах. При хроническом катаральном гингивите в популяции лейкоцитов TLR-2 больше всего экспрессировали лимфоциты, в меньшей степени — моноциты и еще меньше — нейтрофилы. TLR-4 в большей степени экспрессировали моноциты, в меньшей — лимфоциты и нейтрофилы. У пациентов с кандидассоциированным пародонтитом доминировали CD282⁺-моноциты, в меньшей степени выявляли CD282⁺-лимфоциты и CD282⁺-нейтрофилы. Экспрессия TLR-4 преобладала в ряду: моноциты — нейтрофилы, лимфоциты.

Таким образом, экспрессия рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-4 на лейкоцитах периферической крови (нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах) и десневой жидкости у людей со здоровым пародонтом имела примерно одинаковый характер, но варьировала при различных формах воспалительных заболеваний тканей пародонта.

5.5. Цитокиновый профиль десневой жидкости, биопленки пародонта и плазмы периферической крови

Нами также было проведена оценка содержания в бесклеточном супернатанте из биопленки (таблица 35) и десневой жидкости (таблица 36)

провоспалительных цитокинов – интерлейкинов. Было установлено, что концентрация интерлейкинов у людей со здоровым пародонтом и больных с воспалительными заболеваниями полости рта значительно варьировала.

Таблица 35

**Содержание интерлейкинов в исследуемом материале биопленки
($M \pm \Delta$), нг/мг**

Показатель	Группа					
	контрольная	1а	1б	1в	2	3
IL-1 β	0,68 $\pm$ 0,31	3,49 $\pm$ 0,83	5,52 $\pm$ 0,84	8,86 $\pm$ 0,90	0,47 $\pm$ 0,15	4,36 $\pm$ 0,70
	(0,37–0,99)	(2,66–4,32)	(4,68–6,36)	(7,96–9,76)	(0,32–0,72)	(3,66–5,06)
IL-6	0,06 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,21	0,34 $\pm$ 0,20	0,54 $\pm$ 0,21
	(0,04–0,08)	(0,28–0,50)	(0,52–0,78)	(0,78–1,20)	(0,14–0,54)	(0,33–0,75)
TNF- α	0,12 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,16	0,56 $\pm$ 0,10	0,85 $\pm$ 0,16	0,78 $\pm$ 0,15	0,43 $\pm$ 0,22
	(0,04–0,20)	(0,18–0,50)	(0,46–0,66)	(0,69–1,01)	(0,63–0,93)	(0,21–0,65)
IL-4	1,54 $\pm$ 0,86	4,86 $\pm$ 1,68	5,22 $\pm$ 0,98	8,59 $\pm$ 1,27	2,96 $\pm$ 0,67	7,11 $\pm$ 0,79
	(0,68–2,40)	(3,18–6,54)	(4,24–6,20)	(7,32–9,86)	(2,29–3,63)	(6,36–9,08)
IL-8	1,62 $\pm$ 0,78	4,94 $\pm$ 0,85	6,97 $\pm$ 1,24	9,11 $\pm$ 0,68	8,58 $\pm$ 1,56	7,72 $\pm$ 1,36
	(0,84–2,40)	(4,09–5,79)	(5,73–8,21)	(8,43–9,79)	(7,02–10,14)	(6,36–9,08)
IL-17A	2,33 $\pm$ 1,64	5,36 $\pm$ 1,42	7,02 $\pm$ 1,36	9,36 $\pm$ 0,87	7,58 $\pm$ 1,13	8,36 $\pm$ 1,67
	(1,29–4,57)	(3,94–6,78)	(5,66–8,38)	(8,49–10,23)	(6,45–8,71)	(6,69–10,03)
INF- γ	1,39 $\pm$ 0,46	4,35 $\pm$ 0,64	6,98 $\pm$ 1,14	10,21 $\pm$ 1,27	2,55 $\pm$ 0,64	9,74 $\pm$ 1,21
	(0,93–1,85)	(3,71–4,99)	(5,84–8,11)	(8,94–11,48)	(1,91–3,19)	(8,53–1,21)
Всего:	7,74 $\pm$ 4,15	23,73 $\pm$ 5,69	32,92 $\pm$ 5,79	47,97 $\pm$ 5,36	23,56 $\pm$ 4,5	38,26 $\pm$ 6,16
	(3,59–11,89)	(18,04–29,42)	(27,13–38,71)	(42,61–53,33)	(19,06–28,06)	(32,10–44,42)

Таблица 36

Содержание интерлейкинов в десневой жидкости ($M \pm \Delta$), нг/мл.

Показатель	Группа					
	Контрольная	1а	1б	1в	2	3
IL-1 β	4,60 $\pm$ 2,10 (2,5–6,7)	13,96 $\pm$ 3,31* (10,65–17,27)	20,44 $\pm$ 3,12* (17,32–23,56)	28,46 $\pm$ 2,89* (25,47–31,25)	2,68 $\pm$ 0,52 (2,16–3,20)	19,64 $\pm$ 3,17* (16,47–23,81)
IL-6	0,24 $\pm$ 0,02 (0,22–0,24)	1,56 $\pm$ 0,22* (1,34–1,78)	1,89 $\pm$ 0,26* (1,63–2,15)	2,46 $\pm$ 0,18* (2,28–2,64)	0,84 $\pm$ 0,36* (0,48–1,22)	1,63 $\pm$ 0,21* (1,42–1,84)
TNF- α	0,85 $\pm$ 0,55 (0,30–1,40)	1,92 $\pm$ 0,88 (1,04–2,80)	2,78 $\pm$ 0,52* (2,26–3,30)	3,82 $\pm$ 0,16* (3,66–3,98)	3,61 $\pm$ 0,19* (3,49–3,80)	2,46 $\pm$ 0,34* (2,12–2,80)
IL-4	26,50 $\pm$ 2,30 (25,2–28,8)	32,50 $\pm$ 2,40* (30,1–34,9)	30,64 $\pm$ 1,53* (29,11–32,27)	35,61 $\pm$ 3,14* (32,47–38,75)	12,37 $\pm$ 3,45* (8,92–15,82)	29,72 $\pm$ 0,58* (29,14–30,30)
IL-8	18,70 $\pm$ 5,00 (13,7–21,7)	23,70 $\pm$ 4,30 (19,40–28,00)	27,60 $\pm$ 2,13* (25,47–29,73)	32,42 $\pm$ 3,45* (29,97–35,87)	25,73 $\pm$ 2,84* (22,89–28,57)	29,57 $\pm$ 2,46* (27,11–31,13)
IL-17A	46,60 $\pm$ 13,70 (30,02–59,9)	82,20 $\pm$ 16,60* (65,6–98,8)	89,47 $\pm$ 12,14* (77,35–101,61)	94,58 $\pm$ 15,21* (79,37–109,79)	87,65 $\pm$ 13,70* (80,92–94,38)	91,34 $\pm$ 9,73* (81,61–101,07)
INF- γ	13,57 $\pm$ 2,15 (11,42–15,72)	31,70 $\pm$ 3,10* (28,6–34,8)	38,63 $\pm$ 4,54* (34,09–44,17)	47,70 $\pm$ 3,67* (44,03–51,37)	11,69 $\pm$ 3,25 (8,44–14,94)	35,43 $\pm$ 3,69* (31,74–39,12)
Всего:	111,06 $\pm$ 25,42 (85,64–136,48)	187,54 $\pm$ 27,71* (142,33–222,25)	211,45 $\pm$ 24,24* (187,21–235,69)	244,95 $\pm$ 28,70* (216,25–273,65)	144,57 $\pm$ 17,34* (127,23–161,91)	209,79 $\pm$ 20,18* (189,61–229,97)

Так, содержание ключевого медиатора протективного иммунитета IL-1 β у людей со здоровым пародонтом в материале из биопленки составило $0,68 \pm 0,31$ нг/мг, у больных ХПЛ — статистически достоверно значимо в 5,1 раза выше ($3,49 \pm 0,83$ нг/мг), ХПС — в 8,1 раза ($5,52 \pm 0,84$ нг/мг), ХПТ — в 13,0 раз ($8,86 \pm 0,90$ нг/мг), КАП — в 6,4 раза ($4,36 \pm 0,70$ нг/мг) и только у больных ХГ — в 1,4 раза меньше ($0,47 \pm 0,15$ нг/мг) при $p > 0,05$. При этом концентрация IL-1 β у больных ХПТ была статистически достоверно выше, чем у больных ХПЛ (в 2,5 раза) и в 1,6 раза выше, чем у больных ХПС.

Содержание провоспалительного цитокина IL-6 у людей со здоровым пародонтом в материале из биопленки составило $0,06 \pm 0,02$ нг/мг, у больных ХПЛ — в 6,5 раз выше ($0,39 \pm 0,11$ нг/мг), ХПС — в 10,8 раза ($0,65 \pm 0,13$ нг/мг), ХПТ — в 16,5 раза ($0,99 \pm 0,21$ нг/мг), КАП — в 9,0 раза ($0,54 \pm 0,21$ нг/мг) и больных ХГ — в 5,7 раза ($0,34 \pm 0,20$ нг/мг) при $p < 0,05$. Среднее количество этого цитокина у больных ХПТ было в 1,5 раза выше, по сравнению с больными ХПС и в 2,5 раза — по сравнению с больными ХПЛ ($p < 0,05$).

Такая же тенденция отмечена и для TNF- α : в контрольной группе — $0,12 \pm 0,08$ нг/мг, у больных ХПЛ — в 2,8 раз выше ($0,34 \pm 0,16$ нг/мг), ХПС — в 4,7 раза ($0,56 \pm 0,10$ нг/мг), ХПТ — в 7,1 раза ($0,85 \pm 0,16$ нг/мг), КАП — в 3,6 раза ($0,43 \pm 0,22$ нг/мг) и больных ХГ — в 6,5 раза ($0,78 \pm 0,15$ нг/мг) при $p < 0,05$. Количество TNF- α у больных ХПТ было в 2,5 раза больше, чем у больных ХПЛ и в 1,5 раза, чем у больных ХПС.

Средние значения IL-17A у людей со здоровым пародонтом были равны $2,33 \pm 1,64$ нг/мг, у больных ХПЛ — $5,36 \pm 1,42$ нг/мг, ХПС — $7,02 \pm 1,36$ нг/мг, ХПТ — $9,36 \pm 0,87$ нг/мг, КАП — $8,36 \pm 1,67$ нг/мг, ХГ — $7,58 \pm 1,13$ нг/мг, то есть в 2,3–4,0 раза выше при всех изученных нами формах воспалительных заболеваний тканей пародонта ($p < 0,05$). Содержание IL-17A у больных ХПТ было статистически достоверно в 1,3 раза больше, чем у больных ХПС и в 1,7 раза, чем у больных ХПЛ.

Концентрация IL-8 у лиц со здоровым пародонтом была на уровне $1,62 \pm 0,78$ нг/мг, статистически достоверно в 3,0 раза меньше, чем у больных ХПЛ

($4,94 \pm 0,85$ нг/мг), в 4,3 раза, чем у больных ХПС ($6,97 \pm 1,24$ нг/мг), в 5,6 раз, чем у больных ХПТ ($9,11 \pm 0,68$ нг/мг), в 4,8 раз, чем у больных КАП ($7,72 \pm 1,36$ нг/мг) и в 5,3 раза, чем у больных ХГ ($8,58 \pm 1,56$ нг/мг). У больных ХПТ она была в 1,8 раза выше, чем у больных ХПЛ и в 1,3 раза, чем у больных ХПС ($p < 0,05$).

Уровни IL-4 составили $1,54 \pm 0,86$ нг/мг у представителей контрольной группы, статистически достоверно в 3,2 раза больше — у пациентов с ХПЛ ($4,86 \pm 1,68$ нг/мг) в 3,4 раза — у больных ХПС ($5,22 \pm 0,98$ нг/мг), в 5,6 раза при ХПТ ($8,59 \pm 1,27$ нг/мг) и в 4,6 раза — при КАП ($7,11 \pm 0,79$ нг/мг), а у больных ХГ в 1,9 раза ($2,96 \pm 0,67$ нг/мг). При ХПТ содержание IL-4 было в 1,8 раза выше, чем при ХПЛ и в 1,6 раза, чем при ХПС ($p < 0,05$).

Содержание INF- γ у людей со здоровым пародонтом варьировало в пределах $1,39 \pm 0,46$ нг/мг, у больных ХПЛ статистически достоверно выше в 3,1 раза ($4,35 \pm 0,64$ нг/мг), в 5,0 раз — у больных ХПС ($6,98 \pm 1,14$ нг/мг), в 7,3 раза — у больных ХПТ ($10,21 \pm 1,27$ нг/мг), в 7,0 раза — у больных КАП ($9,74 \pm 1,21$ нг/мг), а у больных ХГ — в 1,8 раза ($2,55 \pm 0,64$ нг/мг) при $p < 0,05$. При этом у больных ХПТ оно было выше в 1,5 раза выше, чем у больных ХПС и в 2,3 раза, чем у больных ХПЛ; у больных ХПС в 1,6 раза выше, чем у больных ХПЛ при $p < 0,05$.

Суммарное количество оцененных нами цитокинов у пациентов с заболеваниями пародонта было статистически достоверно выше, чем у здоровых людей. Так, у последних оно составило $7,74 \pm 4,15$ нг/мг, у больных ХПЛ — в 3,1 раза больше ($23,73 \pm 5,69$ нг/мг), ХПС — в 4,3 раза ($32,92 \pm 5,79$ нг/мг), ХПТ — в 6,2 раза ($47,97 \pm 5,36$ нг/мг), КАП — 4,9 раза ($38,26 \pm 6,16$ нг/мг) и ХГ — в 3,0 раза ($23,56 \pm 4,50$ нг/мг) при $p < 0,05$.

В десневой жидкости содержание IL-1 β у людей со здоровым пародонтом составило $4,60 \pm 2,10$ нг/мл, у больных ХПЛ — в 3,0 раза выше ($13,96 \pm 3,31$ нг/мл), ХПС — в 4,4 раза ($20,44 \pm 3,12$ нг/мл), ХПТ — в 6,2 раза ($28,46 \pm 2,89$ нг/мл), КАП — в 4,3 раза ($19,64 \pm 3,17$ нг/мл), а больных ХГ — в 1,7 раза меньше ($2,68 \pm 0,52$ нг/мл) при $p < 0,05$.

При этом концентрация IL-1 β у больных ХПТ была статистически достоверно выше, чем у больных ХПЛ, в 1,5 раза и в 1,4 раза выше, чем у больных ХПС.

Средние значения IL-6 у людей со здоровым пародонтом были на уровне $0,24 \pm 0,02$ нг/мл, в 6,5 раз выше — у больных ХПЛ ($1,56 \pm 0,22$ нг/мл), 7,9 раза — у пациентов с ХПС ($1,89 \pm 0,26$ нг/мл), 10,3 раза — у людей с ХПТ ($2,46 \pm 0,18$ нг/мл), 6,8 раза — у больных КАП ($1,63 \pm 0,21$ нг/мл) и больных ХГ — в 3,5 раза ($0,84 \pm 0,36$ нг/мл) при $p < 0,05$. При этом содержание IL-6 у больных ХПТ оказалось выше в 1,3 раза по сравнению с ХПС и в 1,6 раза по сравнению с ХПЛ (разница была статистически достоверна).

Количество TNF- α в десневой жидкости людей со здоровым пародонтом соответствовало $0,85 \pm 0,55$ нг/мл, у больных ХПЛ оно было в 2,2 раза выше ($1,92 \pm 0,88$ нг/мл), ХПС — в 3,3 раза ($2,78 \pm 0,52$ нг/мл), ХПТ — в 4,5 раза ($3,82 \pm 0,16$ нг/мл), КАП — в 2,9 раза ($2,46 \pm 0,34$ нг/мл) и больных ХГ — в 4,3 раза ($3,61 \pm 0,19$ нг/мл) при $p < 0,05$. При этом у больных ХПЛ содержание TNF- α было в 1,5 раза меньше, чем у больных ХПС ($p > 0,05$), а у больных ХПТ оно было в 2 раза больше, чем у пациентов с ХПЛ и в 1,4 раза, чем у больных ХПС ($p < 0,05$).

У людей со здоровым пародонтом содержание IL-17A было на уровне $46,60 \pm 13,70$ нг/мл, у больных ХПЛ — в 1,8 раза выше ($82,20 \pm 16,60$ нг/мл), ХПС — в 1,9 раза ($89,47 \pm 12,14$ нг/мл), ХПТ — в 2,1 раза ($94,58 \pm 15,21$ нг/мл), КАП — в 2,0 раза ($91,34 \pm 9,73$ нг/мл), ХГ — в 1,9 раза ($87,65 \pm 13,70$ нг/мл) при $p < 0,05$. Разница значений у больных ХП в зависимости от степени тяжести пародонтита была статистически не достоверной.

Среднее содержание INF- γ в группе здоровых людей составило $13,57 \pm 2,15$ нг/мл, у больных ХПЛ — статистически достоверно в 2,5 раз больше ($31,70 \pm 3,10$ нг/мл), ХПС — в 2,9 раза ($38,63 \pm 4,54$ нг/мл), ХПТ — в 3,5 раза ($47,70 \pm 3,67$ нг/мл), КАП — в 2,6 раза ($35,43 \pm 3,69 \pm 2,75$ нг/мл), а у больных ХГ — статистически не достоверно в 1,2 раза меньше ($11,69 \pm 3,25$ нг/мл).

Количество IL-8 у лиц со здоровым пародонтом было равно $18,70 \pm 5,00$ нг/мл, в 1,3 раза меньше, чем у больных ХПЛ ($23,70 \pm 4,30$ нг/мл) при $p > 0,05$;

статистически достоверно в 1,5 раза меньше, чем у больных ХПС ($27,60 \pm 2,13$ нг/мл); в 1,7 раза, чем у больных ХПТ ($32,42 \pm 3,45$ нг/мл); в 1,6 раза, чем у больных КАП ($29,57 \pm 2,46$ нг/мл), и в 1,4 раза, чем у больных ХГ ($25,73 \pm 2,84$ нг/мл). У больных ХПТ она была в 1,7 раза выше, чем у больных ХПЛ, и в 1,2 раза, чем у больных ХПС, а у последних — в 1,5 раза больше, чем при ХПЛ ($p < 0,05$).

Содержание IL-4 было равно $26,50 \pm 2,30$ нг/мл у представителей контрольной группы, статистически достоверно в 1,22 раза больше у пациентов с ХПЛ ($32,50 \pm 2,40$ нг/мл), 1,16 раза у больных ХПС ($30,64 \pm 1,53$ нг/мл), 1,34 раза у больных ХПТ ($35,61 \pm 3,14$ нг/мл), 1,12 раза у пациентов с КАП ($29,72 \pm 0,58$ нг/мл), а у больных ХГ в 1,12 раза меньше ($12,37 \pm 3,45$ нг/мл). Разница значений в зависимости от степени тяжести пародонтита была незначительной.

Суммарное количество выявленных цитокинов у пациентов с интактным (здоровым) пародонтом ($111,06 \pm 25,42$ нг/мл), оказалось достоверно выше в 1,7 раза, чем при ХПЛ ($187,54 \pm 27,71$ нг/мл); в 1,9 раза, чем при ХПС ($211,45 \pm 24,24$ нг/мл); в 2,2 раза, чем при ХПТ ($244,95 \pm 28,70$ нг/мл); в 1,9 раза, чем при КАП ($209,79 \pm 20,18$ нг/мл), и в 1,3 раза по сравнению с больными ХГ ($144,57 \pm 17,34$ нг/мл).

Следует отметить, что содержание цитокинов в бесклеточном супернатанте из биопленки зубодесневой борозды у пациентов с интактным пародонтом было значительно меньше, чем в десневой жидкости (рис. 70). Так, в десневой жидкости средняя концентрация IL-1 β , TNF- α и INF- γ была выше приблизительно в 7 раз, чем в содержимом биопленки, IL-6 — в 4 раза, IL-8 — в 5 раз, а IL-4 — в 17 раз и IL-17A — в 16 раз. У больных ХПЛ эта разница для большинства цитокинов была значительно меньше: от 3 до 7 раз, и только для IL-17A — в 15 раз; при ХПС — от 3 до 6 раз и для IL-17A — в 13 раз; при ХПТ — от 2,5 до 5 раз, для IL-17A — 10 раз, но для IL-1 β отмечена 9-кратная разница.

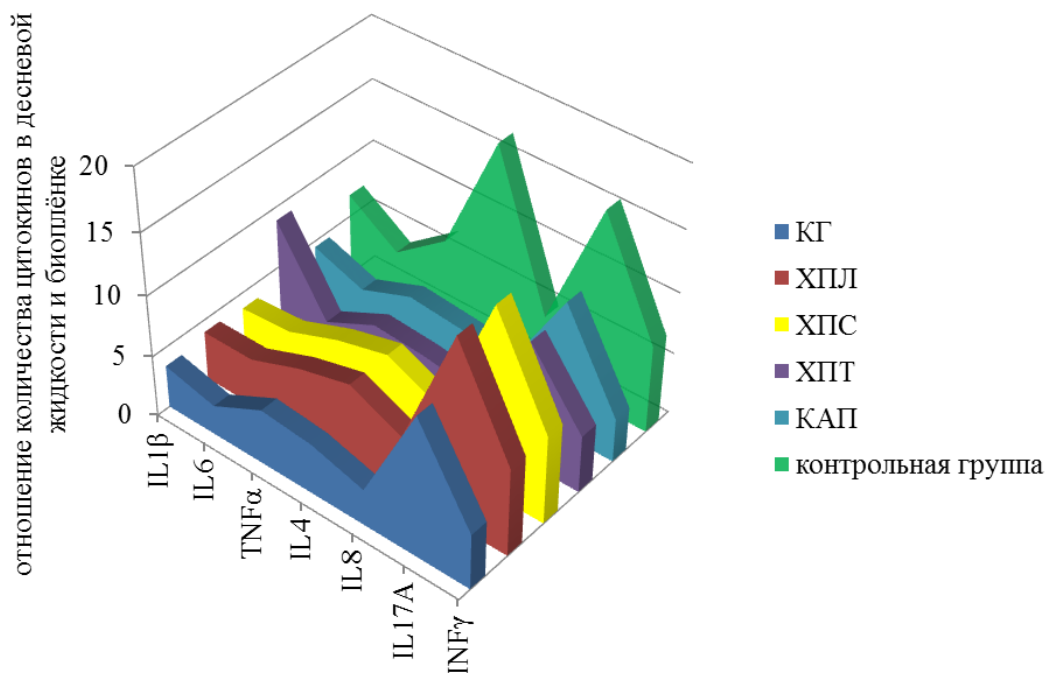


Рис. 70. Соотношение количества интерлейкинов в десневой жидкости и содержимом биопленки

При катаральном гингивите наименьшая разница — в 2,5 раза — выявлена в содержании IL-6, наибольшая — для IL-17A (в 12 раз), для остальных цитокинов — от 3 до 4,6 раза. При КАП также наименьшая разница в содержании IL-6 (3 раза), наибольшая — в содержании IL-17 (11 раз), для всех остальных цитокинов — 4–4,6 раза.

Таким образом, в десневой жидкости после удаления супра- и поддесневого налета содержание всех оцененных нами цитокинов было выше от 3 до 17 раз, чем в биопленке, но их соотношение при всех формах воспалительных заболеваний тканей пародонта имело тот же характер, как и у людей со здоровым пародонтом.

В завершение нашего исследования мы провели оценку взаимосвязей изученных факторов врождённого иммунитета, как лейкоциты, антимикробные пептиды — дефензины, цитокины и Toll-like-рецепторы иммунокомпетентных клеток (гл. 5) с ранее изученными клиническими и бактериологическими данными (гл. 3-4). В результате построения корреляционной матрицы (таблица 37) выявлены следующие виды взаимосвязей для ряда параметров.

Таблица 37

**Корреляционная матрица содержания цитокинов и клинико-
лабораторных показателей**

Переменная	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-4	IL-8	IL-17A	INF- γ
Группа	0,495	0,386	0,425	0,268	0,259	0,486	0,343
Возраст	0,379	0,257	-0,299	0,247	0,344	0,505	0,402
ПК	0,525	0,398	0,387	0,259	0,323	0,412	0,256
КПУ	-0,185	0,026	-0,206	0,102	0,243	0,257	0,115
Кариес	0,437	0,365	0,459	0,305	0,338	0,352	0,286
ОHI-s	0,225	0,289	0,305	0,134	0,296	0,306	0,257
PMA	0,118	0,215	0,329	0,243	0,303	0,364	0,264
PI	0,499	0,381	0,406	0,256	0,345	0,412	0,213
API	0,136	0,214	0,257	0,223	0,379	0,257	0,266
P. i.	0,346	0,249	0,406	0,217	0,264	0,379	0,278
T. f.	0,388	0,326	0,312	0,184	0,197	0,255	0,314
T. d.	0,328	0,214	0,347	-0,115	-0,178	0,347	0,119
A. a.	0,412	0,381	0,413	0,237	0,602	0,314	0,215
P. g.	-0,606	0,399	0,464	0,296	0,247	0,389	0,292
Количество видов в ассоциации	-0,577	0,317	0,256	0,244	0,239	0,413	-0,195
Количество инфицированных участков	0,408	0,176	0,316	0,281	0,292	0,378	0,254
HNP 1–3	0,449	0,306	0,417	0,214	0,328	0,256	0,317
TLR-2 Лф	0,244	0,164	0,513	0,396	0,214	0,416	0,345
TLR-4 Лф	0,265	0,271	0,187	0,174	0,196	0,214	0,211
TLR-2 Мн	0,289	0,317	0,219	0,154	0,213	0,326	0,317
TLR-4 Мн	0,234	0,234	0,347	0,178	0,249	0,425	0,375
TLR-2 Нф	0,335	0,319	0,455	0,245	0,292	0,274	0,134
TLR-4 Нф	0,349	0,348	0,399	0,301	0,237	0,291	0,197
Пол	-0,377	0,115	0,124	0,167	0,215	0,117	0,165
Курение	0,279	0,291	0,216	0,184	0,179	0,214	0,217
Сердечно-сосудистые заболевания	0,308	0,342	0,295	0,261	0,219	0,237	0,303
Заболевания ЖКТ	0,254	0,301	0,334	0,259	0,274	0,251	0,201

В частности, установлена обратная корреляционная зависимость между содержанием IL-1 β в десневой жидкости и наличием *P. gingivalis* ($R = -0,606$), количеством видов приоритетных патогенов в ассоциациях ($R = -0,577$), и прямая — с количеством инфицированных участков ($R = 0,408$), с возрастом ($R = 0,379$), наличием сердечно-сосудистых заболеваний ($R = 0,308$), частотой выявления кариозных поверхностей ($R = 0,437$), со степенью тяжести ХП ($R = 0,495$), пародонтальным индексом PI ($R = 0,499$), глубиной пародонтальных карманов ($R = 0,525$), но не индексами API и РМА, с содержанием α -дефензинов в десневой жидкости и экспрессией TLR нейтрофилах ($R = 0,349$ — $0,349$), а также слабая корреляция - с привычкой курения ($R = 0,279$).

Для IL-6 установлена умеренная зависимость со степенью тяжести ХП, PI, с содержанием α -дефензинов в десневой жидкости и экспрессией TLR нейтрофилах ($R = 0,319$ — $0,348$), с наличием сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных заболеваний ($R = 0,308$ — $0,301$), а также слабая корреляция - с привычкой курения ($R = 0,291$).

Для TNF- α выявлена умеренная взаимосвязь со степенью тяжести ХП и клиническими параметрами воспаления, с содержанием α -дефензинов в десневой жидкости и экспрессией TLR нейтрофилах. Для IL-6 показана взаимосвязь с некоторыми гигиеническими индексами полости рта и (кариес, РМА) экспрессией TLR нейтрофилах. Для IL-8 выявлена взаимосвязь с увеличением частоты выделения *A. actinomycetemcomitans* и α -дефензинов, для IL-17A — с частотой выделения *P. gingivalis* и числом видов, выделяемых в ассоциации, а также с клиническими параметрами состояния пародонта.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микрофлора полости рта приобретает на ранних этапах жизни человека и с течением времени развивается вместе с организмом хозяина, формируя комплексы многочисленных родов и видов, колонизирующих различные экологические ниши [299]. В литературе имеется много данных об ответных реакциях эпителиальных и иммунных клеток после контакта с планктонными бактериями [259, 271, 283, 434]. Однако современные модели взаимодействия микробов и организма хозяина в полости рта подчеркивают критическую природу комплексных природных биопленок, которые формируют уникальные микробные экологические ниши [174, 186], изменяющиеся при прохождении от состояния здоровья до болезни [334].

Главной целью изучения микробиома человека является оценка структуры и функций нашей естественной микрофлоры и ее влияния на здоровье человека и предрасположенность к заболеваниям. Из-за клинической важности и доступности для исследований *in vivo* биопленки полости рта являются наиболее воспринимаемыми микробными сообществами, ассоциированными с организмом человека. Было показано, что существует последовательность селективных микробных взаимодействий, которые направляют созревание определенных структур сообществ, генерирующих образование зубного (дентального) налета и биопленки десны или пародонта [180].

Соответственно, мы поставили **основной целью** нашего исследования повышение эффективности диагностики и обоснование тактики лечения воспалительных заболеваний пародонта с учетом динамики формирования микробной биопленки по данным микробиологических, иммунологических и молекулярных методов исследования в эксперименте *in vitro* и в клинических условиях.

В настоящем исследовании представлены результаты обследования 920 человек — пациентов пародонтологического (стоматологического) профиля за период времени с 2009–2015 гг. Из них методом случайной выборки были

рандомизированы 300 больных с воспалительными заболеваниями пародонта (хронический пародонтит, хронический гингивит, кандидо-ассоциированный пародонтит) в возрасте от 21 до 59 лет (мужчин — 147, женщин — 153), давность заболевания — от 3-х до 10-и лет (в среднем 4,8 года). Контрольную группу составили 70 человек с интактным (здоровым) пародонтом и аналогичными гендерными характеристиками.

Клиническая часть работы включала верификацию диагноза, согласно МКБ 10 по данным клинико-лабораторного обследования пациентов, включая выявление в исследуемом материале из пародонтальных карманов пациентов представителей пародонтопатогенных видов бактерий, изучение их чувствительности к антибиотикам и генетических маркеров резистентности, а также изучение факторов врожденного иммунитета у обследованных людей, что позволило обосновать новые подходы к назначению антибактериальной и иммуностропной терапии.

Методическую основу экспериментальной части исследования составило сопоставление данных моделирования микробной биопленки с использованием современных методов микроскопии (сканирующей электронной, трансмиссионной, зондовой, лазерной атомно-силовой), оценки микробной адгезии *in vitro* как начального этапа колонизации и оценки структуры биопленки в организме пациента. Особый интерес представляло сопоставление молекулярных факторов врожденного иммунитета — цитокинов, антимикробных пептидов — дефензинов и Toll-like-рецепторов иммунных клеток в десневой жидкости, омывающей биопленку, или в парадонтальном кармане при развитии патологии пародонта. Подобные исследования в сравнительном аспекте при разной патологии пародонта ранее не проводились.

При объективном клиническом обследовании пациентов были выявлены характерные клинические признаки хронических воспалительных заболеваний тканей пародонта, коррелирующие со степенью тяжести. Это позволило нам провести анализ взаимосвязей общепринятых клинических параметров заболеваний пародонта с микробиологическими и иммунологическими

данными, полученными в группах сравнения.

Так, средние показатели (медиана и интерквартильный размах) индекса ПМА у больных ХПЛ — 50,7 (44,6; 57,4)%, ХПС — 62,3 (58,3; 65,5)% и ХПТ — 70,4 (68,6; 72,5)% статистически достоверно отличались друг от друга ($p = 0,001$). Индексы ПМА у больных с гингивитом (группа 2) — 46,8 (40,7; 53,8)% — статистически достоверно не отличались от значений у больных ХПЛ, у больных КАП (группа 3) — 58,6 (56,8; 64,7)% — соответствовали значениям больных ХПС. Медиана индекса кровоточивости 38,6 (35,2; 43,5)% у пациентов с ХПЛ и гингивитом — 36,5 (32,8; 44,6)% в 3 раза превышала этот показатель в контрольной группе — 11,6 (10,4; 13,3)%, в 5 раз у больных ХПС — 54,4 (50,4; 61,9)% и у больных ХПТ — 56,3 (50,1; 60,4)%, в 6 раз у больных КАП — 62,1 (60,9; 68,4)% ($p_{M-U} = 0,001$).

Медиана и 50% значений глубины пародонтальных карманов, отражающие степень деструкции кости альвеолярных отростков у больных ХПЛ, равные 3,0 (3,0; 3,5) мм, ХПС — 5,0 (2,5; 5,2) мм и ХПТ — 6,0 (5,5; 6,6) мм, статистически достоверно значимо отличались от контрольных значений 1,1 (0,9; 1,3), а также между собой при $p_{M-U} = 0,001$; у пациентов с КАП — 5,06 (4,6; 5,9) мм, незначительно отличались от значений у больных ХПС, а у больных катаральным гингивитом — 2,7 (2,8; 3,3) мм — от величин у больных ХПЛ.

Средние значения ПИ — 3,99 (3,97; 4,03) баллов у больных ХПЛ, 4,87 (4,56; 5,11) баллов — у больных ХПС, 6,43 (6,31; 6,50) баллов — у больных ХПТ, 3,80 (3,28; 4,08) баллов — у больных ХГ и 5,14 (4,86; 5,64) баллов у больных КАП — значительно превышали значения у здоровых людей 0 (0; 0,6).

У представителей контрольной группы воспалительные процессы в тканях пародонта отсутствовали.

При оценке цитоморфологии смешанной биопленки с использованием различных видов микроскопического исследования пародонта у пациентов с интактным пародонтом (условно здоровые) и основными нозологическими формами воспалительных заболеваний пародонта также были выявлены значительные различия. Смешанная микробная биопленка интактного пародонта

имела структурированный характер с отчетливыми отверстиями, выполняющими дренажную функцию, тяжи, укрепляющие матрикс. При увеличении 100× слабо прослеживались контуры бактерий, прикрытые мантией. Местами были видны разрывы пролиферирующей биопленки с выходом микробной массы в виде бугра. При увеличении 16 000× были отчетливо видны контуры микробных клеток под мантией (кокки и палочковидные или бациллярные клетки). Величина клеточных элементов микробной биомассы составляла примерно от 250 до 850 нм для кокковидных и палочковидных форм соответственно.

В смешанной биопленке слизистой оболочки десен при хроническом гингивите при увеличении 6000× доминировали кокковые формы с четкой морфологической картиной стрептококков и единичных клеток сахаромикетов. Поэтому данный вариант морфологической картины мы охарактеризовали как кокковый. Это согласуется с литературными данными о том, что микробный состав при хроническом гингивите представлен преимущественно альфа- и бета-гемолитическим микроаэрофильными стрептококками [108, 157, 203, 255]. Известно также, что при гингивите наблюдаются воспалительная инфильтрация и отек слизистой десны (пародонта) [17, 81, 173].

Принципиально иная картина наблюдалась нами при хроническом пародонтите: при увеличении 6000× отмечалось наличие как кокковых, так и палочковидных или бактериоидных форм, причем с преобладанием последних. При идентификации они преимущественно оказались представителями родов анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы *Porphyromonas* и *Prevotella*, относящихся к группе бактериоидов. При использовании трансмиссионной электронной микроскопии были отмечены особенности строения грамположительных кокков и грамотрицательных бактериоидных форм, а также извитых (трепонемы), которые позволили провести их ориентировочную идентификацию. На сделанных нами фотографиях с помощью трансмиссионной электронной микроскопии клеточный состав при хроническом пародонтите был характерен для представителей бактерий, относящихся к родам *Porphyromonas*,

Tannerella, Prvotella и Treponema.

В биопленке при кандидо-ассоциированном пародонтите доминировали дрожжевые грибы *Candida*. При большом увеличении (12 000×) на фотографии, сделанной с помощью сканирующего электронного микроскопа, были видны фрагменты биопленки, заключенные в мантию. Клеточный состав представлял типичные бластоспоры гриба *Candida albicans*. При увеличении 2500× была видна типичная биопленка с мантией, покрывающая фрагменты псевдомицелия грибов *Candida albicans*. В пользу видовой принадлежности данного штамма говорило наличие единичных хламидоспор на концах нитей псевдомицелия. Полученные результаты полностью подтвердили и дополнили известные литературные данные о микроскопическом составе налета при кандидозном процессе у больных пародонтитом и трубчатых органов [64, 86, 87, 130].

Следовательно, хотя сравнительные различия в составе прижизненно изученных биопленок с помощью электронной сканирующей и трансмиссионной микроскопии были установлены нами впервые, но полученные данные частично согласовывались с исследованиями других авторов по отдельным видам нозологических форм.

В настоящее время факторы, ведущие к развитию заболевания пародонта, до конца не известны, однако у многих заболевших ХП выявляются фундаментальные сдвиги в составе биопленок, ассоциированные с появлением большого количества бактерий пародонтопатогенной группы, важнейшей из которых является *P. gingivalis*. Этот вид анаэробных бактерий может проявлять мощные деструктивные свойства и пролиферировать до достижения большого количества, способствующего повреждению тканей пародонта, что обусловлено присущими ему специализированными факторами вирулентности. Поэтому его относят к одному из главных этиологических агентов прогрессирования пародонтита [59, 60, 80, 81, 180].

Наличие в биопленках зубодесневой борозды и пародонтальных карманов бактерий пародонтопатогенной группы, включая *P. gingivalis*, было подтверждено нами с помощью набора реактивов «Мультидент-5», основанного

на молекулярно-биологических методах исследований.

Только у 4 (5,7%) из 70 человек с интактным пародонтом была выявлена ДНК *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia*, у 6 (8,6%) человек — *T. forsythia*, у 3 (4,3%) — *T. denticola*. *P. gingivalis* в норме не выявили. Частота же выявления этих видов бактерий у больных катаральным гингивитом была в 1,4–5,0 раз выше, чем у здоровых людей. Пародонтопатогены определяли в 5–30 раз чаще у больных хроническим пародонтитом, а при кандидо-ассоциированным пародонтите в 1,3–2,0 раза реже, чем у больных ХП, за исключением *A. actinomycetemcomitans*. Хотя бы один вид из трех представителей пародонтопатогенной группы 1 порядка определялся практически у всех больных ХП (90–100%, в зависимости от степени тяжести ХП).

Содержание пародонтопатогенов 2 порядка мы определяли с помощью системы Micro-IDent®plus (Hain Lifescience, Германия), использующей принцип обратной гибридизации. У представителей контрольной группы с интактным пародонтом ДНК *P. micra* выявили в 12 (17,1%) образцах, *C. rectus* — в 9 (12,8%), *E. nodatum* — 7 (10,0%), *E. corrodens* — 2 (2,8%), *Capnocytophaga* spp. — 21 (30,0%) и чаще всего *F. nucleatum* — в 23 (32,8%) образцах. При воспалительных заболеваниях пародонта от одного до нескольких видов из перечисленных представителей пародонтопатогенной группы 2 порядка определялся в 70–100%, также в зависимости от степени тяжести ХП.

В итоге у 76% индивидуумов контрольной группы с интактным пародонтом в области зубодесневой борозды не было выявлено ни одного из исследуемых нами видов пародонтопатогенов 1 порядка, у 20% — один вид, и у 4% человек было выявлено два вида пародонтопатогенов. У 50% больных гингивитом пародонтопатогены не были выявлены, у 40% пациентов был выявлен только один вид микробов, у 12% — два вида и у 8% больных — три вида пародонтопатогенов в ассоциациях. При ХП у 8% больных не было выявлено ни одного вида пародонтопатогенных микробов 1 группы. Один вид пародонтопатогенов был определен у 7% пациентов, два вида — у 15%, три вида — у 34%, четыре вида микробов — у 21% и пять видов — у 15% больных ХП.

Не имели пародонтопатогенов 13% больных КАП, один вид был выявлен у 25% пациентов, два вида — у 35%, по 18% людей имели 3–4 вида пародонтопатогенов в ассоциациях, пять видов не выявили ни у одного человека. Однако во всех случаях в составе биопленки при КАП выделяли грибы рода *Candida*.

Таким образом, все выявленные нами виды пародонтопатогенных бактерий чаще всего встречались в области зубодесневой борозды у больных ХП. Причем у 55% пациентов с катаральным гингивитом, 63% больных кандидассоциированным пародонтитом и 70% с хроническим пародонтитом были выявлены ассоциации 2–4 видов пародонтопатогенов 1 порядка.

Следует отметить, что мы изучали микрофлору десневой жидкости, получая исследуемый материал общепринятым способом, предварительно удалив наддесневые отложения (супрагингивальную бляшку) стерильными кюретками и осушив место отбора образца с помощью стерильного шарика ваты, исключая при этом содержимое естественной биопленки. Мы решили оценить состав пародонтопатогенной микрофлоры как в десневой жидкости, так и в частично разрушенной микробной биопленке, отбирая, по возможности, всё содержимое пародонтального кармана.

Было установлено, что в частично разрушенной биопленке частота определения большинства изучаемых нами пародонтопатогенных видов бактерий 1 и 2 порядков при ХП была выше, чем в десневой жидкости. В исследуемом материале из биопленки ДНК *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. micra*, *F. nucleatum*, *E. nodatum*, *E. corrodents* и *Capnocytophaga* spp. выявляли статистически достоверно чаще, чем в десневой жидкости на 11–23%. При этом частота выявления пародонтопатогенных видов бактерий 1 порядка увеличивалась в зависимости от степени тяжести пародонтита от 4 до 12 раз, а *P. gingivalis* — от 37 до 75 раз по сравнению со здоровыми людьми. Частота выявления пародонтопатогенных видов бактерий 2 порядка увеличивалась от 2 до 12 раз. Разница в частоте выявления *P. intermedia* и *C. rectus* была статистически недостоверной.

При кандидассоциированном пародонтите ДНК пародонтопатогенов

также выявляли чаще в биопленке по сравнению с десневой жидкостью, но разница была статистически недостоверной, за исключением частоты выявления *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* и *F. nucleatum*. ДНК пародонтопатогенов 1 порядка не была идентифицирована у 33% больных КАП в десневой жидкости и у 13% — в биопленке, но была выявлена ДНК *C. albicans*.

При КАП один вид пародонтопатогенов 1 порядка был определен у 43% человек в десневой жидкости и статистически достоверно реже — у 25% в биопленке; два вида — у 38% больных в десневой жидкости, у 35% пациентов — в биопленке. Три или четыре вида в ассоциации определили в биопленке, но не в десневой жидкости у 18% пациентов. Пять видов пародонтопатогенов в ассоциации у больных КАП не выявляли. Следовательно, у больных КАП ДНК пародонтопатогенов 1 и 2 порядков определяли реже как в десневой жидкости, так и содержимом биопленки, чем у больных ХП.

Недавно было установлено, что вирулентность *C. albicans* повышается в зрелых смешанных многовидовых биопленках, культивируемых на реконструированных эпителиальных клетках человека (RHOE) по сравнению с одновидовыми биопленками. При этом наблюдается повышение секреции IL-18, активности ЛДГ и инвазивности *C. albicans*. В ответ на инфицирование *C. albicans* эпителиальные клетки полости рта продуцируют большие количества IL-6, IL-8 и TNF- α , что указывает на то, что цитокины играют значительную роль в контроле инфекций полости рта [129, 350]. После контакта с *C. parapsilosis* гингивальные эпителиальные клетки человека экспрессируют высокие уровни mRNA TLR2, TLR4, но не TLR9. Повышенным уровнем цитокинов и АМП можно объяснить увеличение уровней цитокинов и АМП можно объяснить ингибирование роста *C. parapsilosis* на эпителиальных клетках десен [130, 163].

В настоящее время стало очевидным, что биопленки полости рта запускают хронические воспалительные реакции, которые обуславливают деструктивные процессы при пародонтите. Однако характерные особенности специфических клеток отвечать на биопленки плохо изучены. R. Peuyala с соавт.

(2012) [385] разработали модели биопленок со *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* на твердых газопроницаемых контактных линзах. Биопленки и планктонные культуры инкубировали при анаэробных условиях с линией OKF4 эпителиальных клеток в течение 24 часов. Биопленки *P. gingivalis* значительно ингибировали продукцию Gro-1 α , IL-1 α , IL-6, IL-8, TGF α , факталкина (CX3CL1), MIP-1 α и IP-10. В целом биопленки всех видов бактерий ингибировали продукцию Gro-1 α , TGF α и факталкина, тогда как биопленки *F. nucleatum* стимулировали значительное увеличение продукции IL-1 α , IL-6, IL-8 и IP-10. Биопленки *A. naeslundii* индуцировали повышенные уровни IL-6, IL-8 и IP-10. Планктонные стрептококки полости рта и в виде биопленки слабо стимулировали выделение любого из этих медиаторов эпителиальными клетками.

Результаты данных исследований показали, что биопленки и планктонные бактерии полости рта индуцировали различные ответы. Более того, некоторые виды бактерий в биопленках обладали высокой стимулирующей активностью и при взаимодействии с рецепторами клеток организма индуцировали ответ, отличный от отдельных бактерий.

Известно, что образование биопленок оказывает значительный вклад в формирование у бактерий **резистентности к антибиотикам и факторам врожденного иммунитета организма хозяина** [135, 254, 280, 305]. Даже несмотря на то, что в области изучения биопленок получены важные научные результаты, контроль биопленок остается всё еще не решенной проблемой и является центральным направлением современных исследований.

В настоящее время исследования направлены на открытие нетрадиционных источников противомикробных препаратов, секвенирование микробных генов фокусируется на определение экспрессии генов резистентности к антибиотикам, метагеномов и поиска новых мишеней патогенных бактерий. В этой связи выделяются естественные вещества, называемые антимикробными пептидами (AMP), так как они имеют более высокую скорость поражающего действия и

мощность защиты, чем комбинированные наборы традиционных противомикробных препаратов. Более того, природные вещества обычно более комплексны, чем синтетические, и являются рабочими платформами с жизнеспособными и биологически подтвержденными исходными точками для дизайна химических библиотек [286, 433].

Мы предложили собственные оригинальные модели для формирования биопленок пародонтопатогенных бактерий, в частности многослойную модель смешанной биопленки — *S. sanguinis*+*F. nucleatum*+*P.gingivalis*, основанную на сочетании ранних, промежуточных и поздних колонизаторов пародонта (Заявка на изобретение РФ «Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*» № 2015149913 / 20(076763)). В основу данной модели, в отличие от аналогов, положен главный принцип — формирование биопленки в условиях текучей среды и анаэробноза. Для оценки чувствительности к антибактериальным препаратам непосредственно при культивировании биопленки (для биопленкообразующих штаммов) нами предложена модифицированная биофильмограмма в триацетатных планшетах на двухфазной питательной среде, также с обеспечением движения жидкой фазы в условиях анаэробноза (Заявка на изобретение РФ «Способ определения чувствительности облигатно-анаэробных микроорганизмов в биопленке к антимикробным средствам» № 2016111845).

Мы установили, что наиболее часто применяемые (за последние 20-30 лет) в стоматологической практике препараты — метронидазол и линкомицин продемонстрировали самое высокое число устойчивых штаммов — 52,3 % и 22,7 % соответственно, причём чувствительных к метронидазолу штаммов было в 3,9 раза меньше, чем устойчивых, а для линкомицина это соотношение приближалось к 1:1.

Количество метициллин-резистентных штаммов составило 11,4 %, что коррелировало с выявлением генов резистентности **СТХ-М-2** у 16,7 % штаммов. При использовании β -лактамаза-защищённых препаратов (амоксиклав)

показатель резистентных штаммов снижался до 2,3 %, что коррелировало с выявление гена резистентности **Mec-1** у 5,5 % штаммов. Резистентность к карбапенемам (имепенем) выявлена только у 2,3 % штаммов, что коррелировало с выявлением гена **VIM** у 2,8 %.

Резистентность к макролидам (спирамицин) выявлена у 13,6 % штаммов, что коррелировало с наличием гена **Erm** выявлен у 11,1 % штаммов. Резистентность к тетрациклинам (доксциклин) выявлена только у 4,6 % штаммов, а ген **Tet** - у 11,1 % штаммов, корреляционная зависимость не выявлена.

Резистентность к гликопептидам (ванкомицин) выявлена у 13,6 % штаммов, а гены **VanA** и **VanB** выявлены у 3,3 % штаммов, корреляционная зависимость также не подтверждена.

Резистентность к фторхинолонам разных поколений – ципрофлоксацину и моксифлоксацину выявлена у 13,6 % и 4,6 % штаммов соответственно, а плазмиды **QnrB** – у 5,5 % штаммов, при этом установлена прямая высокая корреляционная зависимость для моксифлоксацина.

Таким образом, для большинства изученных антибактериальных препаратов (β -лактамы, карбапенемы, макролиды, фторхинолоны) установлена достоверная взаимосвязь между наличием генов, кодирующих резистентность, и результатами фенотипического метода определения чувствительности. Случаи её отсутствия (тетрациклины, гликопептиды) могут быть объяснены наличием дополнительных генетических маркеров резистентности, которые не учитывались в нашем исследовании, так как помимо генов **Tet**, **VanA** и **VanB** отвечающих за устойчивость к данным антибиотикам, возможно её кодирование другими хромосомными генами и плазмидами.

В связи с проблемой роста антибиотикорезистентности в последние годы в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта много внимания уделяется *применению эубиотических препаратов*, укрепляющих барьеры колонизационной резистентности организма человека за счет микробного антагонизма [14, 19, 26, 45, 75, 76, 78]. В отечественной и зарубежной литературе

описаны попытки применения лактококков и лактобактерий для лечения пародонтита и профилактики рецидивов [104, 441].

Вместе с тем к стабилизирующей микрофлоре полости рта относятся также вейлонеллы (*Veillonella parvula*) и слюнные стрептококки (*Streptococcus salivarius*). Последние, как известно, являются ведущим антагонистом кариесогенных стрептококков и основных пародонтопатогенных видов [70, 157, 281, 359, 410], однако их эффективность при воспалительных заболеваниях в пародонте не изучена, что и послужило основанием для проведения нами экспериментального исследования, которое показало эффективность колонизации биопленки пародонта у крыс кандидатными пробиотическими штаммами стабилизирующей микрофлоры полости рта *Veillonella parvula* и *Streptococcus salivarius* (V+S). Применение экспериментальной взвеси V+S для лечения животных с лигатурным пародонтитом продемонстрировало возможность колонизации слизистой оболочки полости рта, что констатировали более чем у половины животных, взятых в эксперимент, причем колонизирующая ассоциация стабильно сохранялась в течение недели после завершения приема пробиотической микробной взвеси животными.

Первые результаты исследований *Streptococcus salivarius* K12 в качестве кандидатного пробиотического штамма были выполнены на рубеже нового тысячелетия, когда было показано, что данный штамм продуцирует два активных бактерицидных фактора саливарицин А и саливарицин В, закодированные в мегаплазмиде [398, 460].

Далее было установлено, что бактериоцины *Streptococcus salivarius* K12 ингибируют рост других видов стрептококков: кариесогенных стрептококков (*S. mutans*, *S. sobrinus*), возбудителей ангины, заболеваний дыхательных путей и легких (возбудителей воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта, с которыми связывают развитие галитоза — неприятного запаха изо рта (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Micromonas micros*, *Eubacterium saburreum*) [156, 157]. Это позволило исследователям разработать пробиотический препарат для применения в виде геля в полости рта «Лородент»,

содержащий живые бактерии штамма *Streptococcus salivarius* K12. Препарат успешно применялся оториноларингологами, гастроэнтерологами, стоматологами в США, Великобритании, с 2000 г. — в Новой Зеландии, а теперь — и в России.

Учитывая приведенный спектр действия саливарицинов, который включает важнейшие пародонтопатогенные виды, очевидна целесообразность применения данного штамма в комплексном лечении пародонтита. По нашим данным, это более целесообразно, чем описанный в литературе ранее патент РФ на применение лактобацилл, для которых не доказано наличие антагонистического действия на пародонтопатогенные виды [68]. Недостатком перечисленных лекарственных форм является использование монокультур, которые не выдерживают конкуренции с биопленкой пародонтопатогенного типа. Поэтому в результате наших экспериментальных исследований на «крысиной модели» пародонтита было обосновано применение двух симбионтных штаммов — *Streptococcus salivarius* K12 и *Veillonella parvula* (Заявка на изобретение РФ «Пародонтальная повязка» № 2015140848 / 15(062920)). В проведенных нами экспериментах наблюдалась длительная персистенция данных видов в биопленке (28 суток), подтвержденная масс-спектрометрическим исследованием, что сопровождалось снижением количественной обсемененности стафило-энтерококковой ассоциации.

В плане изучения патогенеза воспалительных заболеваний пародонта и коррекции существующих направлений лечения крайне важную роль играет функциональное состояние иммунной системы и в частности такой малоизученный компонент, как **факторы врожденного иммунитета** [15, 16, 62, 63, 92, 211, 317, 389, 458].

Поэтому в нашем исследовании была проведена оценка взаимосвязей таких факторов, как лейкоциты, антимикробные пептиды — дефензины, цитокины и Toll-like-рецепторы иммунокомпетентных клеток. Новизна исследования определялась оценкой этих факторов в десневой жидкости, то есть в непосредственном контакте с биопленкой, формируемой в естественных

условиях полости рта.

Воспалительные заболевания тканей пародонта являются воспалительными процессами, развивающимися после выброса нейтрофилов в ответ на распространение поддесневой бактериальной биопленки [291]. Предполагается, что нейтрофилы оказывают протективное действие и предотвращают бактериальные инфекции, но они могут также оказывать повреждающее действие на ткани пародонта. У больных ХП наблюдается увеличенный выброс нейтрофилов в полость рта, с повышенной экспрессией генов семейства *Bcl-2* и сниженной проапоптозной активностью [306]. При выходе из кровотока в очаг воспаления у лейкоцитов меняется экспрессия генов и фенотипа [148].

Полиморфноядерные лейкоциты относятся к первой линии защиты против инфекций и главным источником триггерных рецепторов, экспрессированных на миелоидных клетках (*TREM-1*), способных усиливать продукцию провоспалительных цитокинов и регулировать апоптоз. Различная регуляция *TREM-1* гингипаинами *P. gingivalis* может являться новым механизмом, с помощью которого *P. gingivalis* манипулирует врожденным иммунитетом организма хозяина, помогая развитию хронического воспаления в тканях пародонта [148].

Пародонтит представляет важный пример повреждения тканей организма человека, опосредованного нейтрофилами. Нейтрофилы, премированные или стимулированные наличием или персистенцией инфекции, проявляют повышенный и экстенсивный ответ. Это, в свою очередь, ведет к деструкции тканей, связанной с активностью нейтрофилов [124, 291, 306, 385].

В нашем исследовании было показано, что среднее содержание лейкоцитов в периферической крови у пациентов с ХП разных степеней тяжести мало отличалось друг от друга, а также от значений у практически здоровых людей. Однако у больных ХГ оно было статистически достоверно значимо ниже, чем у здоровых людей, больных ХП легкой и средней степенями тяжести. Еще меньше было содержание лейкоцитов у больных КАП.

В смывах из полости рта у здоровых людей контрольной группы в нашем исследовании содержание нейтрофилов составило $1,01 \cdot 10^6$ — $2,33 \cdot 10^6$ клеток/мл, а у больных с воспалительными заболеваниями полости рта статистически достоверно выше: при ХГ от $3,3 \cdot 10^6$ до $5,9 \cdot 10^6$ клеток/мл, ХПЛ — $3,1 \cdot 10^6$ — $4,2 \cdot 10^6$ клеток/мл, ХПС — $5,0 \cdot 10^6$ — $6,3 \cdot 10^6$ клеток/мл, ХПТ $9,8 \cdot 10^6$ — $14,8 \cdot 10^6$ клеток/мл, у больных КАП — $12,2 \cdot 10^6$ — $17,5 \cdot 10^6$ клеток/мл. При этом разница в содержании Нф у больных с различной степенью тяжести пародонтита также была статистически достоверно значимой.

Как известно, вещества, выделяемые нейтрофилами, частично ответственны за деструкцию тканей при пародонтите. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований, показавших, что содержание нейтрофилов в смывах из полости рта отражает степень тяжести пародонтита и эффективность проводимых терапевтических мероприятий [141]. Lakschevitz F.S. с соавторами (2013) [306] показали, что у больных пародонтитом по сравнению со здоровыми людьми, нейтрофилы после миграции в полость рта приобретают измененный транскриптом с повышенной экспрессией генов семейства Bcl-2 и сниженной проапоптозной активностью, что характеризует фенотип более долго живущих нейтрофилов. Вероятно, это влияет на тяжесть и продолжительность воспалительных реакций при заболеваниях полости рта.

Учитывая то, что нейтрофилы осуществляют важные регуляторные механизмы, можно предположить, что повышенная чувствительность к пародонтиту у людей с врожденной дисфункцией нейтрофилов не может быть адекватно объяснена нарушениями иммунного контроля пародонтопатогенных бактерий, особенно когда эти состояния рефрактерны к стандартной терапии пародонтита и антибиотикам. Поэтому необходимы системные биологические подходы на уровне транскриптома, протеома и метаболома нейтрофилов, которые позволят дать бóльшие представления о нейтрофилах, кроме их способности фагоцитировать и убивать патогены, но и участие в регуляции ответа хозяина и резолюции воспаления [300, 361]. Тем не менее окислительный

и протеолитический арсенал нейтрофилов, очевидно, связан с повреждением тканей при пародонтите.

При оценке функциональной (фагоцитарной) активности оронеитрофилов у больных с воспалительными заболеваниями пародонта оказалось, что показатель активности был статистически достоверно выше, чем у нейтрофилов периферической крови. При этом наблюдалась тенденция к снижению фагоцитарной активности лейкоцитов, наибольшая у пациентов с ХПТ. По данным других исследователей, которые оценивали фагоцитарную активность со штаммом пародонтопатогена, установлено, что через 30 минут после взаимодействия *P. gingivalis* с ПМЯЛ больных хроническим ($62,16 \pm 19,39\%$) и агрессивным пародонтитом ($43,26 \pm 26,63\%$) наблюдался более активный фагоцитоз *P. gingivalis*, чем у людей со здоровым пародонтом ($24,43 \pm 19,87\%$) ($p < 0.05$). При этом лейкоциты секретировали значительно большее количество активных форм кислорода, чем при отсутствии любого стимула ($p < 0.05$). Также установлено увеличение выделения АФК при взаимодействии лейкоцитов с *A. Actinomycescomitans* [236].

Согласно патогистологическим исследованиям, Нф формируют «стенку» между соединительным эпителием и зубным налетом с патогенными микробами, которая играет роль антимикробной секреторной структуры и фагоцитарного аппарата [417]. Зазор между нейтрофилами и бактериальной биопленкой, образующийся при хроническом воспалении, позволяет предположить, что уклонение бактерий от нейтрофилов является основной характеристикой пародонтита.

Гиперактивация нейтрофилов также может приводить к повреждению тканей и усиливать распространенность и тяжесть воспалительных заболеваний пародонта [417]. Пониженный клиренс нейтрофилов в дальнейшем приводит к персистенции и активации нейтрофилов в пародонтальных тканях. Дефекты клиренса апоптозных нейтрофилов могут быть хотя бы частично ассоциированы с повышенной чувствительностью к пародонтиту пожилых людей [250].

Однако уклонение бактерий от бактерицидной системы нейтрофилов вместе с задержкой их апоптоза может трансформировать их из защитников в разрушителей. Поэтому израильские ученые G. Nussbaum и L. Shapira (2011) [361] считают, что на современном этапе попытки индуцировать реакции организма, супрессирующие или активирующие нейтрофилы, преждевременны.

Активация нейтрофилов при инфекционных и воспалительных процессах приводит к быстрому высвобождению дефензинов — антимикробных пептидов (АМП), которые затем обнаруживают во многих жидкостях организма [191, 392]. Дефензины обладают широким спектром активности, относительной селективностью по отношению к мишени (бактериальным мембранам), стремительностью развития механизмов активности АМП и низкой частотой появления резистентных штаммов [286].

В настоящее время ведутся исследования о возможности применения АМП для профилактики образования биопленок и разрушения уже существующих. Так как резистентность к антибиотикам в основном связана с низкой скоростью и низкой метаболической активностью бактерий в таких сообществах, использование АМП для ингибирования формирования биопленки может быть потенциально привлекательным терапевтическим подходом.

Действительно, в связи с главным механизмом действия АМП, основанным на их способности к пермеабиллизации и/или формированию пор в цитоплазматических мембранах, они обладают высоким потенциалом действия также на медленно растущие или даже не растущие бактерии [189, 190].

В нашем исследовании наблюдались значительные вариации содержания HNP 1–3 в десневой жидкости у разных людей даже из одной группы. При этом число людей с высоким содержанием α -дефензинов увеличивалось с ростом тяжести воспалительных процессов в области зубодесневой борозды, хотя содержание HNP 1–3 в десневой жидкости у представителей контрольной группы и пациентов с ХПЛ статистически достоверно не отличалось, но было в 5 раз меньше, чем у больных ХПС, в 6 раз меньше, чем у больных ХПТ, а также в 3,3 раза, чем у больных КАП. У больных ХГ уровень α -дефензинов был

статистически достоверно в 1,5 раза выше, чем у людей со здоровым пародонтом.

Следует отметить, что у 20% представителей контрольной группы с помощью ПЦР была выявлена ДНК одного и только у 4% — двух видов пародонтопатогенов. Именно у них в области исследуемых нами участков зубодесневой борозды были выявлены высокие уровни содержания α -дефензинов. У людей, не имеющих пародонтопатогенов в области зубодесневой борозды, среднее содержание HNP 1–3 в десневой жидкости варьировало в диапазоне 313–729 ng/ml, почти в 2 раза ниже, чем в целом по группе.

Такая же тенденция выявлена и у больных с воспалительными заболеваниями полости рта. При этом наблюдались умеренно статистически достоверные корреляции между содержанием HNP 1-3 в десневой жидкости и наличием в пародонтальных карманах *P. gingivalis* ($R = 0,596$), *T. denticola* ($R = 0,612$), *T. forsythia* ($R = 0,673$), количеством видов в ассоциациях ($R = 0,447$) и количеством инфицированных участков ($R = 0,396$). Кроме этого, отмечены умеренные корреляции с количеством кариозных поверхностей ($R = 0,506$), пародонтальным индексом PI ($R = 0,397$), API ($R = 0,269$), глубиной пародонтальных карманов ($R = 0,392$) и возрастом ($R = 0,412$). Выявленные корреляции соответствовали распределению пациентов по группам ($R = 0,447$) и наличием у пациентов сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний ($R = 0,394$). С содержанием α -дефензинов в десневой жидкости умеренно отрицательно коррелировали различия по полу ($R = -0,269$) и привычка курения ($R = -0,337$).

В исследованиях других авторов показано, что в нейтрофилах из участков повреждения тканей пародонта также наблюдались высокие уровни α -дефензинов. По-видимому, пародонтопатогены (например, *P. gingivalis*, *T. denticola*) более резистентны к фагоцитозу и антимикробным пептидам, чем непатогенные (*Actinomyces naeslundii* и *Streptococcus sanguinis*). Кателицидин может нейтрализовать антинейтрофильный лейкотоксин, продуцируемый *A. Actinomycetemcomitans* [244].

Уровни α -дефензинов в плазме периферической крови были в 4–5 раз

ниже, чем в десневой жидкости как у стоматологически здоровых людей, так и у больных с воспалительными заболеваниями тканей пародонта. Причем содержание HNP 1–3 в плазме периферической крови больных с различными формами воспалительных заболеваний полости рта было статистически достоверно выше в 2–7 раз, чем у практически здоровых людей с интактным пародонтом. У больных ХП уровни α -дефензинов коррелировали со степенью тяжести заболевания: ХПТ в 1,4 раза > ХПС в 2,5 раза > ХПЛ при $p < 0,05$.

Содержание HNP 1–3 в плазме периферической крови статистически достоверно умеренно коррелировало с тяжестью воспалительных реакций в полости рта ($R = 0,494$), возрастом ($R = 0,472$) и полом пациента ($R = -0,369$), а также со стоматологическими показателями — глубиной пародонтального кармана ($R = 0,456$), количеством кариозных поверхностей ($R = 0,449$); слабо коррелировало с индексом API ($R = 0,187$) и индексом КПУ ($R = -0,190$). Наличие в содержимом пародонтальных карманов пародонтопатогенных видов бактерий 1 порядка *P. gingivalis* ($R = 0,397$) и *T. forsythia* ($R = 0,388$) статистически достоверно умеренно коррелировало с содержанием HNP 1–3 в плазме периферической крови. Слабая корреляция отмечена для *T. denticola* ($R = 0,203$) и количества видов пародонтопатогенов в ассоциациях ($R = 0,236$) и заболеваниями ЖКТ ($R = 0,268$).

Следует отметить, что полученные нами данные об уровнях содержания HNP 1–3 у больных ХП частично соответствовали результатам, описанными ранее другими исследователями [52, 58].

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что содержание α -дефензинов HNP 1–3 в десневой жидкости и плазме периферической крови, может быть связано с возрастом и полом пациента, состоянием гигиены полости рта, наличием кариозных поверхностей и пародонтопатогенных видов бактерий *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, сопутствующих заболеваний и других признаков.

Распознавание микробов в значительной степени опосредуется Toll- like-рецепторами, которые представлены на лейкоцитах и взаимодействуют с

консервативными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами. Распознавая специфические лиганды, TLR-2 и TLR-4 взаимодействуют с большинством пародонтопатогенов [140, 143, 382, 442].

Мы оценили экспрессию TLR-2 и TLR-4 на клетках из содержимого зубодесневой борозды (смывов десневой жидкости раствором Хэнкса), окрашенных антителами к CD282 (TLR-2) или CD284 (TLR-4), меченных FITC. Препараты просматривали под микроскопом ECLIPSE 50i (Nicon, Япония) при увеличении $\times 1000$. Были отобраны по 20 человек из каждой группы.

Относительная частота выявления клеток, экспрессирующих CD282 (TLR-2), у пациентов контрольной группы составила $10,3 \pm 3,2\%$ и CD284 (TLR-4) — $13,6 \pm 3,4\%$, в группе пациентов с ХП в фазе обострения статистически достоверно в 3 раза ниже — $4,1 \pm 2,1\%$ и $5,7 \pm 2,3\%$ ($p < 0,05$), у больных ХГ — $15,1 \pm 1,9\%$ и $8,6 \pm 2,3\%$ и у пациентов с КАП $5,3 \pm 2,1\%$ и $4,6 \pm 1,9\%$.

Так как ранее нами было установлено, что клеточных элементов в десневой жидкости меньше, чем требуется для иммунофенотипирования в проточном цитометре [92], мы определили экспрессию TLR-2 и TLR-4 на лейкоцитах, выделенных из периферической крови обследованных пациентов согласно стандартным методикам. Причем экспрессия TLR-2 и TLR-4 на лейкоцитах периферической крови у разных людей, независимо от группы, к которой они принадлежали, значительно варьировала от полного отсутствия до 100%-ной экспрессии на моноцитах у отдельных индивидов [52, 92].

Проведенное нами двойное окрашивание CD14/CD282 и CD3/CD284 лейкомазсы из периферической крови и клеток цельной крови позволило показать, что экспрессия TLR-2 на моноцитах и TLR-4 на лимфоцитах была очень низкой и не превышала 1%. Самый высокий уровень экспрессии маркеров CD282 (TLR-2) был на лимфоцитах людей со здоровым пародонтом $1,06 \pm 0,45\%$ (0,51–1,51 %), в абсолютных значениях $24,38 \pm 10,35$ (14,03–34,73) млн. кл./литр.

С помощью моноклональных антител к CD282 и CD284 на поверхности основных популяций лейкоцитов периферической крови (нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов) выявлена экспрессия TLR-2 и TLR-4: самая высокая

— TLR-2 у людей со здоровым пародонтом на лимфоцитах, в меньшей степени на моноцитах и самая низкая — на нейтрофилах периферической крови. В то же время у здоровых людей больше всего было выявлено TLR-4⁺-нейтрофилов, в меньшем количестве — лимфоцитов и еще меньше — моноцитов.

При ХП экспрессия TLR-2 была выше на моноцитах, но ниже на нейтрофилах и лимфоцитах по сравнению с контролем; экспрессия TLR-4 выше на моноцитах и лимфоцитах, но ниже на нейтрофилах.

У больных ХГ TLR-2 больше всего экспрессировали лимфоциты, в меньшей степени — моноциты и еще меньше — нейтрофилы. TLR-4 было больше на моноцитах, меньше — на лимфоцитах и нейтрофилах. У пациентов с КАП преобладали CD282⁺-моноциты, в меньшей степени выявляли CD282⁺-лимфоциты и CD282⁺-нейтрофилы. Уменьшение экспрессии TLR-4 наблюдали в ряду: моноциты, нейтрофилы, лимфоциты.

Экспрессия CD284 (TLR-4) на лейкоцитах периферической крови у обследованных нами пациентов имела такой же характер, а выявленные тенденции были статистически достоверны ($p < 0,05$).

Итак, экспрессия рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-4 на лейкоцитах десневой жидкости и периферической крови (нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах) у людей со здоровым пародонтом имела одинаковый характер, но варьировала при различных формах воспалительных заболеваний тканей пародонта.

Пониженная экспрессия TLR и нарушение сигнальных путей могут уменьшать факторы защиты, относящиеся к врожденному иммунитету, приводить к персистенции бактерий и усиливать воспаление. М. Benakanakere с соавт. (2015) [140] считают, что *P. gingivalis* может индуцировать ДНК-метилирование TLR2 и таким образом модулировать врожденные защитные механизмы, что может способствовать повышению чувствительности к пародонтиту. По данным S. M. Sarah и др. (2006) [406], экспрессия TLR-2 значительно увеличена при гингивите по сравнению с экспрессией TLR-4, но

снижена при хроническом пародонтите. Хотя F. S. Lakschevitz и др. (2013) [306] считают, что у пациентов с ХП увеличена экспрессия TLR.

В настоящее время еще недостаточно данных о способности многовидовых биопленок полости рта специфически стимулировать ответные реакции, а также их сравнительных оценок с отдельными бактериями в пределах микробных сообществ [139, 238]. Заболевания пародонта включают комплексную сеть взаимодействий между планктонными микробами или биопленками и клетками организма. С помощью модельных систем, основанных на совместном культивировании этих клеток и бактериальных биопленок, были получены четкие различия между планктонными бактериями и биопленками, патогенами и комменсалами, влиянием на клеточный ответ живых и мертвых бактерий [345].

В то же время известно, что многовидовые биопленки обладают уникальными признаками, а в зависимости от их видового состава они могут быть ассоциированы со здоровым пародонтом, гингивитом или пародонтитом, что было подтверждено нами при использовании сканирующей электронной микроскопии в сочетании с ПЦР-диагностикой.

Более того, R. Peuyala и соавт. (2013) [384] выявили специфические медиаторы, уровень которых был значительно выше при стимуляции многовидовыми биопленками по сравнению с тем, который можно было бы ожидать при простом аддитивном эффекте монобиопленок. Наконец, многие биопленки проявляют ингибирующее действие либо не изменяют нормальные фоновые уровни медиаторов, трансляции и секреции и/или разрушают различные медиаторы в модельных системах биопленок. Это часто контрастирует с уровнями медиаторов, ожидаемых при стимуляции монобиопленками или при заражении планктонными бактериями [385].

R. A. McLaughlin и A. J. Hoogewerf (2006) [340] представили доказательства того, что биопленки и планктонные бактерии по-разному реагируют на цитокины. Так, биопленки *S. aureus* ATCC, обработанные 2 ng/mL IL-1 β в течение 6 часов, содержали в 2,5 раза больше клеток, чем

необработанные. В планктонных культурах увеличения роста бактерий не наблюдалось. С помощью проточной цитометрии было показано, что IL-1 β связывался с 63% клеток биопленки, но только с 11% планктонных клеток. Авторы считают, что бактерии в биопленке ускользают от защитных реакций организма человека, размножаясь более быстро при выделении медиаторов воспаления активированными протективными клетками.

Поэтому мы провели анализ содержания в бесклеточном супернатанте над- и поддесневой биопленки и десневой жидкости IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-17A и INF- γ . Выбор спектра цитокинов для наших исследований был обусловлен их известными свойствами.

Было установлено, что концентрация интерлейкинов у всех обследованных пациентов значительно варьировала. Так, содержание ключевого медиатора воспалительных процессов IL-1 β в материале из биопленок у больных ХП статистически достоверно увеличивалось от 5 до 13 раз в зависимости от степени тяжести пародонтита по сравнению со здоровыми людьми; у больных КАП — в 6,4 раза, а у больных ХГ было статистически недостоверно ниже в 1,5 раза. В десневой жидкости, отобранной у этих же пациентов после удаления над- и поддесневого налета, наблюдалась такая же тенденция, однако разница в зависимости от степени тяжести пародонтита была меньше, но в 3–6 раз выше, чем у людей со здоровым пародонтом. У больных КАП содержание IL-1 β в десневой жидкости было в 4,3 раза выше, чем у людей со здоровым пародонтом, а при ХГ — в 1,7 раз меньше ($p < 0,05$). При этом содержание данного цитокина в десневой жидкости было в 7 раз выше, чем в биопленке у людей со здоровым пародонтом, у больных ХГ — в 3,5 раза, у больных ХП — от 3,7 до 9 раз.

Некоторые авторы в системе мультивидовых биопленок на гидроксиапатитных дисках, культивируемых с эпителиальными клетками, клетками периодонтальных связок или пульпы зубов, наблюдали значительное увеличение апоптоза и деградации IL-1 β , IL-6 и IL-8. Биопленки, представленные некоторыми видами, значительно увеличивали содержание ряда медиаторов, тогда как биопленки *P. gingivalis* оказывали противоположное

действие даже на базальную продукцию цитокинов/хемокинов [238]. Кроме того, были выявлены гингипаины *P. gingivalis* инактивирующие TNF- α [343, 458]

Биопленки *A. actinomycetemcomitans* связывают IL-1 β . При снижении жизнеспособности биопленок блокируется их способность связывать IL-1 β , что приводит к утечке IL-1 β в культуральную среду. В некоторых клетках *A. actinomycetemcomitans* IL-1 β локализуется во внешней кромке нуклеоида. Близкий контакт с живыми биопленками *A. actinomycetemcomitans* уменьшал пролиферацию и апоптоз десневых кератиноцитов человека. Авторы предполагают, что биопленки *A. actinomycetemcomitans* могут нарушать решающий первый этап локального воспаления при пародонтите, связывая и интернализируя IL-1 β [371].

Еще более выраженной в наших исследованиях была разница в содержании в составе биопленки IL-6 в зависимости от степени тяжести пародонтита от 6,5 раз до 16,5 раз, в 9 раз у больных КАП и 5,7 раза — у больных ХГ по сравнению со здоровыми людьми ($p < 0,05$). В десневой жидкости она также была выше в 6,5–10,3 раза у пациентов с ХП, в 6,8 раза — у больных КАП и только в 3,5 раза — у больных ХГ. Количество TNF- α увеличивалось при различных стадиях ХП от 2,8 до 7,1 раза в составе биопленки и от 2,2 до 4,5 раз в десневой жидкости, по сравнению с контролем, при этом их уровни были приблизительно одинаковы у больных ХПЛ и ХПС. У больных КАП разница была в 3,6 и 2,9 раза, а у больных ХГ — в 6,5 и 4,3 раза соответственно.

Таким образом, у здоровых людей соотношение содержания TNF- α в десневой жидкости и биопленке было равно 7,1 и 4,6–5,6 при других формах заболеваний пародонта.

Содержание IL-17A в биопленке у больных ХП было в 2,3–4,0 раза выше, чем у здоровых людей, у больных КАП — в 3,6 раза, у пациентов с ХГ — в 3,3 раза. У больных ХПЛ и ХПС разница была незначительной. В десневой жидкости при всех формах заболеваний содержание IL-17A было в 1,8–2,0 раза выше, чем у здоровых людей, но в 10–16 раз выше, чем в биопленке.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, установивших, что у людей с ХП увеличена экспрессия mRNA IL-17A в десневой жидкости и тканях, по сравнению со здоровыми людьми [137, 463, 445]. У пациентов с агрессивным пародонтитом отмечают систематически повышенные уровни IL-17A в сыворотке крови [413]. Эффективная терапия пародонтита приводит к снижению экспрессии IL-17 [179]. Однако в других работах показано, что пародонтит может быть связан со снижением концентрации IL-17A в слюне [481] и в десневой жидкости у пациентов с генерализованным агрессивным пародонтитом [199].

Поэтому можно предположить, что у некоторых пациентов на определенных стадиях IL-17 может играть конфликтную роль, как усиливая рекрутирование протективных нейтрофилов, так и поддерживая деструктивное воспаление. Вместе с тем бесспорным можно считать факт, что экспрессия IL-17A значительно увеличивается в хронически воспаленных тканях пародонта, по сравнению со здоровыми тканями [80], причем на экспрессию IL-17 оказывают локальное и системное влияние лечебные пародонтологические мероприятия [179, 379].

IL-17 оказывает ряд эффектов на эпителиальные клетки полости рта, в том числе усиливает TLR-опосредованное выделение IL1 β и TNF α эпителиальными клетками десен [137]. В какой-то степени удивляет недостаточная секреция эпителиальными клетками IL1 α и TNF α по сравнению с соответствующей регуляцией генов, однако это может отражать необходимость процессинга перед секрецией [379].

C. R. Cardoso с соавт. (2009) продемонстрировали наличие Th17-лимфоцитов в участках повреждения пародонтита [161], по другим данным эти лимфоциты и тучные клетки являются источниками IL-17 в этих тканях [345]. Поэтому можно предположить, что повышенная экспрессия IL-17 связана либо с прямым влиянием патогенной биопленки, либо вторично с медиаторами, индуцируемыми биопленкой [244].

Установлено, что биопленки, состоящие из *Streptococcus gordonii*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis*, индуцируют более высокие уровни IL-1 α и проявляют синергичную стимулирующую активность по сравнению с аддитивным ответом 3 индивидуальных видов бактерий. Только биопленки *S. gordonii* / *A. naeslundii* и *A. naeslundii* / *F. nucleatum* мультибиопленки индуцировали более высокие уровни секреции IL-6 по сравнению с контролем. При культивировании с *S. gordonii* / *A. naeslundii* / *F. nucleatum* первым секретировался IL-8, хотя его уровень не был выше предполагаемого композиционного, индуцируемого монобиопленками [354].

В наших исследованиях концентрация IL-8 в биопленке увеличивалась от 3 до 5,6 раза у больных ХП в зависимости от степени тяжести пародонтита, у больных КАП она была выше в 4,3 раза, а у больных ХГ — в 5,3 раза по сравнению со здоровыми людьми. В десневой жидкости она была выше только в 1,3–1,6 раза, но относительно содержания в биопленке она была выше в 5,1 раза у лиц со здоровым пародонтом и в 3,0–4,8 раза — у больных с хроническими воспалительными заболеваниями тканей пародонта.

Увеличение количества медиаторов острого воспаления (например, IL-8) будет усиливать рекрутирование нейтрофилов и потенцировать удаление любых внедрившихся микробов. Поэтому важно оценить вклад этих цитокинов до применения системных терапевтических агентов, подавляющих их действие. Более того, биопленки *P. gingivalis* индуцируют экспрессию генов IL-8, тогда как секреция IL-8 не коррелировала с экспрессией генов. Это можно объяснить тем, что бактерии выделяют гингипаины, ключевые иммуномодулирующие компоненты *P. gingivalis* [344]. Поэтому авторы считают, что данная модель позволяет отличать патогены и комменсалы, биопленки от планктонных бактерий.

Другие исследователи также выявили различный ответ эпителиальных клеток (секрецию цитокинов и хемокинов) на биопленки патогенов и резидентов [385]. Они также определили меньший уровень продукции IL-8 и IL1 α на *P. gingivalis* и *Streptococcus spp.* Таким образом, все эти исследования показали, что

эпителиальные клетки по-разному реагируют на патогены и комменсалы. Точный механизм этих процессов не полностью понятен. *S. mitis* могут модулировать экспрессию провоспалительного хемокина IL-8 [200]. Исходя из этого можно считать, что *S. mitis* в качестве полезного комменсала может дополнять иммунитет хозяина, поддерживая тканевой гомеостаз.

С другой стороны, биопленки смешанных патогенов и биопленки *P. gingivalis* обладают огромным числом факторов вирулентности, которые могут индуцировать врожденный иммунный ответ. *P. gingivalis* контактируют с эпителиальными клетками с помощью фимбрий и гингипаинов и проникают в клетки [239, 467]. ЛПС и его компонент липид А *P. gingivalis* индуцируют сильный ответ иммунной системы человека, поскольку связываются с комплексом TLR, способствуя секреции провоспалительных цитокинов эпителиальными клетками и клетками других типов [326]. Гингипаины *P. gingivalis* разрушают цитокины и сеть цитокиновых рецепторов хозяина, включая IL-1 β [420], INF- γ [478] и TNF- α [159].

Этим можно объяснить то, почему секреция данных цитокинов и хемокинов не коррелирует с экспрессией генов. Все эти факторы обуславливают патогенный потенциал *P. gingivalis*. Эпителиальные клетки не полностью защищают организм хозяина против действия биопленки, содержащей пародонтопатогенные виды бактерий.

Porphyromonas gingivalis, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* — пародонтопатогены, так называемого «красного комплекса», ассоциированы с поддесневой биопленкой в участках повреждения при пародонтите. G. N. Belibasakis с соавт. (2013) [138] показали, что при культивировании многослойной органотипической культуры эпителиальных клеток человека с 10-видовой (*Campylobacter rectus* (OMZ 697), *Fusobacterium nucleatum* (OMZ 596), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T (OMZ 925), *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T (OMZ 278), *Tannerella forsythia* OMZ1047, *Treponema denticola* ATCC 35405^T (OMZ 661), *Veillonella dispar* ATCC 17748^T (OMZ 493), *Actinomyces oris* (OMZ 745), *Streptococcus anginosus* (OMZ 871) и *Streptococcus oralis* SK 248

(OMZ 607)) или 7-видовой биопленкой, в которой отсутствовали пародонтопатогены «красного комплекса», через 3 часа повышалась экспрессия генов IL-8 одинаково, независимо от видового состава биопленки. При добавлении пародонтопатогенов «красного комплекса» экспрессия генов IL-8 увеличивалась в 3 раза. Через 24 часа секреция IL-8 снижалась до 50%-ного уровня в контрольных клетках, культивируемых на гидроксиапатите, обработанном слюной. Но это не происходило при отсутствии пародонтопатогенов «красного комплекса». Авторы пришли к выводу, что пародонтопатогены «красного комплекса» в составе биопленки по-разному регулируют хемотаксический ответ. Экспрессия IL-8 индуцируется *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, а также их ассоциациями [147].

Этим результатам соответствуют данные о том, что биопленки одного вида *F. nucleatum*, *Actinomyces naeslundii*, *S. gordonii* и *S. oralis* также повышали экспрессию генов IL-8 в эпителиальных клетках полости рта через 6 часов культивирования *in vitro*, тогда как *S. sanguinis* не влияли, а *P. gingivalis* даже понижали их экспрессию [381].

Одновидовые биопленки более эффективно индуцируют секрецию IL-8 эпителиальными клетками полости рта, чем планктонные бактерии, за исключением *P. gingivalis* [383, 385], особенно если они находятся в составе 3-видовой биопленки.

Кинетика секреции IL-8 в экспериментальных системах значительно отличалась от экспрессии генов IL-8 независимо от присутствия бактерий «красного комплекса» уже через 3 часа после внесения мультивидовой биопленки в культуру десневых эпителиальных клеток. Через 24 часа — пик секреции IL-8, причем в 7-видовой культуре он не изменялся. В 10-видовой биопленке он составил 50% от контроля. В 9-видовой системе без *T. denticola* [238] наблюдалось повышение секреции IL-1, IL-6 и IL-8 через 4 часа и снижение — через 24 часа. Биопленка, состоящая из *S. gordonii*, *A. naeslundii* и *F. Nucleatum*, индуцировала увеличение, а включающая *S. gordonii*, *F. nucleatum* и *P. gingivalis*

— уменьшала секрецию IL-8 [384]. Это может указывать на то, что *P. gingivalis* могут снижать хемоаттрактантный ответ эпителиальных клеток [138].

Таким образом, поддесневые биопленки могут индуцировать увеличение секреции IL-8, а в присутствии пародонтопатогенов «красного комплекса» — позднее снижать его экспрессию. Снижение экспрессии может быть связано либо с активным уменьшением воспалительных процессов, либо с деградацией цитокинов протеазами этих пародонтопатогенов. Способность *P. gingivalis* в планктонной форме ингибировать экспрессию генов IL-8 эпителиальными клетками десен называли «хемокиновым параличом» [149, 248, 423]. Можно предположить, что как полимикробные ассоциации, *P. gingivalis*, *T. denticola* и *T. forsythia* могут регулировать хемоаттрактантный ответ IL-8 эпителиальных клеток, обладая потенциалом разрушения гомеостаз организма хозяина с микробом, возможно, в качестве стратегии манипулирования локальным ответом врожденной иммунной системы и повышения их шанса выживания в поддесневой нише.

Уровни IL-4 в содержимом биопленки в нашем исследовании были приблизительно равны содержанию IL-8; а в десневой жидкости у больных ХП были статистически достоверно выше, чем у людей со здоровым пародонтом только в 1,2–1,3 раза, а у больных ХГ — в 2 раза меньше. При этом у здоровых людей в десневой жидкости содержание IL-4 было в 17 раз выше, чем в биопленке, у пациентов с ХПЛ — в 6,7 раз, ХПС — в 5,9 раз, ХПТ, КАП и ХГ — в 4,2 раза.

INF- γ определяли в биопленке у людей с воспалительными заболеваниями пародонта в 3–7 раз больших количествах, чем у здоровых людей, а в десневой жидкости — от 2,5 до 3,5 раз. Только при ХГ его содержание было в 1,2 меньше, чем у здоровых людей ($p > 0,05$). Тем не менее в десневой жидкости у здоровых людей и больных ХПЛ содержание INF- γ было выше более 7 раз, чем в содержимом биопленки, при ХПС — в 5,5 раз, ХПТ — в 4,7 раза, КАП — в 3,6 раза и ХГ — в 4,6 раза.

По данным литературы, содержание IL-4 и INF- γ в десневой жидкости у больных пародонтитом значительно варьирует. INF- γ можно определить приблизительно в 50–70% образцов больных пародонтитом и в более высоких концентрациях, чем в здоровых участках. В здоровых участках больных ХП также отмечены более низкие уровни INF- γ , по сравнению с индуцированным налетом гингивитом [373]. Авторы считают, что уровни INF- γ в десневой жидкости зависят от клинического состояния локального участка, но не от стадии заболевания.

Суммарное количество оцененных нами цитокинов у пациентов с заболеваниями пародонта было также статистически достоверно выше, чем у здоровых людей как в биопленке от 3,1 до 6,2 раза, так и в десневой жидкости — в 1,7–2,2 раза. В десневой жидкости у здоровых людей оно было в 14 раз выше, чем в биопленке, у больных ХП — в 7,9–5,1 раз в зависимости от повышения степени тяжести воспалительных процессов в пародонте.

Таким образом, у обследованных нами пациентов наблюдалось статистически достоверное увеличение содержания провоспалительных (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-17A) и противовоспалительных (IL-4, INF- γ) цитокинов, как в десневой жидкости, так и в содержимом биопленки, по сравнению со здоровыми людьми. Однако у больных ХГ содержание IL-1 β и IL-4 было ниже, чем у людей со здоровым пародонтом. При этом их содержание в десневой жидкости было выше, чем в биопленке.

Высокие уровни IL-4 и IL-6 индуцируют активацию гуморального иммунитета, ограничивая значимость клеточно-обусловленных иммунных реакций. Th17 — клетки, участвующие в рекрутировании нейтрофилов и макрофагов, — участвуют в усилении воспалительных реакций [432]. Выявлена сильная корреляция между IL-17/IL-4 и IL-17/IL-10 у больных ХП [168].

Токсическое действие провоспалительных цитокинов на ткани пародонта связано с их неблагоприятным воздействием на тканевую репарацию, особенно с подавлением нормального процесса ресинтеза соединительной ткани фибробластами, угнетением остеосинтеза, подавлением остеобластулирующего

потенциала. Повышенное содержание провоспалительных медиаторов IL-1 β , IL-6 и TNF- α в ротовой жидкости у людей с гингивитом и хроническим пародонтитом активирует разрушающие пародонт воспалительно-деструктивные процессы [71].

Оценка уровней цитокинов и дефензинов при разных нозологических формах воспалительных заболеваний пародонта, а также патогенетических критериев трактовки результатов их уровней позволила нам внедрить в практику стоматологии способ иммуномодулирующей терапии воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, основанный на применении цитокинотерапии (Патент № 2469736 Российская Федерация, МПК⁸ А 61 К 38/19, А 61 Р 37/02. Способ лечения инфекционно-воспалительных осложнений хирургических операций в полости рта с использованием цитокинотерапии / Г.Д. Ахмедов, Т.В. Царёва, Е.В. Ипполитов. — № 2011149115/15; заяв. 02.12.11 ; опубл. 20.12.12, Бюл. № 35. — 11 с. : ил.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило разработать современные подходы к изучению микробных биопленок полости рта в норме и при различных формах патологии пародонта и слизистой оболочки полости рта. Установлены дифференциально-диагностические критерии состава биопленок при хроническом гингивите, хроническом пародонтите, кандида-ассоциированном пародонтите с использованием сканирующей электронной микроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии и молекулярных методов исследования. Изучено генетическое кодирование факторов резистентности к основным группам антибактериальных препаратов, используемых для лечения стоматологической патологии. Впервые получены данные о резистентных штаммах пародонтопатогенных и условно-патогенных бактерий полости рта, выделяемых при заболеваниях пародонта.

Продемонстрирована возможность исследования процессов взаимодействия микроорганизмов с искусственными материалами медицинского назначения с формированием микробных биопленок в экспериментальных условиях с помощью СЭМ. Разработанная экспериментальная модель образования биопленок на абиотических поверхностях *in vitro* может служить основой для проведения исследований, направленных на борьбу с биопленками. Целесообразность использования микроскопических методов исследования основана на том, что только визуальный контроль способен дать оценку морфофункционального состояния как самих бактерий, так и экзополиматрикса биопленок при использовании тех или иных антибактериальных средств. Сочетание микроскопических методов с традиционными бактериологическими методами исследования, посредством которых можно оценить наличие жизнеспособных бактерий, объективизирует оценку эффективности

средств борьбы с биопленками.

Полученные нами данные могут иметь принципиальное значение при установке лечебных аппаратов и изготовлении шинирующих конструкций из различных вариантов полиакрилатов и полиуретана, так как более низкая колонизация вирулентными видами может рассматриваться как надежное средство профилактики обострений хронического генерализованного пародонтита, развития протезных стоматитов или других гнойно-воспалительных процессов анаэробной или грибковой природы.

Как известно, основной целью терапии заболеваний пародонта является уничтожение его возбудителей антибиотиками и устранение отрицательных последствий воздействия токсинов и ферментов возбудителей на окружающие ткани [81, 89, 93, 265, 348]. Однако в последнее время стоматологи всё чаще сталкиваются с определенными проблемами при лечении данного заболевания. Трудности лечения воспалительных процессов в тканях пародонта связаны с наличием так называемых торпидных или устойчивых к терапии форм пародонтита, которые в определенной степени связаны с длительной персистенцией пародонтопатогенных видов микробов, имеющих механизмы резистентности.

Последнее определяется существенными сдвигами в составе микробиоценоза полости рта, развитием диспропорции стабилизирующих и агрессивных микробных видов, как вследствие прогрессирования самой патологии, так и в результате интенсивного антибактериального лечения по показаниям, приводящего к дисбиозу. Поэтому методы диагностики и лечения данного заболевания, безусловно, требуют дальнейшей разработки.

В связи с этим в последние годы в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта много внимания уделяется применению эубиотических препаратов, укрепляющих барьеры колонизационной резистентности организма человека за счет микробного антагонизма [19, 75, 78]. В отечественной и зарубежной литературе описаны попытки применения лактококков и

лактобактерий для лечения пародонтита и профилактики рецидивов.

К стабилизирующей микрофлоре полости рта относятся также вейлонеллы (*Veillonella parvula*) и слюнные стрептококки (*Streptococcus salivarius*), однако их эффективность при воспалительных заболеваниях пародонта не изучена, что и послужило основанием для проведения нами экспериментального исследования, которое показало эффективность колонизации биопленки пародонта у крыс кандидатными пробиотическими штаммами стабилизирующей микрофлоры полости рта (*Veillonella parvula*, *Streptococcus salivarius*). В эксперименте наблюдалась длительная персистенция данных видов в биопленке, подтвержденная масс-спектрометрическим исследованием, что сопровождалось снижением количественной обсемененности стафило-энтерококковой ассоциации.

Антагонистические свойства живых микробов, входящих в состав препаратов-эубиотиков, играют важную роль в обеспечении защиты макроорганизма от инфекции, с одной стороны, и в регулировании состава микрофлоры в желудочно-кишечном тракте — с другой. Применение экспериментальной взвеси *Veillonella parvula* + *Streptococcus salivarius* для лечения животных с лигатурным пародонтитом продемонстрировало возможность колонизации слизистой оболочки полости рта, что констатировали более чем у половины животных, взятых в эксперимент, причем колонизирующая ассоциация стабильно сохранялась в течение недели после завершения приема взвеси животным.

Учитывая, что в развитии патологии пародонта особую роль играют патогены, способные к колонизации тканей десны и внутриклеточному паразитированию в них, особенно при наличии генетической предрасположенности по ряду аллелей DR и DQ HLA генов человека [62, 446], мы провели изучение факторов врожденного иммунитета, через которые, возможно, реализуются варианты генетической предрасположенности к микробной колонизации пародонтопатогенными видами.

Среди факторов врожденного иммунитета в последние годы всё большее

внимание уделяется значению интерлейкинов, дефензинов и toll-подобных рецепторов. В настоящее время установлены различные нарушения в системе механизмов врожденного иммунитета, ассоциированных с этими факторами, в частности нарушения экспрессии TLR и распознавания лигандов, трансдукции сигналов, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR. Показано участие этих нарушений в развитии атеросклероза, инфекционных, аутоиммунных, аллергических и некоторых других заболеваний.

Универсальность механизмов, обусловленная как широким представительством данных маркеров на разнообразных клетках организма, так и широким спектром лигандов для них, определяет включение молекулярных факторов врожденного иммунитета в патогенетические звенья развития многих заболеваний. В частности, показано, что дефекты молекул, участвующих в трансдукции сигнала от TLR, лежат в основе повышенной восприимчивости к инфекциям.

В нашем исследовании показано, что воспалительные заболевания пародонта ассоциированы с определенными нарушениями в составе молекулярных факторов врожденного иммунитета. Значимость этих механизмов для широкой клинической практики определяет необходимость внедрения адекватных и надежных методов оценки компонентов систем интерлейкинов, дефензинов и Toll-подобных рецепторов, которые представлены в нашем исследовании и могут быть воспроизведены в условиях клинической лаборатории лечебно-профилактических учреждений.

Выводы

1. Установлена возможность моделирования смешанных микробных биопленок с участием пародонтопатогенных видов (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*) in vitro и разработана модель формирования смешанной биопленки на полимерной подложке из полиметилметакрилата в условиях движения жидкой фазы и анаэробии.

2. Выявлены существенные морфологические различия процесса формирования микробной биопленки у грамположительных и грамотрицательных бактерий при общности основных этапов — адгезии, размножения, формирования микроколоний и безмикробного матрикса в эксперименте in vitro на различных объектах по данным сканирующей электронной микроскопии и оценки адгезии in vitro.

3. Определены значимые факторы формирования биопленки на поверхности изготовленных образцов (шероховатость и рельеф поверхности полимерных стоматологических материалов, наличие конгломератов и зазубрин, а также степень их сцепления с материалом), в которых принимают участие представители резидентных (группы *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *S. salivarius*) и пародонтопатогенных видов бактерий (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*), а также дрожжевых грибов (*Candida albicans*), что позволяет обосновать выбор соответствующих материалов и способов обработки образцов для изготовления шинирующих конструкций зубного ряда и зубных протезов.

4. По данным атомно-силовой зондовой микроскопии и оценки адгезии тест-штаммов in vitro установлена взаимосвязь между шероховатостью поверхности материала для изготовления шинирующих конструкций и индексом адгезии микроорганизмов на образцах, полученных при обработке в условиях зуботехнической лаборатории, обеспечивающей минимальную степень шероховатости по сравнению с другими способами обработки (в условиях стоматологического кабинета или непосредственно после фрезеровки образцов).

5. Смешанная микробная биопленка пародонта в норме и при различных воспалительных процессах тканей пародонта (хронический гингивит, хронический пародонтит, кандида-ассоциированный пародонтит) имеет ряд особенностей по видовому составу микробиоты и характеру формируемых ассоциаций микроорганизмов. Сравнительный анализ морфологии смешанной микробной биопленки при выделении чистых культур в анаэробных условиях и одновременной детекции генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий и дрожжевых грибов рода *Candida* подтверждает высокую частоту выделения пародонтопатогенных видов 1 порядка при хроническом пародонтите (до 100%) по сравнению с катаральным гингивитом (не более 20%) и здоровыми лицами (не более 12%), а также грибов рода *Candida* при кандида-ассоциированном пародонтите в количестве 10^3 КОЕ/мл и выше (при частоте выявления дрожжевых грибов до 100%).

6. Анализ частоты ассоциаций различных возбудителей в смешанной биопленке, формирующейся при различных нозологических формах воспалительных заболеваний пародонта, свидетельствует о доминировании ассоциаций приоритетных патогенов *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* с другими пародонтопатогенными видами 1 и 2 порядка у больных хроническим пародонтитом.

7. С помощью экспериментальной модели пародонтита на крысах показана возможность колонизации биоплёнки пародонта кандидатными пробиотическими штаммами *Streptococcus salivarius* K12 и *Veillonella parvula* ATCCTM 10790, сохраняющимися в течение 28 суток исследования.

8. Сравнительный анализ частоты выявления резистентности к антибиотикам, формирующейся в условиях смешанных биопленок в клинических условиях, позволил выявить наличие генов резистентности к бета-лактамам — CTX-M-2, Мес-1, VIM, макролидам и тетрациклинам — Erm и Tet, а также в единичных случаях — генов резистентности к карбапенемам, гликопептидам и плазмиды, кодирующие резистентность к фторхинолонам — QnrB. Наличие генов, кодирующих

резистентность к антибактериальным препаратам, используемым в практической стоматологии, установлено у 13,3% резидентных и 5,5% пародонтопатогенных бактерий, выделенных у пациентов из пародонтальных карманов.

9. Определены группы антибактериальных препаратов для применения при воспалительных заболеваниях пародонта, направленные на эрадикацию возбудителей внутриклеточной локализации и в составе десневой биопленки (макролиды, тетрациклины, фторхинолоны 3–4 поколения).

10. Оценка роли молекулярных факторов врожденного иммунитета — цитокинов и α -дефензинов, как маркеров диагностики воспалительных заболеваний пародонта, позволила выявить резкое увеличение уровня провоспалительных цитокинов— $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL } 1\beta$, $\text{IL } 4$, $\text{IL } 6$, $\text{IL } 17$ в десневой жидкости, а также проследить динамику α -дефензинов и особенности экспрессии рецепторов TLR-2 и TLR-4 на лимфоцитах у больных хроническим пародонтитом.

Установлена умеренно выраженная корреляционная зависимость между содержанием α -дефензинов в десневой жидкости и наличием *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* ($R = 0,612–0,673$), с количеством видов приоритетных патогенов в ассоциациях ($R = 0,447$), менее выраженная – с некоторыми клиническими параметрами заболевания пародонта (количеством инфицированных участков, частотой выявления кариозных поверхностей, индексами PI, API, глубиной пародонтальных карманов) и возрастом ($R = 0,412$) и слабая обратная корреляция содержания α -дефензинов в десневой жидкости с полом и привычкой курения ($R = -0,269–0,337$). Также установлена обратная корреляционная зависимость между содержанием $\text{IL-1}\beta$ в десневой жидкости и наличием *P. gingivalis* ($R = -0,606$), количеством видов приоритетных патогенов в ассоциациях ($R = -0,577$), и прямая — с количеством инфицированных участков ($R = 0,408$) и экспрессией Toll-like рецепторов на нейтрофилах десневой жидкости. Для всех исследованных интерлейкинов установлена связь с клиническими параметрами воспаления тканей пародонта,

что может использоваться при диагностике степени тяжести хронического пародонтита.

11. Оценка роли клеточных факторов врожденного иммунитета показала, что функциональная активность (фагоцитарная) нейтрофилов полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта достоверно выше, чем нейтрофилов периферической крови, а экспрессия рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-4 на лейкоцитах (нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах) имеет дифференциально-диагностическое значение, так как варьирует в зависимости от формы и степени тяжести воспалительных заболеваний тканей пародонта.

12. Полученные результаты микробиологического и иммунологического исследования позволяют оптимизировать ряд консервативных мероприятий при комплексном лечении заболеваний пародонта: обосновать выбор шинирующих конструкций из полимерных материалов и оксида циркония, рекомендовать ряд антибактериальных препаратов и модуляторов иммунитета. При выборе тактики терапии рекомендуется дифференцированный подход, основанный на оценке состояния смешанной биопленки пародонта, выявления внутриклеточных пародонтопатогенных видов и состояния факторов врожденного иммунитета.

Практические рекомендации и перспективы дальнейших разработок

1. Внедрение метода сканирующей электронной микроскопии при моделировании сэндвич-биопленок в условиях текучих сред, а также в клинической практике при необходимости дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний пародонта в сложных клинических случаях, в частности хронического гингивита и хронического пародонтита легкой степени.

2. Применение методов оценки первичной микробной адгезии и разработанных моделей формирования микробной биопленки на образцах полимерных материалов (**Заявка на изобретение РФ** «Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред in vitro» № 2015149913/20(076763)) для выбора стоматологических материалов при изготовлении шинирующих конструкций и зубных протезов с учетом характера инфекционной патологии пародонта и слизистой оболочки полости рта (**Пат. 2554206 Российская Федерация**, МПК⁸ А 61 С 8/02. Способ шинирования зубов / С.Д. Арутюнов, А.Г. Степанов, **Е.В. Ипполитов**, С.В. Журальский, С.Т. Сохов, З.Р. Орджоникидзе, Т.В. Царева, М.С. Деев. — № 2014112271/14; заяв. 01.04.14; опубл. 27.06.15, Бюл. № 16. — 7 с.: ил.; **Пат. 2558974 Российская Федерация**, МПК⁸ А 61 С 8/02. Фрезерованная зубная шина / С. Д. Арутюнов, Р.Д. Отырба, **Е.В. Ипполитов**, С.В. Журальский, О.О. Янушевич. — № 2014112272/14; заяв. 01.04.14; опубл. 10.08.15, Бюл. № 22. — 7 с.: ил.; **Пат. 2567787 Российская Федерация**, МПК⁸ А 61 С 8/02. Фрезерованная зубная шина / С.Д. Арутюнов, О.О. Янушевич, С.В. Журальский, В.Н. Царёв, **Е.В. Ипполитов**, В.И. Хван, Р.Д. Отырба, О.В. Градов. — № 2014122751/14; заяв. 04.06.14; опубл. 10.11.15, Бюл. № 31. — 5 с. : ил.).

3. Дальнейшая разработка пародонтальной повязки с пробиотиками для местного применения при комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта с учетом оценки антогонистической активности и геномных характеристик кандидатных штаммов *Veillonella parvula* и *Streptococcus salivarius* (**Заявка на изобретение РФ** «Пародонтальная повязка» № 2015140848/ 15(062920)).

4. Использование полученной базы данных о генетическом кодировании резистентности к антибиотикам для выбора антибактериальных препаратов для комплексного лечения хронического пародонтита (макролиды, фторхинолоны 3–4 поколения). Проведение молекулярно-биологических исследований для накопления информации и расширения базы данных, в том числе, с учетом данных о резистентности пародонтопатогенной флоры к антибактериальным препаратам в биопленках (**Заявка на изобретение РФ** «Способ определения чувствительности облигатно-анаэробных микроорганизмов в биопленке к антимикробным средствам» № 2016111845).

5. Сочетанное применение при комплексном лечении больных хроническим пародонтитом β -лактамаза-защищенных антибиотиков в острой фазе и антибиотиков внутриклеточного действия в период перехода к фазе ремиссии.

6. Расширение сферы применения способа иммуномодулирующей терапии воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области с учетом персонафицированных данных пациента о состоянии факторов врожденного иммунитета (**Пат. 2469736 Российская Федерация**, МПК⁸ А 61 К 38/19, А 61 Р 37/02. Способ лечения инфекционно-воспалительных осложнений хирургических операций в полости рта с использованием цитокинотерапии / Г.Д. Ахмедов, Т.В. Царёва, **Е.В. Ипполитов**. — № 2011149115/15; заяв. 02.12.11; опубл. 20.12.12, Бюл. № 35. — 11 с. : ил.).

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2469736

**СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННО-
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ХИРУРГИЧЕСКИХ
ОПЕРАЦИЙ В ПОЛОСТИ РТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЦИТОКИНОТЕРАПИИ**

Патентообладатель(ли): *Ахмедов Гаджи Джалалутдинович (RU),
Царева Татьяна Викторовна (RU), Ипполитов Евгений
Валерьевич (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2011149115

Приоритет изобретения **02 декабря 2011 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации **20 декабря 2012 г.**

Срок действия патента истекает **02 декабря 2031 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2554206

СПОСОБ ШИНИРОВАНИЯ ЗУБОВПатентообладатель(ли): *Арутюнов Сергей Дарчоевич (RU)*Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014112271

Приоритет изобретения 01 апреля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 мая 2015 г.

Срок действия патента истекает 01 апреля 2034 г.

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*Л.Л. Кирий*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2558974

ФРЕЗЕРОВАННАЯ ЗУБНАЯ ШИНА

Патентообладатель(ли): *Арутюнов Сергей Дарчоевич (RU)*

Автор(ы): *Арутюнов Сергей Дарчоевич (RU), Отырба Рита
Дуговна (RU), Ипполитов Евгений Валерьевич (RU),
Журальский Сергей Владимирович (RU), Янушевич Олег
Олегович (RU)*

Заявка № 2014112272

Приоритет изобретения 01 апреля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 09 июля 2015 г.

Срок действия патента истекает 01 апреля 2034 г.

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий





СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян, А. А. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных [Текст] / А. А. Авакян, Л. Н. Кац, И. Б. Павлова. — М.: Медицина, 1972. — 183 с.
2. Автандилов, Г. А. Биодеструкция зубных протезов из полимерных материалов (экспериментальное исследование) [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.14 / Автандилов Георгий Александрович. — М., 2013. — 26 с.
3. Автандилов, Г. А. Стафилококки в ротовой полости и их роль в биодеструкции съемных неметаллических протезов [Текст] / Г. А. Автандилов, И. А. Воронов, И. Ю. Лебеденко [и др.] // Российский стоматологический журнал. — 2015. — № 1. — С. 14–20.
4. Агеевец, В. А. Первое обнаружение металло-бета-лактамазы NDM-типа в многопрофильном стационаре в России [Текст] / В. А. Агеевец, И. В. Партина, Е. С. Лисицына [и др.] // Медицинский академический журнал. — 2012. — Т. 12, № 4. — С. 43–45.
5. Азизова, С. А. Тактика лечения пародонтита с учетом особенностей микроэкологии полости рта у коренного населения Республики Дагестан [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.14 / Азизова Салихат Абдулазизовна. — М., 2013. — 24 с.
6. Арутюнов, А. С. Сравнительный анализ адгезии микробной флоры рта к базисным материалам зубных протезов на основе полиуретана и акриловых пластмасс [Текст] / А. С. Арутюнов, В. Н. Царёв, А. Н. Седракян [и др.] // Пародонтология. — 2008. — Т. 49, № 4. — С. 3–8.
7. Арутюнов, С. Д. Микробиологическое обоснование выбора базисной пластмассы съемных зубных протезов [Текст] / С. Д. Арутюнов, Т. И. Ибрагимов, В. Н. Царёв [и др.] // Стоматология. — 2000. — № 3. — С. 4–8.
8. Арутюнов, С. Д. Формирование биопленки на временных зубных протезах: соотношение процессов первичной микробной адгезии, коагрегации и колонизации [Текст] / С. Д. Арутюнов, В. Н. Царёв, Е. В. Ипполитов [и др.] // Стоматология. — 2012. — Т. 91, № 5. — С. 5–10.

9. Афанасьев, С. С. Влияние препаратов цитокинов на устойчивость бактерий к антибиотикам *in vitro* [Текст] / С. С. Афанасьев, А. А. Алёшкин, А. А. Воробьёв [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2005. — № 3. — С. 95–97.
10. Афанасьев, С. С. Интерфероновый статус, препараты интерферона в лечении и профилактике инфекционных заболеваний и реабилитации больных [Текст] / С. С. Афанасьев, Г. Г. Онищенко, В. А. Алёшкин [и др.]. — М.: Триада-Х, 2005. — 767 с.
11. Ахмедов, Г. Д. Иммунный статус при амбулаторных хирургических вмешательствах: монография [Текст] / Г. Д. Ахмедов, В. Н. Царёв, А. М. Панин. — М.: МГМСУ, 2010. — 136 с.
12. Барер, Г. М. Особенности микробной колонизации десны при сочетанной патологии пародонта и сахарного диабета 1 типа [Текст] / Г. М. Барер, В. Н. Царёв, Е. Н. Николаева [и др.] // «Cathedra» — стоматологическое образование. — 2004. — Т. 4, № 11 — С. 26–29.
13. Безрукова, И. В. Агрессивные формы пародонтита: руководство для врачей [Текст] / И. В. Безрукова, А. И. Грудянов. — М.: МИА, 2002. — 126 с.
14. Беляева, Е. А. Микробиота кишечника коренного жителя центрального федерального округа Российской Федерации как основа создания региональных пробиотических препаратов [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Беляева Екатерина Андреевна. — М., 2014. — 25 с.
15. Бутюгин, И. А. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом / И. А. Бутюгин, И. И. Долгушин, Г. И. Ронь // Уральский медицинский журнал. — 2014. — № 5 (119). — С. 34–38.
16. Бутюгин, И. А. Оценка эффективности применения иммуномодулирующих препаратов в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита [Текст] / И. А. Бутюгин, И. И. Долгушин // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. — 2015. — № 12. — С. 133–139.

17. Вагнер, В. Д. Методические рекомендации: Заполнение медицинской карты стоматологического больного при лечении пациентов с болезнями пародонта [Текст] / В. Д. Вагнер, О. О. Янушевич, З. Э. Ревазова [и др.]. — М.: ЦНИИС-МГМСУ, 2015. — 30 с.
18. Воложин, А. И. Патогенез экспериментального пародонтита у кроликов [Текст] / А. И. Воложин, С. И. Виноградова // Стоматология. — 1991. — № 4. — С. 10–12.
19. Воложин, А. И. Разработка и применение пародонтальной повязки из коллагена и суспензии клеток *Lactobacillus casei* 37 в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта [Текст] / А. И. Воложин, В. К. Ильин, Ю. М. Максимовский [и др.] // Стоматология. — 2004. — Т. 83, № 6. — С. 6–11.
20. Высоцкий, С. А. Атомно-силовая микроскопия слюд [Текст] / С. А. Высоцкий // Молодой ученый. — 2012. — № 8. — С. 14–17.
21. Ганковская, О. А. Молекулярно-генетические механизмы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек при патологии инфекционного генеза [Текст]: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.03.09 / Ганковская Оксана Анатольевна. — М., 2010. — 49 с.
22. Голуб, А. В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии [Текст] / А. В. Голуб // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 23–29.
23. Давыдова, М. М. Методы микробиологического исследования применяемые в стоматологии [Текст] / М. М. Давыдова, Л. Я. Плахтий, В. Н. Царёв // Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: учебник / под ред. проф. В. Н. Царёва. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2013. С. 223–268.
24. Детушева, Е. В. Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина [Текст] / Е. В. Детушева, В. Б. Родин, П. В. Слукин [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2015. — Т. 17, № 1. — С. 57–66.

25. Диденко, Л. В. Исследование процессов колонизации и персистенции микроорганизмов на искусственных материалах медицинского назначения [Текст] / Л. В. Диденко, Г. А. Автандилов, Т. А. Смирнова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2015. — № 5. — С. 64–69.
26. Добренев, Д. С. Характеристика биоценологических отношений бактериальных сообществ полости рта и микрoэкологическое обоснование принципов биокоррекции [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Добренев Дмитрий Сергеевич. — Волгоград, 2015. — 23 с.
27. Долгушин, И. И. Внутри- и внеклеточная бактерицидность фагоцитирующих клеток [Текст] / И. И. Долгушин, А. Ю. Савочкина, В. Ф. Долгушина [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. — 2013. — № 1 (43). — С. 85–87.
28. Долгушин, И. И. Кислородзависимый метаболизм интактных и активированных нейтрофильных гранулоцитов слюны [Текст] / И. И. Долгушин, В. А. Маркова, А. Ю. Савочкина, И. В. Пегушина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — Т. 156, № 8. — С. 206–208.
29. Долгушин, И. И. Роль ультраструктур нейтрофильных гранулоцитов в формировании внеклеточных ловушек [Текст] / И. И. Долгушин, А. Ю. Савочкина, Т. Г. Смирнова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2015. — Т. 159, № 4. — С. 464–466.
30. Долгушин, И. И. Секреторные функции нейтрофилов [Текст] / И. И. Долгушин, А. Ю. Савочкина // Аллергология и иммунология. — 2015. — Т. 16, № 2. — С. 209–212.
31. Дятлов, И. А. Актуальные проблемы медицинской микробиологии [Текст] / И. А. Дятлов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2013. — № 1. — С. 88–93.
32. Дятлов, И. А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. [Текст]

/ И. А. Дятлов, А. Ю. Миронов, А. П. Шепелин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2015. — Т. 60, № 8. — С. 61–65.

33. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) [Электронный ресурс]: утв. Решением Комиссии таможенного союза 28.05.2010 № 299 (с изменениями на 15.01.2013): Гл. 2, разд. 18, С. 1142–1215. — Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/902249109>

34. Жолудев, С. Е. Особенности протезирования полными съемными протезами и адаптации к ним у лиц пожилого и старческого возраста [Текст] / С. Е. Жолудев // Уральский медицинский журнал. — 2012. — Т. 100, № 8. — С. 31–35.

35. Зайченко, О. Ю. Испытание акриловых пластмасс на стойкость к искусственной биодеструкции в имитационной модели с применением микробной ассоциации [Текст] / О. Ю. Зайченко, В. К. Ильин, А. И. Воложин [и др.] // Российский стоматологический журнал. — 2002. — № 3. — С. 19–24.

36. Зорина, О. А. Цитокины и их роль в развитии агрессивного пародонтита [Текст] / О. А. Зорина, О. А. Борискина, Н. К. Аймадинова [и др.] // Фарматека. — 2013. — № s3-13. — С. 39–43. — СПЕЦВЫПУСК: Стоматология.

37. Иванов, В. С. Заболевания пародонта [Текст] / В. С. Иванов. — М.: Медицинское информационное агентство, 2001. — 300 с.

38. Ильин, В. К. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания [Текст] / В. К. Ильин, А. И. Воложин, Г. В. Виха. — М.: Наука, 2005. — 280 с.

39. Кафарская, Л. И. Особенности формирования микрофлоры у детей раннего возраста и пути ее коррекции с помощью пробиотиков [Текст] / Л. И. Кафарская, М. Л. Шуникова, Б. А. Ефимов [и др.] // Педиатрическая фармакология. — 2011. — № 8 (2). — С. 94–98.

40. Кетлинский, С. А. Цитокины [Текст] / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.

41. Ковальчук, Л. В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии: учебник [Текст] / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Р. Я. Мешкова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 640 с.
42. Кузьмина, И. Н. Алгоритм проведения программ профилактики на основе персонализированного подхода [Текст] / И. Н. Кузьмина // Стоматология для всех. — 2013. — № 2. — С. 24–28.
43. Кулаков, А. А. Роль защитных факторов организма в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта [Текст] / А. А. Кулаков, О. А. Зорина, О. А. Борискина // Стоматология. — 2010. — № 6. — С. 72–77.
44. Кучерова, М. А. Индекс адгезии микроорганизмов к полимерным базисным материалам как индикатор оценки антимикробных средств [Текст] / М. А. Кучерова, А. Г. Трефилов // Стоматолог. — М., 2008. — № 5. — С. 38–44.
45. Куяров, А. А. Роль нормальной микрофлоры и лизоцима в выборе пробиотических штаммов для профилактики аллергических заболеваний у студенческой молодежи Севера [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Куяров Артём Александрович. — Сургут, 2015. — 22 с.
46. Лагутин, М. Б. Наглядная математическая статистика: учеб. пособие / М.Б. Лагутин. — 3-е изд., испр. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 472 с.
47. Лебеденко, И. Ю. Адгезия микрофлоры полости рта к стоматологическим полимерам холодного отверждения [Текст] / И. Ю. Лебеденко, Д. В. Серебров, А. П. Воронов [и др.] // Российский стоматологический журнал. — 2003. — № 5. — С. 4–6.
48. Лёвкин, А. В. Оценка активности развития кариесогенной микрофлоры на поверхности пломб из современных композитных пломбировочных материалов в условиях клиники и эксперимента [Текст] / А. В. Лёвкин, В. Н. Царёв, В. М. Гринин // Стоматология для всех. — 2013. — № 3 (64). — С. 68–72.
49. Малышева Л. Ю. Оценка клинических, иммунологических и микробиологических показателей у пациентов с хроническим одонтогенным верхнечелюстным синуситом с различной продолжительностью заболевания

- [Текст] / Л. Ю. Малышева, Л. С. Латышина, И. И. Долгушин // Актуальные вопросы хирургии: сб. научно-практ. работ. — Челябинск, 2014. — С. 184–186.
50. Малышева, Л. Ю. Особенности цитокинового профиля пациентов с хроническим одонтогенным верхнечелюстным синуситом в процессе комплексного лечения [Текст] / Л. Ю. Малышева, И. И. Долгушин, Л. С. Латышина // Стоматология: шаг в будущее. Сб. мат-лов междунар. научного е-симпозиума. — Киров: МЦНИП, 2013. — С. 72–78.
51. Мальков, О. В. Измерение параметров шероховатости поверхности детали [Электронный ресурс] / О. В. Мальков, А. В. Литвиненко. — М.: МГТУ им. Баумана. — 2012. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
52. Мартиросян, В. Г. Клинико-микробиологические особенности диагностики хронического генерализованного пародонтита [Текст] / В. Г. Мартиросян, Н. В. Плескановская, Е. Н. Николаева [и др.] // Российский стоматологический журнал. — 2012. — № 4. — С. 29–34.
53. Маянский, А. Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение [Текст] / А. Н. Маянский, И. В. Чеботарь // Журнал микробиологии. — 2011. — № 1. — С. 101–108.
54. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта [Текст] / [В. Н. Царёв и др.]; под ред. В. Н. Царёва. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 576 с.
55. Миронов, А. Ю. Молекулярные маркеры патогенов: монография [Текст] / А. Ю. Миронов, Н. В. Зур. — М.: Тираж, 2013. — 184 с.
56. Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учеб. пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений [Текст] / В. Л. Миронов. — Нижний Новгород: Б.и., 2004. — 110 с.
57. Мюллер, Х. П. Пародонтология: пер. с нем. [Текст] / Х. П. Мюллер. — Львов: ГалДент. — 2004. — 256 с.
58. Николаева, Е. Н. Изучение экспрессии эндогенных антимикробных пептидов у больных хроническим пародонтитом [Текст] / Е. Н. Николаева, В. Г. Мартиросян, В. Н. Царёв [и др.] // Dental Forum. — 2011. — № 4. — С. 17–21.

59. Николаева, Е. Н. Маркеры риска генерализованного пародонтита. Молекулярно-генетические аспекты [Текст] / Е. Н. Николаева. — Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2011. — 384 с.
60. Николаева, Е. Н. Пародонтопатогенные бактерии — индикаторы риска возникновения и развития пародонтита [Текст] / Е. Н. Николаева, В. Н. Царёв, Е. В. Ипполитов // Стоматология для всех. — 2011. — № 3 (I ч.). — С. 4–9.
61. Николаева, Е. Н. Пародонтопатогенные бактерии — индикаторы риска возникновения и развития пародонтита [Текст] / Е. Н. Николаева, В. Н. Царёв, Е. В. Ипполитов // Стоматология для всех. — 2011. — № 4 (II ч.). — С. 4–7.
62. Николаева, Е. Н. Полиморфизм генов HLA II класса в норме и у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта [Текст] / Е. Н. Николаева, В. Н. Царёв, Е. В. Ипполитов [и др.] // Институт стоматологии. — 2006. — № 6 (I ч.) — С. 61–62.
63. Николаева, Е. Н. Разработка алгоритма диагностики хронического генерализованного пародонтита на основе микробиологических и иммуногенетических показателей [Текст] / Е. Н. Николаева, В. Н. Царёв, М. Б. Лагутин // Cathedra — Кафедра Стоматологическое образование. — 2007. — Т. 6 — № 3. — С. 34–40.
64. Носик, А. С. Разработка методов лабораторной диагностики и лечения кандид-ассоциированного пародонтита [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Носик Андрей Сергеевич. — М., 2004. — 23 с.
65. Олейник, И. И. Микробиология и иммунология полости рта [Текст] / И. И. Олейник // Биология полости рта / под ред. Е. В. Боровского, В. К. Леонтьева. — М.: Медицинская книга; Н. Новгород: НГМА, 2001. — С. 237–290.
66. Ордовский-Танаевский, В. В. Микробиологическая оценка поверхности пломб, выполненных материалом «Продиджи» при реставрации зубов [Текст] / В. В. Ордовский-Танаевский, О. О. Янушевич, В. Н. Царёв [и др.] // Стоматология для всех. — 2005. — № 4. — С. 20–21.

67. Парунова, С. Н. Влияние микрофлоры полости рта на регенерацию тканей пародонта у больных сахарным диабетом [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Парунова Светлана Николаевна. — М., 2004. — 27 с.
68. Пат. 2240771 Российская Федерация, МПК⁷ А 61 К 6/00, А 61 К 35/74, А 61 К 38/39. Пародонтальная повязка / Воложин А. И., Ильин В. К., Максимовский Ю. М. [и др.] — № 2003131635/15; заяв. 29.10.2003; опубл. 27.11.2004.
69. Плахтий, Л. Я. Тактика антибактериальной терапии пародонтита, основанная на результатах микробиологического и молекулярно-генетического исследования [Текст]: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.21 / Плахтий Людмила Яковлевна. — М., 2002. — 33 с.
70. Покровский, В. Н. Микрофлора и иммунные процессы при кариесе зубов / В. Н. Покровский, М. М. Давыдова, И. В. Спиранде, В. Н. Царёв // Микробиология, вирусология и иммунология полости рта / под ред. В. Н. Царёва. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013, — С. 343–380.
71. Проходная, В. А. Цитокиновый профиль ротовой жидкости у беременных женщин с воспалительными заболеваниями пародонта [Текст] / В. А. Проходная, Т.В. Гайворонская // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2015. — № 3. — С. 655–660.
72. Пхакадзе, Г. А. Морфологические и биохимические аспекты биодеструкции полимеров [Текст] / Г. А. Пхакадзе. — Киев: Наукова Думка, 1986. — 152 с.
73. Рубцова, М. Ю. Мультипараметрическое определение генов и точечных мутаций в них для идентификации бета-лактамаз [Текст] / М. Ю. Рубцова, М. М. Уляшова, Т. Т. Бахман [и др.] // Успехи биологической химии. — 2010. — Т. 50. — С. 303–348.
74. Савкина, Н. И. Клинико-микробиологическое обоснование выбора материала зубочелюстного протеза [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21 / Савкина Наталия Ивановна. — М., 2004. — 24 с.

75. Самоукина, А. М. Перспективные штаммы энтерококков и лактококков для создания новых пробиотических препаратов [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Самоукина Анна Михайловна. — М., 2006. — 22 с.
76. Сидоренко, С. В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам [Текст] / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. — 2004. — Т. 44. — С. 263–306.
77. Симбарская, М. Л. Особенности местного иммунитета слизистой оболочки влагалища при хроническом рецидивирующем кандидозе гениталий и бактериальном вагинозе у женщин репродуктивного возраста [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.12 / Симбарская Милена Леонидовна. — СПб., 2015. — 25 с.
78. Соколова, С. И. Применение лактобактерина, иммобилизованного на коллагене, в комплексном лечении хронического катарального гингивита у детей с первичным гуморальным иммунодефицитным состоянием [Текст] / С. И. Соколова, В. М. Елизарова, О. С. Ковылина [и др.] // Российский стоматологический журнал. — М., 2007. — № 6. — С. 37–38.
79. Струкова, Л. А. Выявление устойчивости микроорганизмов к антибиотикам методом ПЦР [Текст] / Л. А. Струкова, И. А. Парфёнов // Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины: Материалы XVIII Всероссийской научно-практической конференции. — М.: КРОКУС-Экспо, 2013. — 26–28 марта.
80. Теблосева, Л. М. Современные иммунологические аспекты в патогенезе заболеваний пародонта [Текст]: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.01.14 / Теблосева Лаура Михайловна. — М., 2015. — 39 с.
81. Терапевтическая стоматология [Текст] / под ред. Г. М. Барера. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 2 ч. Болезни пародонта. — 224 с.
82. Ушаков, Р. В. Местное антимикробное лечение в стоматологии / Р. В. Ушаков, В. Н. Царёв. — М.: МИА, 2004. — 136 с.
83. Фурсова, Н. К. Лекарственная устойчивость микроорганизмов [Текст] / Н. К. Фурсова. — М.: Онто-Принт, 2012. — 248 с.

84. Хаитов, Р. М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы [Текст] / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, А. А. Ярилин. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 345 с.
85. Хван, В. И. Лабораторно-экспериментальное обоснование ортопедического лечения зубными протезами с опорой на стекловолоконные и диоксидциркониевые супраструктуры [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.14 / Хван Вячеслав Игоревич. — М., 2010. — 22 с.
86. Хмельницкий, О. К. О кандидозе слизистых оболочек [Текст] / О.К. Хмельницкий // Архив патологии. 2000. — Т. 62, № 6. — С. 3–10.
87. Хмельницкий, О. К. Патоморфология микозов человека [Текст] / О. К. Хмельницкий, Н. М. Хмельницкая. — СПб.: МАПО, 2005. — 432 с.
88. Холлендер, М. Непараметрические методы статистики [Текст] / М. Холлендер, Д. Вулф; пер. с англ. Д. С. Шмерлинга, научн. ред. Ю. П. Адлера, Ю. Н. Тюрина. — М.: Финансы и статистика, 1983. — 516 с.
89. Царёв, В. Н. Антибактериальная терапия в стоматологии [Текст] / В. Н. Царёв, Р. В. Ушаков. — М.: МИА, 2004. — 143 с.
90. Царёв, В. Н. Воспалительные заболевания пародонта [Текст] / В. Н. Царёв, Е. В. Ипполитов // Руководство по медицинской микробиологии / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной, Е. П. Ковалёвой. — М.: БИНOM, 2014. — 3 кн. — Т. 2. — С. 224–230.
91. Царёв, В. Н. Динамика колонизации микробной флоры полости рта различных материалов, используемых для зубного протезирования [Текст] / В. Н. Царёв, С. И. Абакаров, С. Э. Умарова // Стоматология. — 2000. — № 1. — С. 55–57.
92. Царёв, В. Н. Исследование экспрессии рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-4 у больных хроническим пародонтитом с системной потерей минеральной плотности костной ткани [Текст] / В. Н. Царёв, Е. Н. Николаева, Е. В. Ипполитов [и др.] // Мат-лы трудов Всеросс. научно-практ. конф. по трансляционной медицине «Микробиология — практическому

- здоровоохранению», посвященной 70-летию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А. И. Евдокимова. — 2013. — С. 60–64.
93. Царёв, В. Н. Клиническая микробиология [Текст] / В. Н. Царёв, Р. В. Ушаков // Одонтогенные воспалительные заболевания / под ред. Т. Г. Робустовой. — М.: Медицина, 2006. — С. 112–138.
94. Царёв, В. Н. Лабораторная диагностика анаэробной (неклостридиальной) инфекции [Текст] / В. Н. Царёв // Руководство по медицинской микробиологии / под ред. А. С. Лабинской, Н. Н. Костюковой. — М.: Бином. — 2013. — 3 кн. — Т. 1. — С. 439–454.
95. Царёв, В. Н. Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии [Текст] / В. Н. Царёв, М. М. Давыдова // Микробиология, вирусология и иммунология / под. ред. В. Н. Царёва. — М.: Практическая медицина; ГЭОТАР-Медиа, 2009. — С. 474–483.
96. Царёв, В. Н. Микрофлора и иммунные процессы при заболеваниях пародонта [Текст] / В. Н. Царёв, Е. Н. Николаева, Е. В. Ипполитов // Микробиология, вирусология и иммунология полости рта / под ред. В. Н. Царёва. — М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2013. — С. 381–450.
97. Царёв, В. Н. Определение изменения видового состава вирулентной микрофлоры при язвенном пульпите на этапах эндодонтического лечения [Текст] / В. Н. Царёв, А. В. Митронин, Д. А. Черджиева // Эндодонтия Today. — 2011. — № 3. — С. 5–10.
98. Царёв, В. Н. Особенности адгезии анаэробных пародонтопатогенных бактерий и грибов *Candida albicans* к экспериментальным образцам базисной стоматологической пластмассы в зависимости от шероховатости поверхности и способа полировки [Текст] / В. Н. Царёв, Е. В. Ипполитов, А. Г. Трефилов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2014. — № 6. — С. 21–27.
99. Царёв, В. Н. Применение методов микробиологического мониторинга в процессе ортопедического лечения пациентов с вторичной полной адентией

[Текст] / В. Н. Царёв, Т. И. Ибрагимов, А. Г. Трефилов // Стоматолог. — 2008. — № 2. — С. 45–51.

100. Царёв, В. Н. Пространственно-временная модель формирования биопленки полости рта: взаимосвязь процессов первичной адгезии и микробной колонизации [Текст] / В. Н. Царёв, А. Г. Трефилов, Г. Н. Клейменова [и др.] // Журнал «Dental Forum». — 2011. — № 5. — С. 126–131.

101. Царёв, В. Н. Разработка принципов комплексной иммуно-бактериологической диагностики и иммуномодулирующей терапии воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области [Текст]: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.00.21 / Царёв Виктор Николаевич. — М., 1993. — 46 с.

102. Царёв, В. Н. Технологии генодиагностики в отечественной стоматологии [Текст] / В. Н. Царёв, Е. Н. Николаева // Стоматология. — 2007. — № 5. — С. 82–87.

103. Червинец, В. М. Микробиоценоз кишечника и иммунный статус у детей младшего школьного возраста / В. М. Червинец, Ю. В. Червинец, А. М. Самоукина [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 1. — С. 49–52.

104. Червинец, Ю. В. Индигенные лактобациллы полости рта человека — кандидаты в пробиотические штаммы [Текст] / В. М. Червинец, А. Ю. Миронов, С. Г. Ботина [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». — 2012. — № 1. — С. 131–137.

105. Червинец, Ю. В. Нарушения микробиоты желудочно-кишечного тракта здоровых людей [Текст] / Ю. В. Червинец, Е. А. Беляева, В. М. Червинец [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2013. — № 3. — С. 55–58.

106. Черешнев, В. А. Иммунология [Текст] / В. А. Черешнев, К. В. Шмагель. — М.: Магистр-Пресс, 2013. — 448 с.

107. Чернин, В. В. Симбионтное пищеварение человека. Физиология, клиника, диагностика и лечение его нарушений [Текст] / В. В. Чернин, А. И. Парфенов, В. М. Бондаренко [и др.]. — Тверь: Триада, 2013. — 232 с.
108. Шишкина, И. М. Роль микробиологического статуса в патогенезе хронического катарального гингивита с обоснованием лечения [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.21, 03.00.07 / Шишкина Ирина Михайловна. — М., 2007. — 24 с.
109. Шкурова, Т. А. Совершенствование диагностики и профилактики заболеваний пародонта у больных бронхиальной астмой [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.14 / Шкурова Татьяна Александровна. — М., 2015. — 24 с.
110. Ющук, Н. Д. Антибиотики и противоинфекционный иммунитет [Текст] / Н. Д. Ющук, И. П. Балмасова, В. Н. Царёв. — М.: Практическая медицина, 2013. — 232 с.
111. Янушевич, О. О. Стоматологическая заболеваемость населения России. Состояние тканей пародонта и слизистой оболочки рта [Текст] / О. О. Янушевич, Э. М. Кузьмина, И. Н. Кузьмина [и др.]. — М.: МГМСУ, 2009. — 228 с.
112. Aggarwal, S. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family [Text] / S. Aggarwal, A. L. Gurney // *Journal of Leukocyte Biology*. — 2002. — Vol. 71. — P. 1–8.
113. Alcamí, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors [Text] / A. Alcamí // *Nature Reviews Immunology*. — 2003. — Vol. 3(1). — P. 36–50.
114. Allam, J. P. IL-23producing CD68(+) macrophage-like cells predominate within an IL-17polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions [Text] / J. P. Allam, Y. Duan, F. Heinemann [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2011. — Vol. 38. — P. 879–886.
115. Al-Qutub, M. N. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide [Text] / M. N. Al-Qutub, P. H. Braham, L. M. Karimi-Naser [et al.] // *Infection and Immunity*. — 2006. — Vol. 74. — P. 4474–4485.

116. Amano, A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis [Text] / A. Amano // *Periodontology* 2000. — 2010. — Vol. 52. — P. 12–37.
117. Amano, A. Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis* [Text] / A. Amano, A. Sharma, H. T. Sojar [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1994. — Vol. 62, — P. 4682–4685.
118. Amano, A. Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens [Text] / A. Amano, N. Furuta, K. Tsuda // *Periodontology* 2000. — 2010. — Vol. 52. — P. 84–93.
119. Amano, A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains [Text] / A. Amano, T. Fujiwara, H. Nagata [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 1997. — Vol. 76. — P. 852–857.
120. Amarasinghe, J. J. Novel iron-regulated and Fur-regulated small regulatory RNAs in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [Text] / J. J. Amarasinghe, T. D. Connell, F. A. Scannapieco [et al.] // *Molecular Oral Microbiology*. — 2012. — Vol. 27. — P. 327–349.
121. Amarasinghe, J. J. Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation [Text] / J. J. Amarasinghe, F. A. Scannapieco, E. M. Haase // *Infection and Immunity*. — 2009. — Vol. 77. — P. 2896–2907.
122. Amorena, B. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro [Text] / B. Amorena, E. Gracia, M. Monzon [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1999. — Vol. 44. — P. 43–55.
123. Anderl, J. N. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin [Text] / J. N. Anderl, M. J. Franklin, P.S. Stewart // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2000. — Vol. 44. — P. 1818–1824.
124. Andrian, E. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis [Text] / E. Andrian, D. Grenier, M. Rouabhia // *Journal of Dental Research*. — 2006. — Vol. 85 (5). — P. 392–403.

125. Anwar, H. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin [Text] / H. Anwar, J.L. Strap, K. Chen [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 1992. — Vol. 36. — P. 1208–1214.
126. Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions [Text] / G. C. Armitage // *Annals of Periodontology*. — 1999. — Vol. 4. — P. 1–6.
127. Armitage, P. Statistical methods in medical research / P. Armitage, G. Berry, J. N. S. Matthews. — 4th edn. — Blackwell Science Ltd, London, 2002. — 795 p.
128. Bachni, P. Electron microscopic study of the interaction of oral microorganisms with polymorphonuclear leukocytes [Text] / P. Bachni, M. A. Listgarten, N. S. Taichman [et al.] // *Archives of Oral Biology*. — 1977. — Vol. 22. — P. 685–692.
129. Bahri, R. *Candida famata* modulates Toll-like receptor, β -defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells [Text] / R. Bahri, D. Saidane-Mosbahi, M. Rouabhia // *Journal of Cellular Physiology*. — 2010. — Vol. 222 (1). — P. 209–218.
130. Bahri, R. Normal Human Gingival Epithelial Cells Sense *C. parapsilosis* by Toll-Like Receptors and Module Its Pathogenesis through Antimicrobial Peptides and Proinflammatory Cytokines [Text] / R. Bahri, S. Curt, D. Saidane-Mosbahi [et al.] // *Mediators of Inflammation*. — 2010. — Vol. 2010. — Article ID 940383. — 13 p.
131. Balaban, N. Q. Bacterial persistence as a phenotypic switch [Text] / N. Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait [et al.] // *Science*. — 2004. — Vol. 305(5690). — P. 1622–1625.
132. Barnes, T. C. The Many Faces of Interleukin-6: The Role of IL-6 in Inflammation, Vasculopathy, and Fibrosis in Systemic Sclerosis [Text] / T. C. Barnes, M. E. Anderson, R. J. Moots // *International Journal of Rheumatology*. — 2011. — Vol. 2011 — Article ID 721608. — 6 p.
133. Baroud, M. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases [Text] / M. Baroud, I. Dandache, G. F. Araj [et al.] // *International Journal of*

- Antimicrobial Agents. — 2013. — Vol. 41 (1). — P. 75–79. — doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.08.010. Epub 2012 Nov 9.
134. Bartold, P. M. Periodontitis: A host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts [Text] / P. M. Bartold, T. E. Van Dyke // *Periodontology* 2000. — 2013. — Vol. 62. — P. 203–217.
135. Batoni, G. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits [Text] / G. Batoni, G. Maisetta, F. L. Brancatisano [et al.] // *Current Medicinal Chemistry*. — 2011. — Vol. 18 (2). — P. 256–279.
136. Beikler, T. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures [Text] / T. Beikler, T. F. Flemmig // *Periodontology* 2000. — 2011. — Vol. 55. — P. 87–103.
137. Beklen, A. Toll-like receptors 2 and 5 in human gingival epithelial cells cooperate with T-cell cytokine interleukin-17 [Text] / A. Beklen, T. Sorsa, Y. T. Kontinen // *Oral Microbiology and Immunology*. — 2009. — Vol. 24. — P. 38–42.
138. Belibasakis, G. N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the “red complex” species [Text] / G. N. Belibasakis, T. Thurnheer, N. Bostanci // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 10 (8). — doi:10.1371/journal.pone.0081581
139. Belibasakis, G. N. Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells [Text] / G. N. Belibasakis, A. Meier, B. Guggenheim [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. — 2011. — Vol. 50. — P. 6–12.
140. Benakanakere, M. TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis [Text] / M. Benakanakere, M. Abdolhosseini, K. Hosur, [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2015. — Vol. 94 (1). — P. 183–191.
141. Bender, J. S. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease [Text] / J. S. Bender, H. Thang, M. Glogauer // *Journal of Periodontal Research*. — 2006. — Vol. 41 (3). — P. 214–220.
142. Benzer, D. Vancomycin-resistant enterococcus colonization in neonatal intensive care unit: prevention and eradication experience [Text] / D. Benzer, D.

Yavuzcan Öztürk, T. Gürsoy [et al.] // Mikrobiyoloji Bulteni. — 2012. — Vol. 46 (4). — P. 682–688.

143. Beutler, B. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers [Text] / B. Beutler, K. Hoebe, X. Du [et al.] // Journal of Leukocyte Biology. — 2003. — Vol. 74 (4). — P. 479–485. Epub 2003 Jul 1.

144. Bickel, M. Acid-base properties of human gingival crevicular fluid [Text] / M. Bickel, J. L. Munoz, P. Giovannini // Journal of Dental Research. — 1985. — Vol. 64. — P. 1218–1220.

145. Bickel, M. The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique [Text] / M. Bickel, G. Cimasoni // Journal of Dental Research. — 1985. — Vol. 20. — P. 35–40.

146. Binnig, G. Atomic Force Microscope [Text] / G. Binnig, C.F. Quate // Physical Review Letters. — 1986. — Vol. 56 (9). — P. 930–933.

147. Bodet, C. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* [Text] / C. Bodet, F. Chandad, D. Grenier // Microbes and Infection. — 2006. — Vol. 8 (1). — P. 27–35.

148. Bostanci, N. *Porphyromonas gingivalis* regulates TREM-1 in human polymorphonuclear neutrophils via its gingipains [Text] / N. Bostanci, T. Thurnheer, J. Aduse-Opoku [et al.] // PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8 (10). — e75784. — doi:10.1371/journal.pone.0075784

149. Bostanci, N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen [Text] / N. Bostanci, G. N. Belibasakis // FEMS Microbiology Letters. — 2012. — Vol. 333. — P. 1–9.

150. Boyce, B. F. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice [Text] / B. F. Boyce, T. B. Aufdemorte, I. R. Garrett [et al.] // Endocrinology. — 1989. — Vol. 125. — P. 1142–1150.

151. Bradshaw, D. J. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during

aeration [Text] / D.J. Bradshaw, P. D. Marsh, G. K. Watson [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1998. — Vol. 66. — P. 4729–4732.

152. Brandtzaeg, P. Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity [Text] / P. Brandtzaeg // *Beneficial microbes*. — 2010. — Vol. 1 (3). — P. 211–227. — doi:10.3920/BM2010.0009.

153. Brandtzaeg, P. The gut as communicator between environment and host: immunological consequences [Text] / P. Brandtzaeg // *European Journal of Pharmacology*. — 2011. — Vol. 668. — P. 16–32. — doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.006. Epub 2011 Jul 28.

154. Brocker, C. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family [Text] / C. Brocker, D. Thompson, A. Matsumoto [et al.] // *Human Genomics*. — 2010. — Vol. 5. — P. 30–55.

155. Brown, J. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk [Text] / J. Brown, H. Wang, G. N. Hajishengallis [et al.] // *J Dent Res*. — 2011. — Vol. 90. — P. 417–427.

156. Burton J. P. The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics [Text] / J.P. Burton // *Oral Diseases*. — 2005. — Vol. 11 (1). — P. 29–31.

157. Burton, J. P. Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci? [Text] / J. P. Burton, P. A. Wescombe, P. A. Cadieux [et al.] // *Benef Microbes*. — 2011. — Vol. 2. — P. 93–101.

158. Cabiscol, E. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species [Text] / E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros // *International Microbiology*. — 2000. — Vol. 3. — P. 3–8.

159. Calkins, C. C. Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion [Text] / C. C. Calkins, K. Platt, J. Potempa [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 1998. — Vol. 273. — P. 6611–6614.

160. Canabarro, A. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis [Text] / A. Canabarro, C. Valle, M.

- R. Farias [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2013. — Vol. 48. — P. 428–432.
161. Cardoso, C. R. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease [Text] / C. R. Cardoso, G. P. Garlet, G. E. Crippa // *Oral Microbiology and Immunology*. — 2009. — Vol. 24. — P. 1–6.
162. Carrillo-de-Albornoz, A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm [Text] / A. Carrillo-de-Albornoz, E. Figuero, D. Herrera [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2010. — Vol. 37. — P. 230–240.
163. Cavalcanti, Y. W. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria [Text] / Y. W. Cavalcanti, D. J. Morse, W. J. Silva [et al.] // *Biofouling*. — 2015. — Vol. 31 (1). — P. 27–38. — doi:0.1080/08927014.2014.996143
164. Cebo, C. Lectin activities of cytokines: Functions and putative carbohydrate-recognition domains [Text] / C. Cebo, G. Vergoten, J. P. Zanetta // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 2002. — Vol. 1572. — P. 422–434.
165. Cebo, C. Recombinant human interleukins IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties [Text] / C. Cebo, T. Dambrouck, E. Maes [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2001. — Vol. 276. — P. 5685–5691.
166. Central Intelligence Agency. The global infectious disease threat and its implications for the United States [Electronic resource] 1999. — URL: <http://www.odci.gov/cia/publications/nie/report/nie99&17d.html>
167. Chaves, E. S. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy [Text] / E. S. Chaves, M. K. Jeffcoat, C. C. Ryerson [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2000. — Vol. 27. — P. 897–903.

168. Chen, X. T. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis [Text] / X. T. Chen, J. Y. Tan, L. H. Lei [et al.] // American journal of dentistry. — 2015. — Vol. 28 (1). — P. 9–12.
169. Chen, Y. T. Sequence of Closely Related Plasmids Encoding bla(NDM-1) in Two Unrelated *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Singapore [Text] / Y. T. Chen, A. C. Lin, L.K. Siu [et al.] // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7 (11). — e48737.
170. Chew, J. A proteomic investigation of *Fusobacterium nucleatum* alkaline-induced biofilms [Text] / J. Chew, P.S. Zilm, J. M. Fuss [et al.] // BMC Microbiology. — 2012. — Vol. 12. — doi:10.1186/1471-2180-12-189
171. Christenson, K. In vivo-transmigrated human neutrophils are resistant to antiapoptotic stimulation [Text] / K. Christenson, L. Bjorkman, J. Karlsson [et al.] // Journal of Leukocyte Biology — 2011. — Vol. 90. — P. 1055–1063. — doi:10.1189/jlb.0111051
172. Chuard, C. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics [Text] / C. Chuard, P. Vaudaux, F. A. Waldvogel [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 1993 — Vol. 37. — P. 625–632.
173. Cobb, C. M. Microbes, inflammation, scaling and root planing, and the periodontal condition [Text] / C. M. Cobb // Journal of Dental Hygiene. — 2008. — Vol. 82. — P. 4–9.
174. Colombo, A. P. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory peri-odontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the Human Oral Microbe Identification Microarray [Text] / A. P. Colombo, S. K. Boches, S. L. Cotton [et al.] // Journal of Periodontology. — 2009. — Vol. 80. — P. 1421–1432.
175. Consensus report on periodontal diseases. Pathogenesis and microbial factors [Text] // Annals of Periodontology. — 1996. — Vol. 1. — P. 926–932.
176. Conti, H. R. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis [Text] / H. R. Conti, F. Shen, N. Nayyar [et al.] // Journal of Experimental Medicine. — 2009. — Vol. 206. — P. 299–311.

177. Corbin, A. Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model [Text] / A. Corbin, B. Pitts, A. Parker [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2011. — Vol. 55. — P. 3338–3344.
178. Costerton, W. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections [Text] / W. Costerton, R. Veeh, M. Shirtliff [et al.] // Journal of Clinical Investigation. — 2003. — Vol. 112. — P. 1466–1477.
179. Cua, D. J. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system [Text] / D. J. Cua, C. M. Tato // Nature Reviews Immunology. — 2010. — Vol. 10. — P. 479–489.
180. Cugini, C. Porphyromonas gingivalis: keeping the pathos out of the biont [Electronic resource] / C. Cugini, V. Klepac-Ceraj, E. Rackaityte [et al.] // Journal of Oral Microbiology. — 2013. — Vol. 5. — <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.19804>
181. Curtis, M. A. Temperature-dependent modulation of Porphyromonas gingivalis lipid A structure and interaction with the innate host defenses [Text] / M. A. Curtis, R. S. Percival, D. Devine [et al.] // Infection and Immunity. — 2011. — Vol. 79. — P. 1187–1193.
182. Dall, L. Enzymatic modification of glycocalyx in the treatment of experimental endocarditis due to viridans streptococci [Text] / L. Dall, W. G. Barnes, J. W. Lane [et al.] // Journal of Infectious Diseases. — 1987. — Vol. 156. — P. 736–740.
183. Danese, P. N. Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture [Text] / P. N. Danese, L. A. Pratt, R. Kolter // Journal of Bacteriology. — 2000. — Vol. 182 (12). — P. 3593–3596.
184. Darveau, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis [Text] / R. P. Darveau // Nature Reviews Microbiology. — 2010. — Vol. 8. — P. 481–490.
185. Darveau, R. P. Porphyromonas gingivalis neutrophil manipulation: risk factor for Periodontitis? [Text] / R. P. Darveau // Trends in microbiology. — 2014. — Vol. 22 (8). — P. 428–429. — doi:10.1016/j.tim.2014.06.006

186. Darveau, R. P. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system [Text] / R. P. Darveau // *DNA and Cell Biology*. — 2009. — Vol. 28. — P. 389–395.
187. Davies, G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / G. Davies, A. M. Chakrabarty, G. G. Geesey // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1993. — Vol. 59. — P. 1181–1186.
188. Desai, M. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth [Text] / M. Desai, T. Buhler, P. H. Weller [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1998. — 42. — P. 153–160.
189. Di Luca, M. BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides [Text] / M. Di Luca, G. Maccari, G. Maisetta // *Biofouling*. — 2015. — Vol. 31 (2). — P. 193–199. — doi:10.1080/08927014.2015.1021340
190. Di Luca, M. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools [Text] / M. Di Luca, G. Maccari, R. Nifosì // *Pathogens and Disease*. — 2014. — Vol. 70 (3). — P. 257–270. — doi:10.1111/2049-632X.12151
191. Diamond, G. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences [Text] / G. Diamond, N. Beckloff, L. K. Ryan // *The Journal of Dental Research*. — 2008. — Vol. 87. — P. 915–927.
192. Dickinson, B. C. Interaction of oral bacteria with gingival epithelial cell multilayers [Text] / B. C. Dickinson, C. E. Moffatt, D. Hagerty [et al.] // *Molecular Oral Microbiology*. — 2011. — Vol. 26. — P. 210–220.
193. Diggle, S. P. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / S. P. Diggle, R. E. Stacey, C. Dodd [et al.] // *Environmental Microbiology*. — 2006. — Vol. 8. — P. 1095–1104.
194. Donlan, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces [Text] / R. M. Donlan // *Emerg Infect Dis*. — 2002. — Vol. 8 (9). — P. 1–20.

195. Donlan, R. M. Biofilms: survival mechanisms clinically relevant microorganisms [Text] / R. M. Donlan, J. W. Costerton // *Clinical Microbiology Reviews*. — 2002. — Vol. 15(2). — P. 167–193.
196. Duarte, P. M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study [Text] / P. M. Duarte, M. Da Rocha, E. Sampaio [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2010. — Vol. 81. — P. 1056–1063.
197. DuGuid, I. G. Effect of biofilm culture on the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin [Text] / I. G. DuGuid, E. Evans, M. R. W. Brown [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1992. — Vol. 30. — P. 803–810.
198. DuGuid, I. G. Growth-rate-dependent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency [Text] / I. G. DuGuid, E. Evans, M. R. W. Brown [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1990. — Vol. 30. — P. 791–802.
199. Dutzan, N. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients [Text] / N. Dutzan, R. Vernal, J. P. Vaque [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2012. — Vol. 83 (7). — P. 948–954.
200. Eberhard, J. The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms [Text] / J. Eberhard, R. Pietschmann, W. Falk [et al.] // *Oral Microbiology and Immunology*. — 2009. — Vol. 24. — P. 325–330.
201. Ebersole, J. L. Periodontal disease immunology: “double indemnity” in protecting the host [Text] / J. L. Ebersole, D. R. Dawson, L. A. Morford [et al.] // *Periodontol 2000*. — 2013. — Vol. 62 (1). — P. 163–202.
202. Eggert, F. M. The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults [Text] / F. M. Eggert, L. Drewell, J. A. Bigelow [et al.] // *Archives of Oral Biology*. — 1991. — Vol. 36. — P. 233–238.
203. Eick, S. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system [Text] / S. Eick, E. Glockmann. // *Journal of Oral Rehabilitation*. — 2004. — Vol. 31. — P. 278–285.

204. Engelkirk, P. G. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology [Text] / P. G. Engelkirk, J. Duben-Engelkirk, V. R. Dowell. — Belmont: Star Publishing, 1992. — 462 p.
205. Epperson, M. L. Subversion of cytokine networks by virally encoded decoy receptors [Text] / M. L. Epperson, C. A. Lee, D. H. Fremont // Immunological Reviews. — 2012. — Vol. 250 (1). — P. 199–215.
206. Eskan, M. A. Interleukin-1 β modulates proinflammatory cytokine production in human epithelial cells [Text] / M. A. Eskan, M. R. Benakanakere, B. G. Rose [et al.] // Infection and Immunity. — 2008. — Vol. 76. — P. 2080–2089.
207. Eskan, M. A. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss [Text] / M. A. Eskan, R. Jotwani, T. Abe [et al.] // Nature Immunology. — 2012. — Vol. 13 (5). — P. 465–473. — doi:10.1038/ni.2260
208. Ezzo, P. J. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease [Text] / P. J. Ezzo, C. W. Cutler // Periodontology 2000. — 2003. — Vol. 32. — P. 24–35.
209. Fedi, P. F. Jr. Temperature differences at periodontal sites in health and disease [Text] / P. F. Jr. Fedi, W. J. Killoy // Journal of Periodontology. — 1992. — 63. — P. 24–27.
210. Feng, Z. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues [Text] / Z. Feng, A. Weinberg // Periodontology 2000. — 2006. — Vol. 40 (1). — P. 50–76.
211. Feucht, E. C. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells [Text] / E. C. Feucht, C. L. DeSanti, F. Weinberg // Oral Microbiology and Immunology. — 2003. — Vol. 18. — P. 359–363.
212. Fey, P. D. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? [Text] / P. D. Fey // Current Opinion in Microbiology. — 2010. — Vol. 13. — P. 610–615.
213. Figuero, E. Gingival changes during pregnancy: I. Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters [Text] / E. Figuero, A. Carrillo-de-Albornoz, D. Herrera // Journal of Clinical Periodontology. — 2010. — Vol. 37. — P. 220–229.

214. Flamm, R. K. Summary of ceftaroline activity against pathogens in the United States, 2010: report from the Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluation (AWARE) surveillance program [Text] / R. K. Flamm, H. S. Sader, D. J. Farrell [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2012. — Vol. 56 (6). — P. 2933–2940.
215. Flemming, H. C. The biofilm matrix [Text] / H. C. Flemming, J. Wingender // *Nature Reviews Microbiology.* — 2010. — Vol. 8. — P. 623–633.
216. Fletcher, H. M. Прикладные аспекты молекулярной биологии полости рта [Текст] / H. M. Fletcher, A. Progulsk-Fox, J. D. Hilman // *Микробиология и иммунология для стоматологов* / под ред. Р. Дж. Ламонта, М. С. Лантца, Р. А. Берне, Д. Дж. Лебланка. — М.: Практическая медицина. — 2010. — С. 205–224.
217. Forozsh, F. M. Drug resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients at Isfahan AL Zahra hospital, Iran (2009–2010) [Text] / F. M. Forozsh, G. Irajian, T. Z. Moslehi [et al.] // *Iranian Journal of Microbiology.* — 2012. — Vol. 4 (2). — P. 94–97.
218. Fritschi, B. Z. *Staphylococcus aureus* and other bacteria in untreated periodontitis [Text] / B. Z. Fritschi, A. Albert-Kiszely, G. R. Persson // *Journal of Dental Research.* — 2008. — Vol. 87. — P. 589–593.
219. Fu, Q. Y. Correlation of chronic periodontitis in tropical area and IFN- γ , IL-10, IL-17 levels [Text] / Q. Y. Fu, L. Zhang, L. Duan [Text] // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* — 2013. — Vol. 6 (6). — P. 489–492. — doi:10.1016/S1995-7645(13)60080-2
220. Fursova, N. The novel CTX-M-116 β -lactamase gene discovered in *Proteus mirabilis* is composed of parts of the CTX-M-22 and CTX-M-23 genes [Text] / N. Fursova, S. Pryamchuk, A. Kruglov [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* — 2013. — Vol. 57 (3). — P. 1552–1555.
221. Fursova, N. K. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia [Text] / N. K. Fursova, E. I. Astashkin, A. I. Knyazeva [et al.] //

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. — 2015. — Vol. 14 (1). — P. 46.

222. Gaddis, D. E. TLR4 signaling via MyD88 and TRIF differentially shape the CD4⁺ T cell response to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B [Text] / D. E. Gaddis, S. M. Michalek, J. Katz [et al.] // Journal of Immunology. — 2011. — Vol. 186. — P. 5772–5783.

223. Gaffen, S. L. A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17 [Text] / S. L. Gaffen, G. Hajishengallis // Journal of Dental Research. — 2008. — Vol. 87 (9). — P. 817–828.

224. Gaffen, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family [Text] / S. L. Gaffen // Nature Reviews Immunology. — 2009. — Vol. 9. — P. 556–567.

225. Gemmell, E. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity [Text] / E. Gemmell, K. Yamazaki, G. J. Seymour // Periodontology 2000. — 2007. — Vol. 43. — P. 14–40.

226. Golub, L. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingival [Text] / L. Golub, T. Sorsa, H. M. Lee [et al.] // Journal of Clinical Periodontology. — 1996. — Vol. 21. — P. 1–9.

227. Gonzalez-Pastor, J. E. Cannibalism by sporulating bacteria [Text] / J. E. Gonzalez-Pastor // Science. — 2003. — Vol. 301 (5632). — P. 510–513.

228. Gordon, C. A. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / C. A. Gordon, N.A. Hodges, C. Marriott // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 1988. — Vol. 22. — P. 667–674.

229. Gotz, F. Staphylococcus and biofilms [Text] / F. Gotz // Molecular Microbiology. — 2002. — Vol. 43 (6). — P. 1367–1378.

230. Grant, M. M. Oxygen tension modulates the cytokine response of oral epithelium to periodontal bacteria [Text] / M. M. Grant, R. T. Kolamunne, F. E. Lock [et al.] // Journal of Clinical Periodontology. — 2010. — Vol. 37. — P. 1039–1048.

231. Graves, D. T. Cytokines that promote periodontal tissue destruction [Text] / D. T. Graves // *Journal of Periodontology*. — 2008. — Vol. 79. — P. 1585–1591.
232. Graves, D. T. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis [Text] / D. T. Graves, J. Kang, O. Andriankaja [et al.] // *Frontiers of Oral Biology*. — 2012. — Vol. 15. — P. 117–132. — doi:10.1159/000329675. Epub 2011 Nov 11.
233. Graves, D. T. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection [Text] / D. T. Graves, M. Oskoui, S. Volejnikova [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2001. — Vol. 80. — P. 1875–1879.
234. Griffen, A. L. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing [Text] / A. L. Griffen, C. J. Beall, J. H. Campbell [et al.] // *ISME Journal*. — 2012. — Vol. 6. — P. 1176–1185.
235. Gruber, F. P. Alternatives to animal experimentation in basic research [Text] / F. P. Gruber, T. Hartung // *ALTEX*. — 2004. — Vol. 21 (1). — P. 3–31.
236. Guentsch, A. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [Text] / A. Guentsch, M. Puklo, P. M. Preshaw [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2009. — Vol. 44 (3). — P. 368–377. — doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01113.x
237. Guggenheim, B. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms [Text] / B. Guggenheim, A. Meier // *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. — 2011. — Vol. 121. — P. 432–441.
238. Guggenheim, B. In vitro modeling of host-parasite interactions: the “subgingival” biofilm challenge of primary human epithelial cells [Text] / B. Guggenheim, R. Gmur, J. Galicia [et al.] // *BMC Microbiology*. — 2009. — Vol. 9. — P. 280.
239. Guo, Y. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal

degradation of proteins [Text] / Y. Guo, K. A. Nguyen, J. Potempa // *Periodontology* 2000. — 2010. — Vol. 54. — P. 15–44.

240. Gursoy, M. High salivary estrogen and risk of developing pregnancy gingivitis [Text] / M. Gursoy, U. K. Gursoy, T. Sorsa [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2012. — doi:10.1902/jop.2012.120512

241. Gursoy, U. K. Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of *Fusobacterium nucleatum* in an oral mucosa culture model [Text] / U. K. Gursoy, M. Pöllänen, E. Könönen [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2010. — Vol. 81. — P. 1084–1091.

242. Haake, S. K. Болезни пародонта [Текст] / S. K. Haake, D. H. Meyer, P. M. Fives-Taylor [et al.] // *Микробиология и иммунология для стоматологов* / под ред. Р. Дж. Ламонта, М. С. Лантца, Р.А. Берне, Д. Дж. Лебланка. — М.: Практическая медицина. — 2010. — С. 297–339.

243. Haffajee, A. D. Subgingival temperature (III). Relation to microbial counts [Text] / A. D. Haffajee, S. S. Socransky, C. Smith [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 1992. — Vol. 19. — P. 417–422.

244. Hajishengallis, E. Neutrophil Homeostasis and Periodontal Health in Children and Adults [Text] / E. Hajishengallis, G. Hajishengallis // *Journal of Dental Research*. — 2014. — Vol. 93 (3). — P. 231–237.

245. Hajishengallis, G. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment [Text] / G. Hajishengallis, T. Chavakis // *Trends in Immunology*. — 2013. — Vol. 34. — P. 1–6.

246. Hajishengallis, G. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement [Text] / G. Hajishengallis, S. Liang, M. A. Payne [et al.] *Cell Host Microbe*. — 2011. — Vol. 10. — P. 497–506.

247. Hajishengallis, G. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity [Text] / G. Hajishengallis, J. D. Lambris // *Nature Reviews Immunology*. — 2011. — Vol. 11. — P. 187–200.

248. Hajishengallis, G. Porphyromonas gingivalis-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? [Text] / G. Hajishengallis // Microbes Infect. — 2009. — Vol. 11. — P. 637–645.
249. Hajishengallis, G. The keystonepathogen hypothesis [Text] / G. Hajishengallis, R. P. Darveau, M. A. Curtis // Nature Reviews Microbiology. — 2012. — Vol. 10. — P. 717–725.
250. Hajishengallis, G. Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity [Text] / G. Hajishengallis, // Molecular Oral Microbiology. — 2010. — Vol. 25. — P. 25–37.
251. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections [Text] / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cellular Microbiology. — 2009. — Vol. 11 (7). — P. 1034–1043. — doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x. Epub 2009 Apr 6.
252. Hamada, S. Biology, immunology and cariogenicity of Streptococcus mutans [Text] / S. Hamada, H. D. Slade // Microbiology Reviews. — 1980. — Vol. 44. — P. 331–384.
253. Han, Y. W. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen [Text] / Y. W. Han // Current Opinion in Microbiology. — 2015. — Vol. 23. — P. 141–147.
254. Handal, T. Chromosome- and Plasmid-Encoded β -Lactamases in Capnocytophaga spp [Text] / T. Handal, C. Giraud-Morin, A. Dominique [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2005. — Vol. 49 (9). — P. 3940–3943. — doi:10.1128/AAC.49.9.3940–3943.2005
255. Handley, P. S. A comparison of the adhesion, coaggregation and cel 1-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of Streptococcus salivarius [Text] / P. S. Handley, D. W. Harty, J. E. Wyatt [et al.] // Journal of General Microbiology. — 1987. — Vol. 133 (11). — P. 3207–3217.
256. Hanning, M. Transmission electron microscopy study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials [Text] / M. Hanning // European Journal of Oral Sciences — 1997. — Vol. 105. — P. 422–433.
257. Harro, J. M. Vaccine development in Staphylococcus aureus: taking the biofilm phenotype into consideration [Text] / J. M. Harro, B. M. Peters, G. A. O'May [et al.] // FEMS Immunology and Medical Microbiology. — 2010. — Vol. 59. — P. 306–323.

258. Hartman, G. R. Quorum sensing: potential means of treating Gram-negative infections? [Text] / G. R. Hartman, R. Wise // *Lancet*. — 1998. — Vol. 351. — P. 848–849.
259. Hasegawa, Y. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species [Text] / Y. Hasegawa, J. J. Mans, S. Mao, [et al.] // *Infection and Immunity*. — 2007. — Vol. 75. — P. 2540–2547.
260. Hashimoto, M. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin [Text] / M. Hashimoto, S. Ogawa, Y. Asai [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. — 2003. — Vol. 226. — P. 267–271.
261. Hashimoto, M. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide [Text] / M. Hashimoto, Y. Asai, R. Tamai [et al.] // *FEBS Letters*. — 2003. — Vol. 543. — P. 98–102.
262. Hatch, R. A. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / R.A. Hatch, N. L. Schiller // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 1998. — Vol. 42. — P. 974–977.
263. Hentzer, M. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound [Text] / M. Hentzer, K. Riedel, T. B. Rasmussen [et al.] // *Microbiology*. — 2002. — Vol. 148. — P. 87–102.
264. Hentzer, M. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function [Text] / M. Hentzer [et al.] // *Journal of Bacteriology*. — 2001. — Vol. 183 (18). — P. 5395–5401.
265. Hetz, G. Пародонтология сегодня. Часть II. Новое в стоматологии // *Профессиональные методы диагностики и лечения*. — 2001. — Т. 98, № 8. — С. 39–48.
266. Høiby, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [Text] / N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. — 2010. — Vol. 35. — P. 322–332.
267. Honarm, H. Evaluation of a PCR assay to detect *enterococcus faecalis* in blood and determine glycopeptides resistance genes: van A and van B [Text] / H. Honarm,

- M. Falah Ghavidel, I. Nikokar [et al.] // Iranian Journal of Medical Sciences. — 2012. — Vol. 37 (3). — P. 194–199.
268. Hope, C. K. Reducing the variability between constant-depth film fermenter experiments when modelling oral biofilm [Text] / C. K. Hope, K. Bakht, G. Burnside [et al.] // Journal of Applied Microbiology. — 2012. — Vol. 113. — P. 601–608.
269. Howard, G. T. Biodegradation of polyurethane: a review [Text] / G. T. Howard // International Biodeterioration & Biodegradation. — 2002. — Vol. 49. — P. 245–252.
270. Hoyle, B. D. Disparate efficacy of tobramycin on Ca^{2+} , Mg^{2+} , and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [Text] / B. D. Hoyle, C. K. W. Wong, J. W. Costerton // Canadian Journal of Microbiology. — 1992. — Vol. 38. — P. 1214–1218.
271. Huang, G. T. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* [Text] / G. T. Huang, H. B. Zhang, H. N. Dang [et al.] // Microbial Pathogenesis. — 2004. — Vol. 37 (6). — P. 303–312. — Epub 2004 Dec 8.
272. Huang, X. Z. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant Enterobacteriaceae isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq [Text] / X. Z. Huang [et al.] // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7 (7). — e40360. — doi:10.1371/journal.pone.0040360
273. Hueber, A. J. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium [Text] / A. J. Hueber, D. L. Asquith, A. M. Miller [et al.] // Journal of Immunology. — 2010. — Vol. 184. — P. 3336–3340.
274. Hughes, D. T. Inter-kingdom signalling: Communication between bacteria and their hosts [Text] / D. T. Hughes, V. Sperandio // Nature Reviews Microbiology. — 2008. — Vol. 6. — P. 111–120.
275. Iacopino, A. M. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation [Text] / A. M. Iacopino // Annals of Periodontology. — 2001. — Vol. 6. — P. 125–137.
276. Imbronito, A. V. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive

periodontitis, or gingivitis [Text] / A. V. Imbronito, O. S. Okuda, N. Maria de Freitas [et al.] // Journal of Periodontology. — 2008. — Vol. 79. — P. 2313–2321.

277. Imlay, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide [Text] / J. A. Imlay // Annual Review of Biochemistry. — 2008. — Vol. 77. — P. 755–776.

278. Imura, H. Cytokines and endocrine function: An interaction between the immune and neuroendocrine systems [Text] / H. Imura, J. Fukata, T. Mori // Clinical Endocrinology. — 1991. — Vol. 35. — P. 107–115.

279. Ise, N. Structure Formation in Solution: Ionic Polymers and Colloidal Particles / N. Ise, I.S. Sogami. — New York: Springer Science+Business Media, 2005. — 347 p. — ISBN-10 3-540-25271-1.

280. Iwahara, K. Detection of cfxA and cfxA2, the β -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR [Text] / K. Iwahara, T. Kuriyama, S. Shimura [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2006. — Vol. 44 (1). — P. 172–176.

281. Jenkinson, H. F. Микробная экология полости рта [Текст] / H. F. Jenkinson, R. J. Lamont // Микробиология и иммунология для стоматологов / под ред. Р. Дж. Ламонта, М. С. Лантца, Р. А. Берне, Д. Дж. Лебланка. — М.: Практическая медицина. — 2010.— С. 120–138.

282. Jensen, J. The effect of female sex hormones on subgingival plaque [Text] / J. Jensen, W. Liljemark, C. Bloomquist // Journal of Periodontology. — 1981. — Vol. 52. — P. 599–602.

283. Ji, S. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria [Text] / S. Ji, Y. Kim, B. M. Min [et al.] // Journal of Periodontal Research. — 2007. — Vol. 42. — P. 503–510.

284. Johansen, C. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilm [Text] / C. Johansen, P. Falholt, L. Gram // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — Vol. 63. — P. 3724–3728.

285. Jonsson, R. Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women [Text] / R.

Jonsson, B. E. Howland, G. H. Bowden // *Journal of Dental Research*. — 1988. — Vol. 67. — P. 1062–1069.

286. Jorge, P. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches [Text] / P. Jorge, A. Lourenço, M. O. Pereira // *Biofouling*. — 2012. — Vol. 28 (10). — P. 1033–1061.

287. Kaase, M. Carbapenemases in gram-negative bacteria: Current data and trends of resistance resulting from the work of national reference centres [Text] / M. Kaase // *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. — 2012. — Vol. 55 (11-12). — P. 1401–1404.

288. Kallen, A. United states centers for disease control and prevention issue updated guidance for tackling carbapenem-resistant enterobacteriaceae [Text] / A. Kallen, A. Guh // *Eurosurveillance*. — 2012. — Vol. 17 (26). — P. 28.

289. Kamal, G. D. Reduced intravascular catheter infection by antibiotic bonding. A prospective, randomized, controlled trial [Text] / G. D. Kamal, M. A. Pfaller, L. E. Rempe [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. — 1991. — Vol. 265. — P. 2364–2368.

290. Kanangat, S. Modulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by interleukin-1beta: Novel implications in bacterial pathogenesis [Text] / S. Kanangat, A. Postlethwaite, S. Cholera [et al.] // *Microbes and Infection*. — 2007. — Vol. 9. — P. 408–415.

291. Kantarci, A. Neutrophil-mediated host response to *Porphyromonas gingivalis* [Text] / A. Kantarci, T. E. Van Dyke // *Journal of the International Academy of Periodontology*. — 2002. — Vol. 4 (4). — P. 119–125.

292. Kapatral, V. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586 [Text] / V. Kapatral, I. Anderson, N. Ivanova [et al.] // *Journal of Bacteriology*. — 2002. — Vol. 184. — P. 2005–2018.

293. Kassem, A. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts [Text] / A. Kassem, P. Henning, P. Lundberg [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2015. — Vol. 290 (33). — P. 20147–20158.

294. Kebschull, M. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses [Text] / M. Kebschull, P. N. Papapanou // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2011. — Vol. 38. — P. 17–27.
295. Khosravi, Y. Phenotypic detection of metallo- β -lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / Y. Khosravi [et al.] // *Scientific World Journal*. — 2012. — Vol. 2012. — Article ID 654939. — 7 p.
296. Kiiru, J. Analysis of β -lactamase phenotypes and carriage of selected β -lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period [Text] / J. Kiiru [et al.] // *BMC Microbiology*. — 2012. — Vol. 12. — P. 155.
297. Kim, T. S. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds [Text] / T. S. Kim, P. Frank, P. Eickholz [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2009. — Vol. 80 (12). — P. 2020–2027.
298. Kimizuka, Y. Roles of Interleukin-17 in an Experimental *Legionella pneumophila* Pneumonia Model [Text] / Y. Kimizuka, S. Kimura, T. Saga [et al.] // *Infection and Immunity*. — 2012. — Vol. 80. — P. 1121–1127.
299. Kishi, M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2,5-year-old children [Text] / M. Kishi, A. Abe, K. Kishi [et al.] // *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. — 2009. — Vol. 37. — P. 241–249.
300. Kobayashi, S. D. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach [Text] / S. D. Kobayashi, F. R. DeLeo // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. — 2009. — Vol. 1. — P. 309–333.
301. Kolenbrander, P. E. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source [Text] / P. E. Kolenbrander // *International Journal of Oral Science*. — 2011. — Vol. 3. — P. 49–54.
302. Kornman, K. S. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis* [Text] / K. S. Kornman, W. J. Loesche // *Infection and Immunity*. — 1982. — Vol. 35. — P. 256–263.

303. Kuhn, D. M. Candida biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options [Text] / D. M. Kuhn, M. A. Ghannoum // Current Opinion in Investigational Drugs. — 2004. — Vol. 5. — P. 186–197.
304. Kuramitsu, H. K. The whole is greater than the sum of its parts: dental plaque bacterial interactions can affect the virulence properties of cariogenic Streptococcus mutans [Text] / H. K. Kuramitsu, B. Y. Wang // American Journal of Dentistry. — 2011. — Vol. 24. — P. 153–154.
305. Kvist, M. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation [Text] / M. Kvist, V. Hancock, P. Klemm // Applied and Environmental Microbiology. — 2008. — Vol. 74. — P. 7376–7382.
306. Lakschevitz, F. S. Oral Neutrophil Transcriptome Changes Result in a Pro-Survival Phenotype in Periodontal Diseases [Text] / F. S. Lakschevitz, G. M. Aboodi, M. Glogauer // Caldwell CC, PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8 (7). — e68983. — doi:10.1371/journal.pone.0068983
307. Lambert, G. An analogy between the evolution of drug resistance in bacterial communities and malignant tis-sues [Text] / G. Lambert, L. Estévez-Salmeron, S. Oh [et al.] // Nature Reviews Cancer. — 2011. — Vol. 11 (5). — P. 375–382.
308. Lapp, C. A. Modulation by progesterone of interleukin-6 production by gingival fibroblasts [Text] / C. A. Lapp, M. E. Thomas, J. B. Lewis // Journal of Periodontology. — 1995. — Vol. 66. — P. 279–284.
309. Latasa, C. Biofilm-associated protein [Text] / C. Latasa, C. Solano, J.R. Penades, I. Lasa // Comptes Rendus Biologies. — 2006. — Vol. 329 (11). — P. 849–857.
310. Lebeaux, D. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections [Text] / D. Lebeaux, A. Chauhan, O. Rendueles, C. Beloin // Journal of Pathogens. — 2013. — Vol. 2 (2). — P. 288–356.
311. LeBlanc, D. J. Антибиотики и лечение инфекционных заболеваний полости рта [Текст] / D. J. LeBlanc, T. R. Flynn, C. Simos [et al.] // Микробиология и иммунология для стоматологов / под ред. Р. Дж. Ламонта, М. С. Лантца, Р. А. Берне, Д. Дж. Лебланка. — М.: Практическая медицина. — 2010. — С. 427–474.

312. Lee, H. R. *Fusobacterium nucleatum* GroEL induces risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(–/–) mice [Text] / H. R. Lee, H. K. Jun, H. D. Kim [et al.] // *Molecular Oral Microbiology*. — 2012. — Vol. 27. — P. 109–123.
313. Leone, C. W. Immunization enhances inflammation and tissue destruction in response to *Porphyromonas gingivalis* [Text] / C. W. Leone, H. Bokhadhor, D. Kuo [et al.] // *Infection and Immunity*. — 2006. — Vol. 74. — P. 2286–2292.
314. Lewis, J. P. Metal Uptake in host-pathogen interactions: Role of iron in *Porphyromonas gingivalis* interactions with host organisms [Text] / J. P. Lewis // *Periodontology 2000*. — 2010. — Vol. 52. — P. 94–116.
315. Lewis, K. Persister cells [Text] / K. Lewis // *Annual Review of Microbiology*. — 2010. — Vol. 64. — P. 357–372.
316. Li, Y. The *hd0053* gene of *Haemophilus ducreyi* encodes an α 2,3-sialyltransferase [Text] / Y. Li, M. Sun, S. Huang [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2007. — Vol. 361. — P. 555–560.
317. Li, Y. P. An impaired inflammatory cytokine response to gram-negative LPS in human neonates is associated with the defective TLR-mediated signaling pathway [Text] / Y. P. Li, S. L. Yu, Z. J. Huang [et al.] // *Journal of Clinical Immunology*. — 2015. — Vol. 35 (2). — P. 218–226. — doi:10.1007/s10875-015-0128-6. Epub 2015 Jan 29.
318. Liang, S. Periodontal inflammation and bone loss in aged mice [Text] / S. Liang, K. B. Hosur, H. Domon [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2010. — Vol. 45. — P. 574–578.
319. Liljemark, W. R. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases [Text] / W. R. Liljemark, C. Bloomquist // *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. — 1996. — Vol. 7. — P. 180–198.
320. Ling, M. R. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis [Text] / M. R. Ling, I. L. Chapple, J. B. Matthews // *Innate Immunity*. — 2015. — Vol. 21 (7). — P. 714–725. — doi:10.1177/1753425915589387. Epub 2015 Jun 8.

321. Liu, P. F. Vaccination targeting surface FomA of *Fusobacterium nucleatum* against bacterial co-aggregation: implication for treatment of periodontal infection and halitosis [Text] / P.F. Liu, W. Shi, W. Zhu [et al.] // *Vaccine*. — 2010. — Vol. 28. — P. 3496–3505.
322. Liu, X. L. Analysis of resistance phenotype and homology of *Klebsiella pneumoniae* in burn Patients [Text] / X. L. Liu, D. Z. Peng, L. Xue [et al.] // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. — 2012. — Vol. 28 (2). — P. 96–100.
323. Liu, Y. C. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles [Text] / Y. C. Liu, U. H. Lerner, Y. T. Teng // *Periodontology* 2000. — 2010. — Vol. 52. — P. 163–206.
324. Lockhart, P. B. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association [Text] / P. B. Lockhart, A. F. Bolger, P. N. Papapanou [et al.] // *Circulation*. — 2012. — Vol. 125 (20). — P. 2520–2544. — doi:10.1161/CIR.0b013e31825719f3. Epub 2012 Apr 18.
325. Lopatin, D. E. Modulation of immunoreactivity to periodontal disease-associated microorganisms during pregnancy [Text] / D. E. Lopatin, K. S. Kornman, W. J. Loesche // *Infection and Immunity*. — 1980. — Vol. 28. — P. 713–718.
326. Loppnow, H. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS [Text] / H. Loppnow, P. Libby, M. Freudenberg [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1990. — Vol. 58 (11). — P. 3743–3750.
327. Maekawa, T. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis [Text] / T. Maekawa, J. L. Krauss, T. Abe [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2014. — 11 june. — Vol. 15(6). — P. 768–778. — doi: 10.1016/j.chom.2014.05.012.
328. Mah, T. F. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance [Text] / T. F. Mah, B. Pitts, B. Pellock [et al.] // *Nature*. — 2003. — Vol. 426. — P. 306–310.

329. Mahanonda, R. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs [Text] / R. Mahanonda, N. Sa-Ard-Iam, P. Montreekachon [et al.] // *Journal of Immunology*. — 2007. — Vol. 178. — P. 1151–1157.
330. Mahanonda, R. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease [Text] / R. Mahanonda, S. Pichyangkul // *Periodontology 2000*. — 2007. — Vol. 43. — P. 41–55.
331. Mandrell, R. E. Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated [Text] / R. E. Mandrell, R. McLaughlin, Y. Aba Kwaik [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1992. — Vol. 60. — P. 1322–1328.
332. Mariani-Kurkdjian, P. Extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae [Text] / P. Mariani-Kurkdjian, C. Doit, E. Bingen // *Archives of Pediatrics*. — 2012. — Vol. 19 (3). — P. 93–96.
333. Mariotti, A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium [Text] / A. Mariotti // *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. — 1994. — Vol. 5. — P. 27–53.
334. Marsh, P. D. How is the development of dental biofilms influenced by the host? [Text] / P. D. Marsh, D. A. Devine // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2011. — Vol. 38 (11). — P. 28–35.
335. Marsh, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries [Text] / P. D. Marsh // *Dental Clinics of North America*. — 2010. — Vol. 54 (3). — P. 441–454.
336. May, T. B. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients [Text] / T. B. May, D. Shinabarger, R. Maharaj [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews*. — 1991. — Vol. 4. — P. 191–206.
337. McDougald, D. Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal [Text] / D. McDougald, S. A. Rice, N. Barraud [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2012. — Vol. 10. — P. 39–50.

338. McGaha, T. L. Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity [Text] / T. L. McGaha, L. Huang, H. Lemos [et al.] // Immunological Reviews. — 2012. — Vol. 249. — P. 135–157.
339. McKenzie, R. M. Differential response of *Porphyromonas gingivalis* to varying levels and duration of hydrogen peroxide-induced oxidative stress [Text] / R. M. McKenzie, N. A. Johnson, W. Aruni [et al.] // Microbiology. — 2012. — Vol. 158. — P. 2465–2479.
340. McLaughlin, R. A. Interleukin-1 β -induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures [Text] / R. A. McLaughlin, A. J. Hoogewerf // Microbial Pathogenesis. — 2006. — Vol. 41 (2–3). — P. 67–79.
341. Medzhitov, R. Innate immune induction of the adaptive immune response [Text] / R. Medzhitov, C. A. Jr. Janeway // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. — 1999. — Vol. 64. — P. 429–435.
342. Medzhitov, R. Innate immunity [Text] / R. Medzhitov, C. Jr. Janeway // New England Journal of Medicine. — 2000. — Vol. 343. — P. 338–344.
343. Mezyk-Kopec, R. Inactivation of membrane tumor necrosis factor α by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* [Text] / R. Mezyk-Kopec, M. Bzowska, J. Potempa [et al.] // Infection and Immunity. — 2005. — Vol. 73. — P. 1506–1514.
344. Mikolajczyk-Pawlinska, J. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease [Text] / J. Mikolajczyk-Pawlinska, J. Travis, J. Potempa // FEBS Letters. — 1998. — Vol. 440. — P. 282–286.
345. Millhouse, E. Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules [Text] / E. Millhouse, A. Jose, L. Sherry [et al.] // BMC Oral Health. — 2014. — Vol. 14. — P. 80. — doi:10.1186/1472-6831-14-80.
346. Miossec, P. Interleukin-17 and type 17 helper T cells [Text] / P. Miossec, T. Korn, V. K. Kuchroo // New England Journal of Medicine. — 2009. — Vol. 361. — P. 888–898.

347. Moller, D. E. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. Trends Endocrinol [Text] / D. E. Moller // Metabolism. — 2000. — Vol. 11. — P. 212–217.
348. Mombelli, A. On the symmetry of periodontal disease [Text] / A. Mombelli, C. Meier // Journal of Clinical Periodontology. — 2001. — Vol. 28. — P. 741–745.
349. Montagner, F. Beta-lactamic resistance profiles in Porphyromonas, Prevotella, and Parvimonas species isolated from acute endodontic infections [Text] / F. Montagner, R. Castilho Jacinto, F. G. Correa Signoretti [et al.] // Journal of Endodontics. — 2014. — Vol. 40 (3). — P. 339–344. — doi:10.1016/j.joen.2013.10.037. Epub 2013 Dec 12.
350. Mostefaoui, Y. Candida albicans and Streptococcus salivarius modulate IL-6, IL-8, and TNF- α expression and secretion by engineered human oral mucosa cells [Text] / Y. Mostefaoui, C. Bart, M. Frenette [et al.] // Cellular Microbiology. — 2004. — Vol. 6 (11). — P. 1085–1096.
351. Moter, A. Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects [Text] / A. Moter, B. Riep, V. Haban [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2006. — Vol. 44 (9). — P. 3078–3085.
352. Murakami, Y. Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mitis [Text] / Y. Murakami, H. Nagata, A. Amano [et al.] // Infection and Immunity. — 1991. — Vol. 59. — P. 3284–3286.
353. Myneni, S. R. TLR2 signaling and Th2 responses drive Tannerella forsythia-induced periodontal bone loss [Text] / S. R. Myneni, R. P. Settem, T. D. Connell [Text] // Journal of Immunology. — 2011. — Vol. 187 (1). — P. 501–509.
354. Mysak, J. Porphyromonas gingivalis: major periodonto-pathic pathogen overview [Text] / J. Mysak, S. Podzimek, P. Sommerova [et al.] // Journal of Immunology Research. — 2014. — Vol. 2014. — 476068. — doi:10.1155/2014/476068

355. Navarro-San Francisco, M. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a major clinical challenge [Text] / M. Navarro-San Francisco, C. Mora-Rillo¹, M. P. Romero-Gomez [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2012. — Vol. 19 (2). — E72-9. — doi:10.1111/1469-0691.12091
356. Newman, M. G. Антимикробные препараты в стоматологической практике [Текст] / M. G. Newman, A. J. van Vinkelhoff. — М.: Азбука, 2001. — 328 с.
357. Niederman, R. Infection-mediated early-onset periodontal disease in P/E-selectin-deficient mice [Text] / R. Niederman, T. Westernoff, C. Lee [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2001. — Vol. 28. — P. 569–575.
358. Nishimura, E. Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of (hBD-2) on oral streptococci [Text] / E. Nishimura, A. Eto, M. Kato [et al.] // *Current Microbiology*. — 2004. — Vol. 48. — P. 85–87.
359. Nobbs, A. H. Streptococcus adherence and colonization [Text] / A. H. Nobbs, R. J. Lamont, H. F. Jenkinson // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2009. — Vol. 73. — P. 407–450.
360. Novak, M. T. Biomimetic strategies based on viruses and bacteria for the development of immune evasive biomaterials [Text] / M. T. Novak, J. D. Bryers, W. M. Reichert // *Biomaterials*. — 2009. — Vol. 30 (11). — P. 1989–2005.
361. Nussbaum, G. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? [Text] / G. Nussbaum, L. Shapira // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2011. — Vol. 38. — P. 49–59. — doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01678.x
362. Offenbacher, S. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans [Text] / S. Offenbacher, S. Barros, L. Mendoza [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2010. — Vol. 37. — P. 324–333.
363. Offenbacher, S. Gingival transcriptome patterns during induction and resolution of experimental gingivitis in humans [Text] / S. Offenbacher, S. P. Barros, D. W. Paquette [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2009. — Vol. 80. — P. 1963–1982.

364. Okano, S. Proteomics-based analysis of a counter-oxidative stress system in *Porphyromonas gingivalis* [Text] / S. Okano, Y. Shibata, T. Shiroza [et al.] // Proteomics. — 2006. — Vol. 6. — P. 251–258.
365. Oringer, R. J. Modulation of the host response in periodontal therapy [Text] / R.J. Oringer // Journal of Periodontology. — 2002. — Vol. 73. — P. 460–470.
366. Ouhara, K. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells [Text] / K. Ouhara, H. Komatsuzawa, S. Yamada [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2005. — Vol. 55. — P. 888–896.
367. Ozçaka, O. Interleukin-17 and interleukin-18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis [Text] / O. Ozçaka, A. Nalbantsoy, N. Buduneli // Journal of Periodontal Research. — 2011. — Vol. 46 (5). — P. 592–598. — doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01377.x. Epub 2011 Jun 3
368. Page, R. C. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: Inversion of a paradigm [Text] / R. C. Page // Annals of Periodontology. — 1998. — Vol. 3. — P. 108–120.
369. Page, R. C. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction [Text] / R. C. Page, K. S. Kornman // Periodontology 2000. — 1997. — Vol. 14. — P. 9–11.
370. Paino, A. Identification of a novel bacterial outer membraneinterleukin-1beta-binding protein from [Text] / A. Paino, T. Ahlstrand, J. Nuutila [et al.] // Aggregatibacter actinomycetemcomitans. PLoS ONE. — 2013. — Vol. 8. — e70509.
371. Paino, A. Interleukin-1 β is internalised by viable Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm and locates to the outer edges of nucleoids [Text] / A. Paino, E. Lohermaa, R. Sormunen [et al.] // Cytokine. — 2012. — Vol. 60 (2). — P. 565–574.
372. Paino, A. Trimeric form of intracellular ATP synthase subunit beta of Aggregatibacter actinomycetemcomitans binds human interleukin-1beta [Text] / A. Paino, H. Tuominen, M. Jääskeläinen [et al.] // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — e18929.

373. Papathanasiou, E. Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease [Text] / E. Papathanasiou, F. Teles, T. Griffin [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2014. — Vol. 49 (1). — P. 55–61.
374. Paquette, D. W. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases [Text] / D. W. Paquette, R. C. Williams // *Journal of Periodontology*. — 2000. — Vol. 24. — P. 239–252.
375. Paster, B. J. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites [Text] / B. J. Paster, I. Olsen, J. F. Aas [et. el.] // *Periodontology* 2000. — 2006. — Vol. 42. — P. 80–87.
376. Percival, R. S. Effect of temperature on growth, hemagglutination, and protease activity of *Porphyromonas gingivalis* [Text] / R. S. Percival, P. D. Marsh, D. A. Devine [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1999. — Vol. 67. — P. 1917–1921.
377. Pereira, C. A. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis [Text] / C. A. Pereira, B. C. Toledo, C. T. Santos [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. — 2013. — Vol. 76(4). — P. 419–424. — doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.001>
378. Periasamy, S. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel [Text] / S. Periasamy, P. E. Kolenbrander // *Journal of Bacteriology*. — 2009b. — Vol. 191. — P. 6804–6811.
379. Perregaux, D. G. Post-translational processing of murine IL-1: evidence that ATP-induced release of IL-1 alpha and IL-1 beta occurs via a similar mechanism [Text] / D. G. Perregaux, C. A. Gabel // *Journal of Immunology*. — 1998. — Vol. 160. — P. 2469–2477.
380. Peters, J. L. Effects of immunization with natural and recombinant lysine decarboxylase on canine gingivitis development [Text] / J. L. Peters, P. L. DeMars, L. M. Collins [et al.] // *Vaccine*. — 2012. — Vol. 30 (47). — P. 6706–6712. — doi:[10.1016/j.vaccine.2012.08.028](http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.028). Epub 2012 Sep 11.

381. Peyyala, R. Epithelial interleukin-8 re-sponses to oral bacterial biofilms [Text] / R. Peyyala, S. Kirakodu, K. F. Novak [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. — 2011. — Vol. 18. — P. 1770–1772.
382. Peyyala, R. Multispecies biofilms and host responses: “Discriminating the trees from the forest” [Text] / R. Peyyala, J. L. Ebersole // *Cytokine*. — 2013. — Vol. 61. — P. 15–25.
383. Peyyala, R. Novel model for multispecies biofilms that uses rigid gas-permeable lenses [Text] / R. Peyyala, S. S. Kirakodu, J. L. Ebersole [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2011. — Vol. 77. — P. 3413–3421.
384. Peyyala, R. Oral epithelial cell responses to multispecies microbial biofilms [Text] / R. Peyyala, S. S. Kirakodu, K. F. Novak [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2013. — Vol. 92 (3). — P. 235–240.
385. Peyyala, R. Oral microbial biofilm stimulation of epithelial cell responses [Text] / R. Peyyala, S. S. Kirakodu, K. F. Novak [et al.] // *Cytokine*. — 2012. — Vol. 58. — P. 65–72.
386. Pitout, J. D. Enterobacteriaceae that produce extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in the community: the tip of the iceberg? [Text] / J. D. Pitout // *Current Pharmaceutical Design*. — 2012. — Vol. 19. — P. 257–263.
387. Pöllänen, M. T. Environmental stimuli shape biofilm formation and the virulence of periodontal pathogens [Text] / M. T. Pöllänen, A. Paino, R. Ihalin // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2013. — Vol. 14 (8). — P. 17221–17237.
388. Prabhu, A. Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis [Text] / A. Prabhu, B. S. Michalowicz, A. Matheur // *Journal of Periodontology*. — 1996. — Vol. 67. — P. 515–522.
389. Quinn, M. T. Neutrophil Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* [Text] / M. T. Quinn, F. R. DeLeo. — New York: Springer Science+Business Media, 2014. — Vol. 1124. — 551 p. — doi:10.1007/978-1-62703-845-4.

390. Quirynen, M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra — and subgingival plaque formation in man [Text] / M. Quirynen, C. M. Bollen // *Journal of Clinical Periodontology*. — 1995. — Vol. 22. — P. 1–14.
391. Raber-Durlacher, J. E. Experimental gingivitis during pregnancy and postpartum: Clinical, endocrinological, and microbiological aspects [Text] / J. E. Raber-Durlacher, T. J. Van Steenberghe, U. Van der Velden [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 1994. — Vol. 21. — P. 549–558.
392. Rehaume, L. M. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function [Text] / L. M. Rehaume, R. E. Hancock // *Critical Reviews in Immunology*. — 2008. — Vol. 28. — P. 185–200.
393. Rescala, B. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects [Text] / B. Rescala, W. Jr. Rosalem, R. P. Teles [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2010. — Vol. 81. — P. 1308–1316.
394. Rhodes, E. R. Iron acquisition in the dental pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: What does it use as a source and how does it get this essential metal? [Text] / E. R. Rhodes, S. Menke, C. Shoemaker [et al.] // *Biometals*. — 2007. — Vol. 20. — P. 365–377.
395. Roberts, A. Stress and the periodontal diseases: Effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro [Text] / A. Roberts, J. B. Matthews, S. S. Socransky [et al.] // *Oral Microbiology and Immunology*. — 2002. — Vol. 17. — P. 296–303.
396. Rodero, M. P. Skin wound healing modulation by macrophages [Text] / M. P. Rodero, K. Khosrotehrani // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. — 2010. — Vol. 3. — P. 643–653.
397. Rodriguez, E. 17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription [Text] / E. Rodriguez, R. Lopez, A. Paez [et al.] // *Life Sciences*. — 2002. — Vol. 71. — P. 2181–2193.
398. Ross, K. F. Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3 [Text] / K. F. Ross, C. W.

Ronson, J. R. Tagg // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1993. — Vol. 59 (7). — P. 2014–2021.

399. Rudney, J. D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells [Text] / J. D. Rudney, R. Chen, G. J. Sedgewick // *Journal of Dental Research*. — 2005. — Vol. 84 (1). — P. 59–63.

400. Sabharwa, E. R. Antibiotic Susceptibility Patterns of Uropathogens in Obstetric Patients [Text] / E. R. Sabharwa // *North American Journal of Medical Sciences*. — 2012. — Vol. 4 (7). — P. 316–319.

401. Saelim, N. Preparation of sol-gel TiO₂/purified Na-bentonite composites and their photovoltaic application for natural dye-sensitized solar cells [Text] / N. Saelim, R. Magaraphan, Th. Sreethawong // *Energy Conversion and Management*. — 2011. — Vol. 52. — P. 2815–2818.

402. Safonova, A. V. Association of cytokine gene alleles with the inflammation of human periodontal tissue [Text] / A. V. Safonova, A. N. Petrin, S. D. Arutyunov [et al.] // *Acta Naturae*. — 2011. — Vol. 3 (1). — P. 116–122.

403. Saito, T. Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity [Text] / T. Saito, S. Inagaki, K. Sakurai [et al.] // *Archives of Oral Biology*. — 2011. — Vol. 56. — P. 244–250.

404. Samra, J. S. Sepsis and fat metabolism [Text] / J. S. Samra, L. K. M. Summers, K. N. Frayn // *British Journal of Surgery*. — 1996. — Vol. 83. — P. 1186–1196.

405. Sanz, M. Periodontal infections: understanding the complexity — Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology [Text] / M. Sanz, A. J. Van Winkelhoff // *Journal of Periodontology*. — 2011. — Vol. 38. — P. 3–6.

406. Sarah, S. M. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis [Text] / S. M. Sarah, S. Tamilselvan, S. Kamatchiammal [et al.] // *Indian Journal of Dental Research*. — 2006. — Vol. 17. — P. 114–116.

407. Sato, T. Coaggregation between *Prevotella oris* and *Porphyromonas gingivalis* [Text] / T. Sato, F. Nakazawa // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. — 2012. — Vol. 47 (3). — P. 182–186. — doi:10.1016/j.jmii.2012.09.005

408. Sauer, K. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm [Text] / K. Sauer, A. K. Camper, G. D. Ehrlich // *Journal of Bacteriology*. — 2002. — Vol. 184. — P.1140–1154.
409. Saygun, I. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis [Text] / I. Saygun, A. Kubar, S. Sahin [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2008. — Vol. 43. — P. 352–359.
410. Scanapieco, F.A. Микробиоценоз полости рта [Текст] / F. A. Scanapieco // *Микробиология и иммунология для стоматологов* / под ред. Р. Дж. Ламонта, М. С. Лантца, Р. А. Берне, Д. Дж. Лебланка. — М.: Практическая медицина. — 2010. — С. 77–102.
411. Schaible, B. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps [Text] / B. Schaible, C. T. Taylor, K. Schaffer // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2012. — Vol. 56. — P. 2114–2118.
412. Schaible, U. E. Iron and microbial infection [Text] / U. E. Schaible, S. H. Kaufmann // *Nature Reviews Microbiology*. — 2004. — Vol. 2. — P. 946–953.
413. Schenkein, H. A. IL-17 in Sera from Patients with Aggressive Periodontitis [Text] / H. A. Schenkein, T. E. Koertge, C. N. Brooks [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2010. — Vol. 89. — P. 943–947.
414. Scheres, N. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis* [Text] / N. Scheres, M. L. Laine, T. J. De Vries [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2010. — Vol. 45. — P. 262–270.
415. Schlafer, S. Filifactor alocis-involvement in periodontal biofilms [Text] / S. Schlafer, B. Riep, A. L. Griffen [et al.] // *BMC Microbiology*. — 2010. — Vol. 10. — P. 66.
416. Schroeder, H. E. Pocket formation: a hypothesis. In: Lehner, T., Gimasoni, G., eds. *The Borderline between Caries and Periodontal Diseases* [Text] / H. E. Schroeder, R. Attstrom. — London: Academic Press, 1980. — P. 99–123.

417. Scott, D. A. Neutrophils in periodontal inflammation [Text] / D. A. Scott, J. Krauss // *Frontiers of Oral Biology*. — 2012. — Vol. 15. — P. 56–83.
418. Shaniztki, B. Identification of a *Fusobacterium nucleatum* PK1594 galactose-binding adhesin which mediates coaggregation with periopathogenic bacteria and hemagglutination [Text] / B. Shaniztki, D. Hurwitz, N. Smorodinsky [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1997. — Vol. 65. — P. 5231–5237.
419. Shapiro, R. S. Thermal control of microbial development and virulence: Molecular mechanisms of microbial temperature sensing [Text] / R. S. Shapiro, L. E. Cowen // *MBio*. — 2012. — Vol. 3. — doi:10.1128/mBio.00238-12
420. Sharp, L. A lipid A-associated protein of *Porphyromonas gingivalis*, derived from the haemagglutinating domain of the RI protease gene family, is a potent stimulator of interleukin 6 synthesis [Text] / L. Sharp, S. Poole, K. Reddi [et al.] // *Microbiology*. — 1998. — Vol. 144(11). — P. 3019–3026.
421. Sherblom, A. P. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin [Text] / A. P. Sherblom, J. M. Decker, A. V. Muchmore // *Journal of Biological Chemistry*. — 1988. — Vol. 263. — P. 5418–5424.
422. Shin, J. Antibody and T cell responses to *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola* in health and chronic periodontitis [Text] / J. Shin, S. A. Kho, Y. S. Choi [et al.] // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8 (1). — e53703. — doi:10.1371/journal.pone.0053703
423. Shin, J. The fate of *Treponema denticola* within human gingival epithelial cells [Text] / J. Shin, Y. Choi // *Molecular Oral Microbiology*. — 2012. — Vol. 27. — P. 471–482.
424. Shoji, M. Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: Its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization [Text] / M. Shoji, Y. Shibata, T. Shiroza [et al.] // *BMC Microbiology*. — 2010. — Vol. 10. — doi:10.1186/1471-2180-10-152
425. Shu, L. Estrogen modulates cytokine expression in human periodontal ligament cells [Text] / L. Shu, S. M. Guan, S. M. Fu [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2008. — Vol. 87. — P. 142–147.

426. Silva, V. L. Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress [Text] / V. L. Silva, C. G. Diniz, D. C. Cara [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. — 2005. — Vol. 39. — P. 131–138.
427. Sjöholm, A. Aspects of the involvement of interleukin-I and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus [Text] / A. Sjöholm // *Cell Death & Differentiation*. — 1998. — Vol. 5. — P. 461–468.
428. Smalley, J. W. Haemin-restriction influences haemin-binding, haemagglutination and protease activity of cells and extracellular membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* W50 [Text] / J. W. Smalley, A. J. Birss, A. S. McKee [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. — 1991. — Vol. 69. — P. 63–67.
429. Smith, F. N. Cell mediated immune responses to plaque antigens during experimental gingivitis in man [Text] / F. N. Smith, N. P. Lang, H. A. Loe // *Journal of Periodontal Research*. — 1978. — Vol. 13. — P. 232–239.
430. Sobhy, N. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections (in a sample of Egyptian population): analysis of mec gene and staphylococcal cassette chromosome [Text] / N. Sobhy [et al.] // *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. — 2012. — Vol. 16 (5). — P. 426–431.
431. Socransky, S. S. Microbial complexes in subgingival plaque [Text] / S. S. Socransky, A. D. Haffajee, M. A. Cugini [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 1998. — Vol. 25. — P. 134–144.
432. Souto, G. R. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a cross-sectional study in chronic periodontitis [Text] / G. R. Souto, C. M. Queiroz-Junior, M. H. de Abreu [et al.] // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9 (3). — e91636. — doi:10.1371/journal.pone.0091636
433. Spížek, J. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds [Text] / J. Spížek, J. Novotná, T. Rezanka [et al.] // *Journal of Industrial Microbiology*. — 2010. — Vol. 37. — P. 1241–1248.
434. Stathopoulou, P. G. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species [Text] / P. G. Stathopoulou, M. R. Benakanakere,

- J. C. Galicia [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2010. — Vol. 37 (1). — P. 24-29. — doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01505.x
435. Steeves, C. H. Oxidative stress response in the opportunistic oral pathogen *Fusobacterium nucleatum* [Text] / C. H. Steeves, J. Potrykus, D. A. Barnett [et al.] // *Proteomics*. — 2011. — Vol. 11. — P. 2027–2037.
436. Stefani, F.A. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues [Text] / F. A. Stefani, M. B. Viana, A. C. Dupim [et al.] // *Immunobiology*. — 2013. — Vol. 218. — P. 1012–1017.
437. Steinberg, D. The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils [Text] / D. Steinberg, S. Poran, L. Shapira // *Archives of Oral Biology*. — 1999. — Vol. 44. — P. 437–444.
438. Stewart, P. S. New ways to stop biofilm infections [Text] / P. S. Stewart // *Lancet*. — 2003. — Vol. 361. — P. 97.
439. Suci, P. A. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [Text] / P. A. Suci, M. W. Mittelman, F. P. Yu [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 1994. — Vol. 38. — P. 2125–2133.
440. Sutherland, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework [Text] / I. W. Sutherland // *Microbiology*. — 2001. — Vol. 147. — P. 3–9.
441. Svetoch, E. A. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum [Text] / E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. P. Levchuk [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2011. — Vol. 77 (8). — P. 2749–2754.
442. Swaminathan, V. Role of salivary epithelial toll-like receptors 2 and 4 in modulating innate immune responses in chronic periodontitis [Text] / V. Swaminathan, S. Prakasam, V. Puri [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2013. — Vol. 48 (6). — P. 757–765.
443. Takahashi, K. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease [Text] / K. Takahashi, T. Azuma, H. Motohira [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2005. — Vol. 32. — P. 369–374.

444. Takahashi, N. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* [Text] / N. Takahashi // *Oral Microbiology and Immunology*. — 2003. — Vol. 18. — P. 109–113.
445. Takahashi, N. Effect of interleukin-17 on the expression of chemokines in gingival epithelial cells [Text] / N. Takahashi, T. Okui, K. Tabeta [et al.] // *European Journal of Oral Sciences*. — 2011. — Vol. 119. — P. 339–344.
446. Takashiba, S. Gene polymorphism in periodontal health and disease [Text] / S. Takashiba, K. Naruishi // *Periodontology 2000*. — 2006. — Vol. 40 (1). — P. 94–106.
447. Tanaka, S. The detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in tooth, tongue and buccal mucosa plaques in children, using immunoslot blot assay (IBA) [Text] / S. Tanaka, M. Minami, Y. Murakami [et al.] // *Pediatric Dentistry*. — 2006. — Vol. 30 (3). — P. 251–256.
448. Tanner, A. C. R. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults [Text] / A. C. R. Tanner, R. Jr. Kent, T. Dyke Van [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2005. — Vol. 76 (4). — P. 573–581.
449. Tanner, A. C. R. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis [Text] / A. C. R. Tanner, B. J. Paster, S. C. Lu [et al.] // *Journal of Dental Research*. — 2006. — Vol. 85 (4). — P. 318–323.
450. Tetz, G. V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics [Text] / G. V. Tetz, N. K. Artemenko, V. V. Tetz // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2009. — Vol. 53 (3). — P. 1204–1209.
451. Tetz, V. V. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms [Text] / V. V. Tetz, G. V. Tetz // *DNA and Cell Biology*. — 2010. — Vol. 29 (8). — P. 399–405.
452. Thompson, H. L. Effects of anaerobiosis and aerobiosis on interactions of human polymorphonuclear leucocytes with the dental plaque bacteria *Streptococcus mutans*, *Campylobacter*, and *Bacteroides gingivalis* [Text] / H. L. Thompson, J. N. A. Wilton // *Infection and Immunity*. — 1991. — Vol. 59. — P. 932–940.

453. Thurnheer, T. Colonisation of gingival epithelia by subgingival biofilms in vitro: role of “red complex” bacteria [Text] / T. Thurnheer, G. N. Belibasakis, N. Bostanci // Archives of Oral Biology. — 2014. — Vol. 59 (9). — P. 977–986. — doi:10.1016/j.archoralbio.2014.05.023
454. Tonetti, M. S. Neutrophil Migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1 [Text] / M. S. Tonetti, M. A. Imboden, N. P. Lang // Journal of Periodontology. — 1998. — Vol. 69. — P. 1139–1147.
455. Tresse, O. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and β -lactam antibiotics [Text] / O. Tresse, T. Jouenne, G. A. Junter // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 1995. — Vol. 36. — P. 521–526.
456. Triantafilou, K. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis [Text] / K. Triantafilou, A. Hashim, S. Hoch [et al.] // Cell Host & Microbe. — 2014. — Vol. 15 (6). — P. 768–778. — doi:10.1016/j.chom.2014.05.012.
457. Tribble, G. D. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue [Text] / G. D. Tribble, R. J. Lamont // Periodontology 2000. — 2010. — Vol. 52. — P. 68–83.
458. Uehara, A. Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis* [Text] / A. Uehara, M. Naito, T. Imamura [et al.] // Journal of Medical Microbiology. — 2008. — Vol. 57. — P. 500–507.
459. Umeda, J. E. Signaling transduction analysis in gingival epithelial cells after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [Text] / J. E. Umeda, D. R. Demuth, E. S. Ando [et al.] // Molecular Oral Microbiology. — 2012. — Vol. 27. — P. 23–33.
460. Upton, M. Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides [Text] / M.

Upton, J. R. Tagg, P. Wescombe [et al.] // *Journal of Bacteriology*. — 2001. — Vol. 183 (13). — P. 3931–3938.

461. Vardar-Sengul, S. Expression profile of human gingival fibroblasts induced by interleukin-1 β reveals central role of nuclear factor-kappa b in stabilizing human gingival fibroblasts during inflammation [Text] / S. Vardar-Sengul, S. Arora, H. Baylas [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2009. — Vol. 80. — P. 833–849.

462. Vergoten, G. Structural differences between the putative carbohydrate-recognition domains of human IL-1 α , IL-1 β and IL-1 receptor antagonist obtained by in silico modeling [Text] / G. Vergoten, J. P. Zanetta // *Glycoconjugate Journal*. — 2007. — Vol. 24. — P. 183–193.

463. Vernal, R. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis [Text] / R. Vernal, N. Dutzan, A. Chaparro [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2005. — Vol. 32. — P. 383–389.

464. Walters, M. C. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin [Text] / M. C. Walters, F. Roe, A. Bugnicourt [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2003. — Vol. 47. — P. 317–323.

465. Wang, P. L. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts — CD14 and Toll-like receptors [Text] / P. L. Wang, K. Ohura // *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. — 2002. — Vol. 13. — P. 132–142.

466. Warnes, S. L. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health [Text] / S. L. Warnes, C. J. Highmore, C. W. Keevil // *MBio*. — 2012. — Vol. 3(6). — e00489-12.

467. Weinberg, A. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells [Text] / A. Weinberg, C. M. Belton, Y. Park [et al.] // *Infection and Immunity*. — 1997. — Vol. 65 (1). — P. 313–316.

468. Whitmore, S. E. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci [Text] / S. E. Whitmore, R. J. Lamont // *Molecular Microbiology*. — 2011. — Vol. 81. — P. 305–314.

469. Williams, K. B. Randomized clinical trials: is periodontal research good for patients? [Text] / K. B Williams, A. Glaros, M. P. Walker [et al.] // *Periodontology* 2000. — 2012. — Vol. 59 (1). — P. 32–40. — doi:10.1111/j.1600-0757.2011.00430.x
470. Wong, H.L. Interleukin-4 differentially regulates monocytes IL-1 family gene expression and synthesis in vitro and in vivo [Text] / H. L. Wong, G. L. Cost, M. T. Lotze // *Journal of Experimental Medicine*. — 1993. — Vol. 177. — P. 775–781.
471. World Health Organization. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. — Geneva: WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2, 2001. — 105 p.
472. Wu, L. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa* [Text] / L. Wu, O. Estrada, O. Zaborina [et al.] // *Science*. — 2005. — Vol. 309. — P. 774–777.
473. Xu, X. Construction and analysis of hemin binding protein mutants in the oral pathogen *Treponema denticola* [Text] / X. Xu, D. Kolodrubetz // *Research in Microbiology*. — 2002. — Vol. 153. — P. 569–577.
474. Yamanaka, T. Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17 [Text] / T. Yamanaka, T. Furukawa, C. Matsumoto-Mashimo [et al.] // *BMC Microbiology*. — 2009. — Vol. 9, — P. 11. — doi:10.1186/1471-2180-9-11
475. Yamashita, A. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis [Text] / A. Yamashita, T. Sekizuka, M. Kuroda // *Journal of Pathogens*. — 2014. — Vol. 3 (2). — P. 356–376. — doi:10.3390/pathogens3020356
476. Yang, B. Amino acid metabolism related to immune tolerance by MDSCs [Text] / B. Yang, X. Wang, X. Ren // *International Reviews of Immunology*. — 2012. — Vol. 31. — P. 177–183.
477. Yu, J. J. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals [Text] / J. J. Yu, M. J. Ruddy, G. C. Wong [et al.] // *Blood*. — 2007. — Vol. 109. — P. 3794–3802.

478. Yun, P. L. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human gamma interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of *Porphyromonas gingivalis* [Text] / P. L. Yun, A. A. Decarlo, N. Hunter // *Infection and Immunity*. — 1999. — Vol. 67. — P. 2986–2995.
479. Zav'yalov, V. Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis* [Text] / V. Zav'yalov, A. Denesyuk, G. Zav'yaloa [et al.] // *Immunology Letters*. — 1995. — Vol. 45. — P. 19–22.
480. Zav'yalov, V. P. Specific high affinity binding of human interleukin 1 beta by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis* [Text] / V. P. Zav'yalov, T. V. Chernovskaya, E. V. Navolotskaya [et al.] // *FEBS Letters*. — 1995. — Vol. 371. — P. 65–68.
481. Zhao, L. Effect of nonsurgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients [Text] / L. Zhao, Y. Zhou, Y. Xu [et al.] // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2011. — Vol. 38. — P. 509–516.
482. Zilm, P. S. Co-adhesion and biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* in response to growth pH [Text] / P. S. Zilm, A. H. Rogers // *Anaerobe*. — 2007. — Vol. 13. — P. 146–152.
483. Zilm, P. S. Effect of alkaline growth pH on the expression of cell envelope proteins in *Fusobacterium nucleatum* [Text] / P. S. Zilm, A. Mira, C. J. Bagley [et al.] // *Microbiology*. — 2010. — Vol. 156. — P. 1783–1794.
484. Zilm, P. S. The proteomic profile of *Fusobacterium nucleatum* is regulated by growth pH [Text] / P. S. Zilm, C. J. Bagley, A. H. Rogers [et al.] // *Microbiology*. — 2007. — Vol. 153. — P. 148–159.