

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.314.17-08-031.84

Калинина А.Н., Лашко И.С., Царев В.Н., Олесов Е.Е., Степанов А.Ф., Глазкова Е.В., Олесова В.Н.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МЕСТНОГО МЕДИКАМЕНТОЗНОГО ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА (МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ)

ФГБУЗ «Клинический центр стоматологии ФМБА России», 123098, г. Москва;

ГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации ФМБА России», 125371, г. Москва, Россия

В статье приведены результаты микробиологического эксперимента по изучению чувствительности пародонтопатогенов к хвойным полипrenoлам в препарате производства «Солагифт». Оптическая плотность клинических изолятов *Streptococcus constellatus*; *Staphylococcus aureus*; *Fusobacterium nucleatum*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* в процессе культивирования с добавлением концентрата полипrenoлов 1:5 измерялась в течение 3–7 сут. Критерии сравнения: изменение фазы адаптации (лаг-фаза), изменение фазы геометрического роста, амплитуда пика фазы геометрического роста, длительность стационарной фазы, срок отмирания культуры. В сравнении с параметрами пародонтопатогенов в контроле присутствие хвойных полипrenoлов приводило к значительному снижению активности всех микробов по всем критериям, особенно *Staphylococcus aureus*, рост которого полностью подавлялся.

Ключевые слова: хвоя; полипrenoла; пародонтопатогены; чувствительность; микробиология; эксперимент.

Для цитирования: Калинина А.Н., Лашко И.С., Царев В.Н., Олесов Е.Е., Степанов А.Ф., Глазкова Е.В., Олесова В.Н. Новые возможности местного медикаментозного лечения заболеваний пародонта (микробиологическое обоснование). Российский стоматологический журнал. 2018; 22 (4): 180-183. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-4-180-183>

Kalinina A.N., Lasko I.S., Tsarev V.N., Olesov E.E., Stepanov A.F., Glazkova E.V., Olesova V.N.

NEW OPPORTUNITIES LOCAL MEDICAL TREATMENT OF PERIODONTAL DISEASES (MICROBIOLOGICAL RATIONALE)

“Clinical centre of dentistry FMBA of Russia”, 123098, Moscow;

“Institute of advanced training of FMBA of Russia”, 125371, Moscow, Russia

The article presents the results of a microbiological experiment to study the sensitivity of periodontal pathogens to coniferous polyphenols in the preparation of “Solagift”. The optical density of clinical isolates *Streptococcus constellatus*; *Staphylococcus aureus*; *Fusobacterium nucleatum*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* during cultivation with the addition of polyphenol concentrate 1:5 was measured during 3-7 days. Comparison criteria: the change in the phase of adaptation (lag-phase), the phase change of geometric growth, the amplitude of the peak phase of geometric growth, the duration of the stationary phase, the period of the withering away of culture. In comparison with the parameters of periodontal pathogens in the control, the presence of coniferous polyphenols led to a significant decrease in the activity of all microbes according to all criteria, especially *Staphylococcus aureus*, whose growth was completely suppressed.

Keywords: needles; polyphenols; periodontal pathogens; sensitivity; Microbiology; experiment.

For citation: Kalinina A.N., Lasko I.S., Tsarev V.N., Olesov E.E., Stepanov A.F., Glazkova E.V., Olesova V.N. New opportunities local medical treatment of periodontal diseases (microbiological rationale). Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal. 2018; 22(4): 180-183. <http://dx.doi.org/10.18821/1728-2802-2018-22-4-180-183>

For correspondence: Olesov Egor Evgen'evich, Dr. Med. Sci., Professor, E-mail: kc@stomfmba.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 02.11.18

Accepted 16.11.18

Заболевания пародонта – гингивит, пародонтит, периимплантит – по-прежнему встречаются в ежедневной практике врача-стоматолога. Основной причиной воспаления тканей десны разной степени считается патогенное воздействие пародонтопатогенной микрофлоры рта. Среди них: *Streptococcus constellatus*; *Staphylococcus aureus*; *Fusobacterium nucleatum*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [1–10]. Лечебные мероприятия, базирующиеся на элиминации микрофлоры путём профессиональной гигиены рта, включают противомикробные медикаментозные средства.

До настоящего времени актуален поиск эффективных антисептических средств для лечения заболеваний пародонта.

В компании «Солагифт» (г. Томск) разработаны субстанции из хвойной зелени деревьев для наружного применения, среди которых привлекает внимание с позиций возможного использования для лечения заболеваний пародонта концентрат полипrenoлов (75–85 %). Он представляет собой маслянистую жидкость без посторонних включений, цвет от светло-жёлтого до красновато-оранжевого, имеет специфический вкус и запах. По данным компании, препарат полипrenoлов проявляет противовоспалительную и противовирусную активность; оказывает ранозаживляющее действие, значительно ускоряя регенерацию повреждённых

Для корреспонденции: Олесов Егор Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор, E-mail: kc@stomfmba.ru

ных тканей; обладает антиоксидантными и капилляроукрепляющими свойствами; стимулируют обменные процессы в коже. Препарат является биологически-активным компонентом косметических и фармацевтических кремов и мазей, ускоряющих заживление ран и ожогов, повышающих эффективность комплексного лечения хронических заболеваний кожи.

Цель исследования – микробиологическое изучение чувствительности пародонтопатогенов к препарату хвойных полипrenoлов.

Материал и методы

Совместно с Научно-исследовательским медикостоматологическим институтом (НИМСИ) МГМСУ им. А.И. Евдокимова проведены микробиологические исследования целесообразности применения хвойных полипrenoлов в пародонтологии. Для микробиологического изучения чувствительности пародонтопатогенов к хвойным препаратам использовали следующие клинические изоляты микроорганизмов: *Streptococcus constellatus*; *Staphylococcus aureus*; *Fusobacterium nucleatum*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Выделение и культивирование полученных штаммов проводили в соответствии со стандартным протоколом [2]. В данной статье представлено изучение препарата хвойных полипrenoлов в разведении 1 : 5. Критерии сравнения: изменение фазы адаптации (лаг-фаза), изменение фазы геометрического роста, амплитуда пика фазы геометрического роста, длительность стационарной фазы, срок отмирания культуры.

Основой для проведения исследования являлась автоматическая система культивирования микроорганизмов в режиме реального времени – биореактор «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). Данная система предназначена для многоканального культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности (OD) при длине волны $\lambda=850$ нм с использованием встроенного в биореактор дисплея. Оптическая плотность измерялась в единицах Mcf. В графиках динамики оптической плотности обозначения C- и C+ обозначали линии «контроль среды» и «контроль культуры» соответственно. Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовались жидкую питательную среду производства Himedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали тип пробирок TubeSpin®, SW объемом 50 мл с мембранным фильтром для регулирования газообмена (для аэробного и анаэробного культивирования).

Для каждого эксперимента отдельно в стерильных пробирках объемом 8 мл готовили бактериальную взвесь в общем количестве 5 мл. Оптическую плотность полученной взвеси измеряли с помощью денситометра DEN-1B (BioSan, Латвия), которая в конечном итоге для каждого эксперимента составила $0,5 \pm 0,3$ Mcf. Эксперимент продолжался не менее 3 сут, максимум 7 сут.

Результаты и обсуждение

По результатам культивирования клинического изолята *A. Actinomycetemcomitans* с концентратом по-

липrenoлов в контрольной пробирке лаг-фаза длилась до 27 ч (см. рисунок на вклейке). Ускорение бактериального прироста продолжалось в течение 8 ч, что ознаменовало начало логарифмической фазы роста (ускоренный рост на промежутке 27–36 ч). Экспоненциальная фаза роста, характеризующаяся максимальной скоростью деления бактерий, в контрольном образце отмечалась на промежутке с 36-го часа (0,54 Mcf) до 48-го часа (6,00 Mcf). В данной фазе рост клеток происходит с постоянной удельной скоростью, т.е. единица микробной биомассы в единицу времени увеличивается на одну и ту же величину. Однако в первой половине этой фазы деление клеток опережает их рост, клетки мельчают, но во второй половине скорости роста и деления клеток уравниваются. На протяжении всей экспоненциальной фазы клетки продолжают сохранять высокую физиологическую активность, свойственную молодым популяциям. Изменение оптической плотности на данном временном промежутке составило более 5,00 Mcf. Фаза торможения или замедленного роста, характеризующаяся в период линейного роста постоянной скоростью прироста биомассы (числа клеток), была достаточно продолжительной – с 48–78 ч культивирования, с выходом в стационарную фазу культивирования с показателем 7,23 Mcf (78 ч). Соотношение отмирающих, вновь образующихся и покоящихся клеток становится стабильным. Прироста биомассы не наблюдается. Средний показатель стационарной фазы составил $7,20 \pm 0,05$ Mcf.

Значительное удлинение фазы адаптации отмечалось в образце с разведением концентрата 1:5. Ускорение бактериального прироста началось только с 48-го часа культивирования, что почти на 18 ч позже, чем в контрольном образце. Фаза ускоренного роста также была длиннее, чем в других образцах, и выход культуры в экспоненциальный рост был отмечен только к 73-му часу культивирования. Продолжительность лог-фазы 25 ч, максимальный показатель – 5,12 Mcf. Средний показатель в стационарной фазе – $5,25 \pm 0,05$ Mcf, что на 27 % меньше, чем в контрольном образце.

По результатам культивирования клинического изолята *F. Nucleatum* с хвойными полипrenoлами в контрольной пробирке, фаза адаптации продолжалась около 36 ч, первые признаки начала бактериального прироста отмечались после 37-го часа культивирования с менее выраженной фазой ускоренного роста (39–45 ч). Средний показатель изменения оптической плотности составил 0,22 Mcf (снятие показаний OD каждые 3 ч). Экспоненциальная фаза роста, характеризующаяся максимальной скоростью деления бактерий, в контрольном образце отмечалась с 45-го часа (0,45 Mcf) до 73-го часа (4,98 Mcf). В данной фазе отмечается высокая скорость бактериального прироста и изменение оптической плотности в среднем на $5,5 \pm 0,05$ Mcf. Фаза замедленного роста объединяет две фазы – фазу линейного роста ($\mu = \text{const}$) и фазу отрицательного ускорения (98–103 ч). Фаза характеризуется в период линейного роста постоянной скоростью прироста биомассы (числа клеток). Затем при переходе в фазу отрицательного ускорения численность

делящихся клеток уменьшается. Стационарная фаза характеризуется равновесием между погибающими и вновь образующимися клетками. Факторы, лимитирующие рост бактерий в предыдущей фазе, являются причиной возникновения стационарной фазы. Прироста биомассы нет. Средний показатель стационарной фазы составил $5,4 \pm 0,05$ Мсф.

В разведении концентрата в соотношении 1 : 5 отмечалось небольшое увеличение адаптивной фазы с моментальным переходом культуры в фазу логарифмического роста. В данных образцах скорость генерации существенно снижена в сравнении с «классической» лог-фазой, поэтому в данном случае происходит пропорциональное увеличение численности бактериальных клеток – «сбалансированный рост». Необычно быстрое увеличение количества клеток сразу после фазы адаптации, вслед за чем скорость накопления клеток понижается, связано с частичной или полной синхронизацией деления клеток в культуре. Синхронизация культуры наступает в том случае, когда все клетки начинают делиться с почти одинаковой скоростью, при этом зависимость логарифма количества клеток от длительности культивирования приобретает ступенчатый характер в отличие от линейного при обычном асинхронном росте в периодическом режиме культивирования (концентрация исследуемого образца в соотношении 1 : 5). Средний показатель стационарной фазы в концентрациях 1 : 10 и 1 : 5 – $3,44 \pm 0,05$ Мсф, что на 38 % меньше, чем в контрольном образце.

В контрольной пробе наблюдали типичный рост бактериальной популяции *S. aureus* в эксперименте с хвойными полипиренолами. Начальная, или фаза адаптации, составляла 3 ч, после чего ускоренный рост переходил в экспоненциальную фазу, и кривая стремительно достигала максимума на 10-й час (2,53 Мсф). Стационарная фаза была непродолжительной и длилась 5 ч, после чего культура перешла в фазу отмирания. Продолжительность стационарной фазы зависит от состава питательной среды, возраста изначальной культуры, а также от таких процессов, как использование запасных веществ, распад части рибосом и синтез ферментов. По-разному наблюдаемая картина зависит от того, какой именно фактор лимитирует рост бактериальной популяции. Быстрой гибели подвержены лишь очень чувствительные клетки, другие ещё долго сохраняют жизнеспособность, до тех пор, пока есть возможность получать необходимую для этого энергию в процессе окисления каких-либо запасных веществ или клеточных белков. «Урожай» стационарной фазы отмечен средним показателем $2,43 \pm 0,05$ Мсф. Фаза отмирания характеризовалась стадией ускоренной гибели, без перехода в стадию лог-отмирания, так как прослеживалась картина, характеризующаяся превышением количества отмирающих клеток над количеством вновь образующихся, и скорость постоянного отмирания клеток не наблюдалась.

При концентрации 1 : 5 прослеживается явное бактериостатическое воздействие исследуемого образца, поскольку роста не наблюдалось вовсе. Оценка чувствительности к различным концентрациям исследуемого

двумого хвойного полипиренола микроаэрофильного *S. constellatus* показала следующее: фаза адаптации, охватывающая промежуток от момента посева бактерий до видимого начала их роста в контрольной пробирке, продолжалась в среднем до 4 ч культивирования, у сравниваемых образцов отмечено удлинение данной фазы в среднем на 2–4 ч.

Экспоненциальная фаза, характеризующаяся прогрессирующим нарастанием скорости деления клеток, имела достоверные отличия при разведении исследуемого образца в соотношении 1 : 5. В данном образце отмечались и спад скорости генерации популяций, и ярко выраженная фаза замедления. Средний показатель на пике стационарной фазы при разведении 1 : 5 – 1,03 Мсф, что статистически недостоверно в сравнении с контрольным образцом.

Заключение

Таким образом, в сравнении с параметрами культуры изученных пародонтопатогенов в контроле присутствие хвойных полипиренолов приводило к значительному снижению активности всех микробов по всем критериям, особенно *Staphylococcus aureus*, рост которого полностью подавлялся.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиева М.С., Расулов И.М., Магомедов М.А. и др. Комплексная терапия пародонтита с применением сочетанных ирригаций пародонта ионизированной серебром водой и 4% водно-спиртовым раствором прополиса. *Стоматология для всех*. 2016; 1: 32–7.
2. Давыдова М. М., Плахтий Л.Я., Царев В.Н. Выделение и культивирование выделенных штаммов проводили в соответствии со стандартным протоколом. Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии. *Микробиология, вирусология иммунология полости рта. Учебник / под общей редакцией В.Н. Царева*. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2013: 223–68.
3. Казакова А.В., Казанцев А.А. Повышение эффективности комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита тяжелой степени путем применения нового метода подслизистого шинирования. *Сборник статей Второго Евразийского конгресса «Медицина, фармация и общественное здоровье» с международным участием*. Екатеринбург: УГМУ; 2015: 55–8.
4. Кречина, Е.К., Ефремова Н.В., Мустафина Ф.К. и др. Эффективность ФДТ в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. *Клиническая стоматология*. 2016; 2: 34–7.
5. Николаева Е.Н., Балмасова И.П., Ипполитов Е.В. и др. Значение цитокинов ротовой жидкости и пародонтопатогенной микробиоты в развитии гингивита на фоне академического стресса у студентов медицинского вуза. *Медицинский алфавит. Стоматология*. 2017; 1: 31–6.
6. Подпорин М.С., Малазона Т.Т., Кузнецов К.В. Клинико-лабораторное обоснование антимикробной эффективности фотодинамической терапии с разными фотосенсибилизаторами при лечении воспалительных заболеваний полости рта. *Сборник материалов Всероссийской итоговой 76-ой научной конференции. им. Н.И. Пирогова*. Томск: СибГМУ; 2017: 217–8.
7. Самусенко В.О., Подпорин М.С., Малазона Т.Т. Антимикробное действие фотодинамической терапии на возбудителей некластридиальной анаэробной инфекции в тканях пародонта. *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию образования в МГМСУ им. А.И. Евдокимова кафедры общей гигиены*. Москва: РИО МГМСУ, 2016; 2016: 188–90.

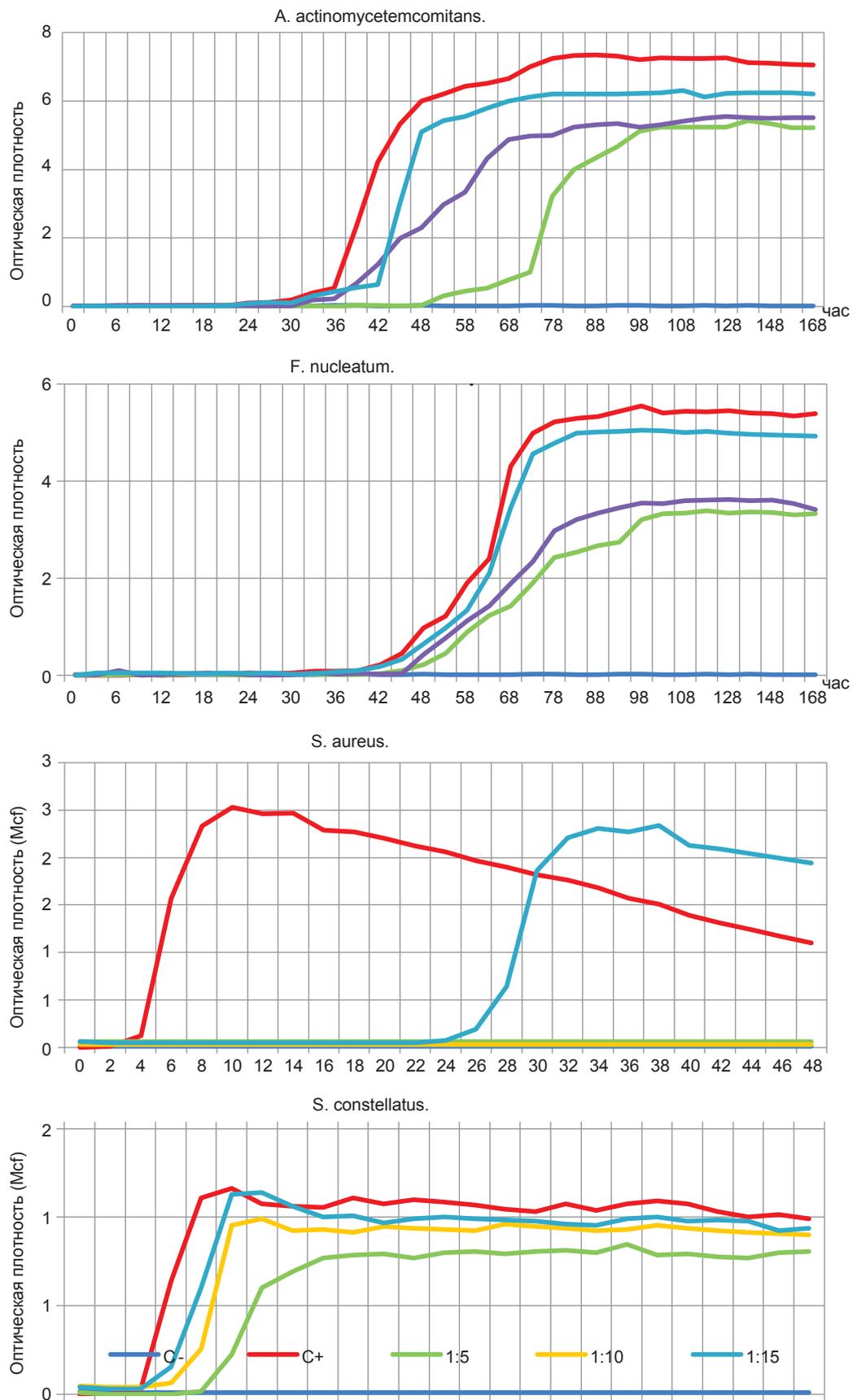
8. Царев В.Н., Арутюнов С.Д., Малазония Т.Т. и др. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции пародонта в экспериментальных и клинических исследованиях. *Клиническая стоматология*. 2015; 4 (76): 14–9.
9. Frolova O., Grudyanov A., Isadzhanian K., Bagaeva V. The results of the laboratory study of antimicrobial safety of bacteriophages in dentistry. *Congrès International Société Française de Parodontologie et d'Implantologie Orale*. Toulouse, France; 2017:10.

REFERENCES

1. Alieva M.S., Rasulov I.M., Magomedov M.A. et al. Complex therapy of periodontitis with the use of combined silver-ionized water and 4% water-alcohol solution of propolis. *Stomatologiya dlya vsekh*. 2016; 1: 32–7. (in Russian)
2. Davydova M.M., Plakhtiy L.Ya., Tsarev V.N. Isolation and cultivation of the isolated strains was carried out in accordance with standard Protocol. Methods of microbiological examination used in dentistry. *Microbiology, Virology immunology of the oral cavity. The textbook / under the General editorship of V.N. Tsarev. [Mikrobiologiya, virusologiya immunologiya polosti rta. Uchebnik / pod obshchey redaktsiyey V.N. TSareva]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013: 223–68. (in Russian)
3. Kazakova A.V., Kazantsev A.A. An increase in the effectiveness of the complex treatment of chronic generalized severe periodontitis by applying a new method of submucosal treatment. *Collection of articles of the Second Eurasian Congress. "Medicine, pharmacy and public health" with international participation. [Sbornik statey Vtorogo Evraziyskogo kongressa. «Meditsina, farmatsiya i obshchestvennoe zdorov'e» s mezhdunarodnym uchastiem]*. Ekaterinburg: UMMU; 2015: 55–8. (in Russian)
4. Krechina E.K., Efremova N.V., Mustafina F.K. et al. The Effectiveness of PDT in the treatment of inflammatory diseases of the periodontal disease. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2016; 2: 34–7. (in Russian)
5. Nikolaeva E.N., Balmasova I.P., Ippolitov E.V. et al. the Importance of oral fluid cytokines and periodontal microbiota in the development of gingivitis against the background of academic stress in medical students. *Meditsinskiy alfavit. Stomatologiya*. 2017; 1: 31–6. (in Russian)
6. Podporin M.S., Malazonia T.T., Kuznetsov K.V. Clinical and laboratory substantiation of antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different photosensitizers in the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity. *Collection of materials of the N.A. Pirogov all-Russian final 76th scientific conference. [Sbornik materialov Vserossiyskoy itogovoy 76-oy nauchnoy konferentsii. im. N.I. Pirogova]*. Tomsk: Siberian State Medical University; 2017: 217–8. (in Russian)
7. Samusenko V.O., Podporin M.S., Malazoniya T.T. Antimicrobial action photodynamic therapy on pathogens of non-clostridial anaerobic infection in periodontal tissues. *Materials All-Russian. scientific-practical. conference with international participation, dedicated to the 70th anniversary of education at MSMSU. A. I. Evdokimov, Department of General hygiene. [Materialy Vserossiyskoy. nauchno-prakticheskoy. konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoy 70-letiyu obrazovaniya v MGMSU im. A.I. Evdokimova kafedry obshchey gigieny]*. Moscow: Moscow state University of medicine of RIO, 2016; 2016: 188–90. (in Russian)
8. Tsarev V.N., Arutyunov S.D., Malazoniya T.T. et al. Evaluation of antimicrobial action of photodynamic therapy on pathogens of non-clostridial anaerobic periodontal infection in experimental and clinical studies. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2015; 76(4): 14 – 9. (in Russian)
9. Frolova O., Grudyanov A., Isadzhanian K., Bagaeva V. The results of the laboratory study of antimicrobial safety of bacteriophages in dentistry. *Congrès International Société Française de Parodontologie et d'Implantologie Orale*. Toulouse, France; 2017:10. (in Russian)

Поступила 02.11.18

Принята в печать 16.11.18



Результаты культивирования клинических изолятов пародонтопатогенов с хвойным полипренолом разного разведения.