

## **Применение молекулярно-генетического метода в диагностике болезней периодонта**

*Кафедра общей стоматологии БелМАПО, ЦНИЛ БелМАПО, Минск*

Возникновение воспалительных болезней периодонта обусловлено действием некоторых представителей поддесневой биопленки. Среди них выделяют: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Целью нашей работы явилась оценка особенностей состава периодонтопатогенов в содержимом периодонтального кармана с помощью ПЦР диагностики при хроническом простом и сложном периодонтите.

Частота выявления ДНК периодонтопатогенов составила: *T. denticola* 60,3%; *T. forsythensis* 61,9%, *P. intermedia* 53,9%, *P. gingivalis* 66,7%, *A.actinomycetemcomitans* 46,0%.

Полученные результаты подтверждают данные о роли периодонтопатогенных видов в этиологии и патогенезе болезней периодонта.

Ключевые слова: болезни периодонта, полимеразная цепная реакция (ПЦР), периодонтопатогенные виды.

Болезни периодонта занимают одно из важнейших мест среди проблем в современной стоматологии. Значительная распространённость, большая потеря зубов у пациентов, неблагоприятное влияние очагов периодонтальной инфекции на организм определяют актуальность проблемы комплексной диагностики и лечения данной патологии. Тревожным на сегодняшний день является тот факт, что возрастает количество агрессивных форм заболевания, протекающих с частыми обострениями и устойчивых к традиционным методам лечения [1].

К настоящему времени получены убедительные данные, что в этиологии и патогенезе болезней периодонта важнейшую роль играют нарушения ассоциативных взаимоотношений представителей автономной флоры полости рта [6,9]. При этом ведущая роль в формировании воспалительного процесса в ротовой полости принадлежит резидентной облигатной анаэробной и микроаэрофильной микрофлоре[7].

Среди оральной флоры ВОЗ рекомендовала выделять, так называемые, «периодонтопатогены» - грамотрицательные анаэробные бактерии: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (*A.ac*), *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*)(*T.f.*), *Treponema denticola* (*T.d.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*), *Prevotella intermedia* (*P.i.*). Эти виды за счет факторов вирулентности индуцируют длительное воспаление и разрушение тканей десны и альвеолярного отростка челюсти, кровоточивость, нарушение сосудистой микроциркуляции крови в тканях десен, дистрофические изменения, что в конечном итоге приводит к выпадению зубов[3,5].

Они также вызывают общую интоксикацию организма, поражение иммунной и эндокринной систем, провоцируют развитие атеросклероза сосудов мозга и сердца, повышают риск развития инсульта и инфаркта миокарда [8].

Особенностью действия этих бактерий является то, что они выделяют чрезвычайно активные эндотоксины. Липополисахариды грамотрицательных

бактерий обладают токсическим действием за счет липида А, вызывающий усиленную продукцию цитокинов. Токсический эффект последних на ткани периодонта прежде всего связывают с подавлением тканевой репарации и гиперактивацией остеокластов. При взаимодействии цитокинов с полиморфно-ядерными лейкоцитами, защитный эффект последних трансформируется в противоположный, что способствует деструкции тканей периодонта.[2]

Периодонтопатогенные виды обладают:

1) Инвазивностью, что обеспечивается ферментами агрессии с гистолитическим действием (коллагеназа, гиалуронидаза, хондроитинсульфатаза, гепариназа, IgG-, IgM- протеазы).

2) Протекцией (способностью сохраняться при действии защитных сил макроорганизма), которая обеспечивается, во-первых, полисахаридной капсулой грамотрицательных микробов, во - вторых - ферментами, способными расщеплять иммуноглобулины и фракции комплемента.

3) Продукцией веществ с неприятным запахом. *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* образуют из метионина метилмеркаптан - газ с неприятным запахом, который, по мнению некоторых исследователей, причастен к индукции и прогрессированию периодонтита (Nakano Y., Yoshimura M., Koga T., 2002; Awano S., et al., 2002); диметилсульфид и сероводород.

4) Адгезивностью. Периодонтопатогены обладают способностью прилипать в большом количестве к эпителиальным клеткам, гидроксипатиту и к грамположительным бактериям.

Для решения проблемы болезней периодонта четко определена теоретическая база. В связи с этим основной целью терапии периодонтита является подавление роста и размножения микроорганизмов и устранение отрицательных последствий их воздействия на окружающие ткани. Повышение эффективности терапии возможно при целевом воздействии на микробные сочетания, ответственные за возникновение конкретных нозологических форм болезней периодонта.

Установление факта наличия периодонтопатогенных микробов в содержимом периодонтального кармана является важной информацией для врача-стоматолога при выборе препарата и метода терапии.

К настоящему времени за рубежом широкое распространение получили методы диагностики, основанные на использовании ДНК-зондов и полимеразной цепной реакции (ПЦР), при использовании которых происходит идентификация не самих патогенных бактерий, а их специфических нуклеиновых кислот. Метод ПЦР сочетает в себе высочайшую чувствительность всех микробиологических методов и направлен на выявление «маркерных» микроорганизмов. При этом данный метод исключает различные осложнения и потенциально ошибочные этапы.

Любой положительный результат имеет клиническое значение, а те концентрации бактерий, которые могут присутствовать в здоровой слизистой оболочке, дают отрицательный результат.

К достоинствам данной диагностики относится: высокая специфичность, быстрота, простота практического применения, необязательное присутствие

живых микроорганизмов, не требуется специальных условий для транспортировки [3, 4, 5].

Целью данного исследования являлась оценка особенностей состава периодонтопатогенов в содержимом периодонтального кармана с помощью ПЦР диагностики при хроническом простом и сложном периодонтите.

Материалы и методы исследования.

Нами проведено обследование 63 человек в возрасте от 18 до 70 лет с болезнями периодонта (хронический простой и сложный периодонтит). Контрольную группу составили 16 человек без признаков патологии периодонта. Комплексное клиническое обследование состояния тканей периодонта проводилось на базе кафедры общей стоматологии БелМАПО и осуществлялось по строго определённой схеме, рекомендованной ВОЗ. Комплекс клинических методов был стандартен (опрос, осмотр, зондирование, оценка степени подвижности зубов, оценка состояния тканей периодонта).

Учитывались индексные параметры: упрощенный индекс гигиены полости рта (Greene J., Vermillion J., 1964), десневой индекс (GI, Loe, Silness, 1963), комплексный периодонтальный индекс нуждаемости в лечении CPITN (ВОЗ, 1982), также учитывалась патологическая подвижность зубов (Fleszar, 1980), рецессия десны (Stahl Morris), вовлечение фуркации в патологический процесс (Hamp, 1975; Tarnow, Fletcher, 1984).

Глубину патологического зубо-десневого кармана измеряли с помощью градуированного пуговчатого периодонтального зонда (Williams). Структура костной ткани оценивалась рентгенологическими методами.

В ходе клинического исследования все пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с классификацией Л.Н.Дедовой (2002) в зависимости от степени тяжести патологического процесса. В первую группу были включены 20 пациентов с хроническим простым и сложным периодонтитом (генерализованным легкой степени тяжести). При этом у данных пациентов клинически определялись карманы глубиной до 4 мм, подвижности и смещения зубов не наблюдалось. На рентгенограмме выявлялась начальная степень деструкции костной ткани межзубных перегородок, снижение высоты до 1/3. Во вторую группу 17 пациентов с хроническим простым и сложным периодонтитом (генерализованным средней степени тяжести). При обследовании пациентов этой группы выявляли карманы глубиной от 4 до 6 мм. Отмечалась подвижность зубов 1-2 степени. На ортопантограмме - резорбция костной ткани межзубных перегородок от 1/3 до 1/2. В третью вошли 19 человек с хроническим простым и сложным периодонтитом (генерализованным тяжелой степени тяжести).

Объективно в данной группе при зондировании были обнаружены карманы более 6 мм глубиной. Отмечалась подвижность зубов 2-3 степени, смещение зубов. На рентгенограмме - резорбция костной ткани более 1/2 длины корня. Всем пациентам проводили исследование состава периодонтальных патогенов в экссудате периодонтального кармана молекулярно-генетическим методом (ПЦР).

После письменного информированного согласия пациентов для проведения микробиологической диагностики производился забор биологического материала из всех периодонтальных карманов в наиболее глубоком участке с

помощью стерильного бумажного штифта стандартного размера (№30). Материал помещали в пробирки с транспортной средой и не позднее 2 часов доставляли в лабораторию для проведения ПЦР исследования. Генодиагностику ДНК *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* проводили на базе лаборатории группы ПЦР диагностики ЦНИЛ БелМАПО, используя диагностические наборы ООО НПФ «ГЕНТЕХ». Чувствительность набора составляет более 10<sup>4</sup> копий/мл для каждого возбудителя, что обеспечивает возможность выявления бактерий в количествах, характерных для участков с риском развития или прогрессирования периодонтита и снижение расхода реагентов для амплификации.

Весь технологический процесс исследования состоял из трех основных процедур: пробоподготовки клинических образцов; проведения самой полимеразной реакции, направленной на умножение (амплификацию) фрагментов ДНК возбудителя заболеваний, и детекции продукта ПЦР, т.е. оценки результата.

Из клинических образцов ДНК выделяли сорбционным методом: адсорбции на частицах двуоксида кремния в присутствии гуанидинатицианата натрия, отмывая этиловым спиртом.

Для проведения амплификации в пробирки типа Eppendorf объемом 0,5 мл внесли 5 мкл анализируемого образца. В каждую из пробирок добавляли 20 мкл амплификационной смеси, состоящей из 15 мкл деионизованной воды, 4 мкл реакционной смеси (мультимикс) и 1 мкл Taq-полимеразы (стандартный набор для амплификации ООО НПФ «ГЕНТЕХ»). Добавляли 25 мкл минерального масла.

Амплификацию ДНК проводили в многоканальном амплификаторе «Терцик МС2» по следующей программе: 1. Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали) - +95°C...2 мин. 2. Отжиг (присоединение праймеров) +95°C...40 сек.+60°C...40 сек. - 33 цикла+72°C...45 сек. 3. Элонгация (доставивание цепей ДНК) +72°C...2 мин.

С помощью источника тока с фиксированным напряжением 150 В «Эльф-2» (ДНК-технология), полученные ампликоны разгоняли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий в течение 30 минут при напряжении 10 В/см.

Для оценки результатов использовали трансиллюминатор Н-2 («Петротерм», Россия) с длиной волны 310 нм с применением видеосистемы для регистрации гелей «Gel-Imager» («Петротерм», Россия) с помощью программы «Gel Explorer» версия 1,0 на базе компьютера Intel Pentium - 4.

Анализ результатов проводился по внутренним контролям и контрольным образцам, а также по количеству синтезированных нуклеотидных пар, молекулярной массе и интенсивности свечения фрагмента молекулы ДНК. Результаты и обсуждение.

При изучении состава периодонтопатогенной микрофлоры у больных с хроническим простым и сложным периодонтитом с помощью набора реактивов "Мультидент - 5 было показано, что частота встречаемости разных видов периодонтопатогенных бактерий была достаточно высока.

У 42 обследованных пациентов с хроническим периодонтитом, то есть в 66,7% случаев, выявили *P.gingivalis*. *B.forsythus* идентифицировали у 39 человек (61,9%). У 38 пациентов (60,3 %) была обнаружена ДНК *T.denticola*, у 34 человек *P.intermedia* ( 53,9%). *A.actinomycetemcomitans* выявили у 29 человек (46,0%). Частота выявления всех исследованных нами видов периодонтопатогенных бактерий у пациентов с хроническим периодонтитом и людей контрольной группы статистически достоверно отличались друг от друга,  $p < 0,05$ . У 6,25% человек со здоровым периодонтом выявили ДНК *A.actinomycetemcomitans*, *P.intermedia*, *B.forsythus*. Ни у одного человека не был выявлен периодонтопатоген *T.denticola*. В 25% случаев обнаружена *P.gingivalis* (Табл. 1).  
Таблица 1 - Сравнительный анализ периодонтального кармана у пациентов с болезнями периодонта (в процентах)

Периодонтопатогены	Диагноз	Хронический периодонтит легкой степени тяжести	Хронический периодонтит средней степени тяжести	Хронический периодонтит тяжелой степени тяжести	Все пациенты с хроническим периодонтитом	Группа контроля
<i>B.forsythus</i>		60,0±9,79*	68,4±10,66*	57,9±11,32*	61,9±6,11*	6,25±6,05
<i>P.gingivalis</i>		52,0±9,99	84,2±8,38*	68,4±10,66*	66,7±5,93*	25±10,82
<i>T.denticola</i>		56,0±9,92*	68,4±10,66*	57,9±11,32*	60,3±6,16*	0
<i>P.intermedia</i>		64,0±9,60*	47,3±11,45*	47,4±11,45*	53,9±6,27*	6,25±6,05
<i>A.actinomycetemcomitans</i>		36,0±9,60*	57,9±11,32*	47,4±11,45*	46,0±6,27*	6,25±6,05

\*- частота выделения периодонтопатогена у пациентов с хроническим периодонтитом по сравнению с группой контроля статистически достоверно отличается,  $p < 0,05$

Частота встречаемости одного вида периодонтопатогена у пациентов с болезнями периодонта составила 9,5% (6 человек). 20,6% (13 человек) обследуемых являются носителями двух видов инфекционных возбудителей. Три вида периодонтопатогенных бактерий встречались в 46,0% случаев (29). У 12 человек (19,0%) идентифицировали 4 вида анаэробов. Выявление ассоциации всех 5 видов периодонтальных микробов было в 3 случаях, что составляет 4,8%. Наиболее часто встречались ассоциации *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *T.denticola*, а также *P.intermedia*, *B.forsythus*, *P.gingivalis* у 5 человек соответственно (7,9%). Красный комплекс *P.gingivalis*, *B.forsythus*, *T.denticola* [7] отличается специфичностью действия на ткани периодонта и особыми клиническими проявлениями (выраженная воспалительная реакция и кровоточивость при зондировании). Представители данной ассоциации *P.gingivalis*, *B.forsythus* проявляют сильную протеиназную активность. В нашем исследовании все представители данной ассоциации «красный комплекс» были обнаружены у 4 пациентов (6,3%). Одновременно 5 периодонтопатогенов было выявлено у 3 человек (4,8%), с такой же частотой были идентифицированы ассоциации *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia* и *T.denticola*; *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *B.forsythus* и *T.denticola*; *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *B.forsythus* и *T.denticola*; *P.gingivalis*, *P.intermedia* и *T.denticola*; *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *B.forsythus*; *P.intermedia*, *B.forsythus* и *T.denticola*; *P.gingivalis* и *B.forsythus*; *P.intermedia* и *T.denticola*; *A.actinomycetemcomitans* и *P.gingivalis*.

Ассоциации *A.actinomycetemcomitans*, *T.denticola*, *B.forsythus*;  
*A.actinomycetemcomitans*, *T.denticola*, *P.intermedia*; *A.actinomycetemcomitans*,  
*T.denticola*, *P.intermedia*, *B.forsythus* были выявлены у 2 человек (3,1%).

Один вид периодонтопатогена выявили у 6 человек. Из них у 3 пациентов выявили *B. forsythus*, у 2- *P. Intermedia*. ДНК *P. gingivalis* была выделена у 1 пациента. Другие варианты ассоциаций встречались с частотой 1,5% (у 1 человека).

В отличие от исследований Е.Н.Николаевой, В.Н.Царева 2004г., мы не выявили доминирующих ассоциаций у пациентов с болезнями пародонта.

Частота встречаемости периодонтопатогенов у пациентов с различной степенью тяжести пародонтита.

Анализируя взаимосвязь клинических параметров и наличия пародонтальных микробов, мы обнаружили зависимость между ростом частоты выявления пародонтопатогенов и выраженностью клинических проявлений. Особенно наглядно взаимосвязь прослеживается между пациентами легкой и средней степени тяжести (Табл.1). Это подтверждает данные Е.Н.Николаевой с соавторами о взаимосвязи между ростом частоты выявления грамотрицательных анаэробных бактерий в области зубодесневой борозды и глубиной пародонтального кармана.[3]

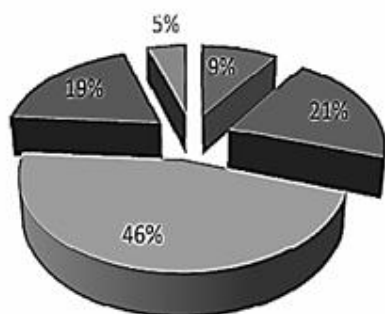
В 1 группе наиболее часто у 16 человек (в 64,0%) идентифицировали *P.intermedia*, у 15 человек (60,0%) *B.forsythus*, у 14 (56,0%) - *T.denticola*, у 13 (52,0%) - *P.gingivalis*, у 9(36%) - *A.actinomycetemcomitans*.

Во второй группе чаще всего была выявлена ДНК *P.gingivalis* у 16 человек (84,2%), *T.denticola* и *B.forsythus* встречались с одинаковой частотой у 13 пациентов (68,4%), *A.actinomycetemcomitans* у 11 человек (57,9%) и у 9 (47,4%) *P.intermedia*.

У пациентов третьей группы наиболее часто выявляли *P.gingivalis* -у 13 человек (68,4%), *T.denticola* и *B.forsythus* идентифицировали у 11 пациентов (57,9%), *P.intermedia* и *A.actinomycetemcomitans* встречались в 9 случаях (47,4%).

### Частота выявления ассоциаций пародонтопатогенов

■ 1вид ■ 2вида ■ 3вида ■ 4вида ■ 5видов





Полученные в результате исследования данные подтверждают, что метод на основе ПЦР является высокоинформативным и чувствительным, его использование может быть рекомендовано для диагностики болезней пародонта.

**Выводы.**

1. У всех пациентов с установленным диагнозом хронический периодонтит ПЦР исследование позволило выделить в содержимом пародонтального кармана ДНК всех пародонтопатогенных видов в значительном проценте случаев: у 42 человек (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. Прослеживается корреляция между ростом частоты выявления пародонтопатогенов в поддесневой области и выраженностью клинических проявлений.

3. Полученные результаты подтверждают данные ряда авторов [3,4,6,7,9] о роли пародонтопатогенных видов в этиологии и патогенезе болезней пародонта.

**Литература**

1. Безрукова, И. В., Грудянов, А. И. Агрессивные формы пародонтита. М., 2002. 80 с.
2. Грудянов, А. И., Овчинникова, В. В., Дмитриева, И. А. Антимикробная и противовоспалительная терапия в пародонтологии. М., 2004. 75 с.
3. Николаева, Е. Н., Царев, В. Н., Щербо, С. Н. Применение новой тест-системы, основанной на полимеразной цепной реакции, в пародонтологии // Институт стоматологии. 2004. № 4. С. 63-66.
4. Царёв, В. Н., Николаева, Е. Н., Плахтий, Л. А. Перспективы применения молекулярно-генетических методов исследования в диагностике пародонтита // Российский стоматологический журнал. 2002. № 5. С. 6-9.

5. Bauermeister, C.-D. Микробиологическая диагностика заболеваний тканей периодонта // Новое в стоматологии. 2003. № 7. С. 27-30.
6. Slots, J. Subgingival microflora and periodontal disease // J. Clin. Periodontol. 1979. 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. 1998. Vol. 25. P. 134-144.
8. Straka, M. Периодонтит и атеросклероз-существует ли между ними связь? // Новое в стоматологии. 2001. № 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. 1998. Vol. 25. P. 85-98