УДК 616.314.163:576.8-053.2+615.454.1

Г.А. КАРКИМБАЕВА, Д.Ж. БАТЫРБАЕВА, А.Г. СЕРЕКОВ
Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова
Модуль пропедевтики стоматологии детского возраста и ортодонтии
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

БИОПЛЕНКА, КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ ВЫСОКОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СИСТЕМЫ КОРНЕВЫХ КАНАЛОВ У ДЕТЕЙ

На базе модуля пропедевтики стоматологии детского возраста и ортодонтии было обследовано 16 подростков в возрасте 14-16 лет с диагнозом хронический фиброзный периодонтит. Из системы корневых каналов каждого пациента были взяты мазки для дальнейшего посева и идентификации чистых культур S.mutans и C.albicans. Далее статическим методом была изучена способность данных микроорганизмов формировать биопленки. Данная тема имеет важное практическое значение в клинике детской эндодонтии.
Ключевые слова: *биопленки, биофильмы, хронический фиброзный периодонтит, корневые каналы*

Актуальность. Биопленка (биофильм) – конгломерат микроорганизмов, расположенных на какой-либо поверхности, окруженный внеклеточным (экстрацеллюлярным) матриксом. Внеклеточный матрикс – полимерное вещество, выделяемое микроорганизмами в составе биопленки. [1]

Доказано, что биопленки способны образовывать более 90% изученных видов бактерий, а их формирование выявляется более чем при 80% хронических заболеваний микробной этиологии. [2]

Характерное свойство всех биопленок – их поразительная устойчивость к физическим и биохимическим воздействиям, включающим антибиотико-резистентность (АБ-резистентность). [3]

Биологическое обоснование АБ-резистентности до сих пор до конца не изучено. Фактор, который частично объясняет устойчивость биопленок, включает высокую клеточную плотность и физическое вытеснение АБ из внеклеточного матрикса. В пределах биопленки происходят различные физиологические изменения, такие как: реакция общего стресса, закрытие ключевых метаболических процессов и индукция защитных механизмов. [4]

Популяция микроорганизмов в составе биопленки гетерогенна, то есть она содержит как быстро, так и медленнорастущие бактерии. Ряд из них устойчивы к антибиотикам за счет экспрессии инактивирующих ферментов, другие – не экспрессируют подобные системы. Общая резистентность биопленки зависит от взаимодействия между целой популяцией микроорганизмов и соответствующей терапии антибиотиками широкого спектра действия и антибактериальными препаратами. [3]

Как известно, одна из задач эндодонтического лечения заключается в полной элиминации системы корневых каналов или их сокращении. Прогноз благополучия лечения хронического апикального периодонтита составляет 10 – 20 %, если не проводится этап стерилизации системы корневых каналов (Абрамова Н.Е., Леонова Е.В., 2003; Wessellink P., 2007; Шепелев Б.В., 2008).

Только в случае полной и адекватной дезинфекции полости зуба и корневых каналов исход лечения будет благоприятен. При несвоевременном лечении кариеса возникает осложненный кариес (пульпиты, периодонтиты). [5]

Поэтому на этапах эндодонтического лечения инструментальная и медикаментозная обработки полости зуба и его корневых каналов проводятся для очистки, дезинфекции и для удаления биопленок из стенок полости зуба и корневых каналов. [6]

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования явилось изучение возможности S.mutans и C.albicans, выделенных у детей с диагнозом хронический фиброзный периодонтит из системы корневых каналов, формировать биопленки.

Для достижения данной цели были решены следующие задачи:

1. Найти и изучить информацию о биопленках (биофильмах), а также о наиболее часто применяемых на практике методах определения возможности формирования биопленок различными микроорганизмами.
2. Сформировать исследуемую группу детей с диагнозом хронический фиброзный периодонтит. Провести соответствующие клинические исследования.
3. Подготовить все необходимые материалы и выбрать основной метод для проведения клинико-микробиологического исследования.
4. Провести все необходимые клинико-микробиологические исследования и адекватно интерпретировать результаты.

Материалы и методы исследования. Нами на базе Института стоматологии КазНМУ имени С.Д.Асфендиярова было обследовано 16 подростков в возрасте 14-16 лет с диагнозом хронический фиброзный периодонтит.

Исследуемый материал (содержимое корневых каналов) мы получали из каждого корневого канала пациента с хроническим фиброзным периодонтитом с помощью заранее простерилизованных в сухожаровом шкафу абсорбентов (бумажных пинов) и далее погружали их в пробирки с физиологическими растворами. Пробирки с исследуемым материалом мы доставляли на кафедру микробиологии, вирусологии и иммунологии на посев для последующей идентификации S.mutans и C.albicans. Далее производили посев содержимого корневых каналов из физиологического раствора на кровяной агар и среду Сабуро, чашки Петри помещали в термостат (24 часа, 37°С).

Способность сформировать биопленки мы изучили по статической методике, которая была аналогична как в случае с S.mutans, так и с C.albicans. [9]. Преимущество этого метода в том, что мы можем видеть способность микроорганизмов образовывать биопленки на гидрофобной поверхности пластика и на гидрофильной поверхности стекла.

Этапы выявления формирования биопленок статическим методом:

1. Стерилизуем покровные стекла (помещаем в емкости с этиловым спиртом). Вносим их в стерильные пластиковые чашки Петри по одному стерильным пинцетом. Подсушиваем закрытые чашки со стеклами в термостате.
2. Ночные культуры тестируемых штаммов в разведении 1:100 (в свежей питательной среде: S.mutans на сахарном бульоне, C.albicans на жидком Сабуро) вносим стерильно по 4 мл в чашки со стеклами таким образом, чтобы клеточная суспензия равномерно покрывала дно чашки (рис.1). В качестве контроля фона в одну из чашек с покровным стеклом вносим стерильную питательную среду. Чашки помещаем в термостат (28^{o}, 24 часа) (рис.2).
3. На следующий день содержимое чашек (рис.3) нужно аккуратно удалить, чтобы не повредить сформировавшиеся биопленки. Затем вносим в чашки по 4 мл дистиллированной воды (рис.4) и по 400 мкл 1% спиртового раствора кристалл виолета (рис.5) и оставляем при комнатной температуре на 45 минут (рис.6).
4. Затем окрашенный раствор осторожно отсасываем (рис.7) и 3 раза промываем чашки со стеклами дистиллированной водой, стараясь не повредить окрашенные биопленки, которые образовались на стекле и на дне чашек (рис.8).
5. Подсушиваем чашки со стеклами. В результате получаем визуально определяемую биопленку, если этот микроорганизм способен к образованию биопленок.

Результаты и их обсуждение. Хронический фиброзный периодонтит у исследуемых подростков развился вследствие осложнения кариеса. Окончательный диагноз ставился на основе данных клинических и рентгенологических исследований.

В 100% случаев нам удалось в дальнейшем выделить после посева на питательные среды и с последующей идентификации S.mutans и C.albicans. Идентификацию S.mutans определяли по биохимическим свойствам [7], которые дают положительную реакцию с маннитом и сорбитом, а с сахарозой и перекисью водорода отрицательную. Важно отметить, что по классификации Брауна (1919) S.mutans является α-гемолитическим (зеленящим) стрептококком [8], это его основное культуральное свойство.

На среде Сабуро выросло множество колоний грибов. Колонии C.albicans выглядели как беловато-кремовые, выпуклые и округлые сливочки (C.albicans образуют псевдомицелий). Мы провели микроскопию колоний (они образуют хламидоспоры), похожих по культуральным признакам на C.albicans и таким образом смогли их идентифицировать.

Результаты, полученные статическим методом, были таковы, что C.albicans и S.mutans в 100% случаев образуют биопленки. Биопленка визуально определяется в случае с S.mutans как мелкие окрашенные пятна (рис.9), а в случае с C.albicans как участки более интенсивного окрашивания неправильной формы (рис.10).

Заключение. Способность микроорганизмов образовывать биопленки, говорит об их высокой вирулентной способности, состоящий из экзополисахаридов, выделяемый микробами и несущий важные функции в жизнедеятельности биопленки, и занимающий 85% массы биопленки. Несмотря на название биопленка не является однородной субстанцией, она гетерогенна в пространстве и во времени, сквозь биопленку проходят водные каналы, несущие питательные вещества и вымывающие продукты жизнедеятельности микроорганизмов [10].

Биопленка является мощным биологическим клеем, с помощью которого она прочно прикрепляется к поверхности микроорганизмов, где они находятся под защитным слоем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 G.C.L.Wong, G.A. O'Toole, All together now: Integrating biofilm research across disciplines // MRS Bulletin. – 36. – 2011. - P. 339-342.
2 Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии, 2010. - 2(3). – С. 4-15.
3 Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms // Lancet, 2001. – 358. – P. 135–138.
4 Mah T-FC, OToole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents // Trends Microbiol, 2001. – 9. – P.34–39.
5 Е. В. Боровский Терапевтическая стоматология // Учебник для студентов медицинских ВУЗов. - М.: Медицинское информационное агентство, 2004. - 385 с.
6 Dorlan R.M. ,Costerton J.W. Clinical microbiology Rev. – 2002. - 15. – P. 167-193.
7 В.В. Меньшикова. Лабораторные методы исследования в клинике . Справочник. - М.: Медицина, 1987. - 336 с.
8 В. В. Зверев, М. Н. Бойченко Медицинская микробиология, вирусология и иммунология// В *2-х* т. Том 2. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 34 с.
9 Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов Salmonella Typhimurium // Журн. Микробиол., 2006. - №4. - С.38-42.
10 Solomonov M. Биопленка как эндодонтическая инфекция // Practical_scientific journal Clinisheskaya Endodotiya.- № 3-4. - 2008. – P.31-34.

G.A. KARKIMBAEVA , D.Z. BATYRBAEVA , A.G. SEREKOV
Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov
Module propaedeutics pediatric dentistry and orthodontics
Department of Microbiology , Virology and Immunology

BIOFILM , AS ONE OF THE HIGH VIRULENCE FACTORS OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE ROOT CANAL SYSTEMS OF CHILDREN

Resume: Based on the module propaedeutics of pediatric dentistry and orthodontics were examined 16 adolescents aged 14-16 years with chronic fibrotic periodontitis. From the root canal systems of each patient was taken swabs for further planting and identification of pure cultures S.mutans and C.albicans. Next, a static method was studied the ability of these microorganisms to form biofilms. This theme plays practical importance in the clinic of children endodontics.

Keywords: biofilm , biofilms , chronic fibrotic periodontitis , root canals

А.Ғ. СЕРЕКОВ, Г.А. КАРКИМБАЕВА, Д.Ж. БАТЫРБАЕВА
С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық Медицина университеті
Балалар жасындағы стоматология мен ортодонтия курсы модулі
Микробиология, вирусология және иммунология кафедрасы

БИОҚАБАТ, БҰЛ БАЛАЛАР ТҮБІР ӨЗЕГІ ЖҮЙЕСІНЕН БӨЛІНГЕН МИКРОАҒЗАЛАРДЫҢ ЖОҒАРЫ ВИРУЛЕНТТІЛІК ФАКТОРЫНЫҢ БІРІ

Түйін: Балалар жасындағы стоматология мен ортодонтия курсы модулінде 14-16 жастың аралығындағы созылмалы фиброзды перидонтит диагнозімен 16 жасөспірім тексерілді. Әрбір емделушінің тамырлы арнасының жүйесінен ал- сүртімдер алынды, содан кейін олардың егісі жасалды және S.mutans және C.albicans бірдейлестірілді. Осы микроорганизмдердің биопленкалар жасау мүмкіндігі статикалық методы бойынша белгілі нысанға келтір болды. Клиникалық эндодонтиясында осы жұмыстың өте маңызды практикалық мағынасы бар.

Түйінді сөздер: биоқабат, биофильмдер, созылмалы фиброзды периодонт қабынуы, түбір өзектері.

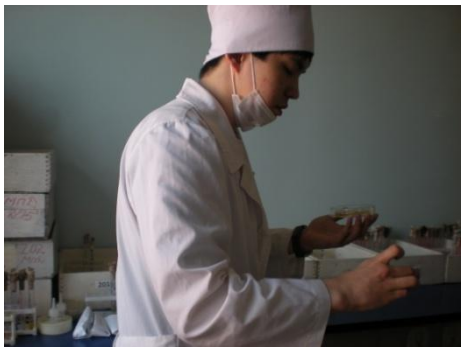

Рисунок 1 - Вносим ночные культуры с жидкой питательной средой в чашки с покровными стеклами

Рисунок 2 - Помещаем чашки с покровными стеклами в термостат

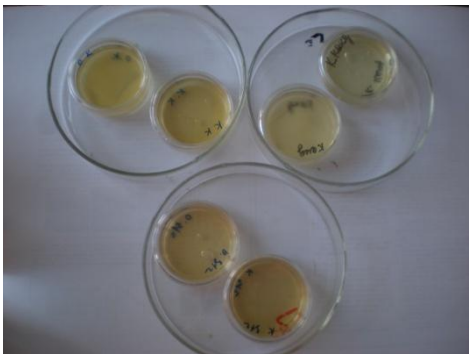

Рисунок 3 - Содержимое чашек на следующий день (находились 1 сутки в термостате)

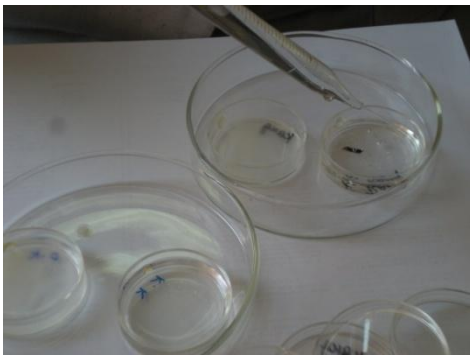

Рисунок 4 - Вносим дистиллированную воду в чашки с покровными стеклами

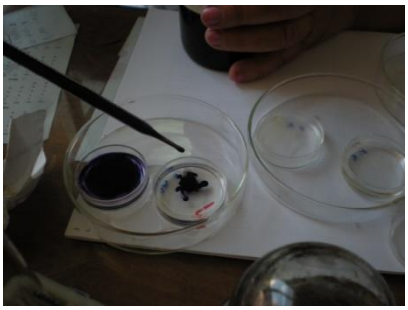

Рисунок 5 - Вносим в чашки с покровными стеклами 1% спиртовой раствор кристалл виолета

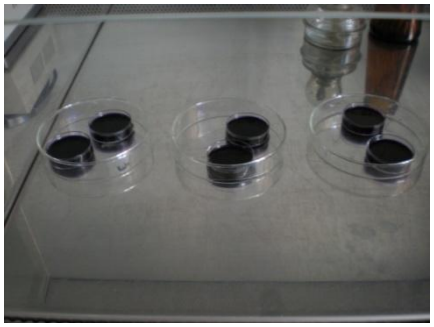

Рисунок 6 - Экспозиция 45 минут при комнатной температуре

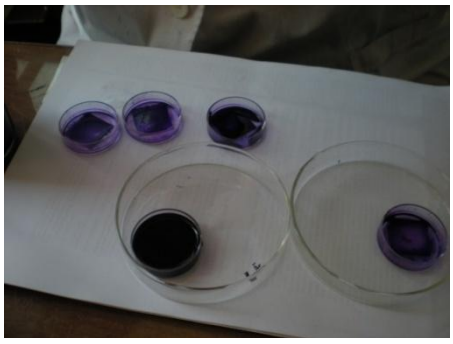

Рисунок 7 - Отсасываем содержимое чашек с покровными стеклами

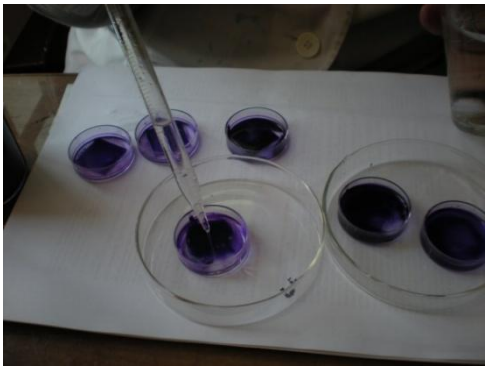

Рисунок 8 - Промываем чашки с покровными стеклами дистиллированной водой

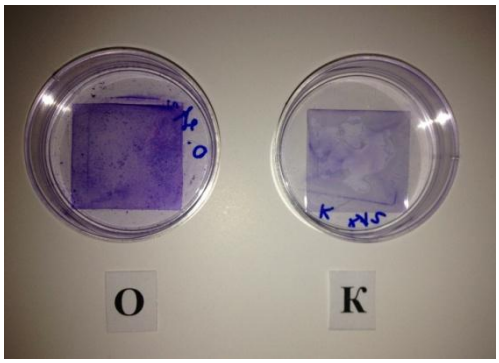

Рисунок 9 - Результаты исследования возможности формирования биопленок культурами S.mutans (О – опыт, К – контроль)

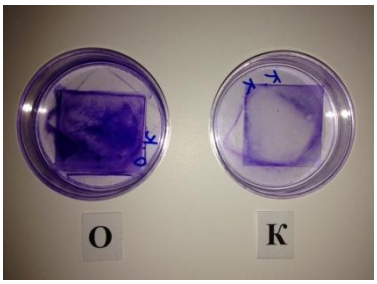

Рисунок 10 - Результаты исследования возможности формирования биопленок культурами C.albicans (О – опыт, К – контроль)

УДК 616.314-089.163-07-08:615.242

Г.А. КАРКИМБАЕВА, Ж.И. РЫСБАЕВА, А.Г. СЕРЕКОВ
Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова
Модуль пропедевтики стоматологии детского возраста и ортодонтии

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИРРИГАЦИОННЫХ СРЕДСТВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ДЕТСКОЙ ЭНДОДОНТИИ

В рамках данной научно-исследовательской работы было проведено клинико-микробиологическое исследование часто используемых ирригационных растворов в клинике детской терапевтической стоматологии. Из системы корневых каналов 16 пациентов в возрасте 14-16 лет с диагнозом хронический фиброзный периодонтит были взяты мазки для дальнейшего посева и идентификации S.mutans и C.albicans. Далее был применен диско-диффузионный метод для изучения клинико-микробиологической характеристики ирригационных растворов. Результаты данной работы имеют важное значение в клинической практике врача-эндодонтиста.
Ключевые слова: *ирригационные растворы, эндодонтическое лечение, корневой канал.*

Актуальность проблемы. В настоящее время большое внимание уделяется проблеме эндодонтического лечения зубов с осложненным кариесом. В структуре стоматологических заболеваний периодонтит занимает третье место после кариеса и пульпита, является одной из наиболее частых причин развития воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области и удаления зубов (Боровский Е.В., 2003; Уразалин Ж.Б., Ибрагимова Р.С., 2005; Копбаева М.Т., Жунусова Л.Ж., 2009).

Как известно, одна из задач эндодонтического лечения заключается в полной элиминации микроорганизмов из системы корневых каналов или их сокращения. [1] При лечении зубов с некротизированной пульпой или проведение повторного эндодонтического лечения при неэффективности первичного вмешательства, элиминация микроорганизмов является более сложной задачей по сравнению с лечением витальных зубов, как с технической, так и микробиологической точки зрения. Это объясняется сложностью анатомического строения системы корневого канала. [2] Когда элементы иммунной системы организма теряют возможность проникать в полость зуба с некротизированной тканью, в системе корневого размножаются условно-патогенные микроорганизмы, способные существовать в условиях дефицита кислорода. Выживанию этих микроорганизмов способствуют органические остатки пульпы и периодонтальный экссудат. Поэтому в зубах с некротизированной пульпой или с неудачно проведенным эндодонтическим лечением скопление микроорганизмов зачастую обнаруживаются в апикальной части корневого канала, где имеется доступ к тканевой жидкости. При хроническом инфекционном процессе бактерии из каналов проникают в дентин через открытые дентинные канальцы. [3]

Большая часть инфекционных процессов в корневом канале являются по своей этиологии полимикробными с преобладанием облигатных анаэробных бактерий. Прогноз благополучия лечения хронического апикального периодонтита составляет 10 – 20 %, если не проводится этап стерилизации системы корневых каналов (Абрамова Н.Е., Леонова Е.В., 2003; Wessellink P., 2007; Шепелев Б.В., 2008). В связи с этим, при эндодонтическом лечении хронического периодонтита возникает необходимость качественной медикаментозной обработки системы корневых каналов, удаления патологически