



РОССИЙСКИЙ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
RUSSIAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY



№1
2025

<http://rjbt.ru/>

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

РОССИЙСКИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 1



Санкт-Петербург
2025

Учредитель:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Главный редактор
Шевчик А.П., д-р техн. наук.

Заместитель главного редактора
Шугалей И.В., д-р хим. наук, профессор

Редакционная коллегия

Абиев Р.Ш., д-р техн. наук, профессор;
Базарнова Ю.Г., д-р техн. наук, профессор;
Виноходов Д.О., д-р биол. наук, доцент;
Волкова О.В., д-р техн. наук, профессор;
Гинак А.И., д-р хим. наук, профессор;
Дмитриев А.В., д-р биол. наук, профессор;
Кипрушкина Е.И., д-р техн. наук, доцент;
Крупская Л.Т., д-р биол. наук, профессор;
Крутиков В.И., д-р хим. наук, профессор;
Макавчик С.А., д-р вет. наук, доцент;
Меледина Т.В., д-р техн. наук, профессор;
Сахабеев Р.Г., канд. биол. наук, доцент;
Сивцов Е.В., д-р хим. наук, доцент;
Симбицев А.С., д-р мед. наук, профессор, член-корр.
РАН;
Сухинин А.А., д-р биол. наук, профессор;
Сысоева М.А., д-р хим. наук, профессор;
Сычев М.М., д-р техн. наук, профессор;
Шамцян М.М., канд. техн. наук, доцент;
Юдин И.В., д-р хим. наук, профессор

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Точка зрения редакции может не совпадать с
мнением авторов статей

©Издательство СПбГТИ(ТУ), 2025
©Коллектив авторов, 2025

Anastasija M. Ivanova^{1*}, Alisa V. Blinova², Marina A. Dmitrienko¹, Ekaterina B. Aronova³

EVALUATION OF 'RED COMPLEX' BACTERIA PROTEOLYTIC ACTIVITY

¹Association of Medicine and Analytics Co., Ltd., St. Petersburg, Russian Federation

²Department of Periodontology, Tver State Medical University, Tver, Russian Federation

³Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

* ai@amamed.ru

*The species composition of oral microbiota is one of the key factors determining the features of chronic inflammation and periodontal diseases progression. 'Red complex' bacteria presented by *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* have the greatest pathogenic potential. These bacteria possess proteolytic activity, which plays various important roles in virulence mechanisms and allowing them to colonize and destroy periodontal tissues. Early diagnosis of pathological conditions induced by microbial contamination allows for a timely treatment of periodontitis. A total of 38 patients aged 18 to 65 years, requiring professional oral hygiene were recruited for this study. Microbial content analysis of dental plaque from the interdental space and the back of the tongue was performed using real-time PCR. The proteolytic activity of oral bacteria was determined by the rapid diagnostic method (diagnostic sensitivity, 0.95; specificity, 0.93). The results demonstrate a strong and significant correlation between the new method and the PCR analysis ($r = 0.785$, $p < 0.001$). Study results show that the rapid diagnostic method can be valuable on the preliminary diagnosis stage for periodontal inflammatory disorders caused by the 'red complex' bacteria.*

Key words: proteolytic activity, oral cavity microbiota, protease, periodontal pathogens, red complex, rapid test

Иванова А.М.^{1*}, Блинова А.В.²,
Дмитриенко М.А.¹, Аронова Е.Б.³

ОЦЕНКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ «КРАСНОГО КОМПЛЕКСА»

¹ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (ООО «АМА»), Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Тверской государственный медицинский университет Минздрава России (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России), Тверь, Российская Федерация

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (ФГАОУ ВО «СПбПУ»), Санкт-Петербург, Российская Федерация

* ai@amamed.ru

*Видовой состав микробиоты является одним из факторов, определяющих особенности прогрессирования воспалительных заболеваний пародонта. Наивысшим патогенным потенциалом обладают бактерии «красного комплекса», включающего виды *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Перечисленные бактерии обладают протеолитическими ферментами, обеспечивающими эффективную инвазию в ткани пародонта. Ранняя диагностика состояний, связанных с микробной контаминацией, позволяет проводить своевременное лечение воспалительных заболеваний пародонта. Было обследовано 38 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, нуждающихся в профессиональной гигиене полости рта. Определение микробного состава зубного налета в межзубном промежутке и на спинке языка проводили методом ПЦР в реальном времени. Для определения протеолитической активности бактерий пользовались новым экспресс-методом (диагностическая чувствительность составила 0,95, специфичность – 0,93). Полученные результаты показали сильную положительную корреляцию данных, полученных с помощью экспресс-метода, с данными ПЦР ($r = 0.785$, $p < 0.001$). Таким образом, метод может представлять практическую ценность в качестве ранней и скрининг-диагностики воспалительных заболеваний пародонта, связанных с присутствием бактериальных колонизаторов, входящих в «красный комплекс» пародонтопатогенных микроорганизмов.*

Ключевые слова: протеолитическая активность, микробиота полости рта, протеазы, пародонтопатогены, красный комплекс, экспресс-анализ

Дата поступления – 06 декабря 2024 г.

Дата принятия – 09 декабря 2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Ведущее место среди стоматологических патологических состояний на сегодняшний день занимают воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) [1]. Отмечается тенденция к увеличению частоты распространения агрессивных, рецидивирующих форм данной нозологии [2].

С каждым годом появляется все больше исследований, свидетельствующих о негативном влиянии пародонтопатогенных микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности, а также тканевых воспалительных медиаторов на общее соматическое здоровье человека [2-5]. При этом на ранних этапах ВЗП могут протекать бессимптомно, а причиной обращения за медицинской помощью часто служат уже выраженные клинические симптомы - кровоточивость десен, подвижности или потеря зубов. Ведущим этиологическим фактором, запускающим механизм развития гингивита и пародонтита, является бактериальная биопленка [6]. Зубная биопленка — это

мультивидовое микробное сообщество, формирующееся в условиях текущих сред (слюна, десневая и ротовая жидкость) со сложной структурной организацией, регулирующейся многочисленными сигнальными взаимодействиями по типу прямых и обратных связей на уровне рецепторов и сигнальных молекул [7]. Многовидовые биопленки обладают уникальными признаками, а в зависимости от видового состава они могут быть ассоциированы со здоровым пародонтом, гингивитом или пародонтитом [8]. Тканевое поражение определяется взаимодействием микробного фактора и локального тканевого ответа на воздействие микроорганизмов [9]. Совокупность нарушения защитной системы пародонта и создание условий для интенсивного размножения микробиоты приводит к патологии зубодесневого прикрепления, воспалению и деструкции пародонта, формированию пародонтального кармана и развитию пародонтита.

Микробиота ротовой полости насчитывает более

700 видов бактерий, а также грибов, вирусов и простейших [10]. Научные достижения последних лет соответствуют модели патогенеза, согласно которой пародонтит инициируется широко распространенной дисбиотической, синергической микробиотой [11]. Представителями патогенной микрофлоры являются грамотрицательные и грамположительные бактерии, такие как *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium timidum*, *Parvimonas micra* и другие [6, 12]. Деструктивным формам заболевания пародонта присуща комбинация наиболее вирулентных патогенов [13]. «Пародонтопатогенность» микрофлоры определяется присутствием протеолитических ферментов в оболочке бактерий и эндотоксинов, непосредственно участвующих в повреждении тканей пародонта и оказывающих дисгармонизирующее влияние на формирование защитных реакций организма. Воспалительный процесс начинается в области зубодесневой борозды (гингивит) и в отсутствие лечения распространяется на область эпителиального и зубодесневого соединения, нарушая фиксацию зуба в костной альвеоле (пародонтит) [12, 14]. Объединенные в «красный комплекс» бактерии *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* считаются наиболее агрессивной бактериальной агломерацией, провоцирующей прогресирование ВЗП и ассоциированы с поддесневой биопленкой в участках повреждения при пародонтите [15, 16]. Общей особенностью бактерий «красного комплекса» является секреция протеолитических ферментов, которые являются установленными факторами вирулентности *P. gingivalis* и *T. denticola* [17].

Таким образом, чрезвычайно важным является своевременное обнаружение и купирование воспалительного процесса, ассоцииированного с патогенным бактериальным фактором, дисбактериозом ротовой полости.

На сегодняшний день существуют разные методы диагностики ВЗП: бактериологический (культуральный) метод, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), газожидкостная хроматография слюны, спектрофотометрический метод анализа слюны, определение pH ротовой жидкости при карбамидной нагрузке. Поскольку протеолитическую активность можно рассматривать как фактор вирулентности бактерий «красного комплекса», играющих ключевую роль в развитии ВЗП, определение данного типа ферментативной активности в ротовой полости может стать одним из критериев оценки развития воспалительного процесса в тканях пародонта.

Целью исследования стала оптимизация методики экспресс-определения протеолитической активности пародонтопатогенных бактерий зубного и язычного налета и ее сопоставление с молекулярно-генетическим методом микробиологического исследования и биохимическим исследованием слюны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Пациенты, принявшие участие в исследовании

В исследовании принимали участие 38 испытуемых в возрасте от 18 до 65 лет (впоследствии испытуемые были закодированы по схеме d01 – d38), нуждающиеся в профессиональной гигиене полости рта, с целью контроля и предотвращения развития воспалительных заболеваний пародонта. Все обследованные пациенты дали добровольное информированное согласие на проведение процедуры.

Исследование проводилось на базе кафедры пародонтологии Тверского государственного медицинского университета (ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России). В процессе стоматологического осмотра ротовой полости, была проведена оценка гигиенического индекса Silness-Loe в области всех зубов [18]. Индексное значение выборки

варьировалось в пределах 0.3–1.8, половина испытуемых имели хорошую (14.6% выборки) или удовлетворительную (35.4%) гигиену полости рта, а другая половина – неудовлетворительную (45.8%) или плохую (4.2%) гигиену полости рта, что говорит о репрезентативности выборки.

Всем 38 испытуемым были проведены ПЦР-анализ микробного состава зубного налета в области межзубного промежутка (зубы 1.5 и 1.6 – верхние правые второй премоляр и первый моляр) и налета со спинки языка, а также экспресс-оценка протеолитической активности бактерий в данных участках полости рта. Десяти пациентам, выбранным случайным образом, проводили также биохимическое исследование слюны.

2.2 Методика отбора проб

За 3–4 часа до исследования не предполагалось какое-либо чистка зубов пациентами, использование ополаскивателей и прием пищи. Взятие материала из межзубного промежутка и соксоб со спинки языка осуществляли стерильным стоматологическим микроаппликатором. Нанесение материала на сегмент для экспресс-диагностики проводили непосредственно после взятия пробы. Для ПЦР-анализа абсорбер помещался в пробирку «Эппendorф» с транспортной средой. Для сбора слюны пациентам предлагалось сесть с опущенной головой, не глотая слюну и не двигая языком и губами, в течение 2 минут аккумулировать слюну в полости рта, затем ее сплюнуть в стерильный контейнер. Данная процедура повторялась трижды. Не допускался анализ слюны при повреждении слизистой оболочки рта, кровоточивости десен.

2.3 Экспресс-определение протеолитической активности в ротовой полости

Проведенный анализ патентного исследования глубиной 30 лет выявил ряд технических решений для экспресс-оценки протеолитической активности в ротовой полости [19–25]. Наиболее полно экспресс-оценка изучена в трудах, посвященных методам определения патогенных бактерий и диагностике заболеваний пародонта [19–23]. Принцип экспресс-определения протеолитической активности заключается в колориметрическом методе оценки. В основе метода лежит реакция гидролиза субстрата трипсина ($\text{Na}\text{-бензоил-DL-аргинин}$ β -нафтиламид). Пептидаза, вырабатываемая пародонтопатогенами «красного комплекса» *T. denticola*, *P. gingivalis* и *T. forsythia*, ассоциированными с ВЗП, расщепляет субстрат, с образованием продуктов реакции, которые, в свою очередь, формируют стойкое изменение цвета при наличии хромогенного вещества. Само хромогенное вещество не специфично по отношению к протеолитическим ферментам или дисбактериозу ротовой полости. Гидролиз, сопровождаемый цветовой реакцией, свидетельствует о наличии протеолитической активности в анализируемой пробе (рис. 1).

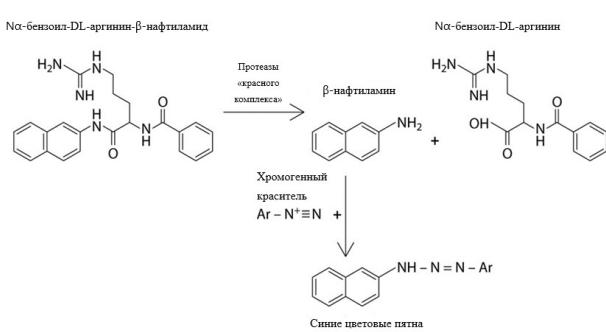


Рис. 1. Реакция, лежащая в основе экспресс-определения протеолитической активности

Для проведения исследования биоматериал, взятый из межзубного промежутка и со спинки языка, одновременно помещались на разные стороны пигментообра-

зующего субстратного слоя устройства. Интерпретация результатов выполнялась через 10 минут после помещения устройства в термостат, работающий в температурном диапазоне 38–45 °C. Результат оценивался как положительный при изменении цвета индикаторного элемента устройства, представляющего собой гидрофильный носитель, содержащий хромогенный реагент, с лососевого на светло-голубой или синий. Интенсивность цветового пятна оценивали при помощи колориметрической шкалы (рис. 2), верифицированной в ходе лабораторного исследования индикаторного элемента на концентрациях раствора трипсина в диапазоне от 0.0167 мг/мл до 5 мг/мл. При отсутствии изменения цвета, результат расценивался как отрицательный.



Рис. 2. Шкала изменения цвета для определения протеолитической активности в ротовой полости

2.4 Методика и условия постановки полимерной цепной реакции

В качестве референсного метода проводили количественный ПЦР-анализ ДНК микроорганизмов зубного и язычного налета. ДНК выделяли из образцов с использованием коммерческого набора для выделения ДНК и РНК «Преп-НК-Био». Для выявления и количественной оценки ДНК возбудителей заболеваний пародонта методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени в биологическом материале использовался набор реагентов «Дентоскрин» (производитель НПФ «Литех», Россия, комплектация OneStep-PB-60). Проведение амплификации, анализ и интерпретация результата осуществлялись согласно методическим указаниям по применению набора реагентов.

Об успешном прохождении ПЦР можно судить по кривым амплификации, соответствующим внутреннему контролю в исследуемых пробах. На рис. 3 показано, что амплификация внутреннего контроля прошла во всех исследуемых точках, следовательно, результаты ПЦР можно принять за достоверный результат содержания ДНК исследуемых микроорганизмов в образцах.

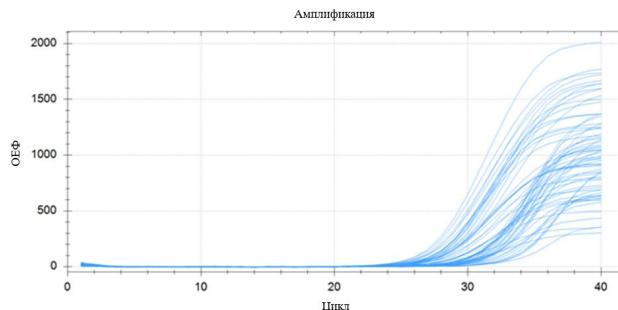


Рис. 3. Кривые амплификации внутреннего контроля в исследуемых биологических образцах

Для проведения статистической обработки отрицательный результат ПЦР-анализа принимали за «0», положительный результат выражали количественно в геном-эквивалентах в мл (ГЭ/мл). Для оценки выраженности бактерий «красного комплекса» в микрофлоре ротовой полости оценивали суммарную бактериальную нагрузку трех бактерий: *T. denticola*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis* как сумму их геном-эквивалентов в мл (ГЭ/мл).

2.5 Биохимическое исследование слюны

Проводили биохимическое исследование слюны для определения количественного и качественного состава короткоцепочечных жирных кислот (С2–С6), являющихся метаболитами анаэробных и аэробных бактерий.

Газожидкостную хроматографию летучих жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, изомасляной, изовалериановой, изокапроновой кислот) выполняли на автоматизированном биохимическом анализаторе AU 5800 (Beckman Coulte, США) с двумя фотометрическими модулями и одним ион-селективным (ISE) модулем. Идентификацию и количественное определение концентраций летучих жирных кислот осуществляли при помощи аналитических стандартов и программного комплекса для обработки хроматографических данных «МультиХром». Оценивали отношение суммарного содержания кислот с разветвленной целью изомеров к кислотам с неразветвленной целью (изоСn/Cn) и анаэробный индекс как отношение суммы пропионовой и масляной кислот к уксусной кислоте (С2–С4).

2.6 Статистическая обработка

Статистическую обработку данных осуществляли в программе Statistica 12, с применением мультивариантного анализа «MANOVA». Использован непараметрический критерий Манн-Уитни — для малых выборок. Для оценки корреляции применяли непараметрический критерий — ранговую корреляцию Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сопоставление результатов ПЦР-анализа, экспресс-определения протеолитической активности и биохимического анализа слюны

Были проанализированы полученные результаты ПЦР-анализа, экспресс-определения протеолитической активности и газожидкостного хроматографического анализа. Полученные результаты выявили значимую сильную корреляцию ($r = 0.785$, $p < 0.001$) между количественными показателями ПЦР-анализа и методом экспресс-определения протеолитической активности (материал из зубодесневой борозды) по всей выборке.

На 10 пациентов, для которых были проведены все три анализа, выявлена заметная значимая отрицательная корреляция показателей экспресс-устройства с анаэробным индексом ($r = -0.647$, $p < 0.01$) и отношением изомеров короткоцепочечных жирных кислот к общему содержанию кислот (изоСn/Cn) ($r = -0.639$, $p < 0.01$), и изоСn/Cn — с количественными показателями ПЦР-анализа ($r = -0.609$, $p < 0.01$). Значимая отрицательная корреляция свидетельствует, что с ростом протеоферментирующих бактерий в ротовой полости, анаэробный индекс и отношение изомеров короткоцепочечных жирных кислот к общему содержанию кислот, снижаются. Суммарная бактериальная нагрузка «красного комплекса» имеет высокую значимую корреляцию с показателями метода экспресс-определения ($r = 0.710$, $p < 0.01$). Таким образом, результаты всех методов анализа коррелируют друг с другом, это можно объяснить тем, что наибольшая нагрузка бактериями «красного комплекса» (определенная методом ПЦР) дает более выраженную протеолитическую активность (экспресс-определение) [15] [21], а содержание пропионовой кислоты на уровне 18–20%, масляной кислоты на уровне 10–12% и изокислот на уровне 5.9–6.5% свидетельствует об увеличении в полости рта анаэробной флоры, обладающей протеолитической и гемолитической активностью [22, 26, 27].

Корреляция результатов, полученных вышеуказанными методами, позволяет рекомендовать метод, который является наиболее простым в исполнении, интерпретации результатов и позволяет получить результат в сжатые сроки.

По значимой корреляции данных биохимического исследования слюны и метода экспресс-определение протеолитической активности можно предположить вза-

имосвязь присутствия пародонтопатогенных бактерий «красного комплекса» с концентрацией летучих жирных кислот. Взаимосвязь летучих жирных кислот с пародонтопатогенной микрофлорой ротовой полости активно исследуется [22, 26, 27]. При этом анализ летучих жирных кислот и точное определение их концентрации в большей степени отражает присутствие в зубном налете бактерий видов *P. gingivalis* и *T. denticola*, а не всех бактерий «красного комплекса». Газожидкостной анализ требует дорогостоящего оборудования, пробоподготовки, продолжителен по времени, поэтому его можно рекомендовать как дополнительный метод исследования, а не как экспресс-метод диагностики бактериальных заболеваний ротовой полости.

3.2 Сопоставление результатов ПЦР-анализа и экспресс-определения протеолитической активности в ротовой полости

На рис. 4 представлены кривые амплификации, общая нагрузка бактерий «красного комплекса» в ГЭ/мл и результаты метода экспресс-определения в образцах биоматериала из межзубного промежутка для пациентов d19, d05, d01 и d10. В образце d19 видно, что содержатся все три бактерии «красного комплекса», и их суммарное количество на порядок выше, чем в остальных образцах. В этом же образце голубое пятно, полученное методом экспресс-определения, имеет более выраженный размер и интенсивность.

В образцах d05 и d01 хорошо заметные голубые пятна соответствуют высокому содержанию бактерии «красного комплекса» (в образце d05 представлены три бактерии, в образце d01 — только *T. forsythensis*) в количестве 2.7×10^6 ГЭ/мл и 1.5×10^5 ГЭ/мл, соответственно.

В образце d10 отсутствует цветовое пятно и выделены лишь единичные бактерии *T. forsythensis* (1.4×10^2 ГЭ/мл), что ниже предела обнаружения метода экспресс-определения.

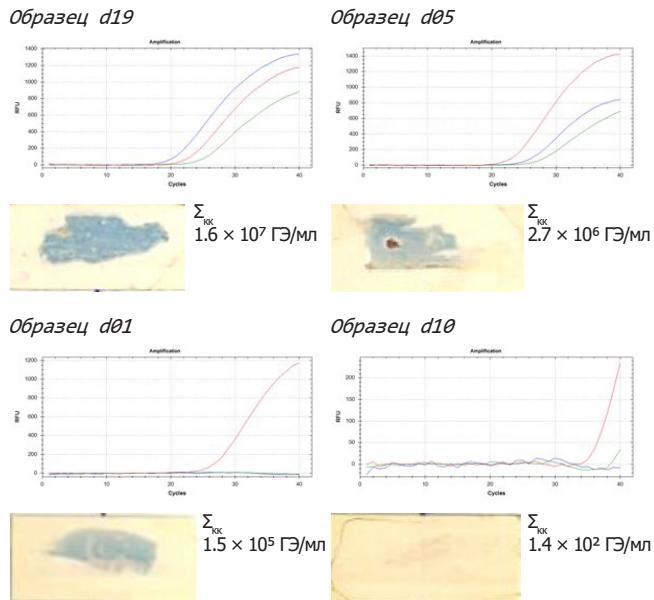


Рис. 4. Сопоставление кривых амплификации и результатов метода экспресс-определения в образцах биоматериала из межзубного промежутка для пациентов d19, d05, d01 и d10

На графиках ПЦР: синим цветом обозначена кривая амплификации ДНК *Porphyromonas gingivalis*; красным — *Tannereilla forsythensis*; зелёным — *Treponema denticola*. Σ_{KK} — общая нагрузка бактерий «красного комплекса» в геном-эквивалентах в мл.

Таким образом, результаты, полученные методом ПЦР, полностью сопоставимы с результатами метода экспресс-определения. Это говорит о возможности ис-

пользования метода экспресс-определения для оценки присутствия бактерий «красного комплекса» в биологических образцах.

3.3 Чувствительность и специфичность метода экспресс-определения

При сопоставлении данных, полученных с помощью экспресс-определения протеолитической активности с результатами ПЦР-анализа, был выявлен предел в 500 ГЭ/мл ДНК бактерий «красного комплекса», свыше которого метод экспресс-определения показывает положительный результат, ниже — отрицательный. Группы с положительным и отрицательным результатами достоверно значимо ($p < 0.01$) отличались по бактериальной нагрузке «красного комплекса»: медианное значение в группе с положительным результатом составило 3.4×10^4 ГЭ/мл, для второй группы медианное значение составило 0 ГЭ/мл.

На исследуемой выборке методика экспресс-определения протеолитической активности показала следующие диагностические характеристики, полученные методом латинского квадрата, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Диагностические характеристики метода экспресс-определения протеолитической активности ротовой полости

| | |
|--|------|
| Чувствительность | 0.95 |
| Специфичность | 0.93 |
| Доля ложноположительных | 0.07 |
| Доля ложноотрицательных | 0.05 |
| Прогностическая ценность положительного результата | 0.96 |
| Прогностическая ценность отрицательного результата | 0.93 |
| Диагностическая точность | 0.93 |

3.4 Отработка методики экспресс-определения протеолитической активности

3.4.1 Обоснование места взятия образца

Анализ биоматериалов, собранных из межзубного промежутка и со спинки языка, показал, что среднее значение количества бактериальной ДНК, характерной для организмов «красного комплекса», было значительно ($p < 0.01$) выше в материале из межзубного промежутка, чем в соскобе со спинки языка (5.6% от количества бактерий межзубного промежутка). В то же время, между этими показателями выявлена значимая заметная корреляция как в показателе среднего значения бактериальной массы «красного комплекса» ($r = 0.51$, $p < 0.001$), так и между результатами ПЦР из межзубного промежутка и соскоба со спинки языка по отдельным видам бактерий: *P. gingivalis* ($r = 0.639$, $p < 0.001$) и *T. denticola* ($r = 0.58$, $p < 0.001$). Таким образом, обе пробы имеют схожие характеристики, но различаются концентрацией бактерий «красного комплекса» в образце. Эти результаты согласуются с гипотезой о симультанной вегетации потенциальных возбудителей заболеваний пародонта в патологическом зубодесневом кармане и на дорсальной поверхности слизистой оболочки языка [24].

Выявлено, что показатели метода экспресс-определения имеют значимую заметную корреляцию с количественными результатами ПЦР-анализа в образце жидкости из межзубного промежутка ($r = 0.680$, $p < 0.001$), и она выше, чем этот показатель для соскоба с корня языка ($r = 0.428$, $p < 0.001$). Представленные данные свидетельствуют в пользу того, что анаэробные бактерии «красного комплекса» в большей степени представлены в анаэробной среде межзубного промежутка.

Показано, что самая высокая корреляция выявлена между результатами экспресс-определения и содержанием *T. denticola* в межзубном промежутке ($r = 0.862$, $p < 0.001$) и в соскобе со спинки языка ($r = 0.899$, $p < 0.001$), что соотносится с данными, согласно которым именно эта бактерия «красного комплекса» доминировала

ла в выборке (83.1%).

Таким образом, в качестве методического указания, можно рекомендовать для ПЦР-анализа и оценки протеолитической активности микробиоты брать образец из межзубного промежутка.

3.4.2 Термостатирование в ходе экспресс-оценки протеолитической активности в ротовой полости

Для получения достоверного аналитического сигнала и воспроизводимых результатов при оценке протеолитической активности, необходимо учитывать внешние факторы, оказывающие влияние на целевую (ферментативную) реакцию, лежащую в основе данного метода экспресс-определения.

Известно, что скорость и температура ферментативных реакций тесно взаимосвязаны. При понижении температуры протеолитическая активность падает, скорость реакции замедляется, как следствие, увеличивается необходимое время экспозиции для экспресс-определения протеолитической активности. Рост температуры провоцирует необратимую денатурацию протеаз, снижается биологическая активность и скорость реакции — время экспозиции с целью получения достоверного результата, растет. Выбор оптимального температурного режима и соответствующего ему времени экспозиции, обеспечивает точность и скорость метода экспресс-определения протеолитической активности.

Опытным путем в лабораторных условиях было установлено, что диапазон температур, обеспечивающий оптимальное течение протеолиза субстрата, с последующим получением достоверного и интерпретируемого аналитического сигнала, базируется в пределах 36–45 °C (рисунок 5 А). Аналогичные данные были получены авторами и прежде [25].

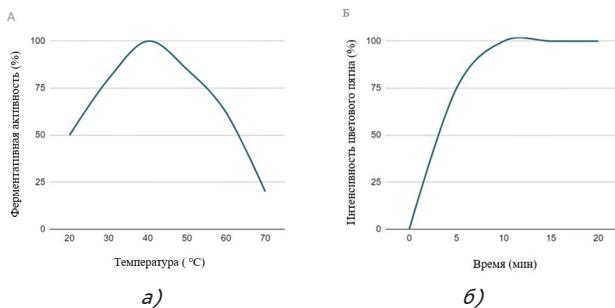


Рис. 5. а) – Зависимость активности трипсин-подобного фермента от температурных условий; б) – доля реакций экспресс-определения для оценки протеолитической активности, у которых проявилось цветовое пятно после нанесения контрольных растворов трипсина при оценке через 5, 10, 15, 20 минут

3.4.3 Период экспозиции при экспресс-определении протеолитической активности

Для метода экспресс-определения в лабораторных условиях было установлено, что нанесенные контрольные растворы трипсина концентрацией от 0.0167 мг/мл до 5 мг/мл проявлялись в виде цветового пятна голубого цвета в период с 5 по 10 минуты экспозиции при поддержании температуры в термостате в пределах 36–45 °C. В этот интервал времени интенсивность и размер цветового пятна увеличивались, что было важно для однозначной качественной интерпретации результата. В 25% образцов к пятой минуте уровень проходившего гидролиза пигментообразующего субстрата не достиг такого уровня, который бы позволял однозначно по цветовой реакции интерпретировать результат. Через 10 минут после нанесения, цветовые пятна проявлялись в 100% образцов с положительной пробой (рисунок 5 Б). В период с 15–30 минуты экспозиции интенсивность пятна незначительно увеличивалась, при этом качественная интерпретация не

изменялась ни в одном из образцов.

В предклиническом исследовании было подтверждено, что при оценке результата после 10-минутной экспозиции результат экспресс-определения протеолитической активности значимо сильно коррелировал ($r = 0.785$, $p < 0.001$) с результатами ПЦР-анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патогенная микробиота ротовой полости, обусловленная присутствием бактерий «красного комплекса» и продуктами их жизнедеятельности, является одной из причин возникновения ВЗП. ВЗП, деструктивно воздействующие на комплекс тканей, развивающиеся постепенно и бессимптомно на начальных этапах, приводят к потере зубов и планомерному разрушению пародонта. Здоровые полости рта являются острой социальной и экономической проблемой, требующей своевременной диагностики и лечения. Комплексный подход к оценке патогенности микробиоты ротовой полости способен облегчить диагностику и обеспечить контроль эффективности назначенного лечения. Метод экспресс-определения протеолитической активности, как фактора вирулентности бактерий «красного комплекса», способен выявить причины деструктивных форм заболевания пародонта, полукаличественно оценить степень обсеменённости и представить перспективы лечения и прогресса выздоровления пациента.

На основании выполненных исследований рекомендуется использование метода экспресс-определения протеолитической активности бактерий «красного комплекса» пародонтопатогенных микроорганизмов в рамках комплексного подхода диагностики микробиоты ротовой полости. Образец для анализа рекомендуется брать из межзубного промежутка. Для проведения экспресс-определения рекомендуется использовать термостат на протяжении 10 минут при поддержании температуры не ниже 38 °C и не выше 45 °C для достижения оптимальных условий протекания ферментативной реакции.

Состоятельность подтверждается корреляцией результатов, полученных методом экспресс-определения по сравнению с методом ПЦР в качестве референсного (значимая сильная корреляция, $r = 0.785$, $p < 0.001$).

Методика экспресс-определения протеолитической активности бактерий ротовой полости показала достаточно высокие диагностические характеристики, а именно: чувствительность метода определения составила 0.95, а специфичность — 0.93, что подтверждено сравнительным анализом полученных результатов с результатами постановки ПЦР.

Таким образом, предлагаемая методика экспресс-определения при соблюдении всех методических рекомендаций может представлять практическую ценность в качестве скрининг-диагностики ВЗП, результаты которой впоследствии можно дополнить ПЦР-анализом и методом биохимического исследования слюны. Экспресс-определение не требует дорогостоящего оборудования и специальной подготовки медицинского персонала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herrera D., Meyle J., Renvert S., Jin, L. White Paper on Prevention and Management of Periodontal Diseases for Oral Health and General Health. FDI World Dent. Fed. 2018, 20, 1–20.
2. Синев И.И., Нестеров А.М., Садыков М.И., Хайкин М.Б. Современный взгляд на комплексное лечение пациентов с хроническим локализованным пародонтитом средней степени тяжести (обзор литературы) // Аспирантский вестник Поволжья. - 2020. - Т. 20. - №1-2. - С. 108-121. doi: 10.17816/2072-2354.2020.20.1.108-121
3. Köönen E., Gursoy M., Gursoy U. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. J. Clin.

Med. 2019, 8, 1135–1165.

4. Груданов А.И., Зорина О.А. Методы диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Руководство для врачей. - М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2009. - 112 с: ил. ISBN 978-5-8948-1713-2

5. Тарабенко С.В., Царев В.Н., Гарипов Р.Д., Дьячкова Е.Ю., Репина С.И. Микробиологическое обоснование и эффективность применения эрбиевого и неодимового лазеров у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта и перимимплантационных тканей. — Клиническая стоматология. — 2019; 4 (92): 41—45. DOI: 10.37988/1811-153X_2019_4_41

6. Caselli E., Fabri C., D'Accolti M., Soffritti I., Bassi C., Mazzacane S., Franchi M. Defining the oral microbiome by whole genome sequencing and resistome analysis: The complexity of the healthy picture. BMC Microbiol. 2020, 20, 120.

7. Ипполитов Е.В., Николаева Е.Н., Царев В.Н. Биопленка полости рта — индукторы сигнальных систем врожденного иммунитета. Стоматология. 2017;96(4):58-62.

8. Диденко Л.В., Автандилов Г.А., Смирнова Т.А. и др. Исследование процессов колонизации и персистенции микроорганизмов на искусственных материалах медицинского назначения. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015; 5:64-69.

9. Hajishengallis G., Lamont R.J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol. Oral Microbiol. 2012, 27, 409–419.

10. Travis J., Potempa J. The Biphasic Virulence Activities of Gingipains: Activation and Inactivation of Host Proteins. Curr. Protein Pept. Sci. 2003, 4, 443–450.

11. Guo Y., Nguyen K.-A., Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: From cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. Periodontoloy 2000 2010, 54, 15–44.

12. Ушаков Р.В., Царев В.Н., Ушаков А.Р., Айвазов Т.Г. Профилактика перимимплантационного мукозита и перимимплантита с применением препарата по-перечно смешанной гиалуроновой кислоты и силиконсодержащего материала ГЭП-СИЛ. Российская стоматология. 2015;8(1):97-98.

13. Mezyk-Kopiec R., Bzowska M., Potempa J., Bzowska M., Jura N., Sroka A., Black R.A., Bereta J. Inactivation of Membrane Tumor Necrosis Factor Alpha by Gingipains from Porphyromonas gingivalis. Infect. Immun. 2005, 73, 1506–1514.

14. Suetenkov D., Akulovich A., Gritsenko E. Qualitative and quantitative assessment of oral periodontopathetic microflora with BANA-test. Periodontology 2012, 2, 66–70.

Сведения об авторах

Иванова Анастасия Михайловна, нач. НТО ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», *Anastasija M. Ivanova, Head of R&D Department at Association of Medicine and Analytics LLC, e-mail: ai@amamed.ru*
Блинова Алиса Владимировна, канд. мед. наук, ассистент кафедры пародонтологии Тверского государственного медицинского университета, *Alisa V. Blinova, Candidate of Medical Sciences, Assistant of the Periodontology Department, Tver State Medical University, e-mail: blinova-alisa@mail.ru, ORCID: orcid.org/0000-0002-4315-163X*
Дмитриенко Марина Александровна, док. техн. наук, директор ООО «AMA», *Marina A. Dmitrienko, Doctor of Technical Science, director of Association of Medicine and Analytics LLC, t-mail: m_dmitrienko@amamed.ru*
Аронова Екатерина Борисовна, канд. техн. наук, доцент, доцент Высшей школы биотехнологий и пищевых производств ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», *Ekaterina B. Aronova, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor Higher School of Biotechnology and Food Production of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University", Aronova_eb@spbstu.ru, ORCID: 0000-0003-4376-2972*

15. Гайдарова Т.А., Попова Н.В. Количественный и качественный состав микрофлоры полости рта больных хроническим генерализованным пародонтитом. Байкальский медицинский журнал, 95 (4) 2010, 95-98.

16. Loesche W.J. Diagnosing Periodontal Disease by Measuring Proteolytic Activity of Periodontopathogenic Bacteria. US 5 116 735 A, 24 December 1990.

17. Bretz W., Loesche W. Characteristics of Trypsin-like Activity in Subgingival Plaque Samples. J. Dent. Res. 1987, 66, 1668–1672.

18. Loesche W.J., Syed S.A., Laughon B.E. Device for Diagnosing Periodontal Disease. US5223403A, 29 June 1993.

19. MacGregor I.D. Comparison of the Silness-Loe (1964) Index with gravimetric measurement of dental plaque. Clin. Prev. Dent. 1987, 9, 9–12.

20. Wikström M. A Method of Determining Porphyromonas Gingivalis. Google Patents. Available online: <https://patentimages.storage.googleapis.com/f8/34/61/ec7bf278302c42/WO1992007086A1.pdf> (accessed on 30 April 1992).

21. Loesche W. System for Measuring Proteolytic Activity of Periodontopathogenic Bacteria. Google Patents. Available online: <https://patentimages.storage.googleapis.com/63/84/66/6710f95a673032/WO1993024651A1.pdf> (accessed on 9 December 1993).

22. Figueredo C.M.S., Gustafsson A. Protease activity in gingival crevicular fluid. Presence of free protease. J.Clin. Periodontol. 1998, 25, 306–310.

23. Lu R., Meng H., Gao X., Feng L., Xu L. Analysis of short chain fatty acids in gingival crevicular fluid of patients with aggressive periodontitis. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2008, 43, 664–667.

24. Lu R., Feng L., Gao X., Meng H., Feng X. Relationship between volatile fatty acids and Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in gingival crevicular fluids of patients with aggressive periodontitis. Beijing Da Xue Bao Yi Xue Ban 2013, 45, 12–16.

25. Стрельникова Н.В. и др. Способ прогнозирования тяжести пародонтитов по составу условно-пародонтопатогенных видов микробиома корня языка. Патент РУ 2 773 275, 2021.

26. Feitosa A.C.R., Amalfitano J., Loesche W.J. The effect of incubation temperature on the specificity of the BANA (N-benzoyl-DLarginine-naphthylamide) test. Oral Microbiol. Immunol. 1993, 8, 57–61.

27. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. – М.: Издательство БИНОМ, 2014. – 312 с.

28. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие. 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 208 с.: ил. ISBN 978-5-9704-0858-2