

Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки

В.Н.Царёв, М.С.Подпорин, Е.В.Ипполитов

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова»,
Москва, Российская Федерация

Частота осложнений по результатам эндодонтического лечения хронических форм пульпита и периодонтита остается высокой и составляет от 32% до 50%, что связывают со свойствами микробной биопленки. Однако исследования этого объекта в корневых каналах и методов эрадикации биопленок повсеместно находятся в начальной фазе исследования.

Цель исследования – лабораторное обоснование и оценка эффективности комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции корня зуба при хронических формах пульпита и периодонтита, а также оценка эффективности эндодонтического лечения с применением сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы. Микрофлору корневых каналов изучали бактериологическим методом (4 бактериальных и 2 грибковых клинических изолята). Влияние ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала оценивали с использованием биореактора. Исследование биопленок системы корневых каналов зуба у больных хроническими формами пульпита (52 человека) и периодонтита (16 человек) проведено с использованием сканирующей электронной микроскопии.

Результаты. Установлено наличие обильной микробной биопленки в устьях дентинных канальцев и obturation дентинных канальцев в отдельных случаях. Описаны особенности формирования кривых роста популяций бактерий оральной микрофлоры (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida krusei*) в результате комплексного воздействия фотодинамической активации и ультразвука по сравнению с контролем без такового. Комплексное воздействие существенно угнетает рост микробных популяций оральных бактерий и грибов рода *Candida*.

Ключевые слова: корневые каналы, микробная биопленка, сканирующая электронная микроскопия, эндодонтическое лечение, ультразвуковая ирригация, фотодинамическая терапия, биореактор, антимикробная активность *in vitro*

Для цитирования: Царёв В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Оценка эффективности эндодонтической дезинфекции корневых каналов зуба с применением сканирующей электронной микроскопии микробной биопленки. Бактериология. 2017; 2(1): 6–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-6-13

Evaluating of the effectiveness of endodontic disinfection of root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms

V.N.Tsarev, M.S.Podporin, E.V.Ippolitov

Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

The frequency of complications after endodontic treatment of chronic forms of pulpitis and periodontitis remains high and ranges from 32% to 50%, which is associated with the properties of microbial biofilms. However, studies of this object in the root canals and biofilm eradication methods are in the initial phase.

The objective. The goal is laboratory study and evaluation of comprehensive effects of ultrasonic treatment and photoactivated disinfection of the tooth root at chronic forms of pulpitis and periodontitis as well as evaluation of the effectiveness of endodontic treatment by scanning electron microscopy.

Materials and methods. Microflora of root canals was studied by bacteriological method (4 bacterial and 2 fungal clinical isolates). Effect of ultrasonic treatment in combination with photoactivated disinfection of the root canal system on the microflora was evaluated using a bioreactor. A biofilm root canal system in patients with chronic forms of pulpitis (52 people) and periodontitis (16 people) was studied by scanning electron microscopy.

Results. In some cases, the presence of abundant microbial biofilms in the mouths of dentinal tubules and obturation of dentinal tubules was found. Growth curves features of the oral microflora bacterium populations (*Porphyromonas gingivalis*; *Fuso-*

Для корреспонденции:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова

Адрес: 123425, Москва, ул. Дедегатская, 20/1
Телефон: (915) 401-9131
E-mail: nikola777@rambler.ru

Статья поступила 19.12.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

For correspondence:

Viktor N. Tsarev Sc.D.(Med), professor. Director of Research Institute of Medicine and Dentistry, Head of Department by microbiology, virology and immunology of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Yevdokimov

Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (915) 401-9131
E-mail: nikola777@rambler.ru

The article was received 19.12.2016, accepted for publication 15.03.2017

bacterium nucleatum; Streptococcus sanguinis; Streptococcus mutans; Candida albicans; Candida krusei) after complex effects of photodynamic activation and ultrasound were described. It was shown that the combined effect significantly inhibits the growth of microbial populations of oral bacteria and fungi of the genus *Candida*.

Keywords: *root channels, microbial biofilm, scanning electron microscopy, endodontic treatment, ultrasonic irrigation, photodynamic therapy, bioreactor, in vitro antimicrobial activity*

For citation: Tsarev V.N., Podporin M.S., Ippolitov E.V. Evaluating of the effectiveness of endodontic disinfection of root channels by using scanning electron microscopy of microbial biofilms. *Bacteriology*. 2017; 2(1): 6–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-6-13

Около трети всех осложнений кариеса зубов в структуре стоматологических заболеваний выпадает на долю пульпитов и периодонтитов. Однако результаты общепринятого эндодонтического лечения пациентов не могут считаться вполне удовлетворительными, так как частота осложнений по результатам лечения остается высокой и колеблется, по данным литературы, от 32% до 50% в сроки наблюдения свыше двух лет [1, 2].

Сложившиеся в стоматологической науке представления о морфологии пульпы зуба, физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в ней, позволяют поновому взглянуть на методики лечения, заставляя находить все более рациональные решения. Так, современные методики выявления патогенных микроорганизмов позволили больше узнать о составе микрофлоры инфицированных каналов, что способствовало повышению эффективности дезинфекции.

В стремительно развивающихся технологиях аэробного и анаэробного культивирования бактерий исследователями высказывается единодушное мнение, что осложнения кариеса зубов имеют полибактериальный характер. Среди патогенов, колонизирующих корневые каналы, выделяют грамотрицательные облигатно-анаэробные палочки разных таксономических групп, а также микроаэрофильные стрептококки [3, 4].

Эндодонтическая обработка каналов остается основным этапом в комплексной терапии заболеваний пульпы, и от того, как проведен этот этап, напрямую зависят отдаленные результаты лечения [5, 6]. В ходе инструментальной обработки образуется так называемый «смазанный слой», который представляет собой конгломерат аморфного клейкого вещества, содержащего отростки одонтобластов, микроорганизмы, остатки тканей пульпы и неорганический матрикс дентина. Бактерии проникают в дентинные каналы, и детрит быстро блокирует латеральные анатомические ответвления, тем самым создавая условия для формирования биопленки, которая, по-видимому, создает условия для дальнейшего размножения бактерий в системе дентинных канальцев [7].

В связи с остротой этой проблемы предложено использование дополнительных физических воздействий, которые, по мнению авторов, способствуют разрушению биопленки. Одним из наиболее популярных является в настоящее время метод фотоактивируемой дезинфекции. Он основан на использовании различных фотобиологических эффектов, вызываемых посредством сочетанного применения светового излучения, кислорода и фотосенсибилизатора [8]. Особое значение приобретает также качественная ирригация корневых каналов с активацией ирриганта с помощью ультразвукового файла пьезоэлектрической группы, что, возможно, повышает эффективность эндодонтического лечения с точки зрения очистки стенок дентинных канальцев [9].

Целью нашего исследования являлось лабораторное обоснование и оценка эффективности комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции корня зуба при хронических формах пульпита и периодонтита, а также оценка эффективности эндодонтического лечения с применением программируемого биокультивирования штаммов и сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы

Всего было обследовано 84 пациента с диагнозом хронический пульпит, в том числе: 29 с диагнозом хронический фиброзный пульпит (ХФП) и 21 с хроническим гангренозным пульпитом (ХГП); 34 пациента с диагнозом хронический периодонтит в фазе обострения. Возраст пациентов составил от 25 до 45 лет (для чистоты эксперимента, т.к. у пациентов более старшего возраста была выявлена общесоматическая патология).

В **клинической части** исследования в каждой группе методом случайной выборки были сформированы по 2 подгруппы:

- 1-ю подгруппу сравнения, или контрольную, составили пациенты, которым проводилась традиционная методика лечения, и сопровождалась взятием материала для проведения сканирующей электронной микроскопии системы дентинных канальцев (СЭМ).

Структуру биопленки корневых каналов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием двулучевого микроскопа «Quanta 200 3D» (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума, при ускоряющих напряжениях 5 кВ, с предварительным напылением золотом (999) в установке «SPI-Module Sputter/Carbon Coater System» (SPI Inc. USA);

- 2-ю подгруппу исследования – основную составили пациенты, которым проводили комплексное лечение с использованием ультразвуковой активации ирриганта и дальнейшей фотодинамической обработкой.

В подгруппе сравнения традиционная методика эндодонтического лечения проводилась в соответствии с протоколом Европейского общества эндодонтистов, а в основной подгруппе, после процедуры механической обработки каналов, проводили медикаментозную обработку с использованием ультразвуковой активации ирриганта на протяжении 10 секунд, затем проводилась фотодинамическая дезинфекция на протяжении 30 секунд, повторная обработка проводилась с сокращенной экспозицией в 2 раза (5 секунд УЗ, 15 секунд ФДТ соответственно). Соотношение проводимых процедур в процессе лечения составило 1 : 1.

В **экспериментальной части** исследования для оценки воздействия ультразвуковой активации ирриганта на штаммы

микроорганизмов использовали аппарат пьезоэлектрической группы «Ultrasonic DTE-D5», а для проведения фотоактивируемой дезинфекции – аппарат «Fotosan 360» с применением в качестве фотосенсибилизатора толуидинового синего.

Микробиологическое изучение патологического содержания корневых каналов осуществляли с помощью бактериологического метода исследования, включавшего в обязательном порядке анаэробное культивирование путем количественных высевов на питательную среду M144 (Himedia, Индия) с добавлением крови (для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий) и M1297A (Himedia, Индия) для грибов рода *Candida*.

Посевы помещали в термостат при температуре 37°C на 48 ч (для анаэробных культур – в анаэроцист на 7 сут), после чего использовали автоматическую систему подсчета количества колоний «Scan 500» (Interscience, Франция).

Из числа выделенных штаммов для экспериментальной части исследования были отобраны наиболее часто встречающиеся у обследованных нами пациентов (4 – бактериальных и 2 – грибковых клинических изолята): *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida krusei*.

В экспериментальной части исследования проводили оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала с использованием биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). В настоящем исследовании данная система, предназначенная для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени, была использована нами впервые в отечественной практике для культивирования анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы, стрептококков и грибов рода *Candida*. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda = 850$ нм.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И.Евдокимова.

В стерильные пластиковые пробирки Eppendorf помещали в равном соотношении взвесь испытуемого штамма и фотосенсибилизатор (по 0,20 мл соответственно), что в конечном количестве равнялось 10^6 КОЕ (колониеобразующих единиц) (в логарифмическом выражении 6,0 соответственно). Экспозиция при ультразвуковой обработке – 10 секунд.

При проведении эксперимента первоначально помещали наконечник ультразвукового аппарата непосредственно в бактериальную взвесь, включали на необходимый период времени, а затем добавляли ФС и помещали наконечник диодного аппарата и световое излучение на 30 секунд (в соответствии с инструкцией). В качестве контроля использовали бактериальную взвесь без последующей дальнейшей ее обработки.

Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали 2 типа пробирок: пробирки 50 мл с мембранным фильтром (TubeSpin®) для аэробов и пробирки 50 мл по типу

Falcon с крышкой без мембраны. В каждую пробирку добавляли 15 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь с помощью биохимической пипетки.

Пробирки помещали в биореактор и с помощью программного обеспечения задавали необходимые параметры культивирования. Для каждого вида микроорганизмов использовали свои настройки биореактора:

- *Porphyromonas gingivalis* (Temperature: 37°C; RPM: 1200 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 1 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);

- *Fusobacterium nucleatum* (Temperature: 37°C; RPM: 1200 min⁻¹; Measurement freq.: 2 h⁻¹; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);

- *Streptococcus sanguis* (Temperature: 37°C; RPM: 1500 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);

- *Streptococcus mutans* (Temperature: 37°C; RPM: 1700 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);

- *Candida albicans* (Temperature: 37°C; RPM: 1300 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 3 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);

- *Candida krusei* (Temperature: 37°C; RPM: 1300 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 3 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm).

Культивирование проводили для грибов – в течение 2 сут, для пародонтопатогенных видов бактерий и стрептококков – в течение 5 сут. Регистрация точек кривой роста – каждые 4 ч.

Результаты эксперимента отображались на графике динамики изменения оптической плотности на протяжении всего периода культивирования. По ключевым точкам кривых роста микробных популяций проводили статистическую обработку данных в 5 повторях и обрабатывали методом параметрической статистики для малой выборки по Манну-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты клинико-лабораторных исследований

В клинической части нашей работы мы сравнивали частоту диагностируемых осложнений при лечении различных форм хронического пульпита и периодонтита, а именно: потребность в повторном эндодонтическом лечении, а также необходимость проведения оперативного хирургического вмешательства. На диаграммах (рис. 1) видно, что в подгруппах, где использовалась стандартная методика лечения, процент повторного лечения и хирургического вмешательства превалирует по сравнению с исследуемой группой (в среднем в 1,5–2 раза чаще).

Как известно, система корневого канала зуба часто имеет сложную морфологию, особенно жевательной группы зубов. Идеально круглый в поперечном сечении, конусовидный корневой канал с одним апикальным отверстием является, пожалуй, редким исключением. Тем самым, достичь полноценной очистки, стерилизации и оптимального формирования стенок корневых каналов возможно далеко не во всех случаях. В подавляющем большинстве случаев каналы имеют неправильную форму, различный диаметр в букколингвальном

и мезиодистальном направлении, многочисленные поднутрения, так называемые «плавники». От основного канала на разных уровнях отходит множество латеральных канальцев. Известно, что основной канал в апикальной части образует дельту и открывается на верхушке корня не одним, а несколькими апикальными отверстиями [10, 11].

По данным литературы, при эндодонтической обработке формируется «смазанный слой», содержащий микроорганизмы [4, 11]. Считается, что «смазанный слой» для микроорганизмов является питательной средой, а также препятствует полноценной адгезии пломбирочных материалов к стенкам корневых каналов. Поэтому при сканирующей электронной микроскопии он представлен элементами микробной биопленки, что подтверждено нашими исследованиями.

В нашем исследовании с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) установлено наличие высокого уровня микробной контаминации «смазанного слоя» в зоне

корневого канала и дентинных канальцев (рис. 2). На микрофотографии при увеличении 1500 раз видны устья дентинных канальцев, которые obturированы скоплениями микроорганизмов, формирующих биопленку (рис. 2А). При увеличении 5000 раз хорошо различимы палочковидные (бактероидные) микробные клетки и округлые дрожжевые элементы грибов (рис. 2Б).

После применения комплексной эндодонтической дезинфекции происходило разрушение матрикса биопленки и удаление микробных скоплений, obturирующих устья дентинных канальцев. При этом «смазанный слой» частично сохранялся (рис. 3).

Таким образом, ассоциации микроорганизмов полости рта колонизируют экосистему корневых каналов в виде биопленки, это существенно затрудняет их удаление из системы корневых каналов, а также препятствует полноценной деконтаминации системы корневых каналов от микроорганизмов. Данное обстоятельство явилось основани-

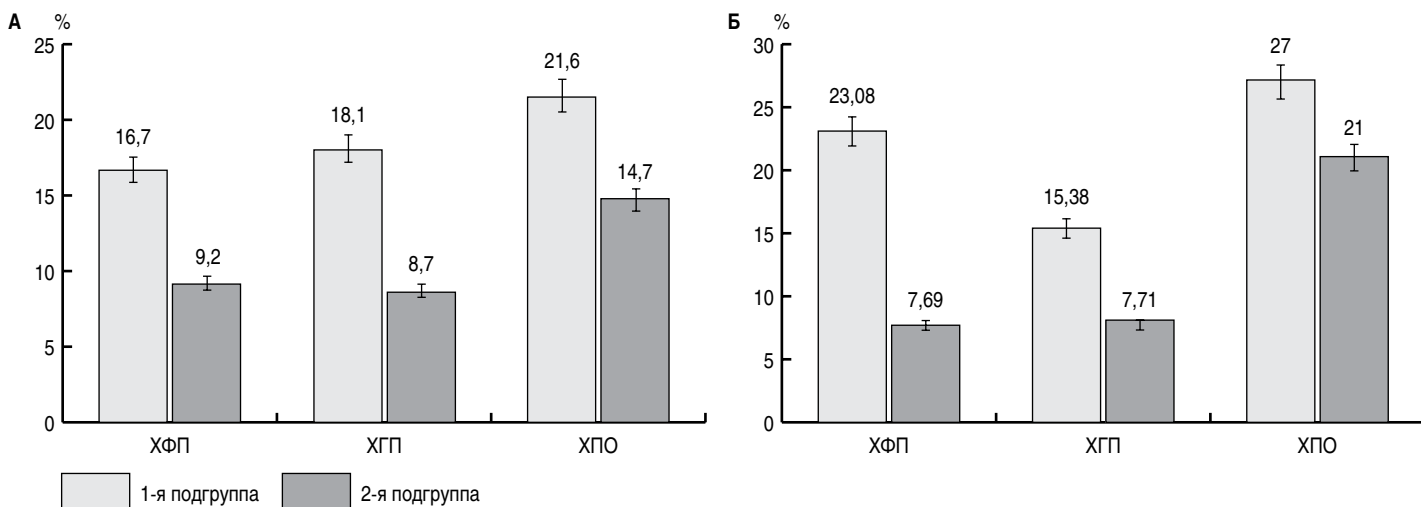


Рис. 1. Клинические показатели эффективности комплексного физиотерапевтического лечения (УЗ + ФДТ): А – частота повторного эндодонтического лечения; Б – частота осложнений, требующих хирургического лечения (ХФП – хронический фиброзный пульпит, ХГП – хронический гангренозный пульпит, ХПО – хронический периодонтит).

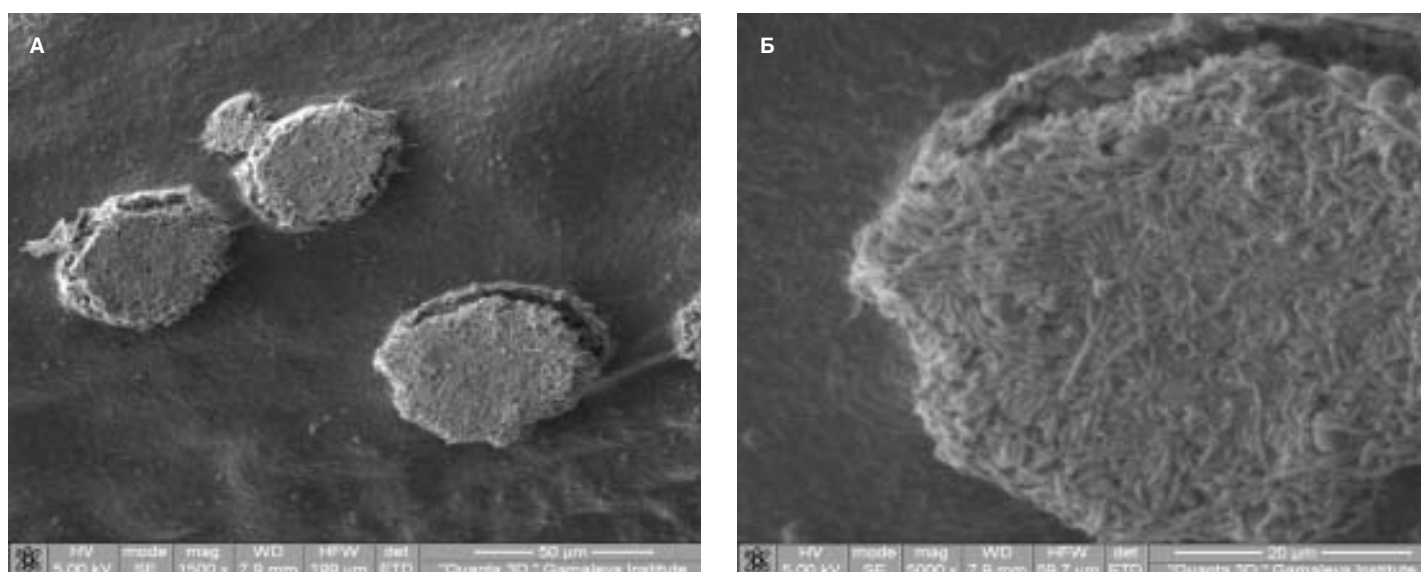


Рис. 2. Микробная obturация дентинных канальцев. Сканирующая электронная микроскопия: А – видны устья трех канальцев. Ув. 1500 раз; Б – устье одного из канальцев. Ув. 5000 раз.

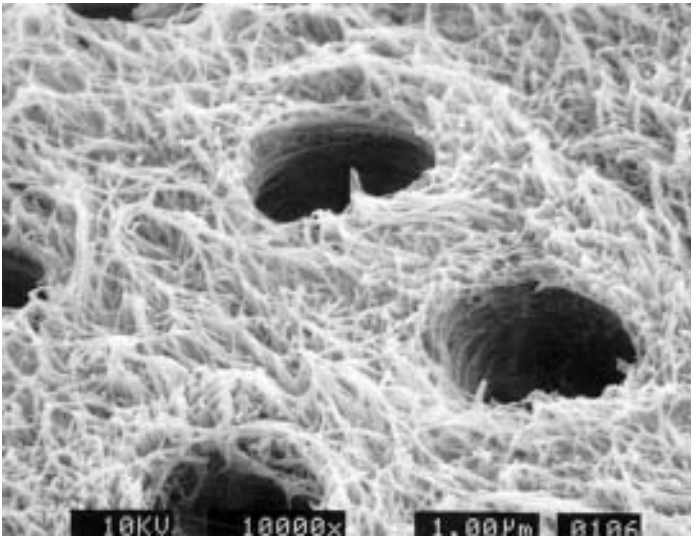


Рис. 3. Устья дентинных каналов после эндодонтической дезинфекции (остатки «смазанного слоя»). Сканирующая электронная микроскопия (ув. 10 000 раз).

ем для расширения нашего исследования в экспериментальной части. Используя новейшие технологии культивирования бактерий с автоматизированным мониторингом этого процесса, мы провели сравнительную оценку фотодинамического и ультразвукового воздействия на разные типы микроорганизмов – возбудителей эндодонтической инфекции.

Результаты экспериментальной части

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамотрицательных анаэробных бактерий с использованием модифицированного метода разведений показала следующее (рис. 4).

На представленных графиках видно, что лаг-фаза, охватывающая промежуток от момента посева бактерий до начала их роста, продолжалась в среднем одинаково у всех исследуемых штаммов – в пределах суток. Так, для *Porphyromonas gingivalis* начало роста отмечалось на 16-й ч

культивирования, а для *Fusobacterium nucleatum* – на 20-й ч, как в контрольной, так и исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза, характеризующаяся прогрессирующим нарастанием скорости деления клеток, имела достоверные отличия как по достижению максимума биомассы (определяемой при данной методике по оптической плотности – OD), так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *Porphyromonas gingivalis* – 2,37 OD (40 ч); *Fusobacterium nucleatum* – 2,45 OD (48 ч). Задержку логарифмической фазы и переход в стационарную фазу в исследуемых пробах наблюдали еще через 20–28 ч культивирования. Показатели пикового максимума оптической плотности исследуемой пробы составили: *Porphyromonas gingivalis* – 1,47 OD (88 ч); *Fusobacterium nucleatum* – 1,46 OD (44 ч) соответственно.

При оценке чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамположительных бактерий установлено, что лаг-фаза роста данных бактериальных популяций продолжалась немного дольше, чем у грамотрицательных бактерий, и заканчивалась к 24 ч культивирования как в контрольной, так и исследуемой пробе (рис. 5). Экспоненциальная (логарифмическая) фаза также имела достоверные отличия: как по достижению максимума биомассы, так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *Streptococcus sanguis* – 2,39 OD (40 ч); *Streptococcus mutans* – 2,49 OD (48 ч). Задержку логарифмической фазы и переход к стационарной фазе в исследуемых пробах наблюдали в промежутке от 32 ч до 40 ч культивирования. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *Streptococcus sanguis* – максимум был отмечен на 36 ч и составил 1,58 OD; более устойчивым оказался *Streptococcus mutans* – 2,01 OD (44 ч).

В экспериментах с грибами рода *Candida* (рис. 6) видно, что лаг-фаза продолжалась не более 6 ч как в контрольной, так и в исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза была для разных видов различна, особенно в скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности в контрольной пробе составили: *Candida albicans* – 7,81 OD (58 ч); *Candida krusei* – 8,5 OD

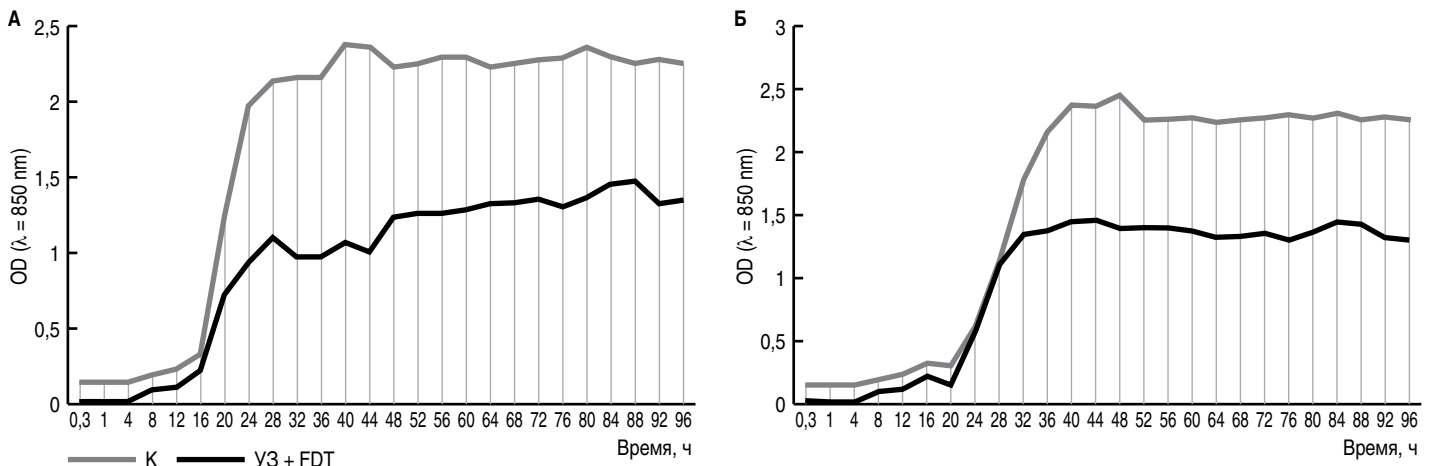


Рис. 4. Оценка чувствительности штаммов грамотрицательных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (ФДТ) обработка *in vitro* (А – *Porphyromonas gingivalis*; Б – *Fusobacterium nucleatum*).

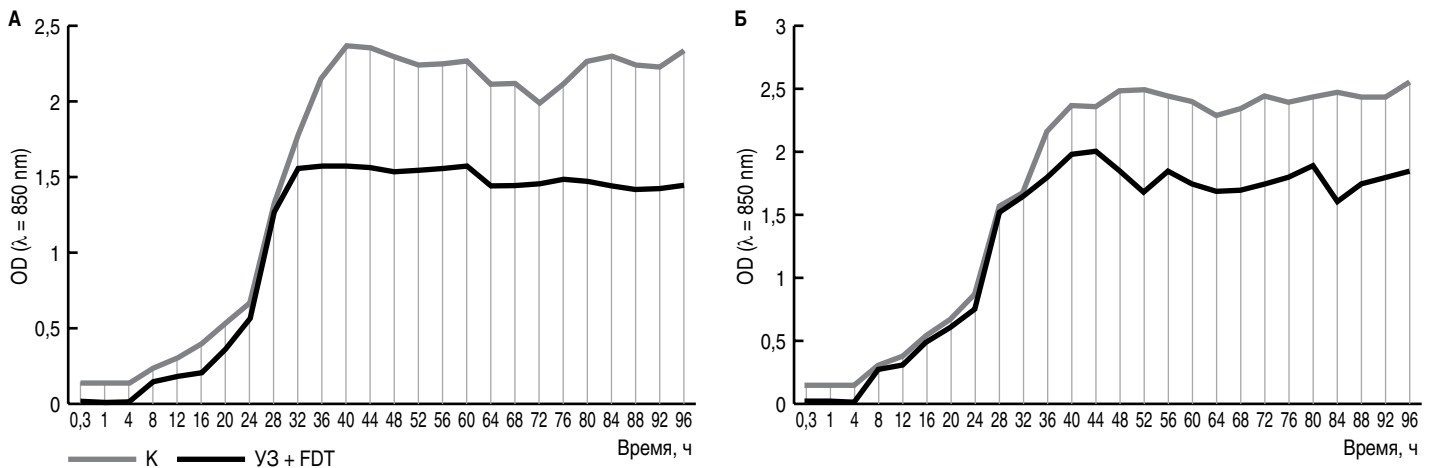


Рис. 5. Оценка чувствительности штаммов грамположительных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (UZ) + фотодинамическая (FDT) обработка *in vitro* (А – *Streptococcus sanguis*; Б – *Streptococcus mutans*).

(62 h). Задержка логарифмической фазы в исследуемых пробах наблюдалась на промежутке от 14 до 34 ч культивирования, причем у *Candida krusei* к 14 ч существенно снизилась скорость прироста клеток, а задержка лог-фазы отмечалась только на 34 ч. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *Candida albicans* – максимум был отмечен на 22 ч и составил 5,61 OD; более устойчивым оказался *Candida krusei* – 6,56 OD (42 h).

Суммарные данные, демонстрирующие выявленные усредненные тенденции роста бактериальных популяций в условиях ультразвуковой обработки в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией, представлены в таблице.

Как следует из представленных данных, для всех исследованных штаммов наблюдали статистически достоверную тенденцию к снижению воспроизводства бактериальной популяции после рассматриваемого вида физического воздействия (фотоактивация и ультразвук). Наиболее выраженное угнетение роста бактериальных популяций наблюдалось при сравнении таких узловых точек кривых роста, как начало подъема логарифмической фазы и в стационарной фазе, однако полного прекращения роста бактериальных популяций и изменения траектории кривой роста ни в одном случае в эксперименте мы не наблюдали.

Обсуждение результатов

Полученные в нашем исследовании результаты позволяют предположить, что любой из представителей микробиоты, колонизирующей поверхность зуба, может контаминировать кариозную полость и проникнуть в пульпу зуба и далее – в систему дентинных канальцев, что является причиной воспалительного процесса. К ранним колонизаторам, которые формируют начальную биопленку, относят различные виды микроаэрофильных стрептококков, обладающих высокими адгезивными свойствами по отношению к эмали зуба. К промежуточным колонизаторам относят фузобактерии, к поздним – большинство представителей пародонтопатогенных видов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и др.).

По данным наших предыдущих исследований, из системы дентинных каналов могут выделяться с высокой частотой (от 50 до 90%) представители облигатно-анаэробных видов – *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus niger*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Tannerella forsythia*, но с меньшей (от 25 до 40%) – представители преимущественно микроаэрофильных видов – *Streptococcus sanguis*, *Propionibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Acti-*

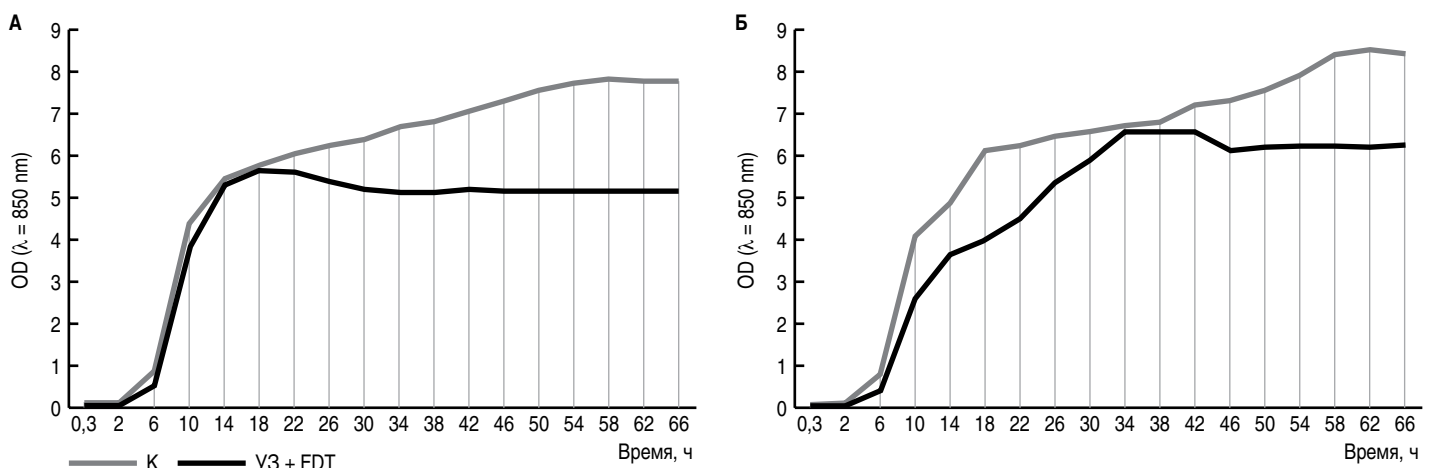


Рис. 6. Оценка чувствительности штаммов дрожжевых грибов рода *Candida* к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (UZ) + фотодинамическая (FDT) обработка *in vitro* (А – *Candida albicans*; Б – *Candida krusei*).

Таблица. Сравнительная характеристика количественных параметров роста микробных популяций с учетом узловых точек кривой роста (по оптической плотности)

Точка кривой роста	Штамм											
	<i>P. gingivalis</i>		<i>F. nucleatum</i>		<i>S. sanguis</i>		<i>S. mutans</i>		<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ	К	ФД ± УЗ
Начало подъема лаг-фазы	0,19 ± 0,04	0,09* ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,09* ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,15* ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,03
Начало подъема логарифм. фазы	0,32 ± 0,04	0,21* ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,15* ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,57* ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,85 ± 0,04	0,53* ± 0,04	0,8 ± 0,05	0,46* ± 0,04
Начало подъема стац. фазы	2,13 ± 0,05	0,93* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,34* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,56* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,8* ± 0,03	6,69 ± 0,05	5,28* ± 0,05	6,1 ± 0,05	5,89* ± 0,05
Средний показатель стац. фазы	2,26 ± 0,05	1,22* ± 0,03	2,28 ± 0,05	1,37* ± 0,03	2,23 ± 0,05	1,51* ± 0,03	2,42 ± 0,05	1,79* ± 0,04	7,38 ± 0,05	5,24* ± 0,05	7,23 ± 0,05	6,27* ± 0,05

Примечание: * достоверное снижение показателя при исследуемом физическом воздействии ($p < 0,05$).

nomycetes spp., а также некоторых облигатно-анаэробных – *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola*, *Eubacterium spp.* При этом частота выделения стафилококка составляла всего лишь 6,2%, энтерококка – 24,1%, а грибов рода *Candida* – 13,8% [12].

В связи с остротой этой проблемы предложено использование дополнительных физических воздействий, которые, по мнению авторов, способствуют разрушению биопленки. Одними из наиболее популярных являются в настоящее время являются методы ультразвуковой и фотоактивируемой дезинфекции.

В эндодонтии ультразвук стали применять благодаря эффекту кавитации (в жидкой среде – формирование пузырьков пара, сопровождающееся шумом и гидравлическими ударами) и акустическим вихревым потокам, возникающим вокруг эндодонтического файла в процессе работы. Вихревые потоки разбивают детрит корневого канала на опилки и нагревают дезинфицирующий раствор, что значительно повышает качество эндодонтического лечения и создает условия для герметичной obturации корневого канала, что можно рассматривать как одно из перспективных направлений лечения [6, 10]. Считается доказанным, что применение ультразвуковой активации ирриганта в процессе обработки корневого канала является более эффективной методикой по сравнению с традиционным ручным методом обработки [4, 9].

Фотоактивируемая дезинфекция с использованием различных фотосенсибилизаторов, индуцирующих цепную фотохимическую реакцию с выбросом высокоактивных окислителей, также позиционируется как обнадеживающий метод разрушения полимерного матрикса биопленки [1, 7, 8].

Вместе с тем представляется крайне важным, что полного прекращения роста и гибели всех микроорганизмов, как это гипотетически предполагалось или позиционировалось в исследованиях некоторых авторов, изучавших эффективность ФДТ или ультразвуковой ирригации, на самом деле не происходит. Как показали наши экспериментальные данные, сохраняется даже траектория кривой роста, свойственная данному виду (или штамму) с присущими особенностями узловых точек, но на более низком уровне. Следовательно, данный вариант эндодонтической дезинфекции с использо-

ванием физических факторов деконтаминации может быть охарактеризован как бактериостатический, но не бактерицидный.

Нельзя не учитывать и тот негативный фактор, что в клинических условиях микробы находятся в ассоциации, да к тому же защищенной матрицей биопленки. Доказано, что полисахаридный матрикс является специфическим барьером для проникновения внутрь биопленки антибактериальных агентов, в связи с чем повышается резистентность микробов к антисептикам и антибиотикам [3, 5, 12].

Обсуждая механизмы эффективности ультразвука и фотодинамической активации в том виде, как они технически обеспечиваются сегодня, к сожалению, можно говорить лишь о бактериостатическом воздействии, однако его может быть вполне достаточно для улучшения микробиологической ситуации в системе корневых каналов и включения механизмов иммунной защиты. По-видимому, это и определяет те положительные результаты, которые получены в наших клинических исследованиях и исследованиях других авторов, использовавших данные виды физической дезинфекции системы корневых каналов зуба.

Заключение

При проведении сканирующей электронной микроскопии подтверждено наличие обильной микробной колонизации «смазанного слоя» в области устьев дентинных канальцев корня зуба, имеющей признаки микробной биопленки, представленной ассоциацией бактериоидных и дрожжевых клеток. Установлена obturация пролиферирующей микробной биопленкой устьев дентинных канальцев, что является показанием для применения физических методов воздействия для более полноценной эрадикации микробной флоры дентинных канальцев.

Как показали наши исследования, фотоактивируемая дезинфекция в комплексе с ультразвуковой активацией ирриганта *in vitro* по-разному влияет на процесс размножения микробных клеток штаммов – представителей нормальной микрофлоры полости рта и бактерий пародонтопатогенной группы, а также на размножение грибов рода *Candida*, но во всех случаях имеет место бактериостатический эффект, вы-

ражающийся в торможении размножения бактерий или грибов по сравнению с контрольными образцами.

При анализе динамики роста популяций бактерий и грибов у них были установлены различия в наступлении основных фаз кривой роста популяции, максимума размножения (стимуляции роста) и перехода к стационарной фазе. Кривые роста бактериальных популяций *in vitro* во всех случаях (со всеми использованными штаммами бактерий и дрожжевых грибов) демонстрировали статистически достоверное снижение по сравнению с контрольными образцами.

Вместе с тем даже сочетанного применения физических факторов деконтаминации (фотодинамическая активация и ультразвук), по-видимому, недостаточно для достижения идеального варианта эндодонтической обработки, к которому сегодня стремятся стоматологи.

Литература

1. Чунихин АА, Митронин АВ. Эндодонтическое лечение пульпита: традиционные и современные подходы. *Эндодонтия Today*. 2009;4:3-10.
2. Hess JC, Medioni E, Vene G. Therapeutique endodontique. Ensemble pulpodentarie. Pulpotomie. *Encycl Med Chir Odontologie*. 2002;1:201-15.
3. Ипполитов ЕВ, Диденко ЛВ, Царёв ВН. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;60(12):59-64.
4. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. *J Endod*. 2007;33(2):81-95. DOI: 10.1016/j.joen.2006.10.008
5. Бир Р, Бауман М, Ким С. Эндодонтия: монография. Пер. с англ. Под ред. проф. Т.Ф.Виноградовой. М.: МЕДпрессинформ; 2004, 368 с.
6. Зюзина ТВ. И снова об ирригации в эндодонтии. *Эндодонтия Today*. 2009;4:11-5.
7. Lambrechts P, Huybrechts B, Bergmans L, et al. Photoactivated disinfection (PAD): paintball endodontics. *Endo Tribune*. 2006;1(7).
8. Царёв ВН, Арутюнов СД, Малазониya ТТ, Царева ЕВ, Подпорин МС, Ипполитов ЕВ, и др. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции пародонта в экспериментальных и клинических исследованиях. *Клиническая стоматология*. 2015;4(76):14-9.
9. Рабинович ИМ, Корнетова ИВ. Клиническое применение ультразвука при эндодонтическом лечении. *Клиническая стоматология*. 2012;4(64):10-4.
10. Деннхардт Х. Ультразвук в эндодонтии. *Медицинский алфавит*. 2014;217(1):10-13.
11. Ruddle CJ. Endodontic access preparation: an opening for success. *Dent Today*. 2007;26(2):114-9.
12. Царёв ВН, Дмитриева ЛА, Ипполитов ЕВ, Нисанова СЕ. Последовательное применение антибактериальных и детоксицирующих препаратов при эндодонтическом лечении хронического апикального периодонтита (Клинико-экспериментальное исследование). *Эндодонтия Today*. 2013;1:8-14.
2. Hess JC, Medioni E, Vene G. Therapeutique endodontique. Ensemble pulpodentarie. Pulpotomie. *Encycl Med Chir Odontologie*. 2002;1:201-15.
3. Ippolitov EV, Didenko LV, Tzarev VN. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, Candida-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2015;60(12):59-64. (In Russian).
4. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. *J Endod*. 2007;33(2):81-95. DOI: 10.1016/j.joen.2006.10.008
5. Bir R, Bauman M, Kim S. Endodontics. Monograph. Ed. with English. Ed by T.F.Vinogradova. Moscow: "MEDpressinform" Publ.; 2004, 368 p. (In Russian).
6. Zyuzina TV. Again on irrigation in endodontics. *Endodontology Toda*. 2009;4:11-5. (In Russian).
7. Lambrechts P, Huybrechts B, Bergmans L, et al. Photoactivated disinfection (PAD): paintball endodontics. *Endo Tribune*. 2006;1(7).
8. Tzarev VN, Arutyunov SD, Malazoniya TT, Tsareva EV, Podporin MS, Ippolitov EV, et al. Assessment of photodynamic therapy antimicrobial effect on nonclostridial parodontium anaerobic infection pathogens in experimental and clinical study. *Clinical Dentistry*. 2015;4(76):14-9. (In Russian).
9. Rabinovich IM, Kornetova IV. Clinical use of ultrasound in endodontic treatment. *Clinical Dentistry*. 2012;4(64):10-4. (In Russian).
10. Denhardt H. Ultrasound in endodontics. *Medical alphabet*. 2014;217(1):10-13. (In Russian).
11. Ruddle CJ. Endodontic access preparation: an opening for success. *Dent Today*. 2007;26(2):114-9.
12. Tzarev VN, Dmitrieva LA, Ippolitov EV, Nisanova SE. Consistent application of antibacterial and detoxifying drugs in endodontic therapy of chronic apical periodontitis (clinical and experimental study). *Endodontology Today*. 2013;1:8-14. (In Russian).

Информация о авторах:

Подпорин Михаил Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (915) 401-9131
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Ипполитов Евгений Валерьевич, кандидат медицинских наук, доцент, заведующий отделом фундаментальных исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1
Телефон: (915) 401-9131
E-mail: ippo@bk.ru

Information about authors:

Mikhail S. Podporin, Junior research associate, laboratory of Molecular biology investigation, Research Institute of Medicine and Dentistry of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (915) 401-9131
E-mail: podporin.mikhail@yandex.ru

Evgenii V. Ippolitov, Head of Fundamental Research Department, Research Institute of Medicine and Dentistry of Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I.Yevdokimov
Address: 20/1, ul. Delegatskaya, Moscow, 123425, Russian Federation
Phone: (915) 401-9131
E-mail: ippo@bk.ru

References

1. Chunikhin AA, Mitronin AV. Endodontic treatment of a pulpitis: traditional and modern approaches. *Endodontology Today*. 2009;4:3-10. (In Russian).