

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МЕТОД ДІАГНОСТИКИ ПАРОДОНТИТУ

Янішен І. В.,
Гришанін Г. Г.,
Дюдіна І. Л.,
Перешивайлова І. О.,
Погоріла А. В.

Україна, м. Харків, Харківський національний медичний університет, кафедра
ортопедичної стоматології

Abstract. *Illnesses of parodontitis occupy one of major places among problems in modern dentistry. Considerable prevalence, severe loss of teeth for patients, unfavorable influence of hearths of parodontitis infection on an organism is determined actuality of problem of complex diagnostics and treatment of this pathology. A research aim is an estimation of features of composition of parodontitis microbiota in content folds of gums by means of polymerase chan reaction of differential diagnostics at chronic simple and complicated parodontitis.*

Materials and research methods. We are conduct an inspection 67 persons in age from 60 to 20, that suffer on the different forms of parodontitis. A control (K) group was laid down by 16 persons that did not have external signs of parodontitis. The complex of clinical methods was standard (questioning, research, sounding, estimation of degree of mobility of teeth, estimation of the state of tissues of parodontitis).

Research results. For all patients with the set diagnosis the chronic periodontitis of research polymerase chan reaction allowed to distinguish in content of the parodontitis pocket of DNA all parodontitispathogenic kinds in the considerable percent of cases : for 42 persons (of 66,7%) - *P. gingivalis*, in 39 (61,9%) - *B. forsythus*, in 38 (60,3%) - *T. denticola*, in 34 (53,9%) - *P. intermedia*, in 29 (46,0%) - *A. actinomycetemcomitans*.

Conclusions. Analysing intercommunication of clinical parameters and presence of microbiota of gingival pockets, we educed dependence between the increase of frequency of exposure of paradontopathogenic and expressiveness of clinical displays. Especially evidently intercommunication is traced between patients with the easy and middle degree of weight. There is correlation between the increase of frequency of exposure of paradontopathogenic in the gingival pockets of area and expressiveness of clinical displays.

Keywords: *Molecular genetic diagnostic method, microbiota, periodontitis.*

Вступ. Хвороби пародонта займають одне з найважливіших місць серед проблем в сучасній стоматології. Значна поширеність, велика втрата зубів у пацієнтів, несприятливий вплив вогнищ пародонтальної інфекції на організм визначають актуальність проблеми комплексної діагностики та лікування даної патології. Тривожним на сьогоднішній день є той факт, самі ті спостереження що зростає кількість агресивних форм захворювання пародонту, що протікають з частими загостреннями і стійкі до традиційного лікування [1].

Для диференційного патогенетичного підходу оральну мікробіоту ВООЗ рекомендує виділяти пародонтопатогени - грамнегативні анаеробні бактерії. А саме - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (A.ac), *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi). Цей пул мікробіоти за рахунок факторів вірулентності індукують тривале запалення і руйнування тканин ясен і альвеолярного відростка щелепи, кровоточивість, порушення судинної мікроциркуляції крові в тканинах ясен, дистрофічні зміни, що зрештою призводить до потреби вилучення зубів [3,5].

Вони також викликають загальну інтоксикацію організму, ураження імунної та ендокринної систем, провокують розвиток атеросклерозу судин мозку і серця, підвищують ризик розвитку інсульту та інфаркту міокарда [8]. Особливістю дії цих бактерій є те, що вони виділяють надзвичайно активні ендотоксини. Ліпополісахариди грамнегативних бактерій мають токсичну дію за рахунок ліпіда А, що викликає посилену продукцію цитокінів. Токсичний ефект останніх на тканини пародонта насамперед, пов'язують з придушенням тканинної репарації і гіперактивацією остеокластів.

При взаємодії цитокінів з поліморфно-ядерними лейкоцитами, захисний ефект останніх трансформується в протилежний, що сприяє деструкції пародонта [2].

Періодонтопатогенні види мікробіоти мають:

1) інвазивні, що забезпечується ферментами агресії з гістолітичних дією (коллагеназа, гіалуронідаза, хондроїтинсульфатаза, гепаріназа, IgG-, IgM- протеази);

2) протекції (здатністю збережуватися при дії захисних сил макроорганізму), яка забезпечується, по-перше, полісахаридною капсулою грамнегативних мікробів, по - друге - ферментами, здатними розщеплювати імуноглобуліни і фракції комплементу;

3) Продукцією речовин з неприємним запахом. *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* утворюють з метіоніну метилмеркаптан - газ з неприємним запахом, який, на думку деяких дослідників, причетний до індукції і прогресуванню пародонтиту (Nakano Y., Yoshimura M., Koga T., 2002; Awano S., et al., 2002); діметилсульфід і сірководень;

4) адгезивні. Періодонтопатогени мають здатність прилипати у великій кількості до епітеліальних клітин, гідроксиапатиту і грампозитивних бактерій.

Для вирішення проблеми захворювань пародонту чітко визначена теоретична база. У зв'язку з цим основною метою терапії пародонтитів є пригнічення росту і розмноження мікробіоти і усунення негативних наслідків їх впливу на навколишні тканини. Підвищення ефективності терапії можливо при цільовому впливі на мікробні поєднання, відповідальні за виникнення конкретних нозологічних форм пародонта.

Встановлення факту наявності пародонтопатогенної мікробіоти у ділянках складок ясен є важливою інформацією для лікаря-стоматолога при виборі препарату і методу терапії.

До теперішнього часу за кордоном широкого поширення набули методи діагностики, засновані на використанні ДНК-зондів і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), при використанні яких відбувається ідентифікація не самих патогенних бактерій, а їх специфічних нуклеїнових кислот.

Метод ПЛР поєднує в собі найвищу чутливість всіх мікробіологічних методів і спрямований на виявлення «маркерних» мікроорганізмів. При цьому даний метод виключає різні ускладнення і потенційно помилкові етапи. Будь-який позитивний результат має клінічне значення, а ті концентрації бактерій, які можуть бути присутніми в здоровій слизовій оболонці, дають негативний результат. До переваг даної діагностики відноситься: висока специфічність, швидкість, простота практичного застосування, необов'язкове присутність живих мікроорганізмів, не потрібно спеціальних умов для транспортування [3, 4, 5].

Мета дослідження - оцінка особливостей складу пародонтопатогенної мікробіоти у вмісті складок ясен за допомогою ПЛР диференціальної діагностики при хронічному простому і ускладненому пародонтиті.

Матеріали і методи дослідження.

Нами проведено обстеження 67 осіб у віці від 20 до 60 років, які страждають на різні форми пародонтиту. Контрольну (К) групу склали 16 осіб які не мали зовнішні ознаки пародонтиту. Комплексні клінічні дослідження тканин пародонта проводили на базі кафедри ортопедичної стоматології Інституту імунології вірусології АМН України дослідження здійснювалося відповідно до певної схеми, рекомендованої ВООЗ. Комплекс клінічних методів був стандартний (опитування, дослідження, зондування, оцінка ступеня рухливості зубів, оцінка стану тканин пародонта).

Враховувалися індексні параметри: спрощений індекс гігієни порожнини рота (Greene J., Vermillion J., 1964), ясенний індекс (GI, Loe, Silness, 1963), комплексний періодонтальний індекс потреби в лікуванні CPITN (ВООЗ, 1982), також враховувалася патологічна рухливість зубів (Fleszar, 1980), рецесія ясен (Stahl Morris), залучення фуркації в патологічний процес (Hamp, 1975; Tarnow, Fletcher, 1984). Глибину патологічної ясенної борозенки вимірювали за допомогою градуйованого пуговчатого періодонтального зонда (Williams). Структура кісткової тканини оцінювалася рентгенологічними методами. Всього досліджено 35 хворих на пародонтит.

Для коректності дослідження пацієнти були розділені на 3 групи відповідно до класифікації Л.Н. Дедовой (2002) в залежності від ступеня тяжкості патологічного процесу. В першу групу були включені 20 пацієнтів з хронічним простим і ускладненим пародонтитом (генералізований легкого ступеня тяжкості). При цьому у пацієнтів клінічно визначалися кишені глибиною до 4 мм, рухливості і зміщення зубів не спостерігалось. На рентгенограмі виявлялася початкова ступінь деструкції кісткової тканини міжзубних перегородок, зниження

висоти до 1/3. До другої групи 15 пацієнтів з хронічним простим і ускладненим пародонтитом (генералізований середнього ступеня тяжкості).

При обстеженні пацієнтів цієї групи виявляли кишені глибиною від 4 до 6 мм. Відзначалася рухливість зубів 1-2 ступеня. На ортопантограмі - резорбція кісткової тканини міжзубних перегородок від 1/3 до 1/2. У третю увійшли 19 осіб з хронічним простим і складним пародонтитом (генералізований важкого ступеня тяжкості). Об'єктивно в даній групі при зондуванні були виявлені кишені більше 6 мм глибиною. Відзначалася патологічна рухливість зубів 2-3 ступеня, зміщення зубів. На рентгенограмі - резорбція кісткової тканини більш 1/2 довжини кореня. Всім пацієнтам проводили дослідження складу пародонтальних патогенів в екссудаті ясеневий складки, або пародонтальної кишені молекулярно-генетичним методом (ПЛР).

Після письмової інформованої згоди пацієнтів для проведення мікробіологічної діагностики проводився забір біологічного матеріалу з усіх пародонтальних кишень в найбільш глибокій ділянці за допомогою стерильного паперового штифта стандартного розміру (№30). Матеріал поміщали в пробірки з транспортним середовищем і не пізніше 2 год доставляли в лабораторію для проведення ПЛР дослідження. Генодіагностика ДНК *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* проводили на базі лабораторії групи ПЛР діагностики ЦНІЛ БелМАПО, використовуючи діагностичні набори ТОВ НВФ «ГЕНТЕХ».

Чутливість набору становить понад 104 копій / мл для кожного збудника, що забезпечує можливість виявлення бактерій в кількостях, характерних для ділянок з ризиком розвитку або прогресування пародонтиту і зниження витрати реагентів для ампліфікації.

Весь технологічний процес дослідження складався з трьох основних процедур: проби підготовки клінічних зразків, проведення самої полімеразної реакції, спрямованої на множення (ампліфікації) фрагментів ДНК збудника захворювань, і детекції продукту ПЛР, тобто оцінки результату. З клінічних зразків ДНК виділяли сорбційними методом: адсорбції на частинках двоокису кремнію в присутності гуанідинітрату натрію, відмиваючи етиловим спиртом. Для проведення ампліфікації в пробірки типу Eppendorf об'ємом 0,5 мл внесли 5 мкл аналізованого зразка. В кожну з пробірок додавали 20 мкл ампліфікаційних сумішей, що складається з 15 мкл деіонізованої води, 4 мкл реакційної суміші (Мультимікс) і 1 мкл Таq-полімерази (стандартний набір для ампліфікації ТОВ НВФ «ГЕНТЕХ»). Додавали 25 мкл мінеральної олії. Для оцінки результатів використовували транслюмінатор Н-2 («Петротерм», Росія) з довжиною хвилі 310 нм із застосуванням відеосистеми для реєстрації гелів «Gel-Imager» («Петротерм», Росія) за допомогою програми «Gel Explorer» версія 1,0 на базі комп'ютера Intel Pentium - 4.

Аналіз результатів проводився за внутрішніми контролюми і контрольних зразках, а також за кількістю синтезованих нуклеотидних пар, молекулярною масою та інтенсивністю світіння фрагмента молекули ДНК.

Результати та обговорення.

При вивченні складу пародонтопатогенної мікробіоти у пацієнтів, які страждають на хронічний пародонтит за допомогою набору реактивів "Мультідент - 5" було показано, що частота утворення різних видів пародонтопатогенної мікробіоти була досить висока. У 42 обстежених пацієнтів, які страждають на хронічний пародонтит, тобто в 66,7% випадків, виявили *P. gingivalis*. *B. forsythus* ідентифікували у 39 осіб (61,9%). У 38 пацієнтів (60,3%) була виявлена ДНК *T. denticola*, у 34 осіб *P. intermedia* (53,9%). *A. actinomycetemcomitans* виявили у 29 осіб (46,0%). частота виділення пародонтопатогенів у пацієнтів, що страждають на пародонтит в порівнянні з групою К статистично достовірно відрізняється, $p < 0,05$.

Частота утворення одного виду пародонтопатогена у пацієнтів, які страждають на пародонтит, склала 9,5% (6 осіб). 20,6% (13 осіб) обстежуваних є носіями двох видів інфекційних збудників. Три види пародонтопатогенних бактерій зустрічалися в 46,0% випадків (29). У 12 пацієнтів (19,0%) ідентифікували 4 види анаеробів. Виявлення асоціації всіх 5 видів мікробіоти було в 3 випадках, що складає 4,8%.

При цьому найбільш часто зустрічалися асоціації *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, а також *P. intermedia*, *B. forsythus*, *P. gingivalis* у 5 осіб відповідно (7,9%). Червоний комплекс *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola* [7] відрізняється специфічністю дії на тканини пародонта особливими клінічними проявами (виражена запальна реакція і кровоточивість при зондуванні). Представники даної асоціації *P. gingivalis*, *B. forsythus* проявляють сильну протеїназну активність. У нашому дослідженні всі представники даної асоціації «червоний комплекс» були виявлені у 4 пацієнтів (6,3%). Одночасно 5 пародонтопатогенів було виявлено у 3 осіб (4,8%), з такою ж частотою були ідентифіковані

асоціації *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* і *T. denticola*; *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* і *T. denticola*; *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* і *T. Denticola*; *P. gingivalis*, *P. intermedia* і *T. Denticola*; *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. Forsythus*; *P. intermedia*, *B. forsythus* і *T. Denticola*; *P. Gingivalis* і *B. forsythus*; *P. intermedia* і *T. Denticola*; *A. actinomycetemcomitans* і *P. gingivalis*. Асоціації *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *B. forsythus*; *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*; *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *B. forsythus* були виявлені у 2 осіб (3,1%).

Один вид пародонтопатогена виявили у 6 осіб. З них у 3 пацієнтів виявили *B. forsythus*, у 2 *P. Intermedia*. ДНК *P. gingivalis* була виділена у 1 пацієнта. Інші варіанти асоціацій зустрічалися з частотою 1,5%. На відміну від досліджень Е.Н. Ніколаєвой, В.Н. Царева 2004р., Не виявлено домінуючих асоціацій у пацієнтів при наявності пародонтитів.

Аналізуючи взаємозв'язок клінічних параметрів і наявності мікробіоти ясенних кишень, ми виявили залежність між зростанням частоти виявлення пародонтогенів і виразністю клінічних проявів. Особливо наочно взаємозв'язок простежується між пацієнтами з легким і середнім ступенем тяжкості. Це підтверджують дані Е.Н. Ніколаєвой зі співавторами про взаємозв'язок між зростанням частоти виявлення грамнегативних анаеробних бактерій в ділянці десневої борозни і глибиною складок ясени [3]. В 1 групі найбільш часто у 16 осіб (в 64,0%) ідентифікували *P. intermedia*, у 15 осіб (60,0%) *B. forsythus*, у 14 (56,0%) - *T. denticola*, у 13 (52,0%) - *P. gingivalis*, у 9 (36%) - *A. actinomycetemcomitans*. У другій групі найчастіше була виявлена ДНК *P. gingivalis* у 16 осіб (84,2%), *T. denticola* і *B. forsythus* зустрічалися з однаковою частотою у 13 пацієнтів (68,4%), *A. actinomycetemcomitans* у 11 осіб (57,9%) і у 9 (47,4%) *P. intermedia*. У пацієнтів третьої групи найбільш часто виявляли *P. gingivalis* - у 13 осіб (68,4%), *T. denticola* і *B. forsythus* ідентифікували у 11 пацієнтів (57,9%), *P. intermedia* і *A. actinomycetemcomitans* зустрічалися в 9 випадках (47,4%).

Отримані в результаті дослідження дані підтверджують, що метод на основі ПЛР є високоінформативним і чутливим, його використання може бути рекомендовано для діагностики хвороб пародонту.

Висновки.

1. У всіх пацієнтів з встановленим діагнозом хронічний пародонтит ПЛР дослідження дозволило виділити у вмісті пародонтальної кишені ДНК всіх пародонтопатогенних видів в значному відсотку випадків: у 42 чоловік (66,7%) - *P. gingivalis*, у 39 (61,9%) - *B. forsythus*, у 38 (60,3%) - *T. denticola*, у 34 (53,9%) - *P. intermedia*, у 29 (46,0%) - *A. actinomycetemcomitans*.

2. Спостерігається кореляція між зростанням частоти виявлення пародонтогенів в ясенних кишнях області і виразністю клінічних проявів.

3. Таким чином, отримані результати підтверджують дані ряду авторів [3,4,6,7,9] про роль пародонтогенних видів в етіології і патогенезі хвороб пародонту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Безрукова, І. В., Грудянов, А. І. Агресивні форми пародонтиту. М., 2012. 80 с.
2. Грудянов, А. І., Овчинникова, В. В., Дмитрієва, І. А. Антимікробна і протизапальна терапія в пародонтології. М., 2004. 75 с.
3. Миколаєва, Е. М., Царьов, В. Н., Щербо, С. Н. Застосування нової тест-системи, заснованої на полімеразної ланцюгової реакції, в пародонтології // Інститут стоматології. 2004. № 4. С. 63-66.
4. Царьов, В. Н., Миколаєва, Е. М., Плахтій, Л. А. Перспективи застосування молекулярно-генетичних методів дослідження в діагностиці пародонтиту // Російський стоматологічний журнал. 2002. № 5. С. 6-9.
5. Bauermeister, C.-D. Лабораторна діагностика захворювань тканин періодонта // Нове в стоматології. 2013. № 7. С. 27-30.
6. Slots, J. Subgingival microflora and periodontal disease // J. Clin. Periodontol. 2011. Vol. 6. P. 351-382.
7. Socransky, S S, Haffajee, A D, Cugini, M A, Smith, C, Kent, R L Jr. Microbial complexes in subgingival plaque // J. Clin. Periodontol. 2009. Vol. 25. P. 134-144.
8. Straka, M. Періодонтит і атеросклероз-чи існує між ними зв'язок? // Нове в стоматології. 2011. № 8. С. 26-33.
9. Tanner, A, Maiden, M F, Macuch, P J, Murray, L L, Kent, R L Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis // J. Clin. Periodontol. 2015. Vol. 25. P. 85-98.