

УДК: 579: 616.314.17-002.2
© Коллектив авторов, 2013

АНТИЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХРОНИЧЕСКОГО ГРАНУЛИРУЮЩЕГО ПЕРИОДОНТИТА

Гайдаш И.С., Лукьянов В.Г., Ильяно В.М., Абрамова Ю.В., Янчевский А.В., Гайдаш Е.И., Гайдаш Д.И.

ДЗ «Луганский государственный медицинский университет»

Хронический периодонтит имеет преимущественно инфекционное происхождение и развивается под влиянием ассоциаций условно-патогенных бактерий, являющихся аутохтонными обитателями ротовой полости [4,1,2]. Несомненно, что развитие хронической патологии бактериальной этиологии возможно, либо на фоне предшествующего иммунодефицитного состояния организма человека, либо при наличии у возбудителей заболевания достаточно высокого иммуносупрессорного потенциала, способного преодолеть систему иммунных факторов противомикробной защиты.

Важным гуморальным фактором иммунной системы является лизоцим, поступающий в ротовую полость в составе слюны и подавляющий рост и размножение бактерий различной структурной организации [5,3,2]. Дефицит лизоцима, или инактивация его под воздействием протеолитических экзоферментов бактерий, обитающих в ротовой полости, может явиться причиной развития микробного дисбиоза, что и имеет место у больных хроническим периодонтитом [1,3,5]. Однако до настоящего времени антилизоцимная активность (АЛА) этиологически значимых возбудителей хронического периодонтита не исследовалась.

Целью нашего исследования явилось определение АЛА возбудителей хронического гранулирующего периодонтита.

Материалы и методы. Тестированию на АЛА подвергнут 681 штамм бактерий, принадлежащих к 29 видам и к 13 родам: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, *Veillonella*, *Gemella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Stomatococcus*. Указанные микроорганизмы были изолированы от 67 больных хроническим гранулирующим периодонтитом в возрасте от 26 до 53. Мужчин было 39 человек (58,2%), женщин – 28 (41,8%).

Работа выполнялась в соответствии с общепринятыми биоэтическими нормами с соблюдением соответствующих принципов Хельсинской декларации прав человека, Конвенции совета Европы о правах человека и биомедицины и соответствующих законов Украины относительно проведения экспериментальных и клинических исследований.

При микробиологическом исследовании применялись бактериоскопический и бактериологический методы. Материалом для исследования служило патологическое отделяемое, полученное при обработке и раскрытии корневых каналов причинных зубов. Исследуемый материал забирали сухими стерильными ватными тампонами и засеивали на оптимальные для каждого вида микроорганизмов твердые питательные среды.

Идентификацию выделенных культур аэробных и анаэробных бактерий проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим свойствам, а также по признакам

патогенности и антигенной структуры в ориентировочной и титрованной реакции агглютинации с живой культурой, или в реакции преципитации. Для видовой идентификации бактерий использовали диагностические наборы для бактериологических лабораторий «СТАФИтест-16», «СТРЕПТО-тест-16», «ЭНТЕРОКОККУС», «АНАЭРОтест-23» (производства фирмы Микро-ЛА-Тест, АО «Лахема»®, Чехия).

АЛА микроорганизмов изучали спектрофотометрическим методом. Для определения АЛА бактериальную массу исследуемых культур засеивали в 30 мл жидкой питательной среды (для каждого вида бактерий использовали соответствующий тип питательной среды) и культивировали при 37 °С в течение 24-96 часов. На спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм) измеряли оптическую плотность бульонной культуры против питательной среды (Y). Супернатант отделяли от бактериальных клеток центрифугированием в течение 15 минут при 3000 оборотов в минуту.

Для определения АЛА в качестве тест-штамма использовали суточную агаровую культуру *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* (штамм 2665 ГИСК им. Л.А.Тарасевича). Выросшие бактериальные клетки тест-штамма убивали хлороформом в течение 60 минут, смывали, фильтровали через крупнопористый фильтр, дважды отмывали 1/15 М фосфатным буфером с трилоном Б (0,372 г/л буфера) и 1 раз 1/15 М фосфатным буфером, после чего оптическую плотность суспензии микрококка доводили до 0,300. На 1/15 М фосфатном буфере готовили раствор лизоцима с концентрацией 20 мкг/мл. Супернатант исследуемых культур микроорганизмов объемом 0,9 мл смешивали с 0,1 мл приготовленного раствора лизоцима и инкубировали 60-120 минут при 37 °С. Потом 0,5 мл смеси супернатанта и лизоцима добавляли к 2,0 мл суспензии тест-штамма *Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus* и измеряли оптическую плотность полученной смеси через 30 и 150 секунд на спектрофотометре СФ-46 (длина волны 540 нм) против 1/15 М фосфатного буфера. В качестве контроля использовали смесь питательного бульона с лизоцимом в соотношении 9:1. По степени лизиса суспензии тест-культуры рассчитывали АЛА исследуемой культуры по формуле: $A = VI * C * (I - \Delta D0 / \Delta Dk) / V2 * Y$, где А - АЛА, мкг инактивированного лизоцима /мл супернатанта * единицы оптической плотности бульонной культуры; VI – объем супернатанта (0,9 мл) бульонной культуры исследуемого штамма; С – исходная концентрация лизоцима (20 мкг/мл); Y - оптическая плотность бульонной культуры исследованного штамма, единицы оптической плотности; $\Delta D0$ – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в опыте между 30 и 150 секундами, ΔDk – изменение оптической плотности суспензии тест-культуры в контроле между 30 и 150 секундами. Статистическая

обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования АЛА возбудителей хронического периодонтита представлены в таблице 1.

Как следует из материалов, приведенных в таблице 1, все штаммы изолированных и идентифицированных возбудителей хронического пери-

одонтита проявляли способность инактивировать лизоцим *in vitro*. Об этом свидетельствовала частота АЛА, которая для каждого вида патогена составляла 100%, что, несомненно, является генетически детерминированным признаком, выработанным данными видами бактерий в течение длительной адаптации к антиинфекционной системе защиты организма человека.

Таблица 1. Видовой состав и антилизоцимная активность этиологически значимых агентов хронического периодонтита

Виды бактерий	Количество штаммов	Частота АЛА, %	АЛА, мкг/мл единиц оптической плотности
Грамнегативные анаэробные бактерии			
<i>Bacteroides buccae</i>	47	100	0,237±0,012
<i>Bacteroides buccalis</i>	23	100	0,185±0,009
<i>Bacteroides oralis</i>	18	100	0,159±0,008
<i>Bacteroides oris</i>	11	100	0,123±0,006
<i>Bacteroides denticola</i>	24	100	0,181±0,009
<i>Bacteroides veroralis</i>	31	100	0,213±0,01
<i>Bacteroides intermedius</i>	9	100	0,117±0,006
<i>Bacteroides loescheii</i>	33	100	0,241±0,012
<i>Bacteroides pneumosintes</i>	15	100	0,144±0,007
<i>Bacteroides oulorum</i>	8	100	0,109±0,005
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	22	100	0,178±0,009
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	13	100	0,136±0,007
<i>Leptotrichia buccalis</i>	7	100	0,103±0,005
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	100	0,099±0,005
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	19	100	0,158±0,008
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	24	100	0,192±0,010
<i>Wolinella succinogenes</i>	39	100	0,216±0,011
<i>Veillonella dispar</i>	19	100	0,157±0,008
<i>Veillonella atypica</i>	17	100	0,201±0,010
Грамположительные анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии			
<i>Gemella morbillorum</i>	26	100	0,207±0,010
<i>Peptococcus niger</i>	38	100	0,214±0,011
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	44	100	0,229±0,11
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	53	100	0,269±0,013
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	67	100	0,295±0,015
<i>Streptococcus mutans</i>	11	100	0,143±0,007
<i>Streptococcus salivarius</i>	29	100	0,227±0,011
<i>Streptococcus oralis</i>	7	100	0,105±0,005
<i>Streptococcus hansenii</i>	13	100	0,073±0,004
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	9	100	0,087±0,004
Всего	681	-	-

Вместе с тем, определение индивидуального потенциала АЛА для каждого из видов бактерий выявило их различие.

В группе грамположительных анаэробных бактерий, изолированных от больных хроническим периодонтитом, наибольшей АЛА обладали штаммы *B. loescheii*, средний показатель АЛА которых составил в среднем 0,241±0,012 мкг/мл единиц оптической плотности. Более низкую АЛА имели штаммы *B. buccae* – 0,237±0,012 мкг/мл единиц оптической плотности, что несущественно (в 1,02 раза) было ниже, чем у *B. loescheii*. На 3-м месте по выраженности АЛА находились штаммы *W. succinogenes* – 0,216±0,011 мкг/мл оптической плотности, что в 1,12 и в 1,10 раза уступало аналогичным показателям для *B. loescheii* и *B. buccae* ($p > 0,05$ в обоих случаях сравнения). Примерно сходную АЛА демонстрировали и штаммы *B. veroralis* (0,213±0,01 мкг/мл оптической плотности).

АЛА других видов грамположительных возбудителей хронического периодонтита была существенно ниже таковой для указанных ранее представителей рода *Bacteroides*. При этом наименьшая АЛА была присуща *P. melaninogenica* – 0,099±0,005 мкг/мл оптической плотности, что в 2,43 раза было ниже

аналогичного показателя для *B. loescheii* ($p < 0,001$).

В группе грамположительных анаэробных и факультативно анаэробных возбудителей хронического периодонтита АЛА обладали все штаммы идентифицированных видов, в связи, с чем частота АЛА составляла 100%. Однако, по силе выраженности АЛА была разной у разных видов.

Наибольшая интенсивность АЛА была характерна штаммам *S. epidermidis*, которая составляла в среднем 0,295±0,015 мкг/мл единиц оптической плотности. Данный показатель оказался также наибольшим среди всех видов бактерий изолированных от больных хроническим периодонтитом, и в 1,22 раза ($p < 0,05$) превышал АЛА *B. loescheii*, имеющего наибольшую АЛА среди изолированных видов грамположительных патогенов указанного заболевания.

На 2-м месте по силе АЛА, как в группе грамположительных, так и его сравнению с группой грамположительных бактерий, находились штаммы *P. anaerobius*. У представителей данного вида, изолированных из дентрита и гноя зубных каналов от больных хроническим периодонтитом уровень АЛА составил в среднем 0,269±0,013 мкг/мл, единиц оптической плотности. Это было в 1,1 раза

ниже, чем у *S. epidermidis*, но в 1,12 раза выше, чем у штаммов *B. loescheii* ($p > 0,05$ в обоих сопоставлениях).

Второй идентифицированный вид рода *Peptostreptococcus* – *P. asaccharolyticus*, в группе грампозитивных возбудителей хронического периодонтита по силе АЛА занял 3-е место. Показатель АЛА при этом составлял в среднем $0,229 \pm 0,11$ мкг/мл единиц оптической плотности, что в 1,29 раза было ниже аналогичного показателя у *S. epidermidis* ($p < 0,05$), и в 1,05 раза было ниже, чем у *B. loescheii* ($p > 0,05$). То есть по силе АЛА штаммы *P. asaccharolyticus* не уступали штаммам *B. loescheii*.

Сходная АЛА была зарегистрирована и у штаммов *S. salivarius* – $0,227 \pm 0,011$ мкг/мл единиц оптической плотности, что не достоверно отличалось от АЛА *P. asaccharolyticus*.

На 5-м месте по силе АЛА в группе грампозитивных возбудителей хронического периодонтита находились штаммы единственного представителя рода *Peptococcus* – *P. niger* ($0,214 \pm 0,011$ мкг/мл единиц оптической плотности). Данный показатель был в 1,38 раза ниже, чем у штаммов *S. epidermidis* и в 1,13 раза ниже, чем у штаммов *B. loescheii* ($p < 0,01$ и $p > 0,05$, соответственно).

На 6-м месте по силе АЛА в группе грампозитивных возбудителей хронического периодонтита оказались штаммы *G. morbillorum* – $0,207 \pm 0,01$

мкг/мл единиц оптической плотности. Это было в 1,43 раза и в 1,16 раза ниже, по сравнению с аналогичными показателями, выявленными соответственно у штаммов *S. epidermidis* и *B. loescheii* ($p < 0,001$ и $p < 0,05$).

АЛА остальных идентифицированных видов грампозитивных возбудителей хронического периодонтита – *S. oralis*, *S. hansenii* и *S. mucilaginosus*, оказалась существенно ниже, чем у предыдущих патогенов анализируемой группы. Наименьшую АЛА демонстрировали штаммы *S. mucilaginosus* – $0,087 \pm 0,004$ мкг/мл единиц оптической плотности (степень снижения относительно АЛА *S. epidermidis* – 3,39 раза, $p < 0,001$).

Выводы: АЛА обладают все 29 видов бактерий, принадлежащих к родам *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, *Veillonella*, *Gemella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Stomatococcus*, которые были изолированы из патологического материала больных хроническим периодонтитом. Сила АЛА является видоспецифическим признаком, и наиболее выражена из числа грампозитивных бактерий у *S. epidermidis*, а из числа грамотригативных бактерий – у *B. loescheii*.

Перспективы дальнейших исследований. Изолированные виды бактерий будут использованы для изучения их антикомплементарной и антииммуноглобулиновой активности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дорощева Н.Г. Патогенетичне обґрунтування способу лікування загострень хронічного періодонтиту: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.04 [Електронний ресурс] / Н. Г. Дорощева; Луган. держ. мед. ун-т. — Луганськ, 2010. — 16 с.
2. Жуматов У.Ж. Микробиологическая оценка эффективности депо- и апексфореза в лечении деструктивных форм хронического верхушечного периодонтита / У.Ж. Жуматов, Х.Х. Хожиев // Клиническая стоматология. - М., 2011. -N1. - С. 76-77
3. Журочко Е.И. Диагностика и лечение деструктивных форм периодонтита у больных на фоне дисбиоза

- полости рта/ Е. И. Журочко, Н. И. Чепурова, Л. Н. Россаханова // Вісник стоматології. -О., 2010. -N 4. - С. 15-17
4. Карпунина Т.А., Косолапова Е.Ю. Мониторинг микробиологического пейзажа корневых каналов при лечении пациентов с хроническими формами апикального периодонтита. Уральский медицинский журнал. 2008. № 10. С. 53-55.
 5. Николишин А.К. Лечение больных с острым гнойным и обострившимся хроническим верхушечным периодонтитом с использованием дозированного вакуума/ А.К. Николишин, Н.В. Котелевская // Эндодонтист. - К., 2010. -N2. - С. 11-13

Гайдаш И.С., Лукьянов В.Г., Ильяно В.М., Абрамова Ю.В., Янчевский А.В., Гайдаш Е.И., Гайдаш Д.И. Антилизозимная активность возбудителей хронического гранулирующего периодонтита // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 172-174.

Установлено, что 29 видов бактерий родов *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Gemella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Stomatococcus*, изолированных от 67 больных хроническим гранулирующим периодонтитом, проявляли антилизозимную активность (АЛА). Сила АЛА являлась видоспецифическим признаком, и была наиболее выражена из числа грампозитивных бактерий у *S. epidermidis*, а из числа грамотригативных бактерий – у *B. loescheii*.

Ключевые слова: антилизозимная активность, бактерии, хронический периодонтит.

Гайдаш І.С., Лук'янов В.Г., Ільяно В.М., Абрамова Ю.В., Янчевський О.В., Гайдаш О.І., Гайдаш Д.І. Антилізоцимна активність збудників хронічного гранулюючого періодонтиту // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 172-174.

Встановлено, що 29 видів бактерій родів *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Gemella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* і *Stomatococcus*, які були ізольовані від 67 хворих на хронічний гранулюючий періодонтит, виявляли антилізоцимну активність (АЛА). Сила АЛА виявилась видоспецифічною ознакою і була найбільшою з грампозитивних бактерій у *S. epidermidis*, а з грамотригативних – у *B. loescheii*.

Ключові слова: антилізоцимна активність, бактерії, хронічний періодонтит.

Gaidash I.S., Lukianov V.G., Ilyano V.M., Abramova J.V., Ianchevskiy A.V., Gaidash E.I., Gaidash D.I. Antilysozymic activity of causative agents of granulomatous chronic periodontitis // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 172-174.

29 bacterial species of the genera such as *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Gemella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Stomatococcus* which were isolated from 67 patients with chronic granulation periodontitis possess antilysozymic activity (ALA). ALA is species specific property which was most pronounced from gram-positive bacteria in *S. epidermidis*, and from gram-negative bacteria in *B. loescheii*.

Key words: antilysozym activity, bacteria, chronic periodontitis.

Надійшла 11.11.2012 р.
Рецензент: проф. І.В.Тоскутова