

© Коллектив авторов, 2020
УДК 616.314.022.7
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15128>
ISSN – 2073-8137

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПОДДЕСНЕВОЙ МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Е. С. Слажнева¹, Л. А. Елизова¹, Е. С. Лобода², Л. Ю. Орехова², В. Г. Атрушкевич¹

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова, Российская Федерация

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова, Российская Федерация

NEW POSSIBILITIES IN THE VISUALIZATION OF SUBGINGIVAL MICROBIAL BIOFILM USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Slazhneva E. S.¹, Elizova L. A.¹, Loboda E. S.², Orekhova L. Yu.², Atrushkevich V. G.¹

¹ A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Russian Federation

² I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russian Federation

Поддесневая микробная биопленка является одним из инициирующих этиологических факторов заболеваний пародонта. Проведено сравнение изображений, полученных с помощью классической сканирующей электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии с 3D-визуализацией. 3D-изображение дает возможность для лучшего изучения морфологии микроорганизмов и архитектоники ненарушенной поддесневой микробной биопленки.

Ключевые слова: пародонтит, биопленка, пародонтопатогены, сканирующая электронная микроскопия

Subgingival microbial biofilm is one of the initiating etiological factors of periodontal diseases. Images obtained using classical scanning electron microscopy and scanning electron microscopy with 3D visualization were compared. The 3D image improves the quality of the study of the morphology of microorganisms and architectonics of undisturbed subgingival microbial biofilm.

Keywords: periodontitis, biofilm, periodontopathogens, scanning electron microscopy

Для цитирования: Слажнева Е. С., Елизова Л. А., Лобода Е. С., Орехова Л. Ю., Атрушкевич В. Г. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПОДДЕСНЕВОЙ МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(4):544-548. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15128>

For citation: Slazhneva E. S., Elizova L. A., Loboda E. S., Orekhova L. Yu., Atrushkevich V. G. NEW POSSIBILITIES IN THE VISUALIZATION OF SUBGINGIVAL MICROBIAL BIOFILM USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(4):544-548. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15128> (In Russ.)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ЭПС – экзополисахариды

Переход от клинического здоровья к пародонтиту обусловлен не внедрением экзогенных патогенов, а изменениями структуры микробного сообщества, то есть таксономического состава и соотношения микроорганизмов, которые трансформируют сообщества в патогенные состояния [1]. Поддесневая микробная биопленка представляет собой сложную биопленку – структурированное микробное сообщество, насчитывающее более 500 микроорганизмов – «естественных колонизаторов» в матриксе синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ [2, 3].

Дентальные биопленки имеют сложную многоуровневую трехмерную организацию, что затрудняет их изу-

чение [4, 5]. Существует достаточно большое количество методов, позволяющих провести визуализацию сформировавшихся бактериальных пленок. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) как инструмент для 2D-визуализации широко используется во многих научных дисциплинах, включая биологические, и давно зарекомендовала себя как метод, позволяющий проводить цитоморфологические исследования состава поддесневой биопленки [6, 7]. Принцип сканирующей электронной микроскопии заключается в прохождении пучка электронов вдоль поверхности образца и фиксации свойств отраженных электронов.

Как правило, идентификация биопленок основана на визуализации по крайней мере двух из следу-

ющих трех критериев: 1) прикрепление микробов к поверхности, 2) структурированные сборки микробных клеток и 3) наличие экзополимерной матрицы. Однако СЭМ-микротографии по-прежнему остаются 2D-изображениями. Обнаружение трехмерной структуры поверхности на основе СЭМ-изображений позволило бы обеспечить более информативную визуализацию исследуемых объектов. В настоящее время в сканирующей электронной микроскопии появились новые возможности и подходы для изучения архитектоники биопленок, что делает это научно-практическое направление перспективным и актуальным [8].

Цель исследования – изучение ультраструктуры нативной поддесневой микробной биопленки на различных участках корня удаленного зуба с помощью сканирующей электронной микроскопии и сравнение изображений, полученных с помощью классической СЭМ и СЭМ с 3D-визуализацией.

Материал и методы. Для исследования по пародонтологическим показаниям было удалено 12 зубов 3-й степени подвижности с использованием минимально травматичных методик по отношению к корню зуба. Поверхность зубов аккуратно отмывали с помощью физиологического раствора от крови и других загрязнений. Удаленные зубы фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на буфере Хенкса (pH=7,2) при температуре 4 °С, затем дегидратировали в спиртах возрастающих концентраций. После дегидратации образцов использовали метод сушки в критической точке в аппарате Quorum K350 (Quorum GaLa Instrumente GmbH, Германия). Подготовленные образцы монтировали на алюминированный столик токопроводящим углеродным клеем, напыляли золотом в напылительной установке Quorum Q150TS (Quorum GaLa Instrumente GmbH, Германия) и исследовали в сканирующем электронном микроскопе S 3400N (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении в условиях высокого вакуума. Проводили исследование поверхности корня в направлении от цемента-эмалевого границы к верхушке корня зуба с шагом 2 мм. В режиме реального времени получали 3D-микротографии путем одновременной регистрации изображений со встроенных в 4 квадранта детекторов отраженных электронов и программного обеспечения Hitachi PC-SEM.

Результаты и обсуждение. Несмотря на то что для сканирующей микроскопии образцы должны быть обезвожены, так как исследование проводится в условиях вакуума, нативная биопленка поддесневой зубной бляшки наблюдалась во всех образцах, демонстрируя, что протокол исследования был эффективен для этой цели. У некоторых зубов цемент корня был полностью покрыт микробной биопленкой, у других поддесневая бляшка отмечалась в виде скоплений или узелков, а также обнаруживались участки, свободные от биопленки.

На полученной серии микротографий наблюдалось множество различных морфологических форм бактериальных клеток (прямые палочки, извитые формы, цепочки крупных коротких палочек или шаровидных клеток, нитевидные), многовидовая структурированная биопленка поддесневой зубной бляшки, некоторые этапы формирования бактериальной пленки и элементов экзополисахаридного матрикса. Только морфологическая идентификация микроорганизмов является одним из ограничений сканирующей электронной микроскопии, но для изучения ультраструктуры биопленок этот метод яв-

ляется одним из ведущих. Недавний метаанализ данных проекта микробиома человека над- и поддесневой зубной бляшки показал, что 13 родов являются одновременно очень распространенными и имеют высокую распространенность в исследуемой популяции: *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus/Aggregatibacter*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Lautropia* и *Porphyromonas* [9]. Из представленных родов шаровидными являются *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Lautropia*, палочки – *Corynebacterium*, *Capnocytophaga*, *Haemophilus/Aggregatibacter*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, нитевидные палочки – *Fusobacterium*, *Actinomyces*, извитые формы – *Spirochaetaceae* [5].

В представленных нами образцах кокковые и нитевидные бактериальные морфотипы наиболее часто встречались в корональной и средней зонах колонизированной микроорганизмами поверхности корня. Апикальная зона поддесневой бляшки была заселена в основном прямыми палочками и извитыми формами (спирохетами).

На микротографиях микробной биопленки в области цемента-эмалевого соединения отмечалось наличие преимущественно кокковой микрофлоры (рис. 1А). При реконструкции классического изображения, полученного с помощью сканирующей электронной микроскопии, в трехмерное (рис. 1Б) даже на относительно небольшом увеличении (x1500) заметна многослойная и рельефная структура бактериальной биопленки, тогда как стандартное изображение кажется однослойным и плоскостным. Тяжи бактерий покрыты внеклеточным экзополисахаридным матриксом, масса которого, по некоторым данным, составляет до 90 % всей массы биопленки [10]. Бактериальные экзополисахариды – главный компонент матрикса биопленки, который некоторые авторы называют также гликокаликсом или слизистым чехлом. Тип полисахарида, который производится, как правило, варьирует между различными видами микроорганизмов, и некоторые виды могут производить несколько видов полисахаридов. Одним из наиболее часто изучаемых матричных полисахаридов является β-1,6-N-ацетил-D-глюкозамин. Он производится, в частности, *A. actinomycetemcomitans* для образования биопленки. У *A. actinomycetemcomitans* β-1,6-N-ацетил-D-глюкозамин опосредует межклеточную адгезию и способствует сцеплению биопленок, но также защищает клетки от гибели макрофагами [11].

На полученных микротографиях продемонстрированы элементы внеклеточного полимерного матрикса, в том числе благодаря использованию 3D-визуализации. Массив биопленки пронизан многочисленными каналами, устья которых открывались на внешнюю (исследуемую) поверхность цемента. Через просветы каналов не видно подложки, на которой сформировалась биопленка (рис. 1Б).

В биопленке средней трети пародонтального кармана отмечалось преобладание палочковидных и извитых форм бактерий, что более типично для представителей анаэробной микрофлоры; биопленка почти полностью покрывала поверхность цемента корня (рис. 1В). Отмечались межвидовые взаимодействия между бактериями, коагрегация палочковидных и овоидных микроорганизмов (рис. 1Г). Наиболее часто в литературе описывается коагрегация между ранним колонизатором *Streptococcus gordonii* (кокки), промежуточным *Fusobacterium*

nucleatum (длинная нитевидная палочка) и поздним колонизатором *Porphyromonas gingivalis* (овоидная короткая палочка) [4]. Микробные метаболические взаимодействия и межвидовая коммуникация яв-

ляются важными аспектами выживания сообществ, которые также могут быть объектом антимикробных стратегий, основанных на экологическом понимании субгингивальных биопленок.

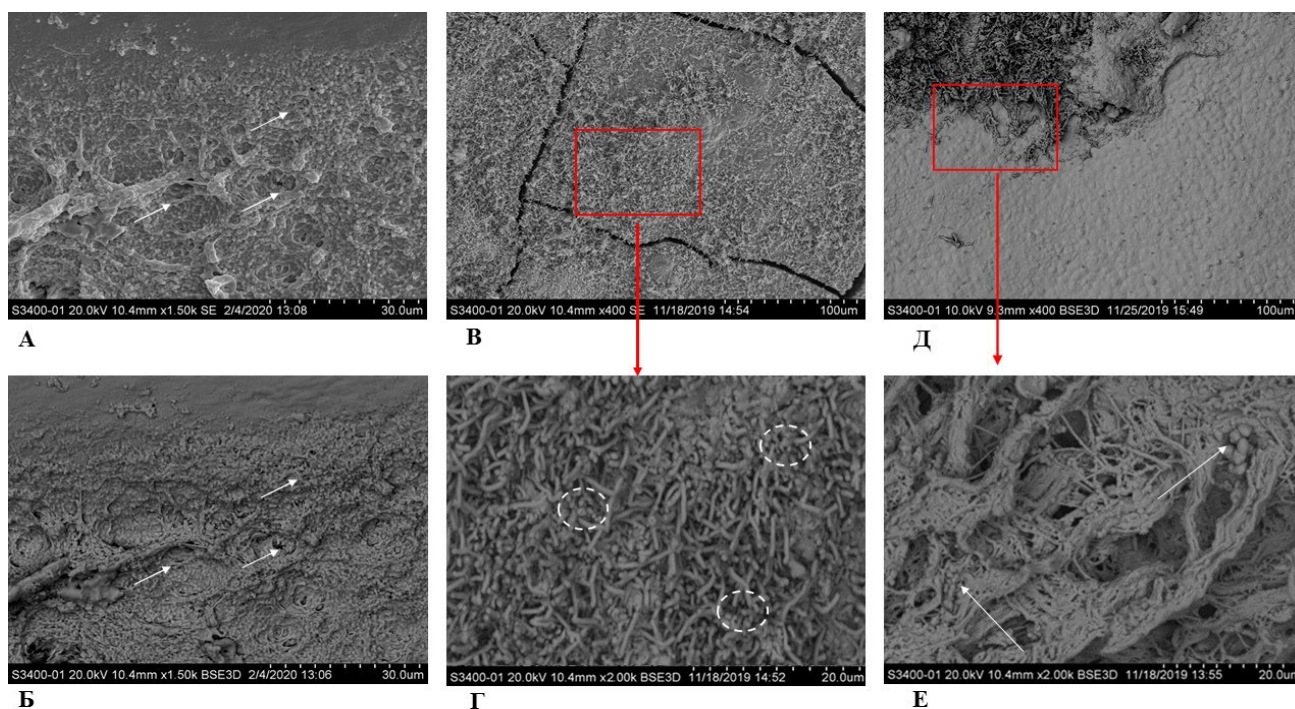


Рис. 1. Микрофотографии микробной биопленки на различных участках корня:

- А – область цемента-эмалевого соединения. Преобладание кокковой микрофлоры. Стрелками указаны каналы в биопленке. Увеличение $\times 1500$; Б – там же 3D-микрофотография. Многослойная и рельефная структура биопленки. Стрелками указаны каналы в биопленке. Увеличение $\times 1500$; В – средняя треть пародонтального кармана. Увеличение $\times 400$; Г – там же 3D-микрофотография. Многослойная архитектура микробной биопленки. Наличие внеклеточного матрикса. Увеличение $\times 2000$; Д – 3D-микрофотография апикальной зоны пародонтального кармана. Отсутствие сформированной биопленки на большей части исследуемой поверхности. Увеличение $\times 400$; Е – 3D-микрофотографии поверхности корня в области сохранной периодонтальной связки. Отмечается присутствие отдельных микроорганизмов и конгломератов бактерий овоидной формы. Указаны стрелками бактерии, фиксированные непосредственно на волокнах периодонта, и заметна пространственная многоуровневая организация этой области. Увеличение $\times 2000$

Резорбция поверхности цемента наблюдалась во многих образцах, и некоторые микроорганизмы неизменно присутствовали в полостях резорбированного цемента. На рисунках 2Д и 2Е представлены микрофотографии поверхности цемента корня, 3D-микрофотография дает рельефное изображение поверхности поврежденного цемента. На ней отчетливо видны кратерообразные дефекты с деминерализованными, подрытыми краями (выделенная область), обнаженные дентинные трубочки.

В нижней части пародонтального кармана периодонтальная связка и соединительная ткань десны граничат с биопленкой. Это область, где происходит дальнейшая потеря прикрепления при прогрессирующем пародонтите и где обычно колонизируется более чистая поверхность зуба. Выявлены нитевидные, палочковидные и спирохетообразные формы бактерий.

В биопленке в области дна пародонтального кармана были обнаружены длинные/короткие палочковидные спирохетообразные и нитевидные микроорганизмы (рис. 2, В, Г). Нередко биопленка не была сформирована полностью, мелкие агрегаты и отдельные бактериальные клетки были рассеяны по всей зоне (рис. 2Д). На микрофотографии с 3D-визуализацией отдельные бактериальные клетки

лучше контрастировались на поверхности неизменного цемента корня.

Наблюдалось два типа бактериальной колонизации: некоторые бактерии образовывали агрегаты (рис. 2А), но не были покрыты пленкообразной структурой, а другие виды бактерий образовывали не большую бактериальную биопленку на поверхности цемента (рис. 2Б).

Удалось зафиксировать некоторые этапы формирования микробной биопленки. Можно наблюдать адгезию микроорганизмов к поверхности (рис. 3, А, Б), коагрегацию бактерий, образование микроколоний и начало синтеза элементов липополисахаридного матрикса (рис. 3, В, Г). Микрофотографии в режиме 3D (рис. 3, Б, Г) лучше демонстрируют объемную структуру и пространственную организацию биопленки, визуализируются более четкие контуры бактерий. Элементы экзоскелетного липополисахаридного матрикса более отчетливо просматриваются на трехмерных фотографиях.

Заключение. Новый протокол визуализации СЭМ, при котором в режиме реального времени изображение получают одновременно с 4 детекторов вторичных отраженных электронов и формируется 3D-изображение, дает возможность для лучшего изучения морфологии микроорганизмов и

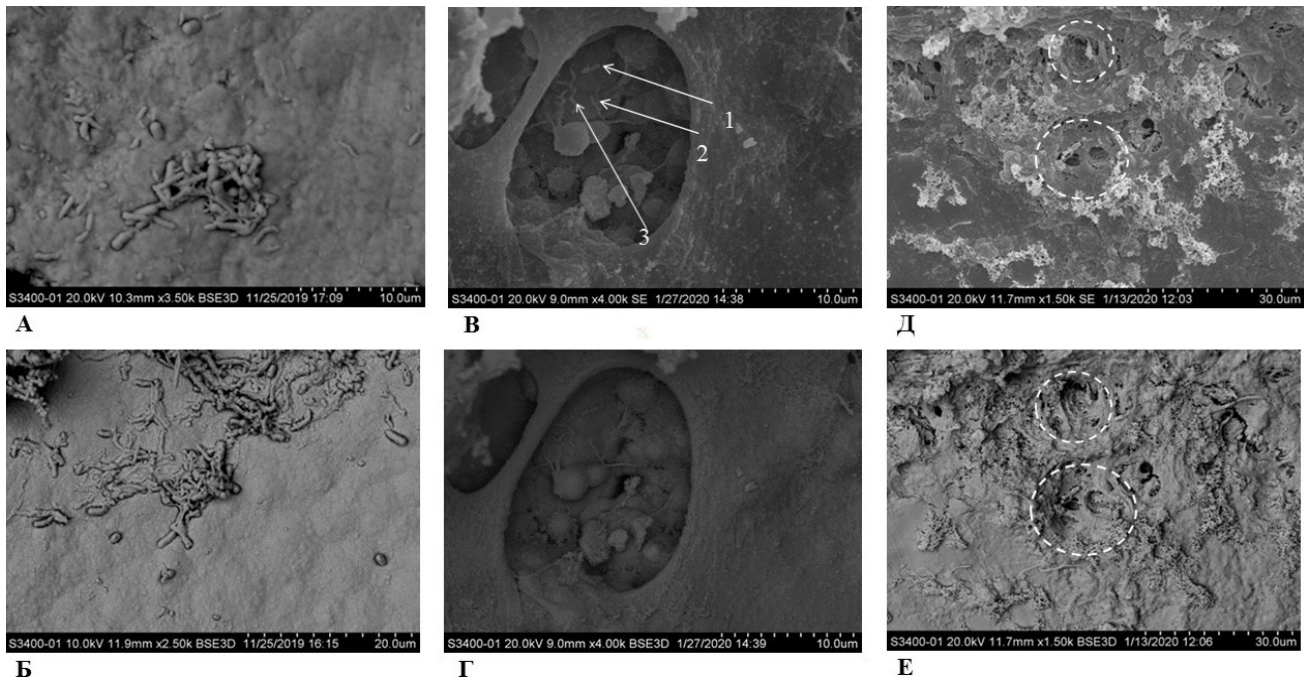


Рис. 2. Особенности ультраструктуры поддесневой микробной биопленки:

А – 3D-микрофотография. Аггегаты бактерий. Увеличение $\times 3500$; Б – 3D-микрофотография апикальной трети пародонтального кармана. Небольшая бактериальная биопленка на поверхности цемента. Увеличение $\times 3500$; В – апикальная зона пародонтального кармана. 1 – короткая палочковидная бактерия; 2 – длинная палочковидная (нитевидная) бактерия; 3 – спирохетообразная (извитая) бактерия. Указаны стрелками. Увеличение $\times 4000$; Г – 3D-микрофотография бактерий в апикальной зоне пародонтального кармана. Лучшая визуализация взаимного расположения объектов и объемное отображение исследуемой поверхности после трехмерной реконструкции стандартного изображения. Увеличение $\times 4000$; Д – микрофотография, демонстрирующая резорбцию поверхности цемента. Увеличение $\times 1500$; Е – 3D-микрофотография поверхности поврежденного цемента. Кратерообразные дефекты с деминерализованными, подрытыми краями (выделенная область), обнаженные дентинные трубочки. Увеличение $\times 1500$

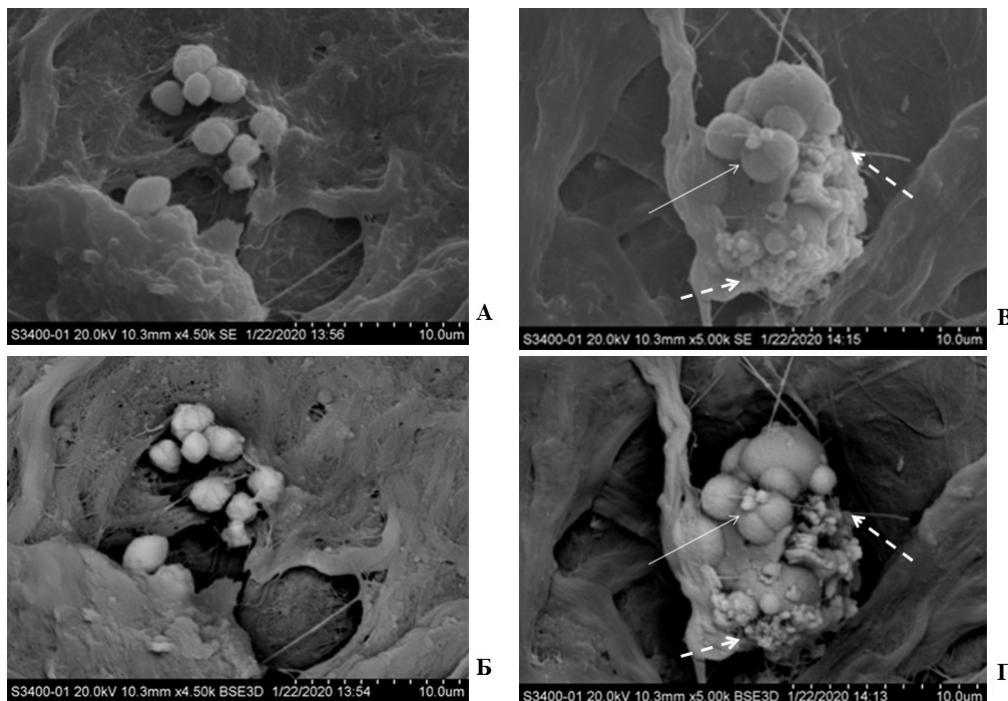


Рис. 3. Этапы формирования микробной биопленки:

А, Б – адгезия микроорганизмов к поверхности. Увеличение $\times 4500$; В, Г – коагрегация бактерий, образование микроколоний, начало синтеза элементов липополисахаридного матрикса. Увеличение $\times 5000$. Прерывистой стрелкой указаны элементы липополисахаридного матрикса. Сплошной стрелкой указана бактериальная клетка, находящаяся в фазе деления. Микрофотографии в режиме 3D лучше демонстрируют объемную структуру и пространственную организацию биопленки, более четкие контуры бактерий. Элементы экзоцеллюлярного липополисахаридного матрикса более отчетливо визуализируются на трехмерных фотографиях

архитектоники ненарушенной поддесневой микробной биопленки *ex vivo*, а также более достоверное представление о поверхностных характеристиках исследуемого образца. Выяснение того, из чего состоят биопленки и как они структурированы, является ключом к разработке новых способов лечения заболеваний, связанных с биопленками, у пациентов. Визуализация позволит более объективно подходить к оценке эффективности новых методов лечения заболеваний пародонта, инициируемых нарушениями в микробных сообществах биопленок.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Arweiler N. B., Netuschil L. The Oral Microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016;902:45-60. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4
2. Marsh P. D., Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J. Clin. Periodont.* 2017;44(18):S12-S22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>
3. Yamashita Y., Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J. Oral Sci.* 2017;59(2):201-206. <https://doi.org/10.2334/josnusd.16-0856>
4. El-Awady A., Rabelo M., Meghil M. M. Polymicrobial synergy within oral biofilm promotes invasion of dendritic cells and survival of consortia members. *Biofilms and Microbiomes.* 2019;5:11. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0084-7>
5. Valm A. M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J. Molec. Biol.* 2019;431:2957-2969. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016>
6. Sha Q., Chen C. Effect of different Aggregatibacter actinomycetemcomitans strains on dual-species biofilms formed with Porphyromonas gingivalis or Dialister pneumosintes. *Eur. J. Oral Sci.* 2020;128(2):136-144. <https://doi.org/10.1111/eos.12682>
7. Holliday R., Preshaw P. M. The ultrastructure of subgingival dental plaque, revealed by high-resolution field emission scanning electron microscopy. *BDJ Open.* 2015;1:15003. <https://doi.org/10.1038/bdjopen.2015.3>
8. Tafti A. P., Kirkpatrick A. B., Holz J. D. 3DSEM: A 3D microscopy dataset. *Data in Brief.* 2016;6:112-116. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.018>
9. Mark Welch J. L., Rossetti B. J., Rieken C. W., Dewhirst F. E., Borisy G. G. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *PNAS.* 2016;113(6):E791-E800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113>
10. Gloag E. S., Fabbri S. Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm.* 2020;2:100017. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100017>
11. Xiao J., Klein M., Falsetta M. L. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathogens.* 2012;8(4):e1002623. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002623>

Сведения об авторах:

Слажнева Екатерина Сергеевна, аспирант; тел.: 89161614847; e-mail: katushkor@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4527-7471>

Елизова Лариса Александровна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры пародонтологии; тел.: 84999730241; e-mail: algur@bk.ru

Лобода Екатерина Сергеевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии терапевтической и пародонтологии; тел.: 88123386407; e-mail: ekaterina.loboda@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1094-7209>

Орехова Людмила Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой, президент Российской пародонтологической ассоциации; тел.: 88123386407; e-mail: prof_orekhova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8026-0800>

Атрушкевич Виктория Геннадьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры пародонтологии, вице-президент Российской пародонтологической ассоциации; тел.: 89166106263; e-mail: atrushkevichv@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4141-1370>

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.135 – 616.839:616.314.18-002.4

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15129>

ISSN – 2073-8137

ОСОБЕННОСТИ ВЕГЕТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ КРОВОТОКА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ В ПАРОДОНТЕ

А. А. Ремизова¹, М. Г. Дзгоева¹, Е. В. Щетинин², З. Г. Дзгоева¹, А. А. Церкова¹

¹ Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ, Российская Федерация

² Ставропольский государственный медицинский университет, Российская Федерация

FEATURES OF THE AUTONOMIC REGULATION OF BLOOD FLOW IN PERIODONTIUM CHRONIC INFLAMMATION

Remizova A. A.¹, Dzgoeva M. G.¹, Shchetinin E. V.², Dzgoeva Z. G.¹, Cerekova A. A.¹

¹ North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russian Federation

² Stavropol State Medical University, Russian Federation

Проведена оценка общего вегетативного гомеостаза у пациентов с хроническим пародонтитом, определен характер вегетативных влияний на кровоснабжение тканей пародонта методом дыхательной пробы. Результаты выявили наличие значимых нарушений вегетативной регуляции сосудов микроциркуляторного русла пародонта, что подтверждено дезадаптивным ответом микрососудов на пробу у большинства обследованных. Для общего вегетативного гомеостаза при пародонтитах характерно повышение активности обоих отделов вегетативной нервной системы в покое с превалированием активности симпатического отдела. У каждого третьего пациента с пародонтитом (как с легкой, так и со средней степенью тяжести) выявлена дисфункция вегетативных влияний в сердечно-сосудистой системе.

Ключевые слова: пародонтит, вегетативный гомеостаз, кровоснабжение пародонта