

УДК 616.314.17-008.1 + 616.311.2-002)-02-092-053.71.8:576.8.097.21

©М. Т. Слобода

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Фактори вірулентності пародонтопатогенної мікрофлори як етіопатогенний фактор розвитку пародонтиту та гінгівіту в осіб молодого віку

Резюме. У статті наведено дані порівняння активності факторів вірулентності бактерій, виділених в осіб молодого віку, залежно від стану тканин пародонта за показниками індексу Green – Vermillion, а також співвідношення між клінічними формами уражень пародонта та типами виділених мікрокультур.

Ключові слова: пародонтит, гінгівіт, особи молодого віку, фактори вірулентності, пародонтопатогенна мікрофлора.

М. Т. Слобода

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Факторы вирулентности пародонтопатогенной микрофлоры как этиопатогенный фактор развития пародонтита и гингивита у лиц молодого возраста

Резюме. Статья содержит данные сравнения активности факторов вирулентности бактерий, выделенных у лиц молодого возраста в зависимости от состояния пародонта по показателям индекса Green – Vermillion, а также соотношение между клиническими формами поражений тканей пародонта и типами выделенных микрокультур.

Ключевые слова: пародонтит, гингивит, лица молодого возраста, факторы вирулентности, пародонтопатогенная микрофлора.

M. T. Sloboda

Lviv National Medical University by Danylo Halytsky

Virulence factors of parodontopatological microflora as etiology factor of periodontitis and gingivitis among young people

Summary. In article the results of comparing the activity of virulence factors of bacteria isolated among young people, depending on the state of oral performance by index Green – Vermillion, and relationship between clinical forms of parodontium disease and selected types of microcultures.

Key words: periodontitis, gingivitis, young persons, virulence factors, parodontopatological microflora.

Вступ. Захворювання тканин пародонта на даний час є однією з найскладніших проблем стоматології, що зумовлено глобальною поширеністю та інтенсивністю вказаної патології серед населення усіх вікових груп в різних регіонах України [1 – 4, 7].

Серед осіб молодого віку частіше зустрічається гінгівіт, проте з кожним роком у всьому світі зростає кількість запальних захворювань пародонта, які характеризуються глибокими дистрофічно-запальними ураженнями тканин, зокрема підвищується кількість атипичних «агресивних» форм пародонтиту [2, 7].

Розвиток і перебіг пародонтиту в молодих осіб має свої особливості. Переважно захворювання починається непомітно, на перших стадіях – безсимптомно, що значно ускладнює своєчасну діагностику. Розробка методів ранньої діагностики хвороб пародонта та застосування методів профілактики, спрямованих на усунення та мінімізацію дії етіопатогенетичних факторів, є особливо важливими, оскільки лікування уражень на подальших стадіях розвитку є трудомістким, а ефективність – недостатньою [7].

Численні дослідження останніх років дають можливість з певністю вказувати на інфекційний характер етіології та патогенезу хвороб пародонта. При цьому запальні процеси тканин пародонта розглядаються як патологічний процес, спричинений комплексом бактеріальних агентів внаслідок порушення гомеостазу між субгінгівальною мікрофлорою та захисними механізмами організму [1, 2, 5, 6, 10].

Мікроорганізми зубної біляшки, зокрема в субгінгівальній зоні, функціонують як своєрідна мікроекосистема, тобто як єдине ціле. Елементи цієї екосистеми взаємодіють між собою завдяки сигнальним молекулам мікроорганізмів і тканинних факторів. Ця екосистема взаємодіє із тканинами пародонта, регуляторними молекулами ясенної рідини та слини. Як наслідок цього може відбуватися експресія факторів вірулентності мікроорганізмів та медіаторів запального процесу. На основі таких досліджень сформульована «екологічна гіпотеза зубної біляшки», як основа етіопатогенезу хвороб пародонта [3, 4, 15].

Основним етіопатогенетичним фактором субгінгівальної зубної біляшки є комплекс факторів вірулентності її мікробних компонентів [8]. Важливо, що ступінь вірулентності

окремих штамів одного виду може значно відрізнятись, чим пояснюється можливість безсимптомної персистенції або патогенної дії мікроорганізмів [9]. Зокрема, це стосується таких важливих пародонтопатогенів як *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [11], *Porphyromonas gingivalis* [12]. *Bacteroides forsythus* [13].

Матеріали і методи. Обстежено 60 осіб віком 20 – 25 років, з них 38 (54,3 %) – жіночої статі, а 32 (45,7 %) – чоловічої. Стан тканин пародонта оцінювали за допомогою гігієнічного індексу Green – Vermillion та папілярно-маргінально-альвеолярного індексу (РМА). Для уточнення діагнозу та оцінки ступеня деструкції кісткової тканини альвеолярних відростків проводили рентгенологічне дослідження.

Відповідно до класифікації хвороб пародонта М. Ф. Данилевського (1994), генералізований пародонтит I ступеня було діагностовано в 11 осіб (18,3 %), гінгівіт – у 49 (81,7 %) осіб, причому катаральну форму хвороби виявлено у 41 особи, а гіпертрофічну – в 8 осіб (відповідно 83,7 і 16,3% від усіх хворих із гінгівітом).

Для виділення та вивчення мікробіоценозів субгінгівальної зубної біляшки визначення факторів вірулентності бактерій ми розробили відповідну модель за аналогією до даних літератури [16, 14].

Дослідження проводили з використанням стандартних полістиролових панелей з 96 виїмками. Посів матеріалу із субгінгівальної зубної біляшки проводили у виїмці, що містила інкубаційне середовище для бактерій та 10 мг. подрібненого дентину. Інкубаційне середовище містило стерильний фільтрат слини людини і рідкі поживні середовища для різних видів бактерій та мікробних угруповань – бульйон Мюллера-Хілтона з глюкозою або цей же бульйон з кров'ю барана. Для ізоляції *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* використовували середовище з ванкоміцином, який затримує ріст кокової мікрофлори. Планшети поміщали в ексікатор з 5 % CO₂ і вирощували до 5-ти діб із щоденним контролем росту. Для визначення лейкотоксину до виїмок, у яких виявлено ознаки росту *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, вносили суспензію лейкоцитів людини і 0,1 % розчин метиленового синього. Внаслідок дії лейкотоксину лейкоцити втрачали здатність знебарвлювати метиленовий синій; ступінь дії

токсину визначався мікроскопічно за кількістю пошкоджених клітин.

Для визначення гіалуронідазної активності мікрометодом бульйонні культури в дозах 0,01 – 0,02 – 0,03 – 0,04 – 0,05 – 0,06 – 0,07 – 0,08 – 0,09 вносили у пробірки з ізотонічним розчином натрій хлориду, що містив гіалуронову кислоту (0,1мл). Загальний об'єм суміші 0,1 мл. Після інкубації додавали оцтову кислоту для осадження гіалуронової кислоти. Титр гіалуронідази визначали за кількістю фільтрату бульйонної культури, при якому виявлялось повне розчинення гіалуронової кислоти. Числове значення титру має обернену величину щодо активності, тобто чим вища активність гіалорунідази, тим менша кількість фільтрату забезпечує розчинення гіалуронової кислоти.

За аналогічною схемою визначали рівень гемолізинів. Фільтрати бульйонних культур в дозах 0,01 – 0,02 – 0,03 – 0,04 – 0,05 – 0,06 – 0,07 – 0,08 – 0,09 вносили в пробірки з ізотонічним розчином натрій хлориду до кінцевого об'єму 0,1мл, після чого вносили суспензію еритроцитів. Після інкубації в термостаті визначався титр – мінімальна кількість фільтрату, що спричиняла повний гемоліз. Як і в попередніх дослідженнях, числове значення титру має обернену величину щодо активності.

Результати досліджень та їх обговорення.
Від хворих з різними клінічними формами

уражень пародонта одержано 152 змішані мікрокультури бактерій, що розвивались у культуральній рідині (планктонна фаза) та на твердій фазі, тобто на дні, бокових поверхнях і на гранулах дентину. Адсорбція бактерій на поверхні твердої фази вказує на їхні виражені адгезивні властивості як один з факторів вірулентності. На основі аналізу культуральних та морфотинкторіальних властивостей ці культури поділені на кілька типів. Культури першого типу росли переважно в планктонній фазі та містили кокову мікрофлору з поодинокими грамнегативними бактеріями. До другого типу культур віднесено ті, що розвивались у планктонній фазі, але містили кокову мікрофлору й грамнегативні паличкоподібні бактерії та коки. Третій тип культур характеризувався наявністю поліморфних грамнегативних бактерій, що розвивались, фіксуючись на твердій фазі, а в рідкій фазі містили кокову мікрофлору. Четвертий тип мікрокультур містив переважно твердофазну форму, що складалась із грамнегативних бактерій, які формували видимі пристіночні угруповання – *A.actinomycetemcomitans*, а також невелику кількість грампозитивних коків у планктонній фазі.

Співвідношення між клінічними формами уражень тканин пародонта, гігієнічним станом порожнини рота та типами виділених мікрокультур показано в таблиці 1.

Таблиця 1. Залежність мікробіологічних показників від стану тканин пародонта за показниками індексу Green – Vermillion

Мікрокультура	Індекс Green-Vermillion							
	добрий ≤0,6		задовільний 0,7–1,6		незадовільний 1,7–2,5		поганий ≥2,6	
Цисло культур Тип	n	%	n	%	n	%	n	%
1	5	41,6	8	30,8	3	3,9	2	5,4
2	7	58,4	12	46,2	6	7,8	3	8,1
3	–		6	23,0	43	55,8	24	24,9
4	–				25	32,5	8	41,6
усього	12	100	26	100	77	100	37	100

Як видно з даних, приведених у таблиці 1, в осіб з добрим станом гігієни порожнини рота (індекс Green – Vermillion ≤ 0,6) у виділених від пацієнтів мікрокультурах переважала грампозитивна кокова мікрофлора, тобто це були

мікрокультури першого та другого типів. При задовільному стані гігієни порожнини рота (індекс Green – Vermillion становив 0,7 – 1,6) також виділялись мікрокультури цих типів, але 23 % становили мікрокультури з наявністю

поліморфних грамнегативних бактерій на твердій фазі (третій тип). При незадовільному стані гігієни порожнини рота, коли індекс Green – Vermillion дорівнював 1,7 – 2,5, мікрокультури першого і другого типів з переважанням кокової мікрофлори становили разом 11,7 %. У цих пацієнтів виділялись переважно мікрокультури третього типу, а 32,5 % становили мікрокультури четвертого типу, основу яких становили грамнегативні бактерії, що за морфологічними та культуральними властивостями можна віднести до *A.actinomycetemcomitans*. Такі ж співвідношення між типами виділених мікрокультур з переважанням четвертого типу виявлено при поганому стані гігієни порожнини рота (індекс Green – Vermillion $\geq 2,6$). Таким чином, методом змішаних мікрокультур виявлено залежність мікрофлори субгінгівальної зубної бляшки від стану гігієни порожнини рота.

У таблиці 2 показано співвідношення між клінічними формами уражень тканин пародонта та типами виділених мікрокультур. При генералізованому пародонтиті I ступеня виділялись мікрокультури третього – четвертого

типів із переважанням грамнегативної мікрофлори з вираженими адгезивними властивостями, що зумовили розвиток цих мікрокультур на твердій фазі (гранули дентину, дно та стінки виїмок планшетів для культивування). Як елемент мікробіоценозу, ці культури містили *A.actinomycetemcomitans*. При катаральному гінгівіті з незначним поширенням патологічного процесу в м'яких тканинах (низький індекс РМА) виділялись усі чотири типи мікрокультур, але переважно третього типу, які становили 55,0 %. При більш поширеному патологічному процесі (високий індекс РМА) мікрокультури з участю високоадгезивних елементів мікробіоценозу становили 58,3 %. При гіпертрофічному гінгівіті виділялись мікрокультури всіх чотирьох типів, проте третій і четвертий типи становили 61,9 %.

Отже, виявлено залежність мікробіоценозів, які формуються в мікрокультурах, від клінічних форм уражень тканин пародонта. При значно виражених патологічних процесах пародонта виділяються мікрокультури з вираженими адгезивними властивостями.

Таблиця 2. Співвідношення між клінічними формами уражень тканин пародонта та типами виділених мікрокультур

Мікрокультура	Клінічна форма уражень пародонта							
	генералізований пародонтит		катаральний гінгівіт з низьким РМА		катаральний гінгівіт з високим РМА		гіпертрофічний гінгівіт	
Число культур	п	%	п	%	п	%	п	%
Тип								
1	–	–	3	5,0	4	8,3	3	14,3
2	–	–	4	6,7	6	12,5	5	23,8
3	7	30,4	21	55,0	10	20,9	7	33,3
4	16	69,6	32	33,3	28	58,3	6	28,6
Усього	23	100	60	100	48	100	21	100

В одержаних змішаних мікрокультурах визначалась продукція факторів вірулентності – гемолізинів, гіалуронідази, лейкотоксинів. При аналізі зіставлено одержані результати залежно від клінічних форм уражень пародонта. Результати приведено в таблиці 3.

Показники, подані в таблиці, вказують, що титри гемолізинів були практично однаковими в мікрокультурах, виділених при різних клінічних станах і не перевищували (0,07 \pm 0,017) мл.

Найвищу активність гіалуронідази виявлено в мікрокультурах, виділених від пацієнтів, у яких патологічний процес в пародонті поєднувався з ураженням кісткової тканини, виявленим при рентгенологічному дослідженні. Лізис гіалуронової кислоти в цих культурах забезпечувався (0,02 \pm 0,004) мл культуральної рідини. Високу активність гіалуронідази (0,03 \pm 0,009) виявлено в мікрокультурах, виділених у пацієнтів із генералізованим пародонтитом. При катаральному гінгівіті виді-

лялись мікрокультури, в яких активність гіалуронідази була низькою, лізис субстрату забезпечувався $0,07 \pm 0,005 - 0,08 \pm 0,017$ культуральної рідини.

При дослідженні продукції лейкотоксинів встановлено, що найбільший відсоток по-

шкоджених лейкоцитів виявлено в мікрокультурах, виділених у хворих з генералізованим пародонтитом та гінгівітом із високим показником РМА ($77 \pm 2,8$) % і ($63 \pm 3,4$) % відповідно.

Таблиця 3. Фактори вірулентності в змішаних мікрокультурах, виділених при різних клінічних формах уражень тканин пародонта

Клінічна форма	Фактор вірулентності					
	гемолізін		гіалуронідаза		лейкотоксин	
	% позит. культур	середній титр	% позит. культур	середній титр	% позит. культур	середній % пошкодження лейкоцит
Генералізований пародонтит	78	$0,06 \pm 0,015$	83	$0,03 \pm 0,009$	87	$77 \pm 2,8$
Катаральний гінгівіт з низьким РМА	65	$0,05 \pm 0,019$	36	$0,08 \pm 0,017$	32	$24 \pm 1,7$
Катаральний гінгівіт з високим РМА	72	$0,07 \pm 0,017$	54	$0,04 \pm 0,005$	61	$63 \pm 3,4$
Гіпертрофічний гінгівіт	69	$0,06 \pm 0,019$	42	$0,07 \pm 0,005$	35	$37 \pm 1,9$

Одержані дані вказують на участь факторів вірулентності субгінгівальної мікрофлори у патогенезі захворювань тканин пародонта.

Висновки. 1. Одержано змішані мікрокультури бактерій субгінгівальної зубної бляшки, видовий склад яких відрізнявся залежно від

рівня гігієни порожнини рота та клінічної форми уражень тканин пародонта.

2. Виявлено, що при генералізованому пародонтиті I ступеня тяжкості виділяються мікрокультури, які продукують фактори вірулентності — лейкотоксин та гіалуронідазу в значних кількостях.

Список літератури

1. Григорьян А. С. Микроорганизмы в заболеваниях пародонта: этиология, патогенез, диагностика / А. С. Григорьян, С. Ю. Рахметова, Н. В. Зырянова. — М. : ГЭОТАР — Медиа, 2007. — 56 с.
2. Грудянов А. И. Частота выявления различных представителей пародонтопатогенной микрофлоры при пародонтите разной степени тяжести / А. И. Грудянов, В. В. Овчинникова // Стоматология. — 2009. — № 3. — С. 34—37.
3. Данилевський М. Ф. Заболевания пародонта / М. Ф. Данилевський, А. В. Борисенко. — К. : Здоров'я, 2000. — С. 340—346.
4. Данилевський М. Ф. Систематика болезней пародонта / М. Ф. Данилевський // Вісник стоматології. — 1994. — № 1. — С. 16—22.

5. Видовой состав анаэробной микрофлоры пародонтального кармана в зависимости от стадии пародонтита / Н. В. Зырянова, А. С. Григорьян, А. И. Грудянов [и др.] // Стоматология. — 2009. — № 4. — С. 43—47.
6. Пиндус Т. О. Тактика диференційованого лікування генералізованого катарального гінгівіту, що базується на ранній ідентифікації пародонтопатогенної мікрофлори, підлітків та дорослих : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.01.22 «Стоматологія» / Т. О. Пиндус. — Ів.-Фр., 2006. — 36 с.
7. Хоменко Л. А. Заболевания пародонта у лиц молодого возраста: проблема риска и диагностики / Л. А. Хоменко, Н. В. Биденко, Е. И. Остапко // Стоматолог. — 2006. — № 1—2. — С. 54—58.

8. *Fusobacterium nucleatum* Outer Membrane Proteins Fap 2 and Rad Induce Cell Death in Human Lymphocytes / Christopher W. Kaplan, Xiaoyuan Ma, Avina Paranjpe [et al.] // *Infect. Immun.* — 2010. — Vol. 78(11). — P. 4773–4778.
9. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden / R. Claesson, M. Lagervall, C. Högglund-Aberg [et al.] // *Clin. Periodontol.* — 2011. — Vol. 38(2). — P. 115–121. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01643.x. Epub 2010 Nov 14.
10. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray / A. Colombo, S. Boches, S. Cotton [et al.] // *Journal of Periodontology.* — 2009. — Vol. 80. — P. 1421–1432.
11. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents / Daniel H. Fine, Kenneth Markowitz, David Furgang, [et al.] // *Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45(12). — P. 3859–3869.
12. *Porphyromonas gingivalis* virulence factor gingipain RgpB shows a unique zymogenic mechanism for cysteine peptidases / I. de Diego, F. T. Veillard, T. Guevara [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2013. — Vol. 288(20). — P. 14287–4296. doi: 10.1074/jbc.M112.444927. Epub 2013 Apr 4.
13. Hannah M. Wexler *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty / M. Hannah // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2007. — Vol. 20, № 4. — P. 593–621.
14. Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm / O. Oettinger-Barak, S. G. Dashper, D. V. Catmull [et al.] // *J. Oral Microbiol.* — 2013 May 8;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20320. Print 2013.
15. Marsh P. D. How is the development of dental biofilms influenced by the host? / P. D. Marsh, D. A. Devine // *J. Clin. Periodontol.* — 2011. — Vol. 38 (Suppl. 11). — P. 28–35. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01673.x.
16. A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials / William C. Nance¹, Scot E. Dowd², Derek Samarian¹ [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* — 2013. — Vol. 68 (Issue 11). — P. 2550–2560.

Отримано 16.01.15