

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 579.61

©Коллектив авторов

ПРОТЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ

Е.А. Воропаева, А.Л. Байракова, А.М. Бичучер, В.Л. Дьяков, Л.В. Козлов*

ФГУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Роспотребнадзора, Москва; тел.: 8-(495)-452-38-01; факс: 8-(495)-452-18-30; эл. почта: anaerob.lab@mail.ru

Проведено изучение микробного спектра десневой жидкости больных пародонтозом и определение неспецифической протеолитической и специфической IgA1-протеазной активности выделенных микроорганизмов разработанными иммуноферментными методами определения протеолитической активности.

Микробный спектр десневой жидкости больных пародонтозом был представлен условно-патогенными облигатно- и факультативно-анаэробными бактериями. Были выделены и идентифицированы 24 штамма микроорганизмов. Неспецифическая протеолитическая активность найдена у следующих микроорганизмов: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Aerococcus viridans*, *Bifidobacterium longum*, *Neisseria subflava*, *Streptococcus parvulus*, *Eubacterium alactolyticum*, *Lactobacillus cateniforme*, *Bacillus spp.*

Специфической IgA1-протеазной активностью при отсутствии протеолитической активности в отношении IgG обладали *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus hansenii*, *Streptococcus salivarius*, *Leptotrichia buccalis*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Neisseria sicca*. Не была обнаружена протеолитическая активность в средах культивирования *Eubacterium alactolyticum* (1 штамм), *Prevotella buccalis*, *Aerococcus viridans* и *Streptococcus sanguis*.

Ключевые слова: пародонтит, ротовая полость, микрофлора, протеиназы, IgA1-протеиназа, активность, иммуноферментный метод.

ВВЕДЕНИЕ. Пародонтит – хронический воспалительный процесс, характеризующийся неравномерным течением. Как правило, наблюдаются этапы повышенной активности на различных участках пародонта, сопровождаемые периодами покоя. Полное удаление бактериального налета ведет к уменьшению воспаления, однако, остаются деструктивные нарушения, ведущие к потере десневого аттачмента и костной резорбции.

При формировании патологического десневого кармана (пародонтального кармана) при пародонтите резко возрастает концентрация микроорганизмов в десневой жидкости.

Десневая жидкость представляет собой транссудат, который секретируется в области десневого желобка и практически сразу смешивается с микрофлорой слизистой десны и ротовой жидкости. Концентрация бактерий у здорового человека в десневой жидкости составляет не более 100 тыс. клеток в мл, а при развитии гингивита или пародонтита составляет десятки и сотни миллионов. В данном биотопе преобладают нитевидные и извитые облигатно-анаэробные виды бактерий: фузобактерии, лептотрихии, актиномицеты, кампилобактеры,

* - адресат для переписки

спирохеты и др. Это основное место обитания представителей родов группы бактероидов: *Bacteroides*, *Porphyromonas* и *Prevotella*. Здесь также встречаются простейшие, дрожжеподобные грибы, микоплазмы и др.

Количественные и качественные нарушения в составе симбионтов, нарушения их взаимодействия с макроорганизмом имеют решающее значение в возникновении и развитии пародонтита. Задержка пищи, детрита в кармане, нарушение циркуляции жидкости создают оптимальные условия для размножения разнообразной облигатно-анаэробной флоры, включая *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, других представителей группы бактероидов, токсическим факторам которых отводят решающую роль в прогрессировании воспалительного процесса в пародонте.

Традиционные диагностические методы не всегда позволяют разграничить активный пародонтальный процесс и хроническое состояние. Поэтому при наличии пародонтальной симптоматики необходимо использовать тесты, являющиеся специфическими, и позволяющие прогнозировать развитие заболевания и эффективность лечения.

Вирулентность бактерий в значительной степени определяется их ферментативными свойствами, в частности, протеазной активностью [1, 2].

Особое место занимают бактериальные IgA1-протеазы (IgA-специфические постпролиновые эндопептидазы), расщепляющие секреторный и сывороточный IgA1 (подкласс IgA человека).

IgA1-протеаза, наряду с липополисахаридом, является ведущим фактором вирулентности возбудителей бактериальных менингитов (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*), а также ряда других патогенных микроорганизмов, колонизирующих слизистые респираторного и урогенитального трактов: *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus sanguis*, *Prevotella spp.* [3-5]. По данным литературы, регулярно выделяемые из десневых карманов больных пародонтитом виды *Prevotella* (*P. oralis*, *P. veroralis*) и *Capnocytophaga* (*C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. gingivalis*, *C. granulosa*) обладают выраженной IgA1-протеазной активностью [6, 7].

Таким образом, количественное содержание IgA1-протеазы в десневой жидкости может являться критерием развития воспалительного процесса в пародонтальной области.

Целью настоящего исследования явилось изучение микробного спектра десневой жидкости больных пародонтозом и определение неспецифической протеолитической и специфической IgA1-протеазной активности выделенных микроорганизмов.

МЕТОДИКА. Обследовано 7 больных пародонтозом в возрасте 35-55 лет. Для исследования содержимого пародонтального кармана и десневой жидкости использовали метод количественного забора материала микропипетками. Материал помещали в коллекторы с транспортной средой Amies с активированным углем для доставки в лабораторию. Для исследования микрофлоры тщательно суспендировали содержимое тампонов в пробирках с предварительно редуцированным бульоном Шедлера (в соотношении 1:10) и проводили десятикратные серийные разведения до конечной концентрации 10^{-9} . Исследуемый материал из соответствующих разведений в количестве 20 мкл высевали секторами на общие и дифференциально-диагностические питательные среды для выделения и идентификации аэробных и анаэробных бактерий. Родовую и видовую идентификацию осуществляли на основании изучения морфологических, культуральных и биохимических свойств выделенных микроорганизмов согласно руководствам [8, 9].

Для определения протеазной активности наращивали биомассу выделенных штаммов на БС-среде в течение 24-72 ч. Конечная концентрация микроорганизмов в пробах составляла 10^6 КОЕ/мл. Наличие общих и специфических протеаз определяли в образцах культуральной жидкости, очищенных от бактерий и твердых

примесей центрифугированием при 3800 g в течение 20 мин с последующей фильтрацией с использованием фильтров “Миллипор” диаметром 0,1 мкм.

Протеолитическую активность образцов определяли с помощью двух иммуноферментных тест-систем: по способности расщеплять IgG человека и по способности расщеплять IgA1 человека.

Метод основан на измерении степени гидролиза за выбранное время сорбированных в лунках микропанели IgG или IgA1 человека ферментами, находящимися в растворах, помещаемых в лунки. Степень гидролиза измеряли по остаточному количеству IgG или IgA1 с помощью антител к этим иммуноглобулинам, конъюгированных с пероксидазой.

В лунках 96-луночной полистироловой панели (“Медполимер”, Россия) сорбировали (в течение 18 ч при 4°C) IgG и IgA1 человека, добавляя в 1 лунку 90 мкл раствора, содержащего 10 мкг/мл иммуноглобулина. Далее, после двукратной отмывки панели 0,1 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,4, в лунках раститровывали двукратными разведениями культуральную жидкость исследуемых микроорганизмов, используя ФСБ с твином (фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20) от 1 до 1/128 (объем разведений – 100 мкл). Инкубировали 1 ч при 37°C и постоянном перемешивании. Далее, после трехкратной отмывки панели ФСБ в лунки добавляли 100 мкл кроличьих антител, меченных пероксидазой, к соответствующим иммуноглобулинам человека. Инкубировали 1 ч при 37°C при перемешивании. После трёхкратной промывки ФСБ вносили в лунки 100 мкл субстратного буфера (250 мкл 0,02 М раствора тетраметилбензидина в 10 мл 0,15 М цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0). Инкубировали 10 мин при 24°C в темноте до появления выраженной цветной реакции. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл 7% серной кислоты. Оптическую плотность раствора измеряли в лунках при 450 нм. Ферментативную активность микроорганизмов оценивали по изменению оптической плотности в лунках, содержащих разведения культуральной жидкости по сравнению с контролем – ФСБ с твином.

Критерием протеолитической активности служил тангенс угла наклона зависимости оптических плотностей от разведения вносимой культуральной жидкости. Протеолитическая активность, выявляемая этим методом в отношении обоих субстратов IgG и IgA1, считалась неспецифической, а активность по гидролизу исключительно IgA1 считалась специфической IgA1-протеазной. Приведенным методом исследована способность микрофлоры десневой жидкости больных пародонтозом продуцировать протеиназы, обладающие неспецифической и специфической (по гидролизу исключительно IgA1 человека) активностями.

Для исследования устойчивости микроорганизмов к воздействию трипсина культуры, выращенные в мясопептонном бульоне (МПБ), стандартизовали по оптической мутности до 10 ед. мутн. = $0,93 \cdot 10^9$ кл/мл. В пробирки с 3 мл МПБ, содержащего 4% трипсина в опытных пробах и без трипсина в контролях, засевали по 75 мкл стандартизованных клеточных суспензий. Через сутки инкубации при 37°C проводили количественный посев методом четырех секторов из всех пробирок на МПА с 5% дефибринированной бараньей кровью. Результаты учитывали через сутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Микробный спектр десневой жидкости больных пародонтозом был представлен условно-патогенными облигатно- и факультативно-анаэробными бактериями.

Были выделены и идентифицированы 24 штамма микроорганизмов: *Actinomyces israelii* (1), *Actinomyces naeslundii* (1), *Aerococcus viridans* (3), *Bacillus spp.* (1), *Bifidobacterium longum* (1), *Eubacterium alactolyticum* (2), *Lactobacillus cateniforme* (1), *Leptotrichia buccalis* (1), *Neisseria mucosa* (1), *Neisseria sicca* (1), *Neisseria subflava* (1), *Prevotella buccalis* (1), *Streptococcus acidominimus* (1), *Staphylococcus haemolyticus* (1), *Streptococcus hansenii* (1), *Streptococcus salivarius* (2), *Streptococcus sanguis* (1), *Streptococcus parvulus* (2), *Streptococcus porcinus* (1).

ПРОТЕАЗЫ МИКРОФЛОРЫ ПРИ ПАРОДОНТОЗЕ

Следует отметить, что десневая жидкость, взятая даже у одного больного, но из разных мест (верхняя или нижняя челюсть), различалась по своему микробному спектру. Результаты приведены в таблице.

Таблица. Протеолитическая активность микроорганизмов десневой жидкости больных пародонтозом.

№№ эксп	Микроорганизм	Способность расщепить		Специф. IgA1-аза
		IgA1	IgG	
1	<i>Actinomyces israelii</i>	+	+	
2	<i>Aerococcus viridans</i>	+	+	
3	<i>Aerococcus viridans</i>	+	+	
4	<i>Aerococcus viridans</i>	+	+	
5	<i>Bifidobacterium longum</i>	+	+	
6	<i>Neisseria sicca</i>	+	—	+
7	<i>Neisseria subflava</i>	+	+	
	<i>Streptococcus acidominimus</i>			
8	(<i>Aerococcus viridans</i>)	+	—	+
9	<i>Streptococcus hansenii</i>	+	—	+
10	<i>Streptococcus parvulus</i>	+	+	
11	<i>Streptococcus parvulus</i>	+	+	
12	<i>Streptococcus porcinus</i>	+	+	
13	<i>Streptococcus salivarius</i>	+	—	+
14	<i>Streptococcus sanguis</i>	+	+	
15	<i>Streptococcus salivarius</i>	—	—	
16	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	—	+
17	<i>Bacillus spp.</i>	+	+	
18	<i>Eubacterium alactolyticum</i>	+	+	
19	<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	+	
20	<i>Eubacterium alactolyticum</i>	—	—	
21	<i>Prevotella buccalis</i>	—	—	
22	<i>Lactobacillus cateniforme</i>	+	+	
23	<i>Leptotrychia buccalis</i>	+	—	+
24	<i>Neisseria mucosa</i>	+	+	

Наличие активности

+

Отсутствие активности

—

Неспецифическая протеолитическая активность была найдена у следующих микроорганизмов: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Aerococcus viridans*, *Bifidobacterium longum*, *Neisseria subflava*, *Streptococcus parvulus*, *Eubacterium alactolyticum*, *Lactobacillus cateniforme*, *Bacillus spp.*

Специфической IgA1-протеазной активностью при отсутствии протеолитической активности в отношении IgG обладали *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus hansenii*, *Streptococcus salivarius*, *Leptotrychia buccalis*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Neisseria sicca*. Не была обнаружена протеолитическая активность в средах культивирования *Eubacterium alactolyticum* (1 штамм), *Prevotella buccalis*, *Aerococcus viridans* и *Streptococcus sanguis*.

Таким образом, из 24 микроорганизмов специфической IgA1-протеиназной активностью обладали 6 продуцентов, один не обладал протеолитической активностью, а остальные выделяли в культуральную среду неспецифические протеиназы.

Следует отметить, что у одного пациента после проведенного лечения и при клинической картине отсутствия воспаления ранее обнаруженные микроорганизмы, продуцирующие IgA1-протеазу, не были найдены.

В связи с полученными результатами возникает вопрос: почему наиболее патогенные микроорганизмы для защиты от действия IgA макроорганизма создают специфическую IgA1-протеазу, не обладающую активностью в отношении других белков, а не довольствуются неспецифическим ферментом, который способен расщеплять также и IgA? Можно предположить, что микроорганизмы обладают чувствительностью к протеолитической атаке и неспецифическая протеаза может ими секретироваться только в ограниченном количестве, недостаточном для защиты от IgA. В то же время секреция IgA-протеазы ничем не ограничена, поскольку этот высоко специфический фермент на микроорганизм не действует. В пользу такого предположения могла бы свидетельствовать различная чувствительность бактерий к протеолитической атаке, например, к действию трипсина. Можно было бы предположить, что продуценты специфической IgA-протеазы должны быть менее устойчивыми к протеолизу по сравнению с продуцентами неспецифических протеиназ. Устойчивость к действию трипсина была исследована для трех микроорганизмов: *Bacillus spp.*, продуцирующего неспецифическую протеиназу, а также *Streptococcus salivarius* и *Staphylococcus hemolyticus* – продуцентов исключительно специфической IgA1-протеиназы. В первом случае выращивание микроорганизма на среде, содержащей 4% трипсин дало трехкратное подавление роста: $8,7 \cdot 10^8$ КОЕ/мл по сравнению с контролем – $2,85 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Для *Streptococcus salivarius* подавление роста составляло 17 раз – $7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл против $1,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, а для *Staphylococcus hemolyticus* – 8 раз – $1,5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл против $1,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в контроле. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу предложенной гипотезы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Предложен иммуноферментный метод определения протеолитической активности в культуральной среде для выявления продуцентов неспецифических протеиназ и специфической IgA1-протеазы. Приведенным методом исследована способность микрофлоры десневой жидкости больных пародонтозом продуцировать протеиназы, обладающие неспецифической и специфической (по гидролизу исключительно IgA1 человека) активностями. Микроорганизмы, обладающие способностью продуцировать IgA1-протеазу, осуществляют выработку неограниченных количеств этого фермента, что и создает им возможность бороться с IgA хозяина и обуславливают их патогенность.

Полученные результаты могут быть использованы для изучения роли протеиназ в патогенезе заболевания и создания системы мониторинга терапии и эрадикации возбудителей.

Работа поддержана грантом МНТЦ № 631.2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Теймуразов М.Г. (2006) Получение и некоторые свойства менингококковой IgA1-протеазы. Дисс. канд. наук, ФГУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва.
2. Frandsen E.V.G., Kjeldsen M., Kilian M. (1997) Clin. Diagn. Lab. Immunol., **4**, 458-464.
3. Kornfeld S. J., Plaut A. G. (1981) Rev. Infect. Dis., **3**, 521-534.
4. Plaut A. G., Bachovchin W.W. (1994) Methods Enzymol., **244**, 137-151.
5. Kilian M., Reinholdt J., Lomholt H., Poulsen K., Frandsen E.V.G. (1996) APMIS, **104**, 321-338.
6. Fradsen E.V.G., Reinholdt J., Kilian M. (1987) Infect. Immun., **55**, 631-638.
7. Fradsen E.V.G., Wade W.G. (1996) Microbiology, **142**, 441-448.
8. Поздеев О.К. (2005) Медицинская микробиология, ГЭОТАР-Медиа, М.
9. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений (1989) Приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 года, М.

Поступила: 02. 07. 2007.

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF MICROFLORA IN ORAL CAVITY OF PATIENTS WITH PERIODONTITIS

E.A. Voropaeva, A.L. Bajrakova, A.M. Bichucher, V.L. D'yakov, L.V. Kozlov

Gabrichovsky Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia; tel.: 8-(495)-452-38-01; fax: 8-(495)-452-18-30; e-mail: anaerob.lab@mail.ru

Microbial spectrum and non-specific as well as specific IgA1 protease activity of isolated microorganisms were investigated in gingival liquid of patients with periodontitis.

Microorganisms from the gingival liquid of these patients belonged to conditional-pathogenic obligate and facultatively anaerobic bacteria. 24 strains of microorganisms have been identified. Nonspecific proteolytic activity was found in the following microorganisms: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Aerococcus viridans*, *Bifidobacterium longum*, *Neisseria subflave*, *Streptococcus parvulus*, *Eubacterium alactolyticum*, *Lactobacillus cateniforme*, *Bacillus spp.*

Specific IgA1-protease activity and lack of proteolytic activity towards IgG was found in *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus hansenii*, *Streptococcus salivarius*, *Leptotrychia buccalis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Neisseria sicca*. No proteolytic activity was found in cultivation medium of *Eubacterium alactolyticum* (1 strain), *Prevotella buccalis*, *Aerococcus viridans* and *Streptococcus sanguis*.

Key words: periodontitis, a mouth, microflora, proteases, IgA1-protease, activity, ELISA.