

Г.Е.АФИНОГЕНОВ,
д.м.н., профессор

А.Г.АФИНОГЕНОВА,
к.ф.н.

Е.Н.ДОРОВСКАЯ,
ФГУ «РНИИТО
им. Р.Р. Вредена Росздрава»

А.В. ГРОССЕР,
ООО WDS

Антиадгезивная активность зубных паст

Полученные в процессе клинических исследований зубной пасты «R.O.C.S.» данные о значительном улучшении гигиенического состояния полости рта, отмеченная и исследователями и испытуемыми задержка скорости отложения зубного налета [1,2], побудили нас к проведению дополнительных исследований влияния протеолитического фермента бромелайна (одного из ключевых компонентов запатентованного состава) на антиадгезивные свойства зубной пасты «R.O.C.S.».

Установление взаимодействия между патогеном и клеткой-мишенью в результате бактериальной адгезии является определяющим звеном в ходе инфекционного процесса. Прикрепление и последующее размножение микроорганизмов с образованием микроколоний и/или пленки обеспечивает им более выгодные условия существования, связанные, в частности, с противодействием механическому удалению бактерий из макроорганизма. Доказано, что адгезивность болезнетворных микроорганизмов часто коррелирует с их патогенностью и вирулентностью. Так, на авирулентном штамме *Escherichia coli* было продемонстрировано, что перенесенная плазмида, контролирующая синтез антигена K88, усиливает не только адгезию микроорганизмов к щеточной каемке энтероцитов, но и вирулентность экспериментально измененного штамма [3,4,5]. Адгезия *E.coli* к уроэпителию приводит не только к механическому закреплению микроорганизма в новой экологической нише, но и вызывает адекватную новым условиям перестройку метаболизма, механический контакт и связывание P-ворсинок с клеткой эпителия ведут к изменению механизма сборки новых ворсинок (они становятся короче) и яв-

ляются сигналом к экспрессии ряда генов вирулентности *E.coli* (комплекса пар и гемолизина) [6].

Молекулярный механизм бактериальной адгезии является универсальным для патогенных и комменсальных форм, что подтверждено на примере микрофлоры верхних дыхательных путей, нижних отделов пищеварительного и мочеполового трактов [7]. Основой взаимодействия любых биологических систем и межклеточных коммуникаций служит лиганд-рецепторное узнавание [8,9], при котором меньший по размерам и молекулярной массе участник называют лигандом (например, поверхностные структуры клеточной стенки бактерий), а его более крупный комплементарный партнер - рецептором (например, сайты связывания на цитолемме эукариотической клетки).

Лиганды и рецепторы представляют собой полимеры гликолипидной или гликопротеинной природы, состоящие из множественных копий уникальных в каждом случае субъединиц и определяющие тропизм различных патогенов к своим клеткам-мишеням [10]. Именно последнее обстоятельство способствует колонизации бактериями тканей макроорганизма с повышенной плотностью рецепторов [9]. In vivo на процесс адгезии существенное влияние оказывают растворенные компоненты биологических жидкостей и секретов, с которыми патогены чаще встречаются до контактов с клетками-мишениями и которые по химическому строению аналогичны клеточным рецепторам. Orksov и Birch-Anderson (1980) [11] продемонстрировали, что *E. coli* адгезирует к мукину слюны раньше, чем к эпителию ротовой полости. Способностью адсорбировать белковые компоненты слюны обладают стрептококки полости рта (*Streptococcus sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*), причем в исследовании было показано, что

нарушить эту адгезию возможно с помощью протеолитического фермента трипсина [12].

Показатели адгезии как многофакторного процесса зависят от большого числа условий, как со стороны бактерий, так и макроорганизма. Известно, что видовая принадлежность в значительной степени характеризует адгезивные свойства бактерий. Так, *Streptococcus mutans* практически не фиксируется на эпителиоцитах языка и щек, но необратимо прикрепляется к поверхности зубов [13]. Arbuthnott и Smith (1979) [5] отмечают, что адгезивность *St. pyogenes* к эпителиальным клеткам ротовой полости в 6 раз выше, чем у *E. coli*. Для целого ряда микроорганизмов показана прямая связь степени гидрофобности клеточной поверхности и адгезивности. Так, *St. aureus* из гнойных очагов более гидрофобен, чем из окружающей среды, полости носа, поверхности кожи [4].

К факторам, влияющим на адгезивные свойства тканей и клеток хозяина, относится индивидуальное состояние пациента: высокая степень колонизации эпителиоцитов ротовой полости *Str. pyogenes* у больных различными воспалительными заболеваниями, снижение этого показателя у носителей и практически полное отсутствие у здоровых людей [4]. Существует разница в прикреплении микроорганизмов к разным участкам в пределах одного макроорганизма. Для *Str. salivarius* и *St. aureus* нижняя поверхность языка рассматривается как богатая рецепторами зона и наиболее благоприятная для инвазии область [13]. На вариабельность рецепторного аппарата эпителиоцитов может оказывать влияние и гетерогенность клеточной популяции, обусловленная физиологическими изменениями поверхностных структур клеток при дифференциации или старении. Патологические изменения тканей макроорганизма создают дополнительные условия, способствующие адгезии микроорганизмов [14].

Изучение молекулярной природы лиганд-рецепторных комплексов, образующихся при взаимодействии различных бактерий с соответствующими

им клетками-мишениями, а также факторов, влияющих на процесс адгезии *in vivo* и *in vitro*, позволяет разработать профилактические меры, направленные на подавление ранних этапов инфекционного процесса.

В основе поисков антиадгезивных препаратов лежит создание эффективных препятствий с разнообразными механизмами действия при установлении взаимодействия между лигандами и рецепторами. Одним из наиболее известных механизмов, с учетом которого осуществляется подбор ингибиторов процесса адгезии, является введение в систему бактерии - эукариотические клетки растворимых веществ, конкурирующих с лигандами или рецепторами за места связывания на клеточных поверхностях [9]. При этом все растворимые соединения можно разделить на две группы, способные реагировать либо с бактериальными, либо с эукариотическими клетками. Избирательное связывание лигандов микроорганизмов предпочтительнее, так как в меньшей степени влияет на рецепторный аппарат клеток-мишеней, а через него на самые разнообразные процессы в тканях макроорганизма [15].

К настоящему времени известны многочисленные экспериментальные доказательства того, что применение природных или синтетических аналогов клеточных рецепторов и компонентов тканевых жидкостей способно значительно снизить, а в отдельных случаях и полностью предотвратить прикрепление микроорганизмов к клеткам хозяина [9,15,16]. Установлены факты взаимодействия бактериальных лигандов с белками, гликопротеинами плазмы крови (иммуноглобулином классов A и G, p2-микроглобулином, фибриногеном, фибронектином, альбумином, трансферрином, а также некоторыми другими [4,16,17], мочи (TH-белком) [18,19], слюнами (муцином, агглютининами) [20], что позволило использовать большинство из перечисленных выше соединений в экспериментальных и клинических условиях в качестве ингибиторов бактериальной адгезии. Сегодня имеются данные об антиадгезивном действии экзогенных протеолитических фермен-

тов. Действие ферментов не ограничивается изменением характера прилипания бактерий к мишени, но и приводит к нарушению уже сформированных колоний. Разные ферменты демонстрируют различный уровень эффективности. Результаты аналитических исследований указывают на специфичность такого влияния [21].

Задачей настоящего исследования было оценить влияние зубной пасты, содержащей бромелаин на адгезию микроорганизмов, обитающих в полости рта человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Исследована зубная паста «R.O.C.S.», включающая бромелаин.

Контролем служила зубная паста аналогичной рецептуры без бромелаина.

Исследование проводилось следующим методом. Тестируемые образцы были обозначены условными номерами 56 («R.O.C.S.») и 57 (контроль).

Тест-культуры микроорганизмов.

Клинические штаммы микроорганизмов, выделенные из ротовой полости волонтеров: *Staphylococcus aureus* 20, *Streptococcus salivarius* 67, *Streptococcus sangius* 12, *Streptococcus sobrinus* 83.

Культура клеток кожно-мышечных фибробластов эмбриона человека.

Оборудование: бактериологические анализаторы - IEMS-фотометр фирмы «LabSystems» (Финляндия), BBL Crystal фирмы «Becton Dickinson» (США); система ввода изображений «Видео-ТЕСТ-морфология» (Германия).

МЕТОДЫ

Микробиологические, морфологические.

Все исследования проводили в 3 повторениях.

ЭТАП 1

Путем прямого посева тампоном из полости рта у 10 волонтеров на 5% кровяной агар получены чистые культуры микроорганизмов *Staphylococcus*

aureus 20, *Streptococcus salivarius* 67, *Streptococcus sanguis* 12, *Streptococcus sobrinus* 83.

Полученные штаммы были идентифицированы на вышеперечисленных бактериологических анализаторах.

ЭТАП 2

Изучена антиадгезивная активность тестируемых паст на культуре клеток (КК) кожно-мышечных фибробластов эмбриона человека. Фибробласти выращивали в пробирках Лейтона на покровных стеклах в ростовой питательной среде Игла 24 ч при 37°C до образования конфлюэнтного монослоя по методике Грабовская К.Б., Тотолян А.А., 1977 [22].

Затем ростовую среду сливали и добавляли по 1,8 мл тестируемых образцов паст и по 0,2 мл суточной культуры соответствующего тест-штамма в дозе 10⁸ КОЕ/мл и

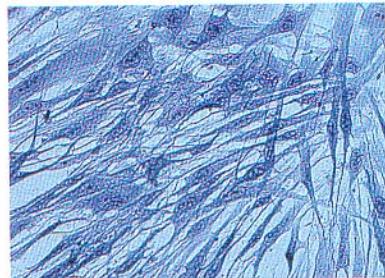


Рис. 1.
Контроль клеток



Рис. 2.
Клетки + *Str. Salivarius* 67

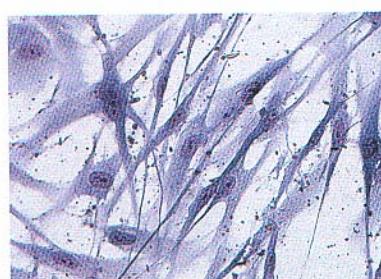


Рис. 3.
Культура клеток + *Str. Salivarius* 67 + з.п.
56 (1:20000) экспозиция 2 ч

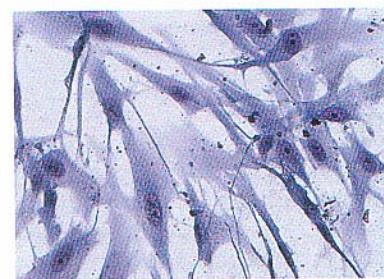


Рис. 4.
Культура клеток + *Str. Salivarius* 67 + з.п.
56 (1:20000) экспозиция 3 мин

ТАБЛИЦА 1

АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕСТ-ШТАММОВ В ПРИСУТСТВИИ ТЕСТИРУЕМЫХ ПАСТ 56 (РОКС) И 57 (КОНТРОЛЬ) ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ 2 Ч

Тест - объект	Показатели интенсивности адгезии тест-штаммов микроорганизмов																
	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	
Контроль																	
Культура клеток (КК) + микроб	8	9	10	7	25	30	29	27	200	270	290	189	100	100	100	100	
Опыт																	
КК + микроб + паста 56	6	7	8	5	24	26	27	26	144	182	216	130	72	70	74	69	
КК + микроб + паста 57	7	8	9	6	24	28	28	26	168	224	252	156	84	83	87	83	

ТАБЛИЦА 2

АДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕСТ-ШТАММОВ В ПРИСУТСТВИИ ТЕСТИРУЕМЫХ ПАСТ 56 (R.O.C.S)
И 57 (КОНТРОЛЬ) ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ 3 МИН

Тест - объект	Показатели интенсивности адгезии тест-штаммов микроорганизмов																
	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Str.saliv.</i>	<i>Str.sang.</i>	<i>Str.sobr.</i>	
Контроль																	
Культура клеток (КК) + микроб	8	9	10	7	25	30	29	27	200	270	290	189	100	100	100	100	
Опыт																	
КК + микроб + паста 56	4	3	2	2	10	18	25	20	40	54	50	40	20	20	17	17	
КК + микроб + паста 57	5	4	3	3	12	20	27	21	60	80	81	63	30	30	28	33	

инкубировали 2 ч при 37°C.

После инкубации клетки монослоя отмывали от неприкрепившихся бактерий многократной смесью среды Игла, фиксировали 96% этиловым спиртом, окрашивали по Романовскому-Гимза и исследовали микроскопически.

Опыты по оценке подавления адгезии тест-штаммов тестируемыми пастами проводили с разведением каждой пасты 1:20 000 в присутствии 50% сыворотки человека.

Интенсивность процесса адгезии тест-штамма оценивали по следующим показателям: 1) индекс адгезии (ИА) выражают средним числом бактериальных клеток на одной эукариотической клетке; 2) процент пораженных клеток монослоя (ПК%); 3) обсемененность 100 клеток монослоя - микробную нагрузку (МН) - определяют по формуле МН = ИА × ПК%.

Степень адгезии микробы определяют по показателю микробной нагрузки относительно контроля, принимаемого за 100%.

В опыте использовали 2 экспозиции - 2 ч и 3 мин с концентрацией 1:20 000, практически не вызывающей повреждения монослоя клеток (рис. 1-4).

Как видно из табл. 1, препараты 56 и 57 недостаточно интенсивно подавляли адгезию тест-микроорганизмов при экспозиции 2 ч - % подавления адгезии составил соответственно в отношении:

- *S.aureus* - 28% и 16%;
- *Str.salivarius* - 30% и 17%;
- *Str.sangius* - 26% и 13%;
- *Str.sobrinus* - 31% и 17%.

Как видно из табл. 2, при сокращении времени экспозиции до 3 мин эффективность препаратов 56 и 57 резко повысилась - % подавления адгезии составил соответственно в отношении:

- *S.aureus* - 80% и 70%;
- *Str.salivarius* - 80% и 70%;
- *Str.sangius* - 83% и 72%;
- *Str.sobrinus* - 79% и 67%.

Во всех случаях препарат 56 («R.O.C.S.» с бромелаином) был более эффективен, чем препарат 57.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность препаратов для подавления адгезии нормальной микробиоты ротовой полости зависит от экспозиции: при 2-часовой экспозиции эффективность зубных паст невысокая, а при времени выдержки 3 мин — она резко возрастает — до 70-80% подавления адгезии штаммов микроорганизмов. При этом 3 мин — обычное время для чистки зубов. Это, по-видимому, связано с обратимостью адгезии в короткие сроки после внесения штаммов в модельную систему, так как обычно через 1-2 ч адгезия становится необратимой.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки данных рецептур, особенно препарата 56 (зубная паста «R.O.C.S.») с бромелаином, как средств для профилактики формирования микробной биопленки в полости рта.

Список литературы находится в редакции.



VI Конгресс Национальной Академии Эстетической Стоматологии



13-15
ОКТЯБРЯ
2006

ОТЕЛЬ РЕНЕССАНС-МОСКВА
ОЛИМПИЙСКИЙ ПРОСПЕКТ, 18/1

119034 Москва,
ул. Остоженка, 6, стр 3.
Тел. (495) 202-48-20

www.naes.ru
E-mail:naes@mail.ru

НАУЧНАЯ ПРОГРАММА КОНГРЕССА - 2006

Проф. Пол Даммер (Университет Уэлса, Кардифф, Великобритания)
«Прогнозирование исхода лечения как основа стандартизации в эндодонтии»

Проф. Гевин Пирсон (Великобритания)
«Новейшие методы дезинфекции кариозных полостей и каналов зуба»

Бэт Шутер (Берн, Швейцария)
«Сложные клинические ситуации в эндодонтии и современные пути их решения»

Проф. Адам Штабхольц
(Университет Адаса, Иерусалим, Израиль)
«Современные лазерные технологии в эндодонтии»

Проф. Адам Штабхольц
(Университет Адаса, Иерусалим, Израиль)
«Повторное эндодонтическое лечение – пути к успеху»

Клод Зибер (Базель, Швейцария)
«Взгляд на эстетику в естественном свете:
светооптические свойства передних зубов и их имитация в стоматологии»

Проф. Айала Штабхольц (Университет Адаса, Иерусалим, Израиль)
«Хирургическое удлинение коронки зуба»

Д-р Дэвид Винклер (Виндзор, Великобритания)

Д-р Карстен Стоклебен (Ганновер, Германия)
«Пародонтологические аспекты стоматологической реабилитации
при окклюзионных дисфункциях»

Проф., д-р Андреас Моритц (Вена, Австрия)
«Применение лазеров в стоматологии и преимущества лазерного отбеливания»

Д-р Йозеф Арнабат (Барселона, Испания)
«Применение Waterlase для препарирования полостей
и периодонтального лечения»

Д-р Антонио Эспана (Барселона, Испания)
«Применение лазеров на мягких тканях и преимущества Waterlase в хирургии»