

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ЭНДОПАРОДОНТАЛЬНОГО ОЧАГА ИНФЕКЦИИ *IN VITRO*

С.И. Гиньятулина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара;

Как цитировать: Гиньятулина С.И. Моделирование биопленки эндодонтопатогенного очага инфекции *in vitro* // Аспирантский вестник Поволжья. 2021. № 1–2. С. 64–68. DOI: <https://doi.org/10.55531/2072-2354.2021.21.1.64-68>

Поступила: 19.01.2021

Одобрена: 26.02.2021

Принята: 10.03.2021

■ Необходимость создания модели эндодонтопатогенного очага инфекции *in vitro* обусловлена отсутствием способа формирования биопленки эндодонто- и пародонтопатогенных бактерий в условиях текучих сред *in vitro* с учетом воссоздания путей сообщения между эндодонтом и пародонтом. Нами предложен способ, техническим результатом которого является максимально близкое воссоздание многовидовой смешанной бактериальной биопленки непосредственно в тканях зуба в среде, приближенной к условиям развития эндодонтопатогенных поражений *in vivo* с возможностью симуляции системы корневых каналов и пародонтальных карманов *in vitro* при дальнейшем тестировании способов хемомеханической и физической обработки на полученной модели. Предложенная модель эффективна для культивирования облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных культур.

■ **Ключевые слова:** эндодонтопатогенные поражения; биопленка; модель *in vitro*.

IN-VITRO MODELING OF A BIOFILM OF ENDOPARODONTAL FOCUS OF INFECTION

S.I. Ginnyatulina

Samara State Medical University, Samara, Russia

To cite this article: Ginnyatulina S.I. *In-vitro* modeling of a biofilm of endoparodontal focus of infection. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhiya*. 2021;(1-2):64–68. DOI: <https://doi.org/10.55531/2072-2354.2021.21.1.64-68>

Received: 19.01.2021

Revised: 26.02.2021

Accepted: 10.03.2021

■ The development of the model of endoparodontal lesion *in vitro* is necessary due to the lack of the method for creating a biofilm of endodonto- and periodontopathogenic bacteria *in vitro* with the reconstruction of communication ways between the endodontium and the periodontium. We have proposed the method, the technical result of which is the maximal reconstruction of a multi-species mixed bacterial biofilm in tooth tissues in the environment similar to *in vivo* conditions, with the possibility of processing root canals and periodontal pockets *in vitro*. The proposed model is effective for the cultivation of obligate-anaerobic and facultative-anaerobic cultures.

■ **Keywords:** endoparodontal lesions; biofilm; *in vitro* model.

Обоснование

В литературе известно достаточно большое количество экспериментальных моделей, позволяющих изучать *in vitro* процессы жизнедеятельности микроорганизмов, заселяющих корневые каналы и пародонтальные карманы при патологических состояниях [1, 4]. Так, например, существует метод микробиологического изучения патологического содержания корневых каналов и пародонтальных карманов путем количественных высевов на питательную среду [6]. Известен также способ оценки взаимного влияния микроорганизмов

методом совместного культивирования с контрольным высеваем и определением численности тест-культуры и изучаемого штамма по количеству выросших колоний на плотной питательной среде [5, 7].

Однако в организме человека биопленка формируется в условиях омывания жидкими секретами, то есть в условиях текучих сред, что обеспечивает дифференцировку клеточных слоев биопленки, постоянный приток питательных веществ и отток продуктов метаболизма [3, 8]. Кроме того, пути сообщения между тканями эндодонта и пародонта,

имеющиеся в естественных условиях, могут значительно влиять на формирование биопленки при сочетанных эндодонто- и пародонтопатогенных поражениях [2]. Таким образом, существует потребность в создании способа формирования биопленки эндодонто- и пародонтопатогенных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*, с учетом вышеуказанных требований.

Цель исследования — создание модели эндодонто- и пародонтопатогенного очага инфекции *in vitro*.

Материалы и методы

Наиболее близким к условиям полости рта является способ формирования смешанной биопленки периодонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*, который был взят нами за прототип [3].

Данный способ осуществляется следующим образом. Бактериальную взвесь из чистой культуры, разведенной в 0,1 % полужидкой агаризованной среде — сердечно-мозговом бульоне (ВНИ, LIM или АС), содержащей 0,01 % менадиона и 0,1 % гемина — стимуляторов роста анаэробных бактерий, до концентрации 10^6 – 10^8 КОЕ/мл, помещают на подложку из полимерных материалов (метилметакрилат, полиуретан, триацетат или плотную агаровую питательную среду) в замкнутой емкости. Емкость помещается в микроанаэроостат с постоянным составом бескислородной газовой смеси, состоящей из 80 % азота, 10 % водорода, 10 % углекислого газа, а микроанаэроостат в свою очередь, помещается в шейкер-термостат, обеспечивающий возвратно-поступательные движения в заданном режиме, в диапазоне 60–120 движений в минуту при постоянной температуре культивирования биопленки 37 °С.

Главный недостаток этого метода — отсутствие возможности исследовать взаимное влияние эндодонто- и пародонтопатогенных бактерий через естественные пути сообщения, а также антимикробную эффективность способов хомеомеханической обработки корневых каналов и пародонтопатогенных карманов, так как все они нуждаются в воссоздании модели зуба и окружающих его тканей.

Для достижения указанного технического результата нами предлагается создание модели эндодонто- и пародонтопатогенного очага инфекции *in vitro*, включающей следующие этапы:

1-й этап. Подготовка подложки для микроорганизмов, в качестве которой выступают удаленные человеческие зубы, оттисковая масса и пробирка с силиконовой крышкой. Для этого корневые каналы удаленных зубов инструментально расширяют до 80-го размера

по ISO для облегчения вхождения инструментов и растворов в ходе дальнейших манипуляций. На внешнюю поверхность корня зуба также наносят насечки, имитирующие нарушение целостности цемента во время прогрессирования пародонтита и периодонтита. Подготовленные зубы помещают в стеклянную пробирку с С-силиконом (рис. 1–3), при



Рис. 1. Стеклянная пробирка

Fig. 1. Glass test tube



Рис. 2. Замешивание оттисковой массы

Fig. 2. Mixing the impression compound



Рис. 3. Помещение зуба в оттисковую массу

Fig. 3. Placement of the tooth into the impression compound



Рис. 4. Стерилизация моделей в автоклаве

Fig. 4. Sterilization of models in the autoclave

этом между корнем зуба и оттисковой массой создается пространство для имитации пародонтального кармана. Далее образцы с силиконовой крышкой помещают в крафт-пакеты, после чего стерилизуют в автоклаве при температуре 132 °C, 2,2 атм., в течение 20 мин (рис. 4, 5). Стерильность изготовленной подложки была проверена и подтверждена. Для проведения эксперимента нами было подготовлено 30 подложек по вышеописанной методике.

2-й этап. Взятие содержимого пародонтального кармана и корневого канала у пациентов с эндопародонтальными поражениями, его транспортировка в среде Кэрри – Блэр (рис. 6), идентификация микроорганизмов методом масс-спектрометрии, выделение монокультур.

Нами был взят материал у 12 пациентов с исследуемой патологией. Чаще всего



Рис. 5. Образец опытной модели

Fig. 5. Sample prototype

в корневом канале и в пародонтальном кармане нами были обнаружены следующие микроорганизмы: 1) облигатные анаэробы *Veilonella* spp., *Fusobacterium nucleatum*; 2) факультативные анаэробы *Streptococcus mutans*, *Granulicatella adiacens*, *Str. intermedius*, *Str. Oralis*, *Str. Sangius*.

Видовой состав микрофлоры эндодонтического канала и пародонтального кармана был схожим, что подтвердило сочетанное течение патологии у исследуемых пациентов.

3-й этап включает внесение на ранее изготовленную подложку бактериальной взвеси и ее культивацию, при этом бактериальную взвесь разводят в жидкой тиогликолевой среде, до концентрации 10^6 – 10^8 КОЕ/мл, подложку помещают в микроанаэроустат с постоянным составом бескислородной газовой смеси, состоящей из 80 % азота, 10 % водорода, 10 % углекислого газа, который, в свою очередь, помещают в шейкер-термостат,

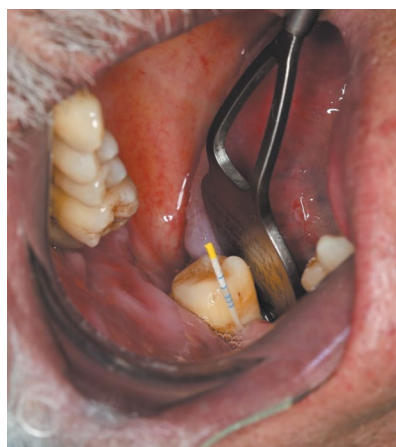


Рис. 6. Взятие содержимого корневого пародонтального кармана и корневого канала и его транспортировка в среде Кэрри – Блэр

Fig. 6. Collection the content of the periodontal pocket and root canal and transporting it in the Cary-Blair transport medium



Рис. 7. Этапы создания энокулюмов, выделение монокультур

Fig. 7. Stages of enoculum creation, isolation of monocultures

обеспечивающий возвратно-поступательные движения в диапазоне 120 движений в минуту при температуре 37 °С в течение 5 сут (рис. 7).

для изучения свойств патогенной микрофлоры биопленки корневого канала и пародонтального кармана.

Результаты и их обсуждение

После выдерживания моделей в шейкер-термостате нами осуществлялось взятие содержимого корневого канала и пародонтального кармана из разработанных моделей и проводилась идентификация микроорганизмов методом масс-спектрометрии, выделение монокультур (рис. 8–10).

После идентификации микроорганизмов нами были обнаружены следующие бактерии: *Veillonella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Str. mutans*, *Granulicatella adiacens*, *Str. intermedius*, *Str. Oralis*, *Str. Sangius*.

Следовательно, предложенная модель эффективна для культивирования облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных культур. Созданная нами анаэробная среда, имитирующая анатомо-физиологические условия для развития эндодонтогенной инфекции, достоверна и может быть использована

Выводы

Техническим результатом предлагаемого способа стало максимально близкое воссоздание многовидовой смешанной бактериальной биопленки непосредственно в тканях зуба в среде, приближенной к условиям развития эндодонтогенных поражений *in vivo* с возможностью симуляции системы корневых каналов и пародонтальных карманов *in vitro* при дальнейшем тестировании способов хемомеханической и физической обработки на полученной модели. Возможности исследования воздействия на микробную биопленку, сформированную предлагаемым способом, очень широки, а их результаты являются достоверными, так как данная модель по сравнению с известными наиболее точно отражает развитие многовидовой биопленки непосредственно в условиях зубных тканей.

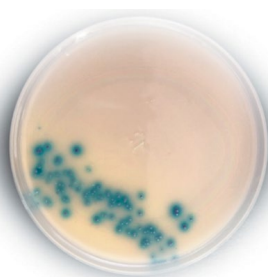


Рис. 8. Колония *Str. intermedius* на чашке Петри

Fig. 8. Colony of *Str. intermedius* in a Petri dish

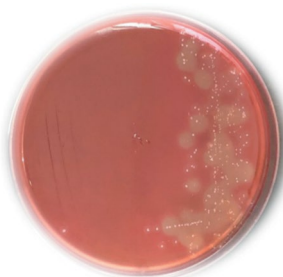


Рис. 9. Колония *Gran. adiacens* на чашке Петри

Fig. 9. Colony of *Gran. adiacens* in a Petri dish

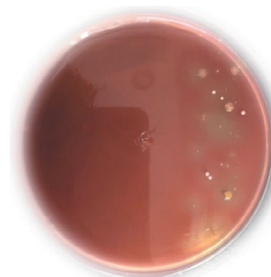


Рис. 10. Колония *Str. mutans* на чашке Петри

Fig. 10. Colony of *Str. mutans* in a Petri dish

Список литературы

1. Батырова М.Ш., Аманова Ш.Х., Колчанова Н.Э., Сахарук Н.А. Методы изучения биопленок в стоматологии // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Материалы 74-й научной сессии сотрудников университета / под ред. А.Т. Щастного. Витебск, 2019. С. 104–106.
2. Винокурова А.А., Магамадова Ф.Ш., Кудревич А.О. и др. Проблемы лечения пациентов с эндодонтиальным поражением // Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. 2020. № 3. С. 4–6.
3. Патент № RU2619169C1/12.05.2017. Бюл. № 23 (II ч.). Ипполитов Е.В. и др. Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*.
4. Колчанова Н.Э., Чернявский Ю.П., Окулич В.К. Современные аспекты изучения микроорганизмов полости рта, образующих биопленку, при патологии периодонта // Стоматолог. 2017. № 3. С. 57–68.
5. Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е. Изучение образования матрикса биопленки микроорганизмами при хроническом периодонтите // Материалы конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека». 25–26 октября 2012 г. Минск. 2017. № 10. С. 160.
6. Румянцев В.А., Родионова Е.Г., Некрасов А.В. и др. Биопленка в эндодонтии. Часть I. Свойства и методы изучения (обзор литературы) // Эндодонтия Today. 2018. № 1. С. 17–21. DOI: 10.25636/10.25636/PMP.2.2018.1.5
7. Maske T.T., van de Sande F.H., Arthur R.A., et al. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review // Biofouling. 2017. Vol. 33, No. 8. P. 661–675. DOI: 10.1080/08927014.2017.1354248
8. Yu O.Y., Zhao I.S., Mei M.L., et al. Dental biofilm and laboratory microbial culture models for cariology research // Dent J (Basel). 2017. Vol. 5, No. 2. P. 21. DOI: 10.3390/dj5020021

References

1. Batyrova MSh, Amanova ShKh, Kolchanova NEh, Sakharuk NA. Metody izucheniya bioplenok v stomatologii. Proceedings of the 74 nauchnaya sessiya sotrudnikov universiteta. "Dostizheniya fundamental'noj, klinicheskoy mediciny i farmacii". Vitebsk; 2019. P. 104–106. (In Russ.)
2. Vinokurova AA, Magamadova FSh, Kudrevich AO, et al. Problems of treating patients with endodontic lesions. *Medicina. Sociologiya. Filosofiya. Prikladnye issledovaniya*. 2020;(3):4–6. (In Russ.)
3. Patent № RU2619169C1/12.05.2017. Byul. № 23 (II ch.). Ippolitov EV, et al. Sposob formirovaniya smeshannoi bioplenki parodontopatogennykh anaerobnykh bakterii v usloviyakh tekuchikh sred *in vitro*. (In Russ.)
4. Kolchanova NE, Chernyavskij YuP, Okulich VK. Modern aspects of studying biofilm forming oral bacteria in periodontal pathology. *Stomatologist*. 2017;(3):57–68. (In Russ.)
5. Kolchanova NE, Okulich VK, Shilin VE. Izuchenie obrazovaniya matriksa bioplenki mikroorganizmami pri hronicheskim periodontite. Proceedings of the conference "Sovremennye problemy infekcionnoj patologii cheloveka". Minsk. 2017. No. 10. P. 160. (In Russ.)
6. Romyancev VA, Rodionova EG, Nekrasov AV, et al. Bioplenka v endodontii Chast' I. Svoystva i metody izucheniya (obzor literatury). *Endodontiya Today*. 2018;(1):17–21. (In Russ.) DOI: 10.25636/10.25636/PMP.2.2018.1.5
7. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, et al. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017;33(8):661–675. DOI: 10.1080/08927014.2017.1354248
8. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, et al. Dental biofilm and laboratory microbial culture models for cariology research. *Dent J (Basel)*. 2017;5(2):21. DOI: 10.3390/dj5020021

■ Информация об авторе

Софья Ильдаровна Гиннатуллина — очный аспирант кафедры терапевтической стоматологии. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. E-mail: gsi1993@yandex.ru

■ Information about the author

Sofya I. Ginatulina — Full-time postgraduate student, Department of Therapeutic Dentistry. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: gsi1993@yandex.ru