

УДК 616.31-022

ДИАГНОСТИКА ЭПИТЕЛИАЛЬНО ИНТЕГРИРОВАННОЙ НОРМОФЛОРЫ ПАРОДОНТА И СОСТОЯНИЕ ПАРОДОНТАЛЬНОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

¹Разина И.Н., ²Чеснокова М.Г., ²Недосеко В.Б.

¹БУЗОО «Городская клиническая стоматологическая поликлиника № 1»,
Омск, e-mail: ira241969@mail.ru;

²ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Омск

Целью исследования являлся сравнительный анализ количественных показателей нормофлоры в различных участках биотопа пародонтального кармана и выявление взаимосвязи концентрации эпителиально интегрированных лактобацилл и бифидобактерий с клиническим состоянием тканей пародонта. Исследовалась вариабельность распределения и частота выявления лактобацилл и бифидобактерий в содержимом пародонтального кармана и тканевом биоптате, содержащем микроорганизмы, ассоциированные с эпителием, методом культурального посева. Установлено количественное превалирование эпителиально интегрированной нормофлоры по сравнению с показателями содержимого пародонтального кармана, относительная стабильность ее количественного состава, в большей степени характерная для лактобацилл. Выявлена чувствительность эпителиально интегрированной бифидофлоры к изменению условий в биотопе пародонтального кармана по мере прогрессирования заболевания и взаимосвязь ее количественного содержания с клиническими индексными показателями пародонтального статуса. Количественные показатели эпителиально интегрированной лактофлоры относительно стабильны, что определяет особую роль данных микроорганизмов в формировании экологического барьера на пути распространения пародонтальной инфекции. Полученные данные расширяют представление о механизмах колонизационной резистентности нормобиоты и обуславливают проведение соответствующей пробиотической терапии у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Ключевые слова: пародонтит, лактобациллы, бифидобактерии, воспаление, эпителиально интегрированная микрофлора

DIAGNOSTICS OF EPITHELIAL INTEGRATED NORMAL FLORA AND PERIODONTAL STATUS OF PATIENTS WITH CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS

¹Razina I.N., ²Chesnokova M.G., ²Nedoseko V.B.

¹Municipal dental clinic № 1, Omsk, e-mail: ira241969@mail.ru;

²Omsk State Medical Academy, Omsk

This article tested how clinical state of chronic periodontal patients depends on lactobacilli and bifidobacteria number as main representatives of normoflora. Allocation variability and frequency of lactobacilli and bifidobacteria disclosure in different parts of the periodontal pocket were examined too. This article proves that epithelially integrated representatives of normoflora is concentrated more in periodontal pocket than others microorganisms and their quantity is stable that characterizes lactobacilli. The epithelially integrated normoflora dependence on clinical state of chronic periodontal patients is determined, and article demonstrates how quantity of epithelially integrated normoflora representatives correlates with clinical state of patients. The lactobacilli number is stable, that's why this indicator is very important for making patients resistant to periodontal disease. This article broaden our mind in question of normoflora colonization resistance mechanisms and proves probiotic therapy as periodontal patients treatment.

Keywords: periodontitis, lactobacilli, bifidobacteria, inflammation, epithelial integrated microflora

Воспалительные заболевания тканей пародонта, как правило, сопровождаются дисбиозом, выраженность которого соответствует степени поражения пародонта. Симбионтная микрофлора, адгезированная непосредственно к эпителию слизистой полости рта, формирует барьер колонизационной резистентности и препятствует проникновению патогенной микрофлоры [2, 3]. Однако в доступной нам литературе количественные параметры непосредственно эпителиально интегрированной нормофлоры ранее не изучались. Учитывая вышесказанное, представляет

интерес диагностика нормофлоры, ассоциированной с тканями пародонта, изучение ее количественных показателей и установление взаимосвязи данных показателей с клиническим состоянием пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП).

Среди представителей нормального микробиоценоза полости рта наибольшая физиологическая значимость принадлежит роду *Lactobacillus*, представленному более чем десятью видами [1, 2, 4]. Антагонизм лактобацилл в отношении других микроорганизмов обусловлен образованием

большого количества молочной кислоты, продукцией лизоцима, перекиси водорода, бактериоцинов – лактоцинов, короткоцепочных жирных кислот, диацетила. Существует взаимосвязь количественного содержания молочнокислых бактерий с бактериями рода *Bifidobacterium*. Общими свойствами данных микроорганизмов являются способность к интенсивному кислотообразованию и приспособленность к существованию в кислой среде [7]. Бифидобактерии вырабатывают витамины и антибиотические субстанции, подавляющие рост условно-патогенных микроорганизмов. Механизм подавления нормофлорой условно-патогенной и патогенной микрофлоры также обусловлен конкуренцией за питательные вещества, связыванием рецепторных структур эпителиальных клеток. При этом нормофлора эволюционно приспособлена к условиям полости рта, обладает высокой колонизационной активностью при отсутствии инвазивных свойств, являясь экологическим барьером на пути распространения инфекции [2, 4]. Следовательно, снижение ее концентрации может нарушать барьерные функции эпителия и усугублять воспаление тканей пародонта. Количественные показатели содержания именно представителей рода *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* служат одним из критериев определения степени дисбиоза полости рта [5]. Однако определение концентрации данных микроорганизмов у пациентов с ХГП при помощи стандартных методов забора и бактериологического посева биоматериала затруднено ввиду различного распределения представителей нормофлоры в биотопе пародонтального кармана (ПК), что может быть обусловлено выраженной адгезией к эпителиальным клеткам и особенностями их жизнедеятельности (анаэробы, оптимальный рН лактобактерий 5,5–5,8, бифидобактерий – 6,0). Учитывая, что полость рта является начальным отделом пищеварительного тракта, оптимальным, по нашему мнению, является изучение «пристеночного» состава нормофлоры – эпителиально интегрированной (по аналогии с исследованиями микробиоценоза ЖКТ). Именно в данной части биотопа ПК формируется биопленка с особыми условиями жизнедеятельности микроорганизмов, при этом физиологические свойства микроорганизмов одного вида в составе биопленки и в свободном состоянии могут различаться [6]. Следовательно, представляет интерес изучение количественных показателей нормофлоры в местах ее возможной адгезии и установление взаимосвязи данных

показателей с клиническими критериями воспалительного процесса в пародонте.

Цель исследования – провести сравнительный анализ количественных показателей нормофлоры в содержимом ПК и тканевом биоптате. Выявить зависимость концентрации эпителиально интегрированной нормофлоры тканей пародонта с клиническими индексными показателями степени выраженности воспалительного процесса у пациентов с ХГП.

Материалы и методы исследования

На базе ГКСП № 1 г. Омска было обследовано 90 пациентов с диагнозом ХГП и контрольная группа – 20 человек с интактным пародонтом (всего 51 мужчина и 69 женщин в возрасте от 23 до 69 лет). В ходе исследования проводилась индексная оценка состояния тканей пародонта. Наличие, степень и интенсивность воспалительного процесса в десне оценивали по индексу РМА (модификация С. Parma, 1947), индексу кровоточивости десен Muhlemann (Muhlemann, 1971 модификация Коул, 1975) и йодному числу Свракова (1969). Наличие и степень деструкции тканей пародонта оценивали при помощи пародонтального индекса по Russel (1956). В комплексном обследовании пациентов проводилось микробиологическое исследование материала, полученного путём введения стерильных бумажных штифтов № 30 в ПК или десневую борозду (ДБ) (содержимое ПК – тубсер № 1). Также проводили забор десневого биоптата в области зубодесневого сосочка стерильным инструментом под местной анестезией (тканевой биоптат – тубсер № 2). Забор и лабораторная подготовка биоматериала биоптата предусматривали отделение просветных форм микроорганизмов. Лабораторный этап также включал дезинтеграцию биоматериала, двукратные серийные разведения полученного гомогената, высеив на питательные среды (для выделения лактобактерий использовали лактобакагар, для выделения бифидумбактерий – среду Блаурокка) и определение количественной обсемененности биосубстрата, выраженную через десятичный логарифм величины выросших колоний. Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы Bio Stat 2009, применялись непараметрические критерии сравнения выборок (парный критерий Вилкоксона, U-критерий Манна – Уитни, H-критерий Краскела – Уоллиса) и непараметрический корреляционный анализ по Спирмену с оценкой достоверности результатов по T-тесту. Результаты представлены как $M \pm SE$, где M – среднее выборочное, SE – стандартная ошибка среднего. За уровень статистической значимости был взят $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Представители нормофлоры – лактобациллы и бифидобактерии у пациентов с ХГП в содержимом ПК и тканевом биоптате, содержащем пристеночную часть нормофлоры, выявлялись с различной частотой, их концентрация также отличалась вариабельностью (табл. 1).

Таблица 1

Количественные показатели нормофлоры и ее распределение в содержимом ПК и тканевом биоптате у пациентов с ХГП различной степени тяжести (lg КОЕ/мл и %)

Микроорганизмы		ХГП легкой степени (n = 30)		ХГП средней степени (n = 30)		ХГП тяжелой степени (n = 30)	
		Частота выявления (количество пациентов %)					
Lactobacillus spp.	ПК	36,7%		26,7%		36,7%	
	биоптат	56,6%		63,3%		86,7%	
Bifidobacterium spp.	ПК	20,0%		20,0%		10,0%	
	биоптат	53,3%		50,0%		43,3%	
		Концентрация микроорганизмов в lg КОЕ/мл (M ± SE) и %					
Lactobacillus spp.	ПК	0,53 ± 0,16*	18,5%	0,57 ± 0,16	22,2%	0,53 ± 0,16*	18,7%
	биоптат	2,33 ± 0,26* [∧]	81,5%	2,0 ± 0,19 [∧]	77,8%	2,30 ± 0,2* [∧]	81,3%
Bifidobacterium spp.	ПК	0,33 ± 0,14*	14,0%	0,27 ± 0,13	17,5%	0,17 ± 0,10*	29,8%
	биоптат	2,03 ± 0,23* [∧]	86,0%	1,27 ± 0,20 [∧]	82,5%	0,40 ± 0,15* [∧]	70,2%

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении показателей содержимого ПК и биоптата; [∧] – $p < 0,0001$ в сравнении показателей при ХГП легкой, средней, тяжелой степени; [∧] – $p > 0,05$ в сравнении показателей пациентов с интактным пародонтом.

Лактобациллы обнаруживались у 33,4% пациентов в содержимом ПК и у 68,9% в пристеночной части биотопа ПК. Частота обнаружения бифидобактерий была ниже – 16,7 и 48,9% соответственно, что может быть обусловлено их меньшей приспособленностью к микробиологическим условиям биотопа ПК. Однако в тканевом биоптате данные микроорганизмы обнаруживались в 2,9 и 2,1 раз соответственно чаще, чем при исследовании содержимого ПК. Среднее количество эпителиально интегрированных лактобацилл и бифидобактерий было статистически значимо выше ($p < 0,0001$), чем в содержимом ПК. Отмечался значительный перевес в сторону пристеночной нормобиоты (80,2% лактобацилл и 79,6% бифидобактерий) по сравнению с показателями содержимого ПК (19,8% лактобацилл и 20,4% бифидобактерий). Данные факты выявили эпителиальную интеграцию нормофлоры и подтвердили ее роль в формировании устойчивости эпителиального барьера к проникновению инфекции. По мере утяжеления ХГП происходила статистически значимая убыль бифидобактерий в пристеночной части ПК ($N = 25,76$; $p = 0$). При этом количество лактобацилл было стабильно ($N = 1,25$; $p = 0,63$), что указывает на выраженную защитную, стабилизирующую функцию данных микроорганизмов в биотопе ПК. Стабильность эпителиально интегрированной лактофлоры также подтверждала отсутствие значимых различий ее показателей у пациентов с ХГП по сравнению с показателями интактного пародонта ($p = 0,68$), постоянство концентрации лактофлоры в пристеночном слое при ХГП

различной степени тяжести и рост частоты выявления данных микроорганизмов в биоптате с 54,5% при легком пародонтите до 85,7% при ХГП тяжелой степени. Увеличение частоты высева *Lactobacillus spp.* из биоптата по мере прогрессирования ХГП может быть обусловлено благоприятными условиями для данных микроорганизмов: нарастание ацидоза в биотопе ПК, достаточное количество благоприятного субстрата для адгезии (десквамированного эпителия) и питательной среды (гликогена). При этом количественные показатели бифидобактерий, выделенных из биоптата, сравнимы с показателями интактного пародонта только при ХГП легкой степени ($p = 0,72$). По мере прогрессирования ХГП частота обнаружения бифидобактерий в содержимом ПК уменьшалась в 1,9 раз, незначительно сокращалось количество просветной ($N = 0,65$; $p = 0,89$) и значимо – эпителиально интегрированной бифидофлоры ($N = 25,76$; $p = 0$). Полученные данные выявили большую чувствительность бифидофлоры к изменению условий в биотопе ПК по мере прогрессирования ХГП. Однако в пристеночной части сокращение частоты обнаружения данных микроорганизмов происходило в меньшей степени (с 54,5 до 42,9%). Также немаловажно, что процентное содержание пристеночной бифидофлоры при ХГП легкой и средней степени было относительно стабильно (86,0 и 82,5%), уменьшение в 1,4 раза происходило только при тяжелой степени заболевания. Таким образом, эпителиально интегрированная нормофлора отличается большей стабильностью своего количественного

состава, но обладает различной чувствительностью к изменению условий в биотопе ПК по мере прогрессирования ХГП. Определение концентрации именно пристеночной нормофлоры биотопа ПК при различной степени выраженности клинических проявлений ХГП позволило выявить зависимость данных показателей.

Как видно из представленных результатов, низкая концентрация нормофлоры (до 2 lg КОЕ/мл) соответствовала выраженной воспалительной реакции тканей пародонта, при этом статистически значимых различий показателей при полной ее элиминации и концентрации 2 lg КОЕ/мл не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Клинические индексные показатели состояния тканей пародонта при различной концентрации эпителиально интегрированной нормофлоры

Нормофлора lg КОЕ/мл	Индексы				
	РМА, %	ПИ, баллы	Свракова, баллы	Мюллемана, баллы	
Лактобактерии	0	40,54 ± 6,09 *	4,92 ± 0,61 *	3,12 ± 0,31 *	1,26 ± 0,18 *
	2	52,87 ± 2,45 *	6,50 ± 0,23 *	3,05 ± 0,20 *	1,54 ± 0,08 *
	4	48,54 ± 4,53 *	5,00 ± 0,51 *	2,04 ± 0,23 *	1,51 ± 0,13 *
Бифидобактерии	0	57,89 ± 3,34 *	5,98 ± 0,33 *	3,39 ± 0,28 *	1,72 ± 0,12 *
	2	50,22 ± 3,41 *	5,14 ± 0,41 *	2,85 ± 0,17 *	1,51 ± 0,07 *
	4	27,61 ± 8,31 *	4,29 ± 0,31 *	1,20 ± 0,23 *	0,85 ± 0,11 *

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля.

Следовательно, концентрации эпителиально интегрированной нормофлоры 2 lg КОЕ/мл и менее недостаточно для формирования устойчивости эпителиального барьера, что соответствует состоянию дисбиоза в биотопе ПК и подтверждает уже имеющиеся данные [5]. По мере возрастания концентрации нормобиоты в пристеночной части до 4 lg КОЕ/мл и более степень воспаления тканей пародонта снижалась, но выявленная зависимость была выражена в разной степени по отношению к лакто- и бифидофлоре. Так, сравнение индексных показателей при концентрации лактобацилл до 2 lg КОЕ/мл и при 4 lg КОЕ/мл в пристеночной части биотопа ПК выявило значимое уменьшение только индекса Свракова ($p = 0,0322$). Однако рост содержания бифидобактерий в пристеночной части биотопа ПК до 4 lg КОЕ/мл приводил к значимому уменьшению индекса РМА ($p = 0,0123$), индекса Мюллемана ($p = 0,0004$) и индекса Свракова ($p = 0,0011$). При этом статистически значимая обратная корреляционная зависимость средней силы выявлена в отношении концентрации пристеночной бифидофлоры с показателями индекса РМА ($R = -0,515$; $p = 0$), Мюллемана ($R = -0,4695$; $p = 0$) и Свракова ($R = -0,3904$; $p = 0,0002$). В отношении лактофлоры данной корреляционной зависимости не выявлено. Таким образом, изменение индексных показателей состояния пародонтального статуса в зависимости от концентрации нормофлоры в большей степени сопряжено с показателями содержания бифидофлоры, так как

количество эпителиально интегрированной лактофлоры относительно стабильно и в меньшей степени зависит от степени выраженности воспалительной реакции тканей пародонта.

Выводы

Сочетанное изучение просветного и пристеночного состава микробиоценоза ПК представляет значительный интерес. В биотопе ПК большая часть нормофлоры, обеспечивающая ее колонизационную резистентность, адгезирована к поверхности слизистой оболочки и сохраняет относительную стабильность своего количественного состава даже при возрастании степени тяжести заболевания. Данная закономерность в большей степени характерна для показателей лактофлоры, так как бифидофлора проявила чувствительность к изменению микроэкологических условий ПК по мере прогрессирования заболевания. Концентрация эпителиально интегрированной нормофлоры 4 lg КОЕ/мл и более характеризовала усиление устойчивости эпителиального барьера и, как следствие, приводила к снижению выраженности воспалительной реакции тканей пародонта. Количественные показатели бифидофлоры в большей степени сопряжены с клиническими показателями воспаления тканей пародонта, что наиболее информативно отражали показатели индекса РМА, Мюллемана и йодного числа Свракова. Концентрация эпителиально интегрированной лактофлоры относительно стабильна, что определяет ее ведущую роль

в формировании колонизационной устойчивости эпителиального барьера. Полученные данные расширяют представление о механизмах колонизационной резистентности нормобиоты и обуславливают использование соответствующей пробиотической терапии в комплексном лечении пациентов с ХГП.

Список литературы

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50–80.
2. Горская Е.М. Повышение неспецифической резистентности макроорганизма при пероральном применении эубиотиков из лактобацилл // Иммунобиологические препараты: Сборник науч. трудов. – М., 1989. – С. 181–185.
3. Грудянов А.И., Дмитриева Н.А., Фоменко Е.В. Применение пробиотиков в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. – М.: Мед информ агентство, 2006. – С. 6.
4. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология: учебное пособие. – Н. Новгород: Издательство НГМА, 2004. – С. 158.
5. Хазанова В.В., Рабинович И.М., Земская Е.А., Рабинович О.Ф., Дмитриева Н.А. Изучение микробиоценоза при хронических заболеваниях слизистой оболочки полости рта // Стоматология. – 1996. – Т. 75. – № 2. – 26 с.
6. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H. M. Microbial biofilms // Annu Rev Microbiol. – 1995. – № 49. – P. 711–745.
7. Orrhage K., Nord C.E. Bifidobacteria and lactobacilli in human health // Drugs exp. clin. res. – 2000. – № 3. – P. 95–111.

References

1. Glushanova N.A. Bjulleten sibirskoj mediciny, 2003, no 4, pp. 50–80.
2. Gorskaja E.M. *Povyshenie nespecificheskoj rezistentnosti makroorganizma pri peroralnom primenenii jeubiotikov iz laktobacill. Immunobiologicheskie preparaty* [Increased nonspecific resistance of microorganism with oral eubiotics of lactobacilli. Immunobiologicals], Moscow, 1989, pp. 181–185.
3. Grudyanov A.I., Dmitrieva N.A., Fomenko E.V. *Primenenie probiotikov v kompleksnom lechenii vospalitelnyh zabolevanij parodonta* [Use of probiotics in treatment of inflammatory periodontal diseases], Moscow: Med. Inform. Agency, 2006, pp. 6–21.
4. Zelenova E.G., Zaslavsky M.I., Salina E.V., Rassanov S.P. *Mikroflora polosti rta: norma i patologija* [Oral microflora: norm and pathology], N. Novgorod, 2004. pp. 158.
5. Hazanova V.V., Rabinovich I.M., Zemskaya E.A. *Stomatologija*, 1996, no. 2, pp. 26.
6. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, no. 49, pp. 711–745.
7. Orrhage K., Nord C.E. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. *Drugs exp. clin. Res.* 2000, Vol. 26, no 3, pp. 95–111.

Рецензенты:

Ломиашвили Л.М., д.м.н., доцент, заведующая кафедрой терапевтической стоматологии, ОмГМА, г. Омск;

Турчанинов Д.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, ОмГМА, г. Омск.

Работа поступила в редакцию 28.05.2014.