

ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ — ОСНОВНОЙ ФАКТОР ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЯ ПАРОДОНТИТА

Московский государственный медико-стоматологический университет

Представлены современные представления о роли пародонтопатогенных видов бактерий *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*) и *Porphyromonas gingivalis* как ведущих факторов возникновения и прогрессирования пародонтита. Даны терминологические определения факторов, индикаторов и маркеров риска развития воспалительных заболеваний пародонта, показывающих уровень значимости их ассоциаций с заболеванием, а также количественные оценки ассоциаций.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 101—112

Ключевые слова: пародонтит, пародонтопатогенные бактерии, факторы риска, индикаторы риска

V.N.Tsarev, E.N.Nikolaeva, E.V.Ippolitov

PERIODONTOPHATOGENIC BACTERIA OF THE MAIN FACTORS OF EMERGENCE AND DEVELOPMENT OF PERIODONTITIS

Moscow State Medical-Stomatological University, Russia

Presents a modern understanding of the role of periodontopathogenic bacteria types: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* as indicators of periodontitis emergence and development risk. Terminological definitions are given of factors, indicators and markers of risk of periodontium inflammatory diseases development that show the level of importance of their association with the disease as well as the quantitative evaluation of these associations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 101—112

Key words: periodontitis, periodontopathogenic bacteria, factors of emergence, indicators of risk

Накопленный за последние десятилетия опыт исследований по этиологии воспалительных заболеваний пародонта свидетельствует о том, что ведущая роль в формировании воспалительного процесса в полости рта принадлежит облигатно-анаэробной и микроаэрофильной факультативно-анаэробной микрофлоре. Многие исследователи изучали состав и свойства бактериальной биопленки ротовой полости с помощью микроскопических, бактериологических и молекулярных методов исследований, чтобы оценить микробные факторы риска заболеваний пародонта, однако лишь в единичных работах использован комплекс указанных методик и проведено исследование биопленок на моделях *in vitro* [1, 3, 4, 27]. Современные технологии позволили выделить в полости рта генетический материал более 700 видов или филотипов микробов, половина из которых не культивируема [12, 13].

В то же время, в качестве этиологических факторов заболеваний пародонта в настоящее время доказана роль относительно небольшого числа бактерий. К ним относят *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (по старой номенклатуре —

Actinobacillus actinomycetemcomitans), *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Wollinella recta* (*Campylobacter rectus*), *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Treponema denticola*, а также *Parvimonas micra* (*Peptostreptococcus micros*). Хотя с пародонтитом ассоциировано более 20 видов бактерий, только для четырех видов выявлены строгие ассоциации с прогрессированием заболевания [13]. На Всемирном рабочем совещании клинических пародонтологов в 1996 году в качестве специфических патогенных бактерий, обуславливающих заболевания пародонта, были названы три вида: *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus* и *P. gingivalis* [32].

Пародонтит — многофакторное заболевание, индуцируемое микробами зубной биопленки [12]. Проявление и прогрессирование признаков пародонтита зависит от обширного количества факторов и детерминант, включая индивидуальные особенности субъекта, социальные, поведенческие, системные, генетические факторы, изменения на уровне зубов, микробный состав зубного налета и другие факторы риска. В связи с большим количеством показателей, влияющих на развитие и прогрессирование пародонтита, трудно понять, в результате каких процессов происходит иницирование или прогрессирование заболевания. Поэтому основные усилия специалистов направлены на выявление маркеров, которые позволят выявить группы риска еще до развития пародонтита и определить факторы риска, которые можно было бы модифицировать, чтобы предотвратить или изменить течение заболевания [30].

Терминология, связанная с индикаторами риска, указывает на уровень значимости их ассоциаций с заболеванием. Не всегда понятно, какие из этих терминов применяют в стоматологической литературе, ни каким образом клиницисты используют такую информацию. В зависимости от того, какие факторы связаны с началом и прогрессированием заболеваний пародонта, выбирают определенный дизайн исследования и уровень значимости результатов измерения, определяющих силу ассоциаций каждого фактора/индикатора риска и их использование для принятия клинического решения [44]. Самыми строгими показателями заболеваний пародонта являются признаки, наиболее близко отражающие возможный отрицательный результат потери зубов, и которые можно объективно оценить с наименьшей ошибкой измерения. Обычно для этого используют количественные оценки ассоциаций — относительный риск (ОР), отношение шансов (ОШ) и другие. Наиболее сильной ассоциацией для определения факторов риска является величина относительного риска. Относительный риск обычно определяют как отношение риска заболевания в группе, подверженной влиянию фактора, к риску в группе, не подверженной этому влиянию. Относительный риск — оценка ассоциаций, обычно получаемых в динамических исследованиях.

Для снижения риска начала или прогрессирования заболевания некоторые факторы риска можно изменять (например, прекращение курения или улучшение гигиены полости рта с целью снижения риска деструкции тканей пародонта), тогда как другие факторы нельзя модифицировать (генетические факторы). Неизменяемый фактор риска часто называют детерминантой [33].

A. actinomycetemcomitans — грамотрицательные, неспорообразующие, неподвижные, факультативно-анаэробные коккобациллы. Известно пять серотипов *A. actinomycetemcomitans*, различающихся по вирулентному потенциалу [23]. Многие авторы считают, что распространение серотипов *A. actinomycetemcomitans* при различных формах пародонтита является специфическим и индикаторным показателем их принадлежности к истинным пародонтопатогенам или микробам, связанным с высоким риском пародонтита [10]. Обычно пациенты инфицированы стабильно в течение долгого времени только одним серотипом актинобацилл. Например, штаммы серотипа с более часто выявляли при экстраоральных инфекциях и у людей со здоровым пародонтом. Многие штаммы *A. actinomycetem-*

comitans серотипа b такие, как JP-2, продуцируют повышенное количество лейкотоксина — основного фактора вирулентности, ассоциированного с заболеваниями пародонта [12]. Частота выявления серотипов *A. actinomycetemcomitans* отличается в различных популяциях. В США серотип b встречается чаще, чем серотипы a и c у пациентов с локализованным агрессивным пародонтитом. У финнов преобладает серотип b при пародонтите, а c — у здоровых людей. У японцев, страдающих пародонтитом, выявляют серотипы a, c и e. В настоящее время высоко патогенный штамм *A. actinomycetemcomitans* серотипа b считается наиболее вирулентным видом микробов или более высокого риска, особенно у молодых индивидуумов африканского происхождения [23].

Лейкотоксин *A. actinomycetemcomitans* — наиболее изученный фактор вирулентности, вызывает киллинг полиморфноядерных лейкоцитов и моноцитов человека при взаимодействии с интегриновыми рецепторами CD11a/CD18, ускоряет лизис моноцитов, активируя каспазу-1. В низких дозах он индуцирует дегрануляцию нейтрофилов с последующим выделением и активацией матриксной металлопротеиназы-8 (ММП-3), секрецию активной формы IL-1 β . Высокие дозы лейкотоксина вызывают образование пор, лизис клеток, секрецию неактивной формы про-IL-1 β [22]. Таким образом, *A. actinomycetemcomitans* избегает влияния факторов врожденного иммунного ответа, напрямую его атакуя. При лизисе клеток выделяются не только ферменты, разрушающие ткани, но и антимикробные пептиды — дефензины, которые могут убивать бактерии и привлекать другие клетки в очаг воспаления [14]. Протеины *A. actinomycetemcomitans* (особенно лейкотоксин) могут индуцировать апоптоз иммунных клеток организма хозяина. Снижая продукцию лейкотоксина и, таким образом, подавляя воспалительный ответ, данный вид бактерий может иметь преимущество на какой-либо стадии заболевания.

Cdt — токсин *A. actinomycetemcomitans* — вызывает нарушение гомеостаза тканей пародонта и защитной системы организма. В частности, он индуцирует задержку клеточного цикла, ингибирует функции клеток пародонтальных связок, пролиферацию десневых фибробластов, способствует образованию выростов клеток соединительной ткани пародонта. Он также индуцирует апоптоз T-лимфоцитов, активируя каспазу-2 и каспазу-7 [15].

Эндотоксин *A. actinomycetemcomitans* модулирует ответные реакции организма хозяина и способствует деструкции тканей. Липополисахарид (ЛПС) *A. actinomycetemcomitans* индуцирует секрецию макрофагами окиси азота, интерлейкина IL-1 β и TNF- α , IL-6 десневыми фибробластами, влияющих на резорбцию костей [39]. Между поверхностными структурами и компонентами O-антигена ЛПС у различных серотипов (особенно серотипа b) *A. actinomycetemcomitans* имеются значительные различия [12].

Наиболее важным свойством *A. actinomycetemcomitans* является их способность избегать врожденную защиту организма и выживать при механическом удалении бактериальных отложений, проникая в ткани десен и, особенно, в эндотелиальные клетки. Проникновение *A. actinomycetemcomitans* в клетки является энергозависимым процессом, связано с адгезией, синтезом протеинов, активным рецепторозависимым эндоцитозом [13]. *A. actinomycetemcomitans* имеют фимбрии, играющие важную роль в колонизации и инвазии тканей пародонта. Мишенями на клетках организма хозяина для *A. actinomycetemcomitans* являются трансферриновые рецепторы и эпителиальные интегрины. Выделяют актинозависимые и актинонезависимые штаммы *A. actinomycetemcomitans*, инвазирующие клетки организма хозяина. Штаммы актинобацилл, синтезирующие фосфорилхолин, способны проникать в системы циркуляции, связываться с рецепторами для фактора, активирующего тромбоциты. Активность трипсиноподобных протеаз *A. actinomycetemcomitans* коррелирует с клиническими параметрами пародон-

донтита. Они расщепляют коллаген, фибронектин, IgG, сывороточный, но не секреторный IgA, IgM *in vitro*. В 50% сывороток, выделенных у пациентов с агрессивными формами пародонтита, определяли антитела против GroEL протеинов, индуцирующих резорбцию кости у экспериментальных животных, активацию остеокластов и пролиферацию эпителиальных клеток [31]. Антисыворотка против GroEL *A. actinomycetemcomitans* перекрестно реагирует с GroEL *Escherichia coli*; *P. gingivalis*, *T. forsythia* и белками теплового шока (hsp60) [48]. Известно, что белки теплового шока играют определенную роль в этиопатогенезе аутоиммунных заболеваний. Некоторые авторы предполагают, что хронические воспалительные заболевания, например, пародонтит, могут быть результатом постоянного контакта с микробными белками теплового шока, которые способствуют развитию аутоиммунных заболеваний.

Частота выявления *A. actinomycetemcomitans* в зубодесневом налете варьирует в широких пределах, но при воспалительных процессах она обычно увеличивается. Так, *A. actinomycetemcomitans* выявляли в зубодесневой борозде у 0 — 26% здоровых детей [41] и в 40 — 100% поддесневых участков у пациентов с агрессивными формами пародонтита [45]. Наиболее четко была показана связь *A. actinomycetemcomitans* с локализованным агрессивным пародонтитом [29]. В связи с этим, было предположено, что *A. actinomycetemcomitans* является этиологическим фактором локализованного агрессивного пародонтита, но это было трудно подтвердить, в связи с эпизодической природой активации заболевания, а также трудностью культивирования этих микробов. При обширном введении в практику более чувствительных молекулярно-генетических методов исследований были получены похожие результаты, но *A. actinomycetemcomitans* выявили и при хроническом генерализованном пародонтите [2, 8, 23]. Поэтому этот вид микробов многие исследователи считают инициатором агрессивных форм пародонтита, однако недостаточным для его прогрессирования. Основным медиатором агрессивных форм пародонтита, скорее всего, являются ответные реакции организма хозяина [37].

Факторы вирулентности и антигенные свойства *T. forsythia* наименее изучены, по сравнению с другими пародонтопатогенами, в основном, вследствие того, что этот вид микробов трудно культивировать *in vitro*. *T. forsythia* продуцируют протео- и гликолитические ферменты. Активность этих ферментов в поддесневых образцах коррелирует с клиническими признаками пародонтита. Предполагают, что эти ферменты играют ключевую роль в связывании *T. forsythia* с эритроцитами, полиморфноядерными лейкоцитами и фибробластами. Основной поверхностный антиген BspA *T. forsythia* стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов в мононуклеарных клетках линии THP-1 при взаимодействии с CD14 и TLR4 [31].

Так как *T. forsythia* почти всегда определяют в участках, где присутствует *P. gingivalis*, Rudney J.D. et al. [35] предположили, что *T. forsythia* могут также проникать в клетки и существовать, например, в эпителиальных клетках ротовой полости. С помощью ПЦР, а затем методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), *T. forsythia* были выявлены в клетках слизистой щеки [34]. Существуют как инвазивные, так и неинвазивные штаммы *T. forsythia*. По-видимому, проникая в клетки тканей пародонта, бактерии поддерживают внутриклеточный резерв в тех случаях, когда колонизация участка затруднена. Инфицированные клетки являются переносчиками бактерий из одного участка в другой или от одного хозяина к другому и, возможно, защищают их в жесткой гипотонической среде слюны. Способность *T. forsythia* адгезировать и пенетрировать клетки может быть связана с их поверхностным S-слоем. Его белковые компоненты обладают активностью гемагглютинаина и играют важную роль в формировании абсцессов у экспериментальных животных. Инфицирование мышей *T. forsythia* вызывает деструк-

цию альвеолярной кости [31]. Наиболее интригующим фактором вирулентности *T. forsythia* является его способность индуцировать апоптоз. При добавлении экстракта *T. forsythia* к HL-60 и другим клеточным линиям была выявлена цитотоксическая активность, характерные для апоптоза фрагменты ДНК и активация каспазы-3. Более того, этот вид микробов вызывал снижение мембранного потенциала митохондрий и потерю целостности мембран, характеризующих апоптозные процессы в клетках. Так как апоптозные клетки поглощаются резидентными, не активированными макрофагами, возникает вопрос, не запускают ли *T. forsythia* врожденный аутоиммунный ответ. Согласно этому сценарию, резидентные макрофаги пытаются элиминировать апоптозные эпителиальные клетки, инфицированные *T. forsythia*, для поддержания тканевого гомеостаза [4]. *T. forsythia* чаще всего выявляют при хроническом генерализованном пародонтите. Вместе с *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis* этот вид бактерий также отнесли к наиболее вероятным индикаторам риска пародонтита [32, 42, 46]. По мнению японских авторов *T. forsythia* и *S. rectus* можно рассматривать в качестве маркера начала пародонтита [40].

Наиболее изученный вид патогенных микробов, выявляемый в пародонтальных карманах — *P. gingivalis* экспрессирует три основных фактора вирулентности — фимбрии, гингипаины и липополисахариды [13, 18]. Существуют, по крайней мере, 6 серотипов *P. gingivalis*, различающихся по наличию капсульных полисахаридов (К-антигенов) с вирулентными свойствами. Бескапсульные штаммы способны к аутоагрегации и повышенной адгезии к эпителиальным клеткам и другим бактериям полости рта. Фимбрии *P. gingivalis* обеспечивают адгезию к специфическим рецепторам на клетках хозяина; индуцируют интернализацию бактерий, взаимодействуя с β 1-интегринами эпителиальных клеток и изменяя их цитоскелет [4], модулируют образование провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α [25]; индуцируют образование опсонов, усиливающих фагоцитарную и киллинговую активность полиморфноядерных лейкоцитов; активируют экспрессию CD14⁺/CD16⁺ на дендритных клетках при участии TLR2 [5]. Однако они ингибируют взаимодействие между внеклеточными белками и интегринными, секрецию IL-8 и клеточный апоптоз [4]. Вакцинация против фимбрий *P. gingivalis* препятствует развитию пародонтита. *P. gingivalis*, лишённые фимбрий, могут проникать в эпителиальные клетки ротовой полости, но в меньшей степени, чем бактерии, имеющие фимбрии. Штаммы *P. gingivalis*, выделенные из пародонтальных карманов глубиной не менее 4 мм, обладали генами *rag* локуса, кодирующих вирулентные свойства бактерий (Р-фимбрии, Р-подобные фимбрии, гемолизин). Различия в скорости прогрессирования воспалительных процессов могут быть связаны с различиями вирулентных свойств инфицирующих штаммов.

Гингипаины — протеазы *P. gingivalis*, основной функцией которых является осуществление питания при расщеплении протеинов до пептидов. Гингипаины способствуют резистентности к фагоцитозу макрофагами и формированию обширных абсцессов, разрушая сывороточные опсоны [5]. Известно не менее 39 различных субстанций *P. gingivalis* с протеолитической активностью, которые были отнесены к трипсиноподобным ферментам [13]. Выделены и очищены 3 цистеиновые протеазы, способные гидролизировать пептидные связи в Arg-X остатках (Arg-гингипаин или RGP), и одна со специфичностью Lys-X (Lys-гингипаин или KGP) — гингипаин R и гингипаин K. Цистеиновые протеазы способствуют повышенной чувствительности к ЛПС, отщепляя CD 14 на моноцитах; обладают коллагеназной активностью; ингибируют TNF- α . Гингипаины R и K являются критическими факторами для проявления вирулентных свойств *P. gingivalis*. Гингипаин R изменяет сосудистую проницаемость, индуцируя выделение брадикинина, увеличивает адгезию фимбрий к фибробластам и экспрес-

сию ими IL-8, разрушает белки системы комплемента. Гингипаин К обладает такими же свойствами и является наиболее активной фибриногеназой, известной в настоящее время [19, 27]. Бактериальные протеазы индуцируют экспрессию, секрецию и активацию латентных форм матриксных металлопротеиназ организма хозяина, влияют на локальное накопление γ -интерферона и фенотип Th1 и Th2 при пародонтите.

ЛПС — наиболее важный амфифильный компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, повышающий ее структурную целостность и биологическую активность. ЛПС *P. gingivalis* уникален по химической структуре корового полисахарида и липида А и биологической активности [13]. Он индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов моноцитами и макрофагами, обусловленную активацией CD14/TLR-4 и (или) CD14/TLR-2. Интересно отметить, что десневые фибробласты более резистентны к медиаторам воспаления, индуцированным ЛПС *P. gingivalis*, чем фибробласты кожи. Это может быть связано с низкой экспрессией TLR-2 и TLR-4 на десневых фибробластах. В отличие от энтерального ЛПС *P. gingivalis* индуцирует секрецию IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 и низкий уровень γ -интерферона [47]. В то время как TLR-4 является основным трансмембранным рецептором для ЛПС грамотрицательных бактерий, TLR-2 является ключевым компонентом при ответе на дрожжи и грамположительные бактерии [26]. Возможным исключением является ЛПС *P. gingivalis*, который может взаимодействовать с TLR-2. Индукция TLR-2 мышинных макрофагов липополисахаридом *P. gingivalis* приводит к экспрессии генов воспаления, отличной, чем при индукции TLR-4. Более того, ЛПС *P. gingivalis*, по-видимому, стимулирует Th2-опосредованный ответ у мышей и дендритных клеток человека, и таким образом, может регулировать адаптивный иммунный ответ [7]. Важно отметить, что уровень сывороточных антител к ЛПС *P. gingivalis*, определяемый с помощью вестерн-блотта, особенно сильно коррелировал с клиническими параметрами пародонтита [6]. Таким образом, ЛПС *P. gingivalis*, по-видимому, способен влиять на тип иммунного ответа, благоприятствуя гуморальному ответу, и это может увеличивать его выживаемость *in vivo*. Действительно, *P. gingivalis* могут выживать внутри эпителиальных клеток, по-видимому, в некультивируемой стадии. При инвазии клеток усиливаются вирулентные свойства бактерий и воспалительный ответ [5, 46]. Инфицирование *P. gingivalis* приводит к активации многих факторов с помощью различных сигнальных механизмов (p38, ERK, PI3K, каликриин и JNK), что приводит к индукции гипертрофии H9c2 кардиомиобластов. *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia* такими свойствами не обладают [46].

Динамические исследования роли P. gingivalis и T. forsythia при воспалительных заболеваниях пародонта. *P. gingivalis* почти всегда выявляют совместно с *T. forsythia*, поэтому обсуждать роль одного вида микробов без другого практически невозможно [35]. Некоторые авторы считают, что *T. forsythia* в большинстве случаев предшествуют появлению *P. gingivalis*. Так, при гингивите *T. forsythia* выявляли чаще и в большем количестве, чем *P. gingivalis* [43]. Было показано, что *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T. forsythia* выявляют с высокой частотой как у пациентов с потерей зубодесневого прикрепления, так и с положительной динамикой. Наличие любого из этих видов микробов в определенном участке не является прогностическим фактором потери зубодесневого прикрепления в будущем. Однако постоянное присутствие *T. forsythia* у пациентов в каком-нибудь участке с потерей зубодесневого прикрепления при всех визитах к стоматологу в 5,3 раза увеличивало отношение шансов дальнейшего прогрессирования заболевания по сравнению с пациентами, у которых этот вид микробов выявляли периодически или не идентифицировали ни разу. Авторы пришли к заключению, что наличие *T. forsythia* является фактором риска развития пародонтита, но не определяет участок будущей потери зубодесневого прикрепления. У пациентов с

тяжелой степени пародонтита выявляли значительное количество *P. gingivalis* и *T. forsythia*. В участках с воспалением определяли гораздо больше *P. gingivalis*, *T. denticola* и *T. forsythia*, по сравнению со стабильными участками [44]. Позднее была подтверждена важная роль *T. forsythia* и *P. gingivalis* как в инициации, так и прогрессировании хронического пародонтита [7]. Chaves E.S. et al. [8], применяя компьютерный денситометрический анализ для оценки потери кости (CADIA), выявили корреляцию прогрессирования пародонтита с наличием *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* и других видов микробов. В этом исследовании *P. gingivalis* чаще выявляли в пародонтальных карманах пациентов с прогрессирующей резорбцией кости. При этом и положительные, и отрицательные прогностические показатели были относительно высокими, соответственно 84% и 85% [8]. Однако *T. forsythia* в данной работе не определяли. *T. forsythia* и *P. gingivalis* также влияют на характер течения заболевания после проведенной терапии. В ряде работ была выявлена небольшая, но статистически значимая корреляция между клинической потерей зубодесневого прикрепления и персистенцией или повторным восстановлением патогенной микрофлоры [43]. Наличие *P. gingivalis* и *T. forsythia* в поддесневом налете увеличивает риск развития хронического генерализованного пародонтита и снижает вероятность достижения положительных результатов при проведении терапевтических мероприятий.

Таким образом, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* обладают пародонтопатогенными свойствами и принимают участие в этиопатогенезе различных форм пародонтита, поэтому рекомендовано считать их пародонтопатогенами 1 порядка (или типа) [2, 42, 43].

Общепринято считать, что пародонтит начинается с появления специфической субгингивальной бактериальной флоры, происходящей из глубоких отделов зоны десневой борозды. Основными представителями биопленки, непосредственно прилегающей к десневому эпителию, являются пигментообразующие бактерии *P. nigrescens* и *P. intermedia*, а также *T. denticola*, которые можно отнести к пародонтопатогенам 2 порядка (или типа) [2, 42, 43].

Prevotella intermedia являются грамотрицательными, неподвижными, палочковидными бактериями, хорошо растущими в анаэробных условиях. Эти микробы одними из первых колонизируют ротовую полость в начале инфекционного процесса, связываясь или прилипая к другим бактериям и эпителиальным клеткам. Инвазия бактерий из биопленки в соединительную ткань считается особенно важным этапом патогенеза пародонтита [46]. Факторами вирулентности этих бактерий являются мембранно-ассоциированные протеиназы, ЛПС и цитотоксические конечные продукты метаболизма, которые способствуют деградации тканей организма хозяина. Цистеиновые протеазы *P. intermedia* отщепляют CD14 и липополисахарид, связывающий белок (LBP), модулируя, таким образом, вирулентность ЛПС. В дозозависимой манере они снижают экспрессию IL-1 β — специфической mRNA на активированных ЛПС макрофагоподобных клетках U937 и THP-1. Гликопротеиновая фракция *P. intermedia* индуцирует экспрессию ICAM-1 на десневых фибробластах, продукцию IL-8, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и ГМСФ эпителиальными клетками. Штамм *P. intermedia* 17, выделяемый из пародонтальных карманов, отличается от других наличием фимбрий. В многочисленных исследованиях было показано, что *P. intermedia* является одним из этиологических факторов пародонтита. Этот вид пародонтопатогенов чаще выявляют в участках с прогрессирующим воспалительным процессом, чем в стабильных участках [16]. Однако в качестве фактора риска этот вид бактерий в настоящее время не рассматривают, так как с помощью современных методов исследований показано, что обычно их выявляют одновременно с другими пародонтопатогенами [41]. Причем *P. intermedia* и *P. nigrescens* выявляют, в основном, в небольших пародонтальных карманах, в тканях перио-

донта и десен при воспалительных процессах, а также в здоровых участках, *P. gingivalis* — в глубоких пародонтальных карманах. В глубоких пародонтальных карманах рО₂ очень низкое, а рН имеет нейтральные значения. Однако в неглубоких пародонтальных карманах при попадании пищи, чистке зубов и т.д. эти условия могут отличаться. *P. gingivalis* растут только в анаэробных условиях и при нейтральных значениях рН, *P. intermedia* могут выживать в щелочной среде. Это может отражаться на разном распределении *P. gingivalis* и *Prevotella* spp. в ротовой полости. *P. gingivalis* не утилизируют сахара, *Prevotella* обладают сахаролитической способностью. Глюкоза не оказывает влияния на проявление вирулентных свойств *P. gingivalis*. Патогенность *P. intermedia* и *P. nigrescens* снижается в присутствии глюкозы, так как при этом они меньше выделяют конечные цитотоксические продукты метаболизма — сукцинат, изобутират, изовалериат и аммоний [36]. Некоторые исследователи считают, что микробиологический скрининг *P. intermedia* и других пародонтопатогенов может быть полезным для прогнозирования исхода пародонтологического лечения, так как при выявлении этого вида микробов вместе с другими при первичном обследовании наблюдается худший эффект от лечения, чем в участках, где этих микробов не определяли. Отрицательные результаты лечения часто связывают с тем, что одним из механизмов выживания превотелл является наличие у них генов резистентности к антибиотикам и способности вырабатывать β-лактамазы [20].

Факторы вирулентности пародонтопатогенных бактерий могут проявлять антагонистические взаимоотношения. Так, пигментообразующие бактерии *P. gingivalis* и, в меньшей степени, *P. intermedia* и *P. nigrescens* выделяют ферменты, разрушающие лейкотоксин *A. actinomycetemcomitans*. К ним относят гингипаины R и K *P. gingivalis*, цистеиновые протеазы *Prevotella* spp. Бактерии, продуцирующие трипсиноподобные ферменты (*Carpocytophaga* spp. и *T. forsythia*) подобной способностью не обладают. По-видимому, патогенные свойства лейкотоксина проявляются больше при локализованной форме пародонтита, когда пародонтальный карман колонизируют только *A. actinomycetemcomitans*. При совместном инфицировании с пигментообразующими бактериями токсическое действие лейкотоксина снижается [21].

С клиническими параметрами хронического пародонтита, особенно с глубокой пародонтальной карманом и кровоточивостью при зондировании, ассоциирован так называемый «красный» комплекс — *P. gingivalis*, *T. forsythia* и *T. denticola*. При этом бактерии выявляли чаще и в большем количестве в глубоких пародонтальных карманах.

Treponema denticola — грамотрицательные, подвижные, асахаролитические, анаэробные бактерии с типичной спиралевидной морфологией. Ультраструктурное строение слоев наружной мембраны *T. denticola* похоже на строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий, но липидный состав наружного слоя похож на липотейхоевые кислоты клеточной поверхности грамположительных бактерий. Поэтому текучесть наружной мембраны *T. denticola* более похожа на текучесть мембран грамположительных бактерий, содержащих липотейхоевые кислоты, так как в их мембранах закорены фосфолипид- и глицерол-подобные структуры, содержащие две жирные кислоты (структурно сходные с липотейхоевыми кислотами), а не шесть, как липид А типичного ЛПС [31]. Трепонемальные фосфолипиды индуцируют в дозозависимой манере продукцию медиаторов воспаления, оксида азота, TNF-α и IL-1 макрофагами, отвечающими и не отвечающими на ЛПС. Предполагают, что механизм активации цитокинов и индукции резорбции костей отличается от ЛПС-опосредованной активации. Индукцию ЛПС *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* и *Escherichia coli* может вызвать mRNA RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора κB), регулирующий образование остеокластов и резорбцию костей [12].

Поверхностные компоненты *T. denticola* — олигомерный основной поверхностный белок Msp и протеазный комплекс, кодируемый генами локуса *prcA-prtP*, обладают цитопатической активностью. Msp является пориноподобным белком наружной мембраны, который нарушает метаболизм Ca^{2+} и сборку цитоскелета фибробластов. Основной белок наружной мембраны Msp *T. denticola* связывается с фибронектином, фибриногеном и ламинином, играя важную роль в адгезии к клеткам организма хозяина. Он токсичен для клеток HeLa, оказывает цитотоксическое действие на десневые фибробласты, эпителиальные клетки, лимфоциты и эритроциты. Msp усиливает воспалительный ответ, индуцируя дегрануляцию нейтрофилов, выделение коллагеназ, желатиназ и матриксных металлопротеиназ MMP-8 и MMP-9 [9].

Важными внеклеточными белковыми антигенами *T. denticola* являются протеолитические ферменты. На клеточной поверхности экспрессирована наиболее изученная протеаза — дентилизин или треполизин — хемотрипсин-подобная сериновая протеиназа, гидролизующая фибриноген, трансферрин, желатин, сывороточный альбумин, ламинин, коллаген IV, IgG и IgA *in vitro*, а также деградирующая брадикинин, субстанцию P, ангиотензин I и II, ингибиторы протеаз клеток хозяина, α_1 -антитрипсин, антихемотрипсин, α_2 -макроглобулин, антитромбин III, антиплазмин и цистатин C [28]. PrtP-комплекс с протеазной активностью, состоящий из денсилитина, PrcA1 и PrcA2 протеинов, способствует пенетрации тканей *T. denticola* и модулирует продукцию воспалительных цитокинов. Все они обладают адгезивной способностью и цитотоксической активностью против эпителиальных клеток. PrtP участвует в связывании *T. denticola* с *P. gingivalis* [17].

Некоторые авторы предполагают, что дентилизин играет роль в превращении про-IL-1 β в его биоактивную форму, стимулируя воспалительный ответ. Способность деградировать матриксные белки, белки и пептиды, регулирующие воспаление, может способствовать неконтролируемой деструкции тканей пародонта и способствовать прогрессированию заболевания. Дентилизин индуцирует апоптоз эпителиальных клеток. Пептидазы, локализованные на клеточной поверхности *T. denticola*, нарушают воспалительный ответ, деградируя вазоактивные пептиды, гормоны и нейропептиды. Присутствие *T. denticola* в поддесневом налете коррелировало с трипсиноподобной протеолитической активностью, которая, в свою очередь, коррелировала с клиническими параметрами пародонтита. Так, при инокуляции *T. denticola* в поддесневые участки мышей через 48 часов отмечали значительную гиперемию, на 4 день — формирование абсцессов, максимальные размеры которых достигали на 5 — 7 день. При введении формализированных бактерий такие процессы не развивались [11]. Спирохеты могут составлять до 50% состава микрофлоры в поддесневом налете при язвенно-некротическом гингивите и хроническом генерализованном пародонтите и менее 1% в здоровом пародонте [31]. Основной нишей спирохет ротовой полости является десневая жидкость. Чтобы вызвать заболевание, трепонемы должны прилипнуть к субстрату. *T. denticola* может адгезировать на десневых фибробластах как в аэробных, так анаэробных условиях. Важным этапом колонизации пародонтального кармана является захват железа. *T. denticola* способна утилизировать лактоферрин и железосвязывающий протеин слюны с помощью рецепторов внешней мембраны. Благодаря подвижности *T. denticola* выявляли между клетками эпителия, которые в норме очень плотно соединены, а также в соединительной ткани и на поверхности альвеолярной кости. Они способны двигаться в вязких средах, например, в десневой жидкости, и пенетрировать десневой эпителий и соединительную ткань [9]. При подкожном введении монокультур *T. denticola*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* и неинвазивных штаммов *P. gingivalis* экспериментальным животным в участке инъекции появлялись локализованные абсцессы. Однако инвазив-

ные штаммы *P. gingivalis* W50 и A7A1-28 (ATCC 53977) приводили к обширному язвенно-некротическому повреждению в участках, удаленных от места введения инъекции. При совместном инфицировании *P. gingivalis* — *T. denticola*, *P. gingivalis* — *B. forsythus*, *P. gingivalis* — *F. nucleatum* и *P. gingivalis* — *A. actinomycetemcomitans* наблюдали значительные повреждения и большие проявления вирулентности, по сравнению с моноинфицированием каждым из этих бактериальных видов [12].

Подобная схема введения микробов соответствовала их коаггрегации в организме человека при формировании биопленки, что показано при ее моделировании *in vitro* [1].

Несмотря на то, что вирулентные свойства *T. denticola in vitro* хорошо изучены и, согласно теории Socransky S.S., этот вид микробов относят к «красному» комплексу пародонтопатогенов, этиологическая роль трепонем при пародонтите является предметом дискуссии и в настоящее время.

Это связано с тем, что выделяют около шестидесяти их фило типов, многие из которых не культивируемы. Большинство доказательств этиологической роли *T. denticola* основаны на количественных различиях ее содержания у пациентов с пародонтитом и у пациентов со здоровым пародонтом, их ассоциаций со степенью деструкции костной ткани и изменении клинических и микробиологических параметров при проведении регулярной поддерживающей терапии [12].

Итак, свойства и функции этих видов микробов наиболее соответствуют критериям Коха, модифицированным Socransky S. S. (1989) для инфекций полости рта: исследуемый вид микробов должен быть выявлен в большом количестве в участках с активно прогрессирующим заболеванием, чем в здоровых участках, устранение микробов должно прекращать прогрессирование болезни, патогенный микроб должен обладать факторами вирулентности, обуславливающими процессы деструкции тканей, на пародонтопатоген должен развиваться аномальный клеточный или гуморальный иммунный ответ, патогенный потенциал должен быть выявлен на модельных животных.

По мнению Ezzo P.J. et al. [12] общепризнанные виды пародонтопатогенов являются индикаторами, но не факторами риска, так как вероятность (отношение шансов) развития пародонтита при наличии в участках зубодесневого соединения только одного из них повышается не очень сильно.

Нами на основании изучения клинических, микробиологических и молекулярно-генетических исследований (2007 — 2016 гг.) выделены следующие наиболее значимые критерии диагностики ХГП и прогнозирования осложненного течения этого заболевания [1 — 3]: для подтверждения диагноза хронического пародонтита достаточно идентификации одного или двух видов бактерий 1 порядка: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* или комбинации одного из этих видов с *T. denticola*; пародонтопатогенные виды бактерий 2 порядка: *P. intermedia*, *T. denticola* и другие являются индикаторами риска развития хронического пародонтита, их присутствие необходимо, но не достаточно для развития острого воспаления; *T. forsythia* является безусловным индикатором риска кровотоочности десен; факторами риска ХП могут быть *P. gingivalis* или ассоциации — *T. forsythia* и *T. denticola*; *P. intermedia*, *T. forsythia* и *P. gingivalis*; *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola* и *P. gingivalis*; *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*

ЛИТЕРАТУРА

1. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидоз-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015, 60 (12): 59-64.

2. Николаева Е.Н., Царев В.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — индикаторы риска возникновения и развития пародонтита. *Стоматология для всех*. 2011, 3: 4-9.
3. Царев В.Н., Николаева Е.Н. Технологии генодиагностики в отечественной стоматологии. *Стоматология*. 2007,5: 82-87.
4. Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 12-37.
5. Amano A., Furuta N., Tsuda K. Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 84-93.
6. Booth V., Solakoglu Ö., Bavisha N., Curtis M. A. Serum IgG1 and IgG2 antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 2006, 21 (2): 93-99.
7. Brochut P.F., Grenier D., Nakayama K., Mayrand D. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral Microbiol. Immunol.* 2001,16: 79-87.
8. Chaves E.S., Jeffcoat M.K., Ryerson C.C., Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J. Clin. Periodontol.* 2000,27: 897-903.
9. Chi B., Qi M., Kuramitsu H.K. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res. Microbiol.* 2003,154: 637-643.
10. Curtis M.A., Slaney J.M., Aduse-Opoku J. Critical pathways in microbial virulence. *J. Clin. Periodontol.* 2005, 32 (6): 28-38.
11. Ehmke B., Krefi W., Karch H. et al. Interleukin-1 haplotype and periodontal disease progression following therapy. *J. Clin. Periodontol.* 1999. 26: 810-813.
12. Ezzo P.J., Cutler C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2003,32: 24-35.
13. Feng Z., Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006, 40 (1): 50-76.
14. Feucht E.C., DeSanti C.L., Weinberg F. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells. *Oral Microbiol. Immunol.* 2003,18: 359-363.
15. Figueira E.A., de Rezende M.L., Torres S.A. et al. Inhibitory signals mediated by programmed death-1 are involved with T-cell function in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 2009, 80 (11): 1833-1844.
16. Hashimoto M., Asai Y., Tamai R. et al. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide. *FEBS Letters.* 2003, 543: 98-102.
17. Hashimoto M., Ogawa S., Asai Y. et al. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 226: 267-271.
18. Heitz-Mayfield L.J. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2005, 32 (6): 196-209.
19. Houle M.-A., Grenier D., Plamondon P., Nakayama K. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 221: 181-185.
20. Iwahara K., Kuriyama T., Shimura S. et al. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the β -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 449 (1): 172-176.
21. Johansson A., Hånström L., Kalfas S. Inhibition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxicity by bacteria from the subgingival flora. *Oral Microbiol. Immunol.* 2000, 15: 218-225.
22. Kelk P., Claesson R., Hanstrom L. et al. Abundant secretion of bioactive interleukin — I beta by human macrophages induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* 2005, 73: 453-458.
23. Kim T.S., Frank P., Eickholz P. et al. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J. Periodontol.* 2009, 80 (12): 2020-2027.
24. Lee J.Y. *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein vaccine reduces the alveolar bone loss induced by multiple periodontopathogenic bacteria. *J. Periodontal. Res.* 2006, 41 (1): 10-14.
25. Liu Y.C., Lerner U.H., Teng Y.T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 163-206.

26. Mahanonda R., Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology*. 2000. 2007, 43: 41-55.
27. Millhouse E., Jose A., Sherry L. Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules. *BMC Oral Health*. 2014, 14 (80). doi:10.1186/1472-6831-14-80.
28. Moter A., Riep B., Haban V. et al. Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (9): 3078-3085.
29. Mullally B.H., Dace B., Shelburne C.E. et al. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J. Periodont. Res.* 2000, 35: 232-241.
30. Nunn M.E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology*. 2000. 2003, 32: 11-23.
31. O'Brien-Simpson N.M., Veith P.D., Dashper S.G., Reynolds E.C. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontology*. 2000. 2004, 35: 101-134.
32. Offenbacher S., Zambon J.J. Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann. Periodontol.* 1996, 1: 926-932.
33. Paquette D.W., Madianos Ph., Offenbacher S. et al. The concept of «risk» and the emerging discipline of periodontal medicine. *J. Contemp. Dent. Practice*. 1999, 1: 1.
34. Paster B.J., Olsen I., Aas J.F., Dewhirst F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology*. 2000. 2006, 42: 80-87.
35. Rudney J.D., Chen R., Sedgewick G.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J. Dent. Res.* 2005, 84: 59-63.
36. Saito K., Takahashi N., Horiuchi H., Yamada T. Effects of glucose on formation of cytotoxic end-products and proteolytic activity of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodont. Res.* 2001, 36: 355-360.
37. Schenkein H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology*. 2000. 2006, 40 (1): 77-93.
38. Schmidt H., Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17 (1): 14-56.
39. Socransky S. S., Haffajee A. D., Cugini M. A. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontology*. 1998, 25: 134-144.
40. Suda R., Kobayashi M., Nanba R. et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J. Periodontol.* 2004, 75 (8): 1084-1089.
41. Tanaka S., Minami M., Murakami Y. et al. The detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in tooth, tongue and buccal mucosa plaques in children, using immunoslot blot assay (IBA). *Pediatr. Dent.* 2006, 30 (3): 251-256.
42. Tanner A.C.R., Kent R. Jr., Dyke Van T. et al. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J. Periodontol.* 2005, 76 (4): 573-581.
43. Tanner A.C.R., Paster B.J., Lu S.C. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J. Dent. Res.* 2006, 85 (4): 318-323.
44. Tran S.D., Rudney J.D., Sparks B.S., Hodges J.S. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J. Periodontol.* 2001, 72 (1): 1-10.
45. Trevisatto P.C., Tramontina V.A., Machado M.A.N. et al. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2002, 29: 233-239.
46. Tribble G.D., Lamont R.J. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol.* 2000. 2010, 52: 68-83.
47. Wang P.L., Ohura K. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts — CD14 and Toll-like receptors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002, 13: 132-142.
48. Yoshioka M., Grenier D., Hinode D. et al. Antigenic cross-reactivity and sequence homology between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL protein and human fibronectin. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004, 1: 19: 124-128.

Поступила 08.12.16

Контактная информация: Царев В.Н., д.м.н., проф.,
124473, Москва ул. Делегатская, 20, стр. 1, р.т. (495)609-67-00