

Биопленка в эндодонтии

Часть I. Свойства и методы изучения (обзор литературы)

В.А. РУМЯНЦЕВ, д.м.н., профессор, зав. кафедрой
Е.Г. РОДИОНОВА, к.м.н., доцент
А.В. НЕКРАСОВ, ассистент
Ф.Б. ЧЕРДЖИЕВА, врач-стоматолог
М.С. КУПРИЯНОВА, врач-стоматолог
Кафедра пародонтологии

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ»

Biofilm in endodontics

Part I. Properties and methods of study (review of the literature)

V.A. RUMYANTSEV, E.G. RODIONOVA, A.V. NEKRASOV, F.B. CHERDZHIEVA, M.S. KUPRIYANOVA

Резюме

Около 80% микробиоты человека существует в виде биопленок. Свойства микроорганизмов в составе биопленки существенно отличаются от таковых в планктонных суспензиях. В системе корневых каналов (СКК) также обнаружена организация микрофлоры в биопленку. Сложное строение и индивидуальная вариабельность СКК в сочетании с уникальными свойствами биопленки делают дезинфекцию этой системы проблемной. Продолжающееся даже после качественного клинического и рентгенологического показателям эндодонтического лечения персистирование микрофлоры в СКК и дентинных трубчатках обуславливает его низкую эффективность. В последние годы разработаны разные методы изучения биопленки. Авторы подчеркивают, что наиболее объективные из них – это те методы, которые проводятся *in vivo*. Однако в СКК реализовать такие методы практически невозможно, но могут использоваться методы опосредованной оценки свойств биопленки. Цель этого обзора – проанализировать накопившуюся информацию об особенностях биотопа СКК и современных методах изучения биопленки с целью повышения эффективности эндодонтического лечения зубов.

Ключевые слова: эндодонтия, пульпит, апикальный периодонтит, биопленка.

Abstract

About 80% of the human microbiota exists in the form of biofilms. The properties of microorganisms in the composition of biofilms differ significantly from those in planktonic suspensions. In the root canal system (RCS), the organization of microflora in biofilms has also been detected. Complex structure and individual variability of RCS in combination with unique properties of biofilm make disinfection of this system problematic. The persistence of microflora in the RCS and dentinal tubules, which continues even after qualitative clinical and radiological endodontic treatment, causes its low efficiency. In recent years, various methods for studying biofilm have been developed. The authors emphasize that the most objective of them are those that are conducted *in vivo*. However, it is practically impossible to implement such methods in the RCS, but methods of indirect evaluation of biofilm properties can be used. The purpose of this review is to analyze the accumulated information on the features of the biocenosis of the RCS and modern methods of studying biofilms in order to improve the effectiveness of endodontic dentistry.

Key words: endodontic, pulpitis, apical periodontitis, biofilm.

Основные положения

— Современные методы анализа и использование последних достижений науки позволили определить,

что в СКК зубов микрофлора организована в биопленку и потому обладает высокой резистентностью к противомикробным препаратам.

— Ситуацию усугубляет сложное строение и вариативность СКК.

— Перед исследователями стоит непростая задача, используя опыт применения известных современных методов анализа биопленки *in vitro*, разработать объективные методы оценки свойств биопленки СКК *in vivo*.

Биопленка в системе корневых каналов (СКК) зуба представляет собой высокоорганизованную структуру, состоящую из бактериальных клеток, заключенных в липкую внеклеточную полимерную матрицу, прикрепленную к поверхности стенок корневых каналов или дентинных трубочек (ДТ) [43, 48]. Биопленка СКК была описана еще в 1987 году Nair P. N. как конгломерат микробов различной формы, погруженный в экстрацеллюлярный аморфный матрикс [50]. Микробный состав биопленки зависит от соотношения разных видов присутствующих в ней микроорганизмов, их количества, а также наличия питательного субстрата. В отличие от планктонной, микрофлора в биопленке обладает иным фенотипом в плане скорости роста и транскрипции генов [18, 21]. Микроколонии в биопленке занимают примерно 15% от ее общей массы, остальное – полимерная матрица [3]. Свойства бактерий в биопленках отличаются от свойств своих собратьев, культивированных в питательных средах, отчасти потому, что первые защищены от внешних воздействий экстрацеллюлярной матрицей [13]. Микроорганизмы внутри биопленки могут быть примерно в 1000 раз более устойчивыми к антимикробным препаратам и факторам защиты организма хозяина, чем их планктонные аналоги [20, 22, 53]. Биопленка также способствует накоплению мутаций в микробных клетках, что делает их более устойчивыми к неблагоприятным условиям существования [60, 68].

В процессе эндодонтического лечения зубов проводится инструментальная (механическая) обработка СКК и ее очистка с использованием химических противомикробных средств или физико-химических факторов очищения от дентинных опилок и «смазанного слоя», образующегося во время обработки, удаление оставшихся витальных или некротических тканей, разрушение микробной биопленки [1, 65, 72]. В целом, как и в любом другом месте организма, целью такой обработки является снижение бактериальной нагрузки до субкритического уровня, когда уже сами защитные факторы организма хозяина смогут самостоятельно справиться с инфекцией. Поэтому для эндодонтии (микрохирургического вмешательства), как и для общей хирургии, остается в силе правило, сформулированное еще Пироговым Н. И., о необходимости очищения и дезинфекции инфицированной раны для обеспечения ее скорейшего заживления [2, 31, 59]. В то же время критический уровень безопасно остающейся в СКК микробиоты неизвестен, и поэтому научные поиски сосредоточены на разработке методов, которые могут полностью удалить бактериальную биопленку из СКК и ДТ.

Свойства биопленки

При пульпите в биотопе СКК, в процессе гибели пульпы и непосредственно после этого, доминируют аэробы и факультативные анаэробы [9]. По мере прогрессирования некротического процесса экология биотопа меняется. В процессе лечения такие

изменения могут происходить под влиянием проникающего в СКК кислорода, использования ирригационных препаратов и изменения pH среды из-за различных материалов, вводимых в каналы. Это приводит к фенотипическим изменениям, обусловленным генетическим сдвигом микробной популяции [12, 55, 67]. Эндодонтическая инфекция может быть первичной или вторичной. Первичное инфицирование обусловлено развивающимся воспалительным процессом в пульпе зуба под влиянием проникшей в нее (чаще через кариозную полость) инфекцией или продуктами микробной жизнедеятельности, что в конечном итоге приводит к гибели пульпы и развитию апикального периодонтита [63]. Вторичная инфекция развивается в результате либо реинфицирования во время лечения, либо как остаточная (персистирующая) инфекция в необработанных участках СКК и ДТ. Как указывает Соломонов М. Е. (2016), даже после очень качественной инструментации 25-35% стенок каналов остаются необработанными [3]. Именно в последнем случае спустя какое-то время даже при подтвержденном рентгенологически «качественном» эндодонтическом лечении развивается периодонтит [31]. Первичные эндодонтические инфекции являются полимикробными [55, 60]. Персистирующие в СКК и ДТ микроорганизмы представлены преимущественно бактероидами, порфиромонадами, превотеллами, фузобактериями, трепонемами, пептострептококками, зубактериями и кампилобактериями. Считается, что персистирующие микроорганизмы в СКК и ДТ после лечения является основной причиной его неудачи [7]. Соотношение микроорганизмов в первичных эндодонтических инфекциях может быть разным, также вариативна их распространенность и число видов.

Микробная флора, обнаруженная при вторичных инфекциях, как правило, способна выдержать суровые условия существования, такие как широкий диапазон pH и ограниченность в питательном субстрате. Существует определенный контраст в фенотипах микробных клеток при первичных инфекциях по сравнению со вторичными, причем в последнем случае, как правило, преобладают грамположительные бактерии [8, 41, 57]. При вторичном инфицировании в СКК обнаружены *Enterococci*, *Streptococci*, *Lactobacilli*, *Actinomyces* и грибы (в том числе рода *Candida*). В частности, многими исследователями в персистирующей биопленке отмечена высокая доля *Enterococcus faecalis* [43, 69].

Смешанная инфекция в СКК встречается значительно чаще, чем изоляты одного микроорганизма [37]. Микрофлора СКК, ассоциированная с обострением воспалительного процесса в апикальном периодонте, имеет практически такой же состав, как и вне стадии обострения [30]. Микрофлора биопленки вырабатывает различные ферменты, однако среди авторов нет четкого представления о том, можно ли по ним судить о степени ее патогенности [40, 62, 73]. В результате метаанализа 385 источников литературы Martinho F. C. с соавт. (2016) была подтверждена прямая корреляция между содержанием микробных эндотоксинов в СКК и клинической выраженностью апикального периодонтита [49]. Микроорганизмы в составе биопленки способны продолжать свое размножение даже в достаточно жестких условиях существования за счет защитной и питательной

способности внеклеточного матрикса. Он способен накапливать питательные вещества, поддерживать и регулировать метаболизм различных видов резидентных микроорганизмов. Царевым В. Н. с соавт. (2016) с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) выявлена обильная микробная колонизация смазанного слоя в области устьев ДТ корня зуба, имеющая признаки микробной биопленки. Установлена обтурация пролиферирующей биопленкой устьев ДТ [4].

Многие микроорганизмы в составе биопленки способны продуцировать поверхностные клеточные структуры (капсулы) и внеклеточные субстанции (экстрацеллюлярные полисахариды). Последние обеспечивают защиту резидентной микрофлоры от различных воздействий окружающей среды, таких как изменения pH, осмотический шок, УФ-излучение и высушивание [26, 55]. Они также уменьшают действие любых вредных для микрофлоры веществ, которые способны диффундировать через матрицу биопленки. Длительное применение лекарственных препаратов приводит к развитию резистентности микробиоты в СКК из-за изменения экспрессии генов и обмена генами устойчивости, что делает антимикробные агенты малозффективными [10, 19]. Полимерная матрица биопленки действует как барьер, захватывая и связывая внеклеточные ферменты, такие как β -лактамаза, и, таким образом, инактивирует β -лактамы антибиотиков [29]. Другим механизмом, ответственным за антимикробную толерантность, является расположение анаэробных ниш глубоко в толще биопленки, при этом кислород может полностью утилизироваться аэробной микрофлорой на поверхности биопленки и не проникать в ее более глубокие слои [28, 34, 74].

Кворумная чувствительность является важнейшим свойством биопленки и представляет собой бактериальную систему связи «клетка-клетка» [46]. Используя химические сигнальные молекулы, бактерии могут общаться друг с другом. Например, такие молекулы, как компетентность стимулирующие пептиды, участвуют в координации экспрессии генов. Кворумная чувствительность позволяет бактериям контролировать окружающую среду вокруг сообщества микроорганизмов и менять свое поведение в масштабах всего биотопа. Отдельные микробные клетки функционируют гораздо менее эффективно по сравнению с бактериальным сообществом, объединенным в биопленку [47].

Кворумная чувствительность играет важную роль при образовании биопленки [39]. В частности, специфические гены кворумной чувствительности принимают участие в формировании биопленки *E. faecalis* (например, *luxS* – S-рибозилхомоцистеинлиаза). *LuxS* кодирует аутоиндуктор-2, который считается перекрестной сигнальной молекулой [32]. Специфические характеристики штамма бактерий также определяют их способность сосуществовать с другими аналогичными микроорганизмами. Такая ассоциация была продемонстрирована между *E. faecalis*, *Streptococcus gordonii* и *Lactobacillus salivarius* [16]. Одной из причин этого может являться способность *E. faecalis* выживать в условиях дефицита питательных веществ в биопленке в зависимости от того, с каким микроорганизмом она сосуществует. Выработка протеаз в среде биоплен-

ки, по-видимому, влияет на способность сосуществования между бактериями, поскольку она напрямую связана с их вирулентностью [16]. К сожалению, кворумная чувствительность биопленки СКК и возможность ее подавления изучены недостаточно.

Современные методы изучения биопленки

Эти методы помогли понять, что система взаимодействия между микроорганизмами обуславливает либо их синергетическое, либо антагонистическое существование. Это понимание привело к переходу от моно- к полимикробной природе эндодонтической инфекции [30, 64]. Последние исследования сосредоточились именно на полимикробных бактериальных биопленках как более реалистичном отражении того, что происходит непосредственно *in vivo* в СКК [15, 70]. Метагеномные исследования также добавили знаний о характере микробных взаимодействий в биопленках [45, 73]. Известно, что функциональные свойства биопленок тесно связаны с их трехмерной структурой, которая представляет интерес для исследователей и требует использования методов, позволяющих наблюдать за ростом и формированием биопленки *in vivo* [38, 53, 68].

В настоящее время биопленки изучаются двумя способами: первый подразумевает изучение консорциума микроорганизмов как единой системы, а второй – изучение взаимодействий между какими-либо двумя отдельными видами микроорганизмов из состава биопленки [27]. Благодаря достижениям в области молекулярной биологии можно изучать экспрессию генов и белков в биопленках, тем самым постепенно выясняя ту роль, которую каждый вид микроорганизмов играет в этом конкретном сообществе [56]. На практике изучение состава и свойств биопленки СКК является реально решаемой задачей, поскольку некоторые современные методы способны смоделировать как внеклеточный матрикс, так и микроколонию биопленки. У модели биопленки *in vitro* имеются неоспоримые преимущества, например, такие как простота повторения и видоизменения, низкая стоимость.

Системы с микротитровальными планшетами – это достаточно информативные системы изучения биопленки. Они закрыты, и поэтому во время эксперимента вход или выход из реактора отсутствует. Следовательно, в такой экспериментальной модели доступность питательных веществ и молекул для микроорганизмов изменяется в процессе их жизнедеятельности [41]. Система на основе микротитровальных планшетов может использоваться для одновременного проведения разных исследований, что бывает полезным для быстрого скрининга методов обеззараживания и ингибирования биопленки [45]. Изучение биопленки с помощью указанных систем можно подразделить на анализ биомассы, жизнеспособности микрофлоры и анализ количества микроорганизмов [52]. Такой анализ может быть выполнен с использованием ряда красителей, как например: *Stylo9*, флуоресцеин, соли тетразолия, резазурина или метиленовый синий. Они позволяют дифференцировать грибковые и бактериальные биопленки. Однако поскольку системы с микротитровальными планшетами используют разные аналитики и в разных условиях, результаты исследований трудно сопоставимы.

Проточные системы моделирования биопленки, в отличие от системы на основе микротитровальных планшетов, открыты. В них среда, содержащая необходимые для роста биопленки питательные вещества, добавляется с постоянной скоростью, причем одновременно удаляются продукты жизнедеятельности и токсины. Концепция проточной системы основана на предположении, что исходный слой макромолекулярных компонентов должен формироваться на поверхности биопленки, чтобы обеспечить микробную адгезию [31]. Поток жидкости оптимальным образом обеспечивает адгезию микробных клеток к субстрату, что является характерным свойством любой биопленки. Эксперименты с параллельной пластиночной проточной камерой и контролируемые гидродинамическими параметрами обеспечивают почти идеальные условия для микробной адгезии при одновременном уменьшении технических размеров модели [58]. Модифицированное устройство Robbins представляет собой модель, в которой происходит непрерывное образование биопленки, поддерживаемой воздействием потока жидкости [17]. Это устройство может использовать вращающиеся диски с силиконом или гидроксипатитом в качестве субстрата для роста биопленки с добавлением или без добавления агентов, которые поддерживают или ингибируют рост микроорганизмов. Основным преимуществом этой системы является то, что она позволяет оценивать действие более одного противомикробного препарата в одном эксперименте [33]. Это устройство также можно модифицировать и использовать в сочетании с другими проточными устройствами.

Газовая хроматография. Эта методика *in vitro* определения газообразных продуктов, продуцируемых микрофлорой биопленки. Она предполагает культивирование выделенных из биопленки колоний микроорганизмов с последующей оценкой газообразных продуктов их жизнедеятельности. Поскольку информационный обмен внутри биопленки осуществляется в том числе и с помощью продуцируемых газов, а также молекул, переносимых этими газообразными веществами, такое исследование позволяет выявлять механизм функционирования кворумной чувствительности биопленки, по крайней мере, между разными представителями биоценоза. Газовая хроматография позволяет определять продуцируемые микрофлорой NO , карбоновые и ароматические кислоты, ацетон, пероксисомы.

Микрофлюидные системы (МФС) становятся популярными методами изучения биопленок из-за возможности образования последних в условиях, схожих с физиологическими. Кроме того, поскольку камера такой системы мала, она позволяет проводить детальный анализ свойств биопленки в одной ячейке [64]. Такой подход может быть полезным при проведении полимеразной цепной реакции, анализе протеинов и секвенировании ДНК [36, 42]. Однако при этом методе сложно количественно оценить микрофлору с применением таких методов, как флуоресцентное окрашивание. Интересной разработкой в этом аспекте было использование модифицированной методики конфокальной микроскопии, позволяющей количественно изучать пространственные размеры биопленки [71].

Различные методы и технологии помогли нам углубить понимание физиологии биопленки и поведение обитающих в ней микроорганизмов. Однако эти эксперименты выполняются на моделях биопленки *in vitro*, которые могут не точно представлять или имитировать поведение биопленки *in situ*. Еще одна существенная проблема таких методов исследования заключается в том, что в моделях *in vitro* отсутствует иммунная реакция на биопленку со стороны организма хозяина, что ограничивает понимание всего комплекса процессов, которые имеют место непосредственно в СКК.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в последние годы стала очень хорошим методом изучения структуры биопленок [54], поскольку она позволяет провести неразрушающее исследование этих экосистем и их гидратированное пространственное расположение в клеточном масштабе. Особенность такой микроскопии заключается в использовании точечных фильтров, за счет которых получают высококонтрастное изображение. Использование флуоресцентных маркеров позволяет выявлять определенные клетки или даже определенные компоненты внеклеточной матрицы. Использование конкретных меток (например, меток «живые – мертвые») позволяет дифференцировать жизнеспособные и мертвые бактерии, которые различаются по зеленому или красному цвету флуоресценции [44]. Однако этот метод не совсем точен, поскольку обработка образца красителем может привести к гибели бактерий и, следовательно, к ложному результату. Тем не менее, метод позволяет иметь определенное представление об эффективности противомикробных препаратов и о трехмерной структуре биопленки. Ограничения метода те же, что и для световой микроскопии, в том числе и неспособность визуализировать сотовую ультраструктуру биопленки, которая требует более высокого разрешения.

Флуоресцентная микроскопия с высоким разрешением. Новые микроскопические методы, такие как STED (микроскопия на основе подавления спонтанного испускания), PALM (фотоактивируемая локализационная микроскопия) и SIM (структурированная световая микроскопия), могут устранить проблемы, обусловленные недостаточным разрешением [57]. Однако для этой цели биопленка должна быть маркирована флуоресцирующими красителями. Следовательно, важно идентифицировать специфические маркеры для компонентов биопленки.

Сканирующая электронная микроскопия (SEM) преодолевает некоторые из ограничений, связанных с использованием флуоресцентных красителей. Этот метод позволяет сканировать микробные экосистемы для получения качественной информации, а также проводить детальный анализ морфологических структур, таких как клеточная поверхность одной бактерии или идентификация повреждения клеточной мембраны. Он также позволяет анализировать взаимодействия между клетками, обнаруживая структурные изменения в экосистемах [5, 35]. Однако следует иметь в виду, что подготовка образца для такого типа микроскопии обычно связана с условиями высокого вакуума, что приводит к искажению внеклеточной полимерной матрицы [66]. В этом отношении методы низкого вакуума, такие как экологический SEM, могут быть более востребованы.

Заключение

Именно благодаря возможностям SEM удалось определить, что микрофлора СКК организована в биопленку и, более того, жизнедеятельность биопленки в ДТ может способствовать деминерализации дентина корня. Однако все перечисленные методы подразумевают моделирование или изучение свойств биопленки СКК in vitro. Это не дает объективного представления о реальной ситуации в глубине СКК in vivo. На сегодняшний день для оценки свойств биопленки СКК in vivo можно использовать лишь опосредованные методы, основанные на изучении содержимого корневого канала или на результатах диагностического применения тех или иных противомикробных эндодонтических препаратов [4]. Перед исследователями стоит задача поиска новых объективных методов прижизненной оценки свойств биопленки СКК, что важно для разработки и применения наиболее эффективных способов борьбы с эндодонтической инфекцией.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Митронин А. В., Волков Д. П., Митронин В. А. Исследование диффузии озвученного антисептического водного раствора наносеребра в дентин зуба // *Эндодонтия today*. 2017. №2. С. 4-6.
2. Mitronin A. V., Volkov D. P., Mitronin V. A. Issledovanie diffuzii ozvuchennogo antisepticheskogo vodnogo rastvora nanoserebra v dentin zuba // *Endodontiya today*. 2017. №2. S. 4-6.
3. Сирак С. В., Адамчик А. А., Кобылкина Т. Л., Кошель И. В., Лайпанова Ф. М. Сравнительная характеристика препаратов для временного пломбирования корневых каналов при лечении апикального периодонтита // *Эндодонтия today*. 2016. №3. С. 24-27.
4. Sirak S. V., Adamchik A. A., Kobylkina T. L., Koshel I. V., Laypanova F. M. Sravnitel'naya kharakteristika preparatov dlya vremennogo plombirovaniya kornevikh kanalov pri lechenii apikalnogo periodontita // *Endodontiya today*. 2016. №3. S. 24-27.
5. Соломонов М. Е. Биопленка как эндодонтическая инфекция // *Эндодонтия*. 2016. Т. 9. №1-2. С. 67-69.
6. Solomonov M.E. Bioplenka kak tndodonticheskaya infektsiya // *Endodontiya*. 2016. Т. 9. №1-2. S. 67-69.
7. Царев В. Н., Митронин А. В., Подпорин М. С. Микробная биопленка корневых каналов и новые подходы к диагностике и лечению хронических форм пульпита с использованием фотоактивируемой дезинфекции и ультразвуковой обработки // *Эндодонтия today*. 2016. №3. С. 19-23.
8. Tsarev V. N., Mitronin A. V., Podporin M. S. Mikrobnaya bioplenka kornevykh kanalov i novye podkhody k diagnostike i lecheniu khronicheskikh form pulpita s ispolzovaniem fotoaktiviruemoi dezinfekcii i ultrazvukovoy obrabotki // *Endodontiya today*. 2016. №3. S. 19-23.
9. Alhede M., Qvortrup K., Liebrechts R. et al. Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition FEMS // *Immun. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 65. P. 335-342.
10. Alves F. R., Almeida B. M., Neves M. A. et al. Disinfecting oval-shaped root canals: Effectiveness of different supplementary approaches // *J. Endod.* 2011. Vol. 37. P. 496-501.
11. Alves F. R., Andrade-Junior C. V., Marceliano-Alves M. F. et al. Adjunctive steps for disinfection of the mandibular molar root canal system: A correlative bacteriologic, microcomputed tomography, and cryopulverization approach // *J. Endod.* 2016. Vol. 42. P. 1667-1672.
12. Anderson A. C., Hellwig E., Vespermann R. et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: A combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7. e49576.
13. Antunes H. S., Rocas I. N., Alves F. R., Siqueira J. F. Total and specific bacterial levels in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis // *J. Endod.* 2015. Vol. 41. P. 1037-1042.
14. Barbosa-Ribeiro M., De-Jesus-Soares A., Zaia A.A. et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment // *J. Endod.* 2016. Vol. 42. P. 1022-1028.
15. Busscher H. J., van der Mei H. C. Microbial adhesion in flow displacement systems // *Clin. Microbiol. Rev.* 2006. Vol. 19. P. 127-141.
16. Bystrom A., Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy // *Scand. J. Dent. Res.* 1981. Vol. 89. P. 321-328.
17. Caggianiello G., Kleerebezem M., Spano G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 100., P. 3877-3886.
18. Chavez de Paz L.E. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75. P. 1734-1739.
19. Chavez de Paz L. E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria // *J. Endod.* 2012. Vol. 38. P. 318-323.
20. Chavez de Paz L. E., Davies J. R., Bergenholtz G., Svensater G. Strains of *Enterococcus faecalis* differ in their ability to coexist in biofilms with other root canal bacteria // *Int. Endod. J.* 2015. Vol. 48. P. 916-925.
21. Coenye T., de Prieck K., de Wever B., Nelis H. J. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices // *J. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 105. P. 733-740.
22. Costerton J.W., Stewart P.S. Battling biofilms // *Sci. Am.* 2001. Vol. 285. P. 74-81.
23. Davey M. E., O'Toole G. A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. Vol. 64. P. 847-867.
24. Devaraj S., Jagannathan N., Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in vitro // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 24797.
25. Diaz P. I. Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities // *Front. Oral Biol.* 2012. Vol. 15. P. 17-40.
26. Dunavant T. R., Regan J. D., Glickman G. N. et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms // *J. Endod.* 2006. Vol. 32. P. 527-531.
27. Farmer J. T., Shimkevitch A. V., Reilly P. S. et al. Environmental bacteria produce abundant and diverse antibiofilm compounds // *J. Appl. Microbiol.* 2014. Vol. 117. P. 1663-1673.
28. Filoche S. K., Coleman M. J., Angker L., Sissons C.H. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms // *J. Microbiol. Methods*. 2007. Vol. 69. P. 489-496.
29. Flemming H. C., Wingender J., Szewzyk U. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 14. P. 563-575.
30. Flemming H. C. EPS — then and now // *Microorganisms*. 2016. Vol. 4. P. 41.
31. Gabrielska R. A., Rumbaugh K. P. Biofilm models of polymicrobial infection // *Future Microbiol.* 2015. Vol. 10. P. 1997-2015.
32. Gerdes K., Semsey S. Microbiology: Pumping persisters // *Nature*. 2016. Vol. 534. P. 41-42.
33. Gilbert P., Maira-Litran T., McBain A. J. et al. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities // *Adv. Microb. Physiol.* 2002. Vol. 46. P. 202-256.
34. Guo H., Gao C., Zhang C. et al. Morphology of bacterial flora in root canals associated with apical abscesses // *Chin. Med. J.* 2014. Vol. 127. P. 3254-3258.
35. Haapasalo M., Udnæs T., Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment // *Endod. Top.* 2003. Vol. 6. P. 29-56.
36. He Z., Liang J., Zhou W., Xie Q., Tang Z., Ma R., Huang Z. Effect of the quorum-sensing luxS gene on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* // *Eur. J. Oral Sci.* 2016. Vol. 124. P. 234-240.
37. Honraet K., Nelis H. J. Use of the modified Robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation // *J. Microbiol. Methods*. 2006. Vol. 64. P. 217-224.
38. Kaldalu N., Hauryliuk V., Tenson T. Persisters - as elusive as ever // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 100. P. 6545-6553.
39. Kelleher S. M., Habimana O., Lawler J. et al. Cicada wing surface topography: an investigation into the bactericidal properties of nanostructural features // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. Vol. 8. P. 14966-14974.

**Полный список литературы
находится в редакции**

Поступила 22.02.2018

**Координаты для связи с авторами:
170000, г. Тверь, ул. Советская, д. 4**