

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Николаева Дарья Андреевна

РОЛЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*
И *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS*
В РАЗВИТИИ МУКО-ПАРОДОНТАЛЬНЫХ ПОРАЖЕНИЙ

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии

И.А. Гимранова

Уфа – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Современные аспекты клинического течения муко-пародонтальных поражений	10
1.2. Значение бактерий зубной бляшки для развития болезней пародонта	17
1.3. Возбудители болезней пародонта	20
1.4. Вирулентность возбудителей болезней пародонта	27
1.5. Липополисахариды возбудителей болезней пародонта	33
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Клиническая характеристика пациентов	40
2.2. ПЦР-исследование в режиме реального времени (РТ-ПЦР) содержимого пародонтальных карманов пациентов	45
2.3. Выделение бактериологическим методом чистых культур <i>Porphyromonas gingivalis</i> и <i>Porphyromonas endodontalis</i>	48
2.4. Количественное определение липополисахарида с использованием LAL-теста содержимого пародонтальных карманов обследуемых пациентов	52
2.5. Статистическая обработка результатов клинических, молекулярно-генетических и количественных LAL-исследований	55
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	56
3.1. Результаты клинической характеристики пациентов	56
3.2. Результаты оценки стоматологического статуса пациентов	58
3.3. Результаты молекулярно-генетического скрининга содержимого пародонтальных карманов пациентов	63
3.4. Результаты бактериологического посева содержимого пародонтальных карманов пациентов	68

3.5. Результаты количественного LAL-исследования содержимого пародонтальных карманов пациентов	75
3.6. Определение роли липополисахарида по результатам статистической обработки клинических, молекулярно-генетических и количественных показателей ЛПС LAL-исследования	76
ВЫВОДЫ	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	83

Список сокращений и условных обозначений

ВЗП – воспалительные заболевания пародонта

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГРМ-агар – питательный агар на основе гидролизата рыбной муки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕЭ – единицы эндотоксина

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛАП – локализованный агрессивный пародонтит

ЛПС – липополисахарид

МЕ – международная единица

ОП – оптическая плотность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ВНИ-Broth/Agar – Brain Heart Infusion Broth/Agar, сердечно-мозговой бульон/агар

CAL – Clinical attachment level/loss, индекс клинической потери привязанности

CD – Cluster of Differentiation, кластер дифференцировки

EFW – Endotoxin-Free Water, свободная от эндотоксинов вода

HAG – Hemagglutinin, гемагглютинин

HYG – Interdental Hygiene Index, интердентальный гигиенический индекс

ICD – The International Classification of Diseases and Related Health Problems, Международная классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем

IL – Interleukin, интерлейкин

ISO – International Organization for Standardization, Международная организация по стандартизации

LAL – Limulus Amebocyte Lysate, лизат амебоцитов Limulus

OHI-S – Oral Hygiene Index-Simplified, упрощенный индекс гигиены Грина-Вермиллиона

PAMPs – Pathogen-associated molecular patterns, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PI – Periodontal Index, пародонтальный индекс Рассела

pNA – paranitroaniline, p-нитроанилин

SBI – Sulcus Bleeding Index, индекс кровоточивости десневой борозды Мюллемана

SIgA – Secretory Immunoglobulin A, секреторный иммуноглобулин А

TLR – Toll-like receptor, Толл-подобный рецептор

TNF – Tumor Necrosis Factor, фактор некроза опухоли

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. На сегодняшний день заболевания пародонта являются актуальной общемедицинской и социальной проблемой. Самыми распространенными воспалительными заболеваниями пародонта (ВЗП) являются гингивит и пародонтит, и если гингивит характеризуется обратимым процессом, то пародонтит чаще всего представлен хронической формой и отличается прогрессирующей деструкцией пародонтальной связки и костной ткани, приводящей к утрате зубов [7,28].

Согласно международным исследованиям эпидемиологии заболеваний пародонта, тяжелой формой хронического пародонтита страдает 5 – 15% взрослых, умеренный пародонтит находится в пределах 30 – 50% взрослого населения, распространенность гингивита считается очень высокой и затрагивает большинство людей – более 75% [42]. Распространенность ВЗП в России среди детей 12 лет составляет 34%, 15 лет – 41%, взрослых 35-44 лет – 81%, старше 65 лет – возрастает до 91%. Причем наиболее часто встречающаяся патология пародонта в молодом возрасте — гингивит, а после 30 лет — пародонтит [10,15]. Широкая распространенность ВЗП, необратимость процессов пародонтита ставят задачу исследования механизма возникновения и развития данных заболеваний на первый план.

Гипотеза о бактериальной этиологии деструктивных болезней пародонта служит основой для понимания их патогенеза, разработки методов лечения и профилактики пародонтальных заболеваний. Современные терапия и профилактика базируются главным образом на неспецифической бляшечной гипотезе, поэтому для предотвращения заболеваний пародонта или предупреждения их прогрессирования все лечение сводится к борьбе с зубными бляшками. Зубная бляшка - бактериальная биопленка, формирующаяся в придесневых областях и межзубных промежутках и образующая сообщество микроорганизмов.

Первые колонии, населяющие сообщество, состоят в основном из *Streptococcus* spp. и *Actinomyces* spp.. Дальнейшая колонизация бляшки сопровождается ухудшением состояния окружающего пародонта, грамположительные бактерии и актиномицеты сменяют грамотрицательные кокки и палочки, грамположительные палочки и нитевидные формы. На более поздних стадиях в колониях зубной бляшки возрастает число грамотрицательных анаэробов и спирохет. В бляшке, вызвавшей развитие пародонтита, преобладают нитевидные грамположительные, подвижные грамотрицательные бактерии и спирохеты. Существенно отличается состав бляшки острого локализованного пародонтита, в которых преобладают мелкие грамотрицательные кокки [7,28].

Специфическая гипотеза направляет исследования в область выявления специфических бактерий-возбудителей заболеваний и подавления патогенных штаммов у лиц, составляющих группы риска. По данным клинических исследований, основным возбудителем острого локализованного пародонтита считается *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, развитие хронического пародонтита связывают с сообществом микроорганизмов «красного комплекса» - комплекса микроорганизмов с наивысшим патогенным потенциалом: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Предполагаемым первичным возбудителем пародонтита считается *Porphyromonas gingivalis*, а также родственный ему вид *Porphyromonas endodontalis*, чье патогенное действие в значительной степени определяется молекулами липополисахаридов, окружающих клеточную мембрану микробов. К наиболее важным биологическим свойствам липополисахаридов (или эндотоксинов), вырабатываемых грамотрицательными бактериями, относят их способность вызывать лихорадку, апоптоз клеток организма-хозяина, выраженное иммунное воспаление, в конечном итоге приводящее к повреждению тканей. Биологическая активность липополисахарида зависит

от его видовой принадлежности. Липополисахарид *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*, кроме прочих патогенных действий, запускает процесс резорбции кости, играющий ключевую роль в патогенезе пародонтита [6,7,28].

Современная экологическая гипотеза акцентирует внимание исследователей на экологических аспектах развития биопленки зубной бляшки и ее взаимодействии с макроорганизмом. Следуя экологической гипотезе, комменсальная микрофлора десневой борозды становится патогенной при увеличении количества потенциально патогенных микроорганизмов или их групп, а также при наличии специфических факторов предрасположенности организма – хозяина [28]. Разработка данной гипотезы со временем может привести к выработке новой стратегии лечения и профилактики пародонтита. Современные подходы к лечению данной патологии направлены как на изменение состава бляшки, так и модуляцию ответа макроорганизма на бактерии-возбудители.

В связи с этим, **целью настоящего исследования** явилось изучение роли липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* в развитии муко-пародонтальных поражений.

Объектом настоящего исследования явилось рассмотрение роли липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* в развитии деструктивных заболеваний пародонта, предметом – липополисахариды *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*.

Достижение поставленной цели предполагалось посредством решения следующих **задач**:

1. Клиническая характеристика пациентов с диагнозом хронический генерализованный пародонтит легкой и средней степени тяжести.

2. Выявление ДНК *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* в биологическом материале пациентов методом ПЦР в режиме реального времени.

3. Выделение бактериологическим методом чистых культур *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* из образцов с положительными результатами молекулярно-генетического скрининга.

4. Определение наличия липополисахарида в исследуемых образцах.

5. Статистическая обработка результатов. Оценка степени взаимосвязанности концентрации липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* и выраженности клинических проявлений.

Научная новизна и теоретическая ценность работы заключается в изучении степени участия и степени влияния такой патоген-ассоциированной иммуностимулирующей молекулы, как липополисахарид, находящейся на поверхности грамотрицательных бактерий *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*, в развитии деструктивных заболеваний пародонта и выраженности клинических проявлений у пациентов.

Научно-практическая значимость.

Результаты исследования, представленные в данной работе, могут служить источником информации о роли и участии липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* в развитии муко-пародонтальных поражений, а также могут быть использованы в дальнейшем в медицине с целью поиска возможных путей предотвращения развития деструктивных заболеваний пародонта и их лечения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные аспекты клинического течения муко-пародонтальных поражений

Под болезнями пародонта понимают широкий спектр патологических изменений тканей пародонта, представляющих собой всю совокупность опорного аппарата зубов и включающих десну, кость и периодонтальную связку, образованную коллагеновыми волокнами соединительной ткани и прикрепляющую зуб к альвеолярной кости. Большое разнообразие существующих на сегодняшний день классификаций заболеваний пародонта обусловлено многочисленностью видов патологии, а также отсутствием единого принципа их систематизации. В качестве системообразующих признаков выступают клинические проявления заболеваний (клинические формы), патоморфологические признаки, причины и условия возникновения заболеваний, их механизм зарождения и развития, а также характер, стадия (тяжесть течения) и распространенность патологических процессов. Множественность вариантов классификации заболеваний пародонта объясняется также тем, что на настоящий момент отсутствуют точные знания об уровне локализации патологических процессов, протекающих при поражении тканей пародонта, а также о причинно-следственных отношениях соматических системных заболеваний и патологии пародонта. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) пародонтологам рекомендовано к использованию третье издание Международной классификации стоматологических болезней, основанной на МКБ-11 (The International Classification of Diseases and Related Health Problems 11 (ICD-11) [10,53].

Заболевания пародонта чаще всего протекают в форме гингивита и пародонтита, являющихся на сегодняшний день одними из наиболее распространенных инфекций человека. В качестве этиологических агентов, способствующих прогрессированию данных заболеваний, называют

бактерий, покрывающих поверхности зубов и входящих в состав зубной биопленки [2,7,28].

Индукцированный бактериальной зубной бляшкой гингивит выступает наиболее частым заболеванием мягких тканей десны и при поддержании грамотного ухода за полостью рта проявляется обратимым воспалением краевой ткани пародонта, примыкающей к бляшке. В отсутствие адекватного лечения гингивит способен прогрессировать в пародонтит, вызывая разрушение тканей периодонта, образование клинических карманов и резорбцию кости, - именно поэтому в зарубежной литературе гингивит часто называют ранней стадией развития пародонтита [2,40,44,45].

Тяжесть и продолжительность гингивита зависят от факторов, влияющих на взаимоотношения бактерий, населяющих зубную бляшку, и макроорганизма. В большинстве случаев заболевание возникает в результате нарушения гигиены полости рта, что приводит к чрезмерному скоплению бактериального налета и камня на поверхности зубов, в небольших межзубных промежутках, десневых желобках и нависающих краях реставраций, инициируя тем самым местную воспалительную реакцию организма-хозяина [1,3,35]. Однако, такие факторы как плохое питание (приводящее к истощению), вредные привычки (курение), кариес зубов, аномалии зубочелюстной системы (скученность зубов с перекрытием), травмирование десен, продолжительный стресс, гормональные изменения (в период полового созревания, во время беременности), системные заболевания (сахарный диабет, сердечно-сосудистая патология, заболевания желудочно-кишечного тракта, системы крови и др.), иммунная дисфункция, аллергические заболевания, а также прием некоторых лекарственных средств, также способны повлиять на восприимчивость десен к флоре полости рта [29,43,48]. В ряде исследований в качестве этиологических агентов гингивита, способствующих возникновению и прогрессированию воспалительного процесса, признавались цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр и простой герпес

первого типа. Грибковые инфекции, такие как, например кандидоз полости рта, также способны вызвать воспаление десен [33,47,49].

Частота встречаемости гингивита высока во всех возрастных группах, однако истинную распространенность оценить крайне трудно ввиду отсутствия стандартизированного метода диагностики. Клинически обнаруживаются воспалительные изменения тканей десны начинают еще в детстве, прогрессируя с возрастом. Известно, что в период полового созревания происходит повышение восприимчивости к гингивиту (половозрелый гингивит), пик которого приходится на 9 – 14 лет. В возрасте 11 – 17 лет заболевание встречается реже, однако затем медленно прогрессирует до тех пор, пока распространенность не приблизится к 100% на шестом десятилетии жизни [2,39].

Клинические особенности гингивита и тяжесть поражения мягких тканей десны зависят от степени воспаления подлежащей соединительной ткани, обусловленного гистологическими изменениями в деснах в результате высвобождения провоспалительных медиаторов мигрирующими в десневую щель нейтрофилами и в подлежащие соединительные ткани макрофагами. В связи с воспалением наблюдаются изменения эпителия десневой борозды, прежде всего, аномальное разрастание тканей десны в результате их гиперплазии и гипертрофии, что способствует углублению десневой борозды (ложные зубодесневые карманы) и созданию благоприятных условий для скопления зубного камня и развития бактериальной биопленки. Отечность десен обуславливается увеличением количества внеклеточного матрикса, представленного преимущественно коллагеном, в результате нарушения его нормальной внутриклеточной деградации и реконструкции [1,2,25].

Изменение цвета десневых сосочков и маргинальной десны определяется изменением кровоснабжения и наполнения десневых капилляров. При хронизации процесса наблюдается появление огнено-красных, отечных и болезненных изъязвлений эпителия борозды

(гингивостоматит). Набухшие кровью капилляры становятся ближе к поверхности, что приводит к кровотечению даже при незначительной провокации [49,51].

Важно отметить, что при гингивите отсутствует разрушение структур, удерживающих зуб в лунке, хотя само заболевание и может сопутствовать деструкции.

Пародонтит в свою очередь представляет собой инфекционно-воспалительный процесс, характеризующийся прогрессивной необратимой деструкцией пародонтальной связки и резорбцией костной ткани альвеолярного отростка челюстей, приводящей в конечном итоге к потере зубов. По течению патологического процесса различают две основные формы пародонтита, не связанные с другими заболеваниями, - хронический и агрессивный (острый) пародонтит, которым в настоящее время посвящено большинство исследований по изучению этиологии и патогенеза данного заболевания. Третья форма пародонтита возникает на фоне системных заболеваний, чаще всего генетических или гематологических, таких, как например, лейкоз или нейтропения, значительно снижающих устойчивость организма к бактериям. Так, например, у лиц с сопутствующими воспалению мягких тканей десны и разрушению зубочелюстной системы в результате протекающего в тканях пародонта патологического процесса заболеваниями микроорганизмы, такие как *Treponema* spp., способны проникать в ткани пародонта, вызывая их некротическое поражение. Причем, данное тяжелое состояние часто развивается при выраженных стрессах. Проникновение бактерий в ткани пародонта может привести к развитию апикального абсцесса, активно развивающегося на фоне иммунодефицита [2,3,5,10,16,28].

По тяжести протекающего патологического процесса различают легкую, среднюю и тяжелую степени хронического заболевания, характеризующихся различной стадией прогрессирования деструктивного

процесса и разной глубиной поражения тканей пародонта с формированием истинных патологических карманов [53].

В зависимости от распространения патологического процесса по зубочелюстной системе выделяют локализованный и генерализованный пародонтит. Локализованный (очаговый) пародонтит, возникающий лишь на небольшом участке в области одного или нескольких зубов, характеризуется агрессивной формой течения заболевания, в то время как генерализованный охватывает весь зубной ряд (или большинство зубов в ряду), не ограничивается лишь одной челюстью и в большей степени характерен для хронического течения заболевания, однако встречается и при острой форме тоже [53].

Самой частой формой пародонтита является хронический пародонтит, которым чаще болеют взрослые, однако, который может возникать и у детей. Характерным диагностическим признаком данной формы является соответствие тяжести заболевания и выраженности местных факторов, связанных с образованием бактериальных бляшек или зубного камня на поверхности зуба или корня.

При хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести наблюдаются жалобы пациентов на появление кровоточивости десен при чистке зубов и приеме жесткой пищи, редкий запах изо рта, неприятные ощущения в деснах, их зуд и жжение, при этом пальпация десны болезненная. При стоматологическом осмотре наблюдается отечность слизистой десневого края и застойная венозная гиперемия. Имеются наддесневые и поддесневые зубные отложения, а шейки зубов оголяются до верхней трети корней зубов.

Средняя степень тяжести хронического генерализованного пародонтита характеризуется практически постоянной кровоточивостью десен при откусывании пищи и зондировании десны, однако ее безболезненной пальпацией. Слизистая оболочка десневого края и межзубных десневых сосочков измененной конфигурации приобретает

синевато-фиолетовый оттенок, истончаясь в отдельных участках зубодесневой системы. Поддесневые зубные отложения обнаруживаются практически всегда. Оголение корней зубов отмечается в пределах 1/2. Появляется патологическая подвижность отдельных зубов первой, реже второй степени и изменение их положения в зубной дуге.

При тяжелой степени заболевания пациенты указывают на самостоятельную боль десен, не связанную с приемом пищи, но отсутствующую при пальпации. Отмечаются еще большие цианотичность слизистой оболочки маргинальной десны, десневых сосочков и изменение их конфигурации, а также деформация целой десны. В глубоких (>5,5 мм) пародонтальных карманах обнаруживаются обильные поддесневые зубные отложения. Оголение корней зубов достигает более половины длины, а патологическая подвижность отдельных зубов – третьей степени. При этом наблюдается изменение нормального положения зубов, появление щелей между ними, а также их выпадение.

Для хронического пародонтита также характерно умеренно прогрессирующее течение с короткими периодами ускорения. При ремиссии заболевания наблюдается отсутствие жалоб на неприятные или болезненные ощущения в деснах, слизистая оболочка тканей пародонта имеет бледно-розовый цвет, край десны плотно охватывает поверхность зубных коронок. Обострение патологического процесса сопровождается венозной гиперемией слизистой оболочки с очагами артериальной гиперемии и отечности. При пальпации десен обнаруживается болезненность, кровоточивость, а также выделение серозно-гнойного экссудата из клинических карманов.

На скорость прогрессирования и тяжесть патологического процесса в тканях пародонта влияют системные факторы – курение, хроническая общесоматическая патология (чаще всего заболевания ЖКТ, сердечно-сосудистой, эндокринной и нервной систем), аллергические заболевания,

острые инфекционные и вирусные заболевания, первичные и вторичные иммунодефициты, а также онкологические заболевания [2,9,17,19,26].

Агрессивный пародонтит отличается от хронического процесса главным образом несоответствием тяжести заболевания местным факторам, связанным с образованием зубных бляшек или зубного камня, быстрой деструкцией тканей и семейным характером, что позволяет предположить существование генетической предрасположенности к данной форме заболевания. Клинически агрессивный пародонтит выражается острой самопроизвольной болью и кровоточивостью десен, яркой их гиперемией и отечностью тканей. У больных обычно отмечается нарушение функции нейтрофилов или повышение активности макрофагов, в избытке вырабатывающих воспалительные медиаторы – такие как простагландины или интерлейкин- 1β , участвующие в деструкции тканей пародонта.

При этом различают две формы агрессивного пародонтита – локализованную (ранее известную как локализованный ювенильный пародонтит) и генерализованную. Локализованный агрессивный пародонтит (ЛАП) начинает развиваться в период полового созревания, обычно затрагивая резцы и первые моляры. Для данной формы заболевания характерен выраженный гуморальный иммунный ответ на микробных возбудителей. Генерализованный агрессивный пародонтит чаще поражает лиц старше 30 лет, затрагивает, наряду с указанными, еще не менее трех зубов и обычно не сопровождается значительным подъемом титра сывороточных антител к возбудителям [1,25,28].

Несмотря на всю тяжесть и необратимость протекающих в тканях пародонта патологических процессах, распространенность и актуальность заболевания, ученым до сих пор мало известно об этиологии пародонтита. Современные теории связывают деструктивные заболевания пародонта с увеличением числа условно-патогенных бактерий грамотрицательных и анаэробных видов поддесневой микрофлоры. Поиск специфических причин

развития дегенеративных болезней пародонта и их механизмов – открытый вопрос сегодняшнего дня.

1.2. Значение бактерий зубной бляшки для развития болезней пародонта

Достижения в области изучения микрофлоры зубных бляшек и их взаимодействия с тканями организма-хозяина позволили частично пересмотреть концепции развития болезней пародонта.

Господствующее в середине XX века мнение считало зубные бляшки основной причиной развития пародонтита. Данная гипотеза подтверждалась эпидемиологическими исследованиями, обнаруживающими связь пародонтита с возрастом человека и количеством образующихся бляшек, а также результатами изучения естественного течения заболевания, свидетельствовавшими о его медленном прогрессировании. Согласно так называемой неспецифической бляшечной гипотезе все бактерии, населяющие зубную бляшку, в равной степени способны вызывать заболевания пародонта, развивающиеся после того, как размеры бляшки достигнут порогового уровня, а защитные механизмы макроорганизма будут уже не в состоянии противостоять бактериям бляшки и нейтрализовывать их токсические продукты [12,28].

Однако ряд исследований показал совершенно противоречивые концепции об одинаковом патогенном потенциале бактерий зубной бляшки результаты. Обнаружено, что у многих лиц с активным образованием зубных бляшек, зубных камней и развитием гингивита никогда не развивались деструктивные болезни пародонта, а у лиц с пародонтитом пораженные участки могли соседствовать с практически неповрежденными.

В конце XX века был достигнут значительный прогресс в области культивирования и изучения населяющих зубную бляшку микроорганизмов, изменилась их таксономия и были охарактеризованы новые разновидности бляшечных бактерий. Стало известно, что зубной

камень сам по себе не провоцирует развитие кариеса или пародонтита – его пористая поверхность лишь способствует крепкой адгезии биопленки, обеспечивая благоприятные условия для ее развития, а также накопление продуктов жизнедеятельности населяющих ее бактерий. Кроме того, зубной камень делает поверхности зубов недоступными, препятствуя проведению оптимальной индивидуальной гигиены полости рта [27]. Выявленные различия в строении зубных бляшек в нормальном состоянии и при патологии послужили основой для поиска специфических причин пародонтита, в результате чего в 1970 году была сформулирована «специфическая бляшечная гипотеза», предполагающая зависимость патогенности бляшки от присутствия или значительного преобладания в ней специфических микробов, а деструктивный пародонтит следствием инициированного ими процесса. Широкому принятию специфической гипотезы способствовало также то, что вид бактерий *A.actinomycetemcomitans* был назван в качестве основного возбудителя локализованного агрессивного пародонтита [28].

В результате проведенных в последующем исследований *in vitro* по изучению смешанных бактериальных популяций, имитирующих по составу микрофлору зубной бляшки, и имеющих целью исследование изменений ее микробного состава, в качестве альтернативной «специфической» гипотезе была выдвинута экологическая гипотеза, предусматривающая влияние внешних факторов на экологию биопленки зубной бляшки. Согласно данной гипотезе, внешние факторы запускают изменение состава резидентной микрофлоры бляшки, что приводит к преобладанию в ней патогенных микробов, а также проявлению патогенных свойств комменсальными микроорганизмами. Так, нарушение тока и изменение рН десневой жидкости могут приводить к локальному господству патогенных видов. Вместе с тем экологическая гипотеза учитывает варианты вирулентности, позволяющие бактериям влиять на факторы макроорганизма, которые изменяют условия жизни бактерий. Например,

упомянутый выше штамм *A.actinomycetemcomitans*, продуцирующий большое количество токсинов (например, лейкотоксина) за счет деструкции клеток организма-хозяина может приводить к выбросу ими медиаторов, способных изменять состав зубной бляшки. Подобным образом внешние условия могут изменяться под влиянием различных реакций организма-хозяина на бактерии бляшки. Например, у лиц с повышенной реактивностью тканей клетки могут выбрасывать большее количество провоспалительных медиаторов, участвующих в деструкции тканей пародонта. В качестве другого примера можно привести индивидуальные различия гуморального иммунного ответа на специфические виды бактерий, значительно влияющего на прогрессирование пародонтита. Возникающий между резидентной микрофлорой зубного налета и иммунной системой организма дисбиоз обуславливает возникновение и развитие стоматологических заболеваний, поражающих как твердые ткани зубов, так и окружающие их мягкие ткани [6,8,28].

Тем не менее, специфическую и экологическую гипотезы сближает признание ими различий между патогенным потенциалом разных микроорганизмов, населяющих зубную бляшку. Однако экологическая гипотеза все же фокусируется на экологических сдвигах, приводящих к преобладанию или появлению патогенных видов, при этом придавая значение смешанной микрофлоре, отдельные представители которой вряд ли сами по себе способны вызывать сложный процесс, ведущий к воспалению и деструкции тканей при болезнях пародонта.

На сегодняшний день экологическая гипотеза, основывающаяся на экологических аспектах развития микробной биопленки зубной бляшки и взаимодействии ее с макроорганизмом, является общепринятой. Современные подходы к лечению заболеваний пародонта направлены как на изменение состава бляшки, так и модуляцию ответа макроорганизма на бактерии-возбудители [10,28].

1.3. Возбудители болезней пародонта

Оральная микробиота, являющаяся вторым после кишечной по многочисленности и разнообразию составляющих ее видов колонизирующим организм человека микробным сообществом, формируется в результате мутуалистической коэволюции с организмом-хозяином и особыми физиологическими условиями полости рта. В эволюционной компенсации организм-хозяин предоставляет комменсальным бактериям стабильную экологическую нишу, в то время как микробиота полости рта локально поддерживает здоровое состояние хозяина путем формирования симбиотических биопленок, внутри которых различные виды бактерий связаны между собой физическими и метаболическими взаимоотношениями, дающими устойчивость к внешним изменениям среды и преимущество выживаемости для всего микробного сообщества. Микробные ассоциации полости рта уравнивают уровни кислотности ротовой полости и подавляют рост патогенных микроорганизмов, тем самым систематически обеспечивая поддержание гомеостаза. Однако при переходе микробной биопленки в дисбиотическое состояние, нарушающее гомеостатическое равновесие с организмом хозяина, микробиота полости рта может способствовать развитию патологических процессов воспалительных и деструктивных заболеваний пародонта [12,28,32].

Микробиота полости рта формируется набором различных по видовому составу микробных сообществ, отражающих множество разнообразных микроокружений, состав которых, однако, организм человека строго контролирует, оказывая на оральную микробиоту селективное давление, реализуемое за счет специализированных метаболических механизмов в полости рта, и регуляции адгезии к определенным субстратам. Состав микробиоты полости рта контролируется также слюнным секреторным иммуноглобулином А (SIgA), способствующим агрегации и последующему уничтожению потенциально

патогенных бактерий; SIgA, выстроенным в пелликулы зубов и покрывающие эпителий полости рта муциновые слои и обеспечивающим места прикрепления для полезных микроорганизмов; а также антимикробными пептидами, такими как лизоцим и лактоферрин. Так, у пациентов, страдающих ксеростомией (сухость полости рта), наиболее часто наблюдается повышение содержания грибков, кислотопродуцирующих и кислотоустойчивых кариогенных бактерий, не только смещающих нормальный уровень pH ротовой полости, но способствующих развитию кариеса [24,32,46].

В конце XX века проводились интенсивные поиски пародонтальных патогенов путем сравнения состава зубных бляшек в норме и на различных стадиях развития патологического процесса. Проведенные исследования подтвердили присутствие в зубных бляшках более 500 различных видов бактерий, а также связь деструктивных заболеваний пародонта с относительно небольшой группой бактерий. Так, у здоровых лиц и больных гингивитом и пародонтитом четко различаются количественные пропорции специфических микробов: к возбудителям болезней пародонта среди бактерий относят преимущественно грамотрицательные анаэробные виды, рост числа которых отмечается при развивающейся патологии пародонта и сопровождается, соответственно, снижением численности грамположительных факультативных анаэробов. Тем не менее, грамотрицательные анаэробные палочковидные бактерии встречаются и у здоровых лиц, но реже и в гораздо меньшем количестве [7,28].

Экологическое исследование 40 видов бактерий, выделенных из более чем 13 000 образцов зубных бляшек, обнаружило пять основных бактериальных комплексов, состоящих из тесно взаимосвязанных друг с другом в биопленке бляшки видов бактерий [41]. Биологической основой определенных бактериальных комплексов могут служить важные метаболические и сигнальные взаимодействия между бактериями или их общая стимуляция под действием внешних факторов. При этом

структурный анализ наддесневых бактериальных биопленок выявил сложные слоистые структуры, свидетельствующие о разделении функций между видами бактерий [38,50].

Так называемый «зеленый» комплекс пародонтальных микроорганизмов включает в себя виды, обладающие наименьшим патогенным потенциалом и выступающие первичными колонизаторами пародонтальной среды. К нему относятся такие виды бактерий как *Eikenelia corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *C.sputigena*, *C.ochracea*, *Campilobacter concisus*. Так, нити *Corynebacterium* образуют структурный каркас для всей формирующейся биопленки и способствуют ее прикреплению к слюнной пелликуле поверхности зубов. К числу первичных колонизаторов зубной бляшки также относится «пурпурный» комплекс пародонтальных микроорганизмов, включающий в себя, по современным данным, всего два вида бактерий: *Veillonella parvula* и *Actinomyces odontolyticus* [50].

В последующем к поверхности биопленки присоединяются образующие «желтый» комплекс *Streptococcus* spp. видов *S.mitis*, *S.oralis*, *S.sanguinis*, *S.gordonii* и *S.intermedius*, потребляющие сахара и кислород и производящие лактат, ацетат и углекислоту, обеспечивая тем самым поддержание факультативно анаэробных условий в более глубоких слоях биопленки. Данное сочетание микроорганизмов вместе с видами «зеленого» комплекса образует субстрат прикрепления для более поздних колонизаторов поверхности зубов и способно модулировать патогенность основных возбудителей заболеваний пародонта через механизмы межвидовой коммуникации. Кроме того, вырабатывая перекисное соединение H_2O_2 в процессе метаболизма, *Streptococcus* spp. защищают консорциум биопленки от инфекционных агентов [38,50].

Биопленка дорсальной поверхности языка, располагающаяся на нитевидных сосочках, имеет отличную архитектуру и содержит такие нитрат-редуцирующие бактерии как *Neisseria* и *Rothia*, осуществляющие трансформацию нитратов в нитриты, которые в конечном итоге, как

предполагают, преобразуются в NO, обеспечивающий снижение артериального давления, функциональное улучшение эндотелия сосудов, обратное развитие метаболического синдрома и снижение окислительного стресса, поддерживая активность облигатно анаэробных видов бактерий [35,37,50,54].

«Оранжевый» пародонтальный комплекс формируют виды бактерий, обладающие факторами вирулентности и оказывающие наиболее выраженное повреждающее действие на ткани пародонта. Такие виды микроорганизмов как *Campylobacter showae*, *C.gracilis*, *C.rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus constellatus*, *Prevotella intermedia*, *P.nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* и *F.periodonticum* обнаруживаются в пародонтальных карманах при быстро прогрессирующих формах заболеваний пародонта [50].

С образованием глубоких кровотокающих десневых карманов связан «красный» комплекс пародонтальных микроорганизмов, состоящий из *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*, являющихся самыми поздними колонизаторами биопленки зубной бляшки и обладающих наибольшей патогенностью в отношении тканей пародонта. Высокая степень патогенности данных видов микроорганизмов обусловлена наличием факторов вирулентности – протеаз и гемагглютининов, способствующих активному внедрению и размножению микробов в ткани пародонта с последующим их разрушением [6,7,24,28,50].

Несмотря на то, что исследования последних десятилетий были особенно сфокусированы на идентификации возбудителей болезней пародонта, этиологический агент деструктивных поражений установить пока не удалось. Сложность проведения исследований биопленки зубной бляшки обусловлена тем, что классические критерии выявления возбудителя заболевания, известные как постулаты Коха, к болезням пародонта применимы с трудом. Многие связанные с деструктивными заболеваниями пародонта микроорганизмы, такие как, например,

Spirochaetales не поддаются культивированию совсем или требуют, как *P.gingivalis* и *P.endodontalis*, практически точного воссоздания в искусственной системе условий пародонтальной среды, что достигается с большим трудом. Кроме того, предполагаемые возбудители заболеваний встречаются и у здоровых людей тоже, а подходящая модель пародонтита на экспериментальных животных попросту отсутствует. Следует отметить, что выявление молекулярно-генетическими методами некультивируемых или трудно культивируемых бактерий существенно изменило представления ученых о составе микрофлоры пародонта и позволило обнаружить новые виды микроорганизмов, потенциально способных вызывать деструктивные заболевания пародонта [6,31].

Для идентификации возбудителя пародонтита был предложен альтернативный набор критериев, включающий установление связи заболевания с повышенным содержанием предполагаемого возбудителя в очаге поражения, регистрацию клинического улучшения в результате элиминации или снижения численности предполагаемого возбудителя, определение гуморального или клеточного иммунного ответа на антигены микроба-возбудителя, выявление в экспериментальных моделях на животных патогенного потенциала возбудителя, а также факторов вирулентности, которые способны участвовать в деструкции тканей пародонта.

В соответствии с описанными критериями первичными возбудителями пародонтита считают *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, не ассоциированный ни с одним из описанных на сегодняшний момент комплексов пародонтальных микроорганизмов, но, по-видимому, в большей степени связанный с представителями «зеленого» комплекса, и *Porphyromonas gingivalis*. Колонизация полости рта бактериями *P.gingivalis* происходит в раннем возрасте, и они обнаруживаются более чем у трети лиц в половозрелом состоянии, что также справедливо и в отношении *A.actinomycetemcomitans*.

A.actinomycetemcomitans представляют собой неподвижные грамотрицательные факультативно-анаэробные палочковидные бактерии, имеющие, как предполагают, ключевое значение в развитии локализованного агрессивного пародонтита (ЛАП). При ЛАП количество бактерий данного вида значительно возрастает, и они постоянно обнаруживаются в пораженном пародонте больных, а в сыворотке крови и десневой жидкости выявляются высокие титры направленных против данных бактерий антител. Успешное лечение ЛАП сопровождается снижением числа *A.actinomycetemcomitans*. У больных с ЛАП выраженность поражения тканей пародонта коррелирует с уровнем антител к *A.actinomycetemcomitans* и числом бактерий, обнаруживаемых в содержимом пародонтальных карманов.

Некоторые формы хронического пародонтита также могут быть обусловлены *A.actinomycetemcomitans*, однако в данном случае эти бактерии выделяются гораздо реже и в сопоставимо меньших количествах, чем при ЛАП. Кроме того, терапия хронического пародонтита сопровождается лишь уменьшением численности данного вида пародонтопатогенов, но отсутствием полной их элиминации из тканей пародонта.

A.actinomycetemcomitans выявляется также у лиц, не страдающих пародонтитом, а у больных – также и в здоровых тканях, хотя и в меньших количествах. Патогенное влияние, оказываемое данным видом на ткани пародонта, в известной степени обусловлено фенотипической вариабельностью штаммов *A.actinomycetemcomitans*. Из пяти известных серотипов *A.actinomycetemcomitans* (a-e) при заболеваниях пародонта чаще всего выявляется серотип b. Кроме того, острое начало ЛАП часто связано с колонизацией пародонта штаммами, вырабатывающими большое количество лейкотоксина [24,28,32,48].

Бактерии вида *P.gingivalis*, обнаруживаемые примерно в 25% проб здоровых тканей пародонта, являются неподвижными грамотрицательными анаэробными палочками, самыми частыми после *A.actinomycetemcomitans*

возбудителями пародонтита и наиболее тесно связанными с хронической формой заболевания, количество которых существенно возрастает особенно в свежих очагах поражения. Клинически и экспериментально установлено, что возникновение и развитие хронического пародонтита, причиной которого является взаимодействие микробного содержимого и локального тканевого ответа, без образования зубной бляшки не происходит [7]. Обнаружение *P.gingivalis*, а также ближайшего родственного ему вида *Porphyromonas endodontalis*, выделяемого из инфицированных корневых карманов зубов и подслизистых абсцессов эндодонтического происхождения, указывает на риск прогрессирования заболевания, а удачное лечение коррелирует со снижением числа данных бактерий в тканях пародонта. В последних исследованиях установлена высокая распространенность *P.endodontalis* в очагах поражения, обуславливающая симптомы острой инфекции, и достоверная корреляция данного вида с присутствием *T.forsythia* и *P.gingivalis* в содержимом пародонтальных карманов при прогрессировании заболевания. Повышенный титр антител к *P.gingivalis* и *P.endodontalis* свидетельствует о развитии иммунного ответа к возбудителям деструктивных заболеваний пародонта [6,36, 52].

Группа спирохет полости рта представляет собой высокоподвижных спиралевидных грамотрицательных анаэробных микроорганизмов. Молекулярные исследования показывают, что около четверти оральных спирохет относятся к некультивируемым представителям рода *Treponema* (*T.denticola* и *T.lecithinolyticum*), микроскопические исследования которых указывают на связь данных спирохет с пародонтитом, а также их присутствие в свежих очагах разрушения костной ткани альвеолярного челюстного отростка, в пораженных тканях больных с ЛАП и далеко прогрессирующим хроническим пародонтитом. При этом, количество спирохет коррелирует с тяжестью хронических и агрессивных форм пародонтита, а лечение приводит к значительному снижению числа данных микроорганизмов. Подобно другим предполагаемым возбудителям

болезней пародонта, спирохеты обнаруживаются в здоровых тканях в небольшом количестве.

Среди других пародонтальных микроорганизмов, часто упоминаемых в качестве возбудителей болезней пародонта, с пародонтитом наиболее тесно связаны грамотрицательные анаэробные палочки *T.forsythia*, обнаруживаемые в больших количествах в очагах поражения при хроническом пародонтите, число которых снижается при заживлении тканей. Выявление данного вида бактерий позволяет предсказать деструкцию тканей пародонта.

При пародонтите, но не гингивите, может увеличиваться число и других грамотрицательных бактерий, включая *E.corrodens*, *C.rectus*, *F.nucleatum*, *P.nigrescens* и *P.intermedia*, повышенное количество которой в пораженных тканях обнаруживается при так называемом гингивите беременных, что связывают с повышенной секрецией стероидных гормонов, стимулирующих рост данных микробов. Кроме того, показана связь пародонтита с некоторыми грамположительными бактериями, к которым относятся *P.micros*, *E.nodatum* и *S.intermedius*, и которые оказывают косвенное влияние на развитие деструктивных поражений пародонта, способствуя образованию биопленки зубной бляшки. Ко всему прочему, недавние исследования выявили связь хронического пародонтита с герпесвирусами (вирусом Эпштейна-Барр первого типа и цитомегаловирусом), обнаруживаемых в поддесневом пространстве при наличии в нем большого количества *P.gingivalis*, *T.denticola* и *T.forsythia*; однако роль вирусов в патогенезе болезней пародонта пока неясна [24,28,32,48].

1.4. Вирулентность возбудителей болезней пародонта

Вирулентность возбудителей болезней пародонта обусловлена целым рядом факторов, действие которых часто оказывается разнонаправленным, особенно в отношении врожденного иммунитета. Наличие подобных

свойств у пародонтопатогенов согласуется с экологической гипотезой, в соответствии с которой одни и те же виды пародонтальных микроорганизмов могут обитать как в здоровых, так и в пораженных тканях, а различные при этом условия обитания могут индуцировать у бактерий проявление разных фенотипических свойств. К сожалению, на сегодняшний день отсутствует единая теория, объясняющая их роль в микроэкологии полости рта в нормальном состоянии и при патологии, однако разработанные модели заболеваний основаны на взаимодействии разных факторов бактерий и организма-хозяина.

Так, бактерии вида *P.gingivalis* вырабатывают множество протеаз, основная функция которых заключается в обеспечении растущих клеток пептидами. К действиям, нарушающим целостность тканей пародонта организма-хозяина, относятся разрушение белков внеклеточного матрикса тканей пародонта (фибронектина и ламинина), гидролиз коллагенов I, III, IV и V, разрушение фибриногена, инактивация тканевых и плазменных ингибиторов протеиназ, активация матриксных металлопротеиназ и калликреин-куниновой системы. При этом, разрушая белки, протеазы способствуют ослаблению защитных механизмов организма, ввиду чего им приписывают роль основных факторов вирулентности *P.gingivalis*. К повреждению защитных механизмов организма-хозяина приводят разрушение иммуноглобулинов, инактивация или, наоборот, активация компонентов системы комплемента (вызывают хемотаксис нейтрофилов за счет компонента C5 комплемента), деструкция или трансформация цитокинов (TNF- α , IL- γ , IL-6 и IL-8) и хемокинов, расщепление поверхностных рецепторов лейкоцитов (рецептор C5a фагоцитов) и разрушением антимикробных пептидов. Кроме того, протеазы *P.gingivalis* способны активировать протромбин, C-реактивный белок, фактор X и нейтрофилы (путем расщепления активируемого протеазами рецептора 2), а гидролиз молекул CD14 на десневых фибробластах человека, осуществляемый ферментами *P.gingivalis*, приводит к уменьшению

индуцированной ЛПС выработки IL-8. Описанные биологические свойства протеиназ обеспечивают *P.gingivalis* гемом и ионами железа из белков организма-хозяина, жизненно необходимых для развития бактерий, высвобождение внутренних антигенных детерминант (бактериальных и организма-хозяина), посттрансляционный процессинг протеаз, фибриллина и белков наружной мембраны, а также участие во внеклеточной инвазии, что в конечном итоге способствует развитию заболевания.

Лучше всего у данного вида охарактеризованы аргинин- и лизинспецифические цистеиновые протеиназы гингипаин R и гингипаин K. Другую группу цистеиновых протеиназ составляют стрептопаин-подобная протеаза и пародонтаин, обладающие отличной от гингипаинов гемагглютинирующей активностью, а также расщепляющие и инактивирующие ингибитор α_1 -протеиназы. Сходная с папаином Pz-пептидаза связана с бактериальной поверхностью и, хотя на нативный коллаген не оказывает действие, может расщеплять желатин и Pz-пептид, что свидетельствует о возможном участии данного фермента в поздних стадиях деградации коллагена. Другие известные для *P.gingivalis* протеиназы включают аминопептидазы, подобные эндопептидазе эндотелин-превращающий фермент и пролилдипептидилпептидазу IV [28,31].

Подобно другим микробам полости рта, *P.gingivalis* должны обладать способностью прикрепляться к специфическому субстрату, в качестве которого могут выступать поверхности зубов, уже прикрепившиеся к ним бактерии или их метаболиты, слизистая оболочка десны, белки внеклеточного матрикса. Однако показано, что бактерии вида *P.gingivalis* предпочитают поверхность формирующейся биопленки зубной бляшки, прикрепляясь к таким ранним колонизаторам зубной бляшки, как *S.sanguis*, *S.mitis*, *S.oralis*, *S.cristatus* и *Actinomyces naeslundii*, межродовая коагрегация с которыми была показана для *P.gingivalis* в исследованиях *in vitro*. Кроме того, *P.gingivalis* способны прикрепляться также к промежуточным и

поздним бактериям, колонизирующим зубную бляшку (соответственно фузобактериям, *T.denticola* и *T.forsythia*). Биопленка защищает входящие в ее состав бактерии от неблагоприятных воздействий внешней среды, поэтому уже само существование в ней можно отнести к вирулентным свойствам данного вида. Связь бактерий с рецепторами клеток организма-хозяина и последующую колонизацию зубной бляшки могут обеспечивать поверхностные гемагглютинины (HagA, HagB и HagC), также рассматриваемые у *P.gingivalis* в качестве факторов вирулентности. Гемагглютинирующая активность *P.gingivalis* связана с фимбриями, липополисахаридом и липидом на поверхности клеток данных бактерий. Адгезины HagB и HagC участвуют в прикреплении *P.gingivalis* к клеткам организма-хозяина, например эпителиоцитам или эритроцитам. При этом, в связывании могут также участвовать расположенные на поверхности бактериальной клетки протеазы, описанные выше. Установлено, что у *P.gingivalis* образование фибрилл, факторов адгезии, гемагглютинации и протеолиза тесно взаимосвязано. По-видимому, этот сложный комплекс факторов необходим для удовлетворения потребностей возбудителя в питательных веществах, а также роста и проявления вирулентности [6,24].

Как уже указывалось выше, поверхность *P.gingivalis* покрыта перитрихальными фимбриями, которые также относят к факторам вирулентности данного вида пародонтальных бактерий. При этом, под электронным микроскопом различают два типа данных структур: главные фимбрии, длина которых составляет 0,3-3,0 мкм, а ширина – от 3 до 5 нм, состоят из субъединиц фибриллина и проявляют гомологию с субъединицами аналогичных структур бактерий других видов; короткие фимбрии встречаются реже.

В опытах *in vitro* уже показана потенциальная роль фимбрий в колонизации и деструкции тканей пародонта. Именно главные фимбрии выступают важными факторами адгезии *P.gingivalis*, обеспечивая их прикрепление к эпителиальным и эндотелиальным клеткам, фибробластам,

компонентам клеточного матрикса (фибронектину и фибриногену), компонентам слюны (пролиновым белками и статерином), покрытому слюной пленкой гидроксиапатиту (модель зубной поверхности). В отличие от других грамотрицательных бактерий, у которых адгезию обеспечивают минорные компоненты фимбрий, а мажорные лишь образуют каркас молекул, за связывание *P.gingivalis* отвечают целостные молекулы фимбрий. Многочисленные исследования *in vivo* указывают на важность присутствия целостных фимбрий для развития инфекционного процесса. Так, крысы, предварительно иммунизированные очищенными фимбриями *P.gingivalis* или зараженные мутантным штаммом, лишенным длинных фимбрий, обладали в известной степени устойчивостью к индуцируемой *P.gingivalis* деструкции костной ткани зубочелюстной системы.

При этом, показана регуляция синтеза молекул главных фимбрий сигналами внешней среды – удалось выяснить, что экспрессию соответствующих генов способен регулировать, по крайней мере, один из микробов зубной бляшки. Контакт *P.gingivalis* с *Streptococcus cristatus* запускает сигнальный механизм, ведущий к ослаблению кодирующего главные фимбрии гена и блокированию его экспрессии, что предупреждает включение *P.gingivalis* в состав биопленки зубной бляшки, способствует его элиминации из полости рта и предотвращает последующий переход комменсальной зубной бляшки в патогенную. Обратная ситуация наблюдается в условиях *in vitro*: после адгезии *P.gingivalis* к *S.gordonii* образуется биопленка из нагромождающихся микроколоний, пронизанная каналами с жидкостью. На поверхности обоих видов бактерий обнаруживаются несколько специфических адгезин-рецепторных пар, включая главные фимбрии *P.gingivalis* и многофункциональный поверхностный белок *S.gordonii*, по-видимому необходимых для образования подобной смешанной биопленки.

Однако, необходимым условием развития пародонтита является контакт бактерий зубной бляшки с тканями десны. Выявление *P.gingivalis* в

десневой ткани позволяет предположить, что после колонизации слизистой оболочки данные бактерии преодолевают эпителиальный барьер. Проникновение в эпителиальные клетки и последующее размножение в них бактерий *P.gingivalis* является результатом взаимодействия именно главных фимбрий данных микробов с интегринами, находящимися на поверхности эпителия, что активирует сигнальную систему, включающую изменение внутриклеточных концентраций ионов кальция и модуляцию митоген-активируемых протеинкиназных каскадов и приводящую к перестройке цитоскелета эпителиальных клеток, способствующей внедрению в них прилипших бактерий. Кроме того, повреждение сигнальной системы эпителиальных клеток может приводить к подавлению транскрипции и секреции нейтрофилами IL-8. *P.gingivalis* также способны тормозить секрецию данных медиаторов после стимуляции десневых эпителиальных клеток комменсалами зубной бляшки, что существенно ослабляет местный иммунный ответ [28,31].

Инвазия соединительной ткани десны бактериями полости рта, включая *P.gingivalis*, сопровождается развитием воспаления и кровотечения, обеспечивающих поступление микробов в кровоток (бактеримия) и последующее формирование отдельных очагов инфекции. По-видимому, в эндотелии сосудов *P.gingivalis* запускает атерогенный процесс, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии, участвующих в патогенезе ишемической болезни сердца и стенокардии. Проникнув в клетки эндотелия, *P.gingivalis* остается в аутофагосоме, предотвращая при этом сливание ее с лизосомами, что позволяет бактериям избежать гибели.

Связанные с поверхностью грамотрицательных бактерий пузырьки образуются в результате выпячивания наружной мембраны, и потому содержат ее структуры – в отношении *P.gingivalis* это протеазы, ЛПС и гемагглютинины, а также захваченные компоненты периплазмы. Пузырьки наружной мембраны участвуют в связывании *P.gingivalis* с эритроцитами, а

также другими бактериями биопленки зубной бляшки и поверхностью гидроксиапатита. Кроме того, недавно была показана способность поверхностных пузырьков агрегировать тромбоциты. Ученые предполагают, что адгезивные микропузырьки выступают в качестве средств адресной доставки таких факторов вирулентности *P.gingivalis*, как токсинов и протеаз, поскольку малый размер их молекул позволяет проникать в наиболее недоступные для клеток бактерий области пародонта, способствуя разрушению плотных межклеточных контактов (белок окклюдин), адгезии (E-кадгерин) и внеклеточного матрикса (β 1-интегрин), что в конечном итоге обеспечивает проникновение *P.gingivalis* между клетками в наиболее глубокие слои пародонта.

Как и большинство патогенных для человека бактерий *P.gingivalis* является капсульным видом, у которого в настоящее время различают шесть серотипов капсул. Поскольку инкапсулированные штаммы плохо поддаются фагоцитированию, полисахаридную капсулу также считают важным фактором вирулентности. На экспериментальных животных была показана связь структуры капсулы *P.gingivalis* с патогенным действием данных бактерий. Однако, капсульная структура не является единственным фактором вирулентности *P.gingivalis*, о чем свидетельствуют различия в вирулентности бактерий в пределах одного серотипа. Полисахаридный слой на поверхности данных микробов может маскировать ЛПС, изменяя тем самым его активность. При этом, в экспериментах было показано, что при ферментативной обработке клеток *P.gingivalis*, направленной на разрушение полисахаридной капсулы, бактериями высвобождались дополнительные адгезины, скрытые прежде под слизистым слоем [6,24,28].

1.5. Липополисахариды возбудителей болезней пародонта

Физическим барьером между внутренней средой организма и полостью рта служит выстилающий ее эпителий, поверхность которого покрыта вязким слизистым слоем, также служащим в качестве физического

препятствия для стремящихся прикрепиться к внутренним эпителиальным поверхностям патогенных микробных агентов, и, наряду с этим, облегчая очистку эпителия от болезнетворных микроорганизмов, осуществляемую ритмически сокращающимися ресничками эпителиальных клеток.

Однако иногда, при нарушении гомеостаза ротовой полости, внешние факторы способны запускать изменение состава резидентной оральной микрофлоры, способствуя преобладанию в ней патогенных видов, проявлению патогенных свойств комменсальными микроорганизмами, а главным образом, преодолению патогенами эпителиальных барьеров и проникновению их в подлежащие ткани, после чего запускается система врожденного и приобретенного иммунитета, призванная опознать и уничтожить патоген, не нанеся при этом вреда организму-хозяину.

Следовательно, иммунная система должна уметь отличать «своих», комменсальных бактерий, от «чужих», патогенных. Система врожденного иммунитета полагается на опознавание молекул особого типа, присущих многим патогенам, но не свойственных организму-хозяину. Такие патоген-ассоциированные, или микробспецифичные иммуностимуляторы запускают реакции врожденного иммунитета двух типов: воспалительные реакции и фагоцитоз профессиональными фагоцитами (нейтрофилами и макрофагами) и тканевыми дендритными клетками, которые активируют Т-клетки приобретенного иммунитета (специфического звена иммунитета) [22].

Микробспецифичные иммуностимуляторы бывают разного типа, причем большинство из них свойственно многим бактериям, как патогенным, так и безвредным. Это означает, что во избежание развития неуместных иммунных реакций, организм должен быть способен отличить микробспецифичные иммуностимуляторы, вырабатываемые патогенами, от весьма подобных или даже идентичных молекул, выделяемых нормальной микрофлорой.

Таковыми молекулами, составляющими наружную поверхность многих микроорганизмов и не встречающимися у многоклеточных хозяев, служат покрытая пептидогликанами клеточная стенка, жгутики бактерий, тейхоевые кислоты в оболочке грамположительных бактерий, а также молекулы липополисахарида (ЛПС) на поверхности грамотрицательных бактерий. Кроме того, во многих случаях достаточно важным фактором оказывается разница в концентрации иммуностимуляторов: обыкновенно низкие концентрации той или иной молекулы могут отслеживаться иммунной системой, но не вызывать воспалительную реакцию, тогда как внезапные скачки концентрации или появление иммуностимуляторов в обычно стерильных областях организма будут вызывать реакцию врожденного иммунитета [4].

Только грамотрицательные бактерии способны синтезировать липополисахариды (ЛПС), представляющие собой гибридные молекулы из липидов и углеводов, в большом количестве расположенные в наружной мембране бактерий и придающие ей структурную целостность. Молекулы ЛПС состоят из трех основных компонентов: липида А, встроенного в наружную мембрану, коркового липополисахарида и боковых О-цепей, ориентированных наружу от клетки. Особенности строения ЛПС, такие как, например, длина О-цепи, существенно различаются у грамотрицательных бактерий. Так, например, у бактерий с «гладкими» ЛПС в состав молекул входит длинная боковая О-цепь, состоящая из повторяющихся углеводных субъединиц, ввиду чего на питательном агаре формируются гладкие бактериальные колонии, а у бактерий с «шероховатыми» ЛПС О-цепь вовсе отсутствует. Более того, в основе серологической классификации бактерий часто лежат различия именно в структуре и составе корковых полисахаридов и боковых О-цепей [13].

Известно, что липополисахарид в значительной степени определяет патогенное действие грамотрицательных бактерий. Такие клинически значимые свойства ЛПС (или эндотоксина, как его иногда называют) как

летальное токсическое действие, активация системы комплимента, полиморфноядерных лейкоцитов, макрофагов и стимуляция воспаления, оказываемое на В-лимфоциты митогенное действие, адьювантное и пирогенное действие, стимуляция резорбции кости, синтеза простагландинов, выработки фактора некроза опухоли, способность вызывать гипотермию и гипотонию составляют лишь некоторую часть биологических свойств, присущих молекулам ЛПС [28,30].

К наиболее важным из перечисленных свойств относятся способность ЛПС вызывать шок, лихорадку и апоптоз клеток организма-хозяина, а также выраженное местное иммунное воспаление, в конечном итоге приводящее к повреждению тканей. Патогенное действие ЛПС связано в первую очередь с входящим в его состав липидом А. При этом, следует отметить, что не у всех бактерий ЛПС высокотоксичен и способен в биологически значимых концентрациях вызывать описанные реакции – многие виды биологической активности ЛПС зависят от его видовой принадлежности. Так, ЛПС *P.gingivalis*, участвующего в развитии болезней пародонта, стимулирует резорбцию кости, играющую ключевую роль в патогенезе пародонтита, в то время как ЛПС *E.coli* не обладает подобным действием [18].

В большинстве своем практически все пародонтопатогенные виды бактерий (за исключением *T.denticola*, содержащей липоолигосахарид, отличающийся от ЛПС меньшим количеством сахаридных звеньев в составе углеводной цепи), считающиеся основными возбудителями пародонтита синтезируют молекулы липополисахаридов, различающихся однако по биологическим свойствам в зависимости от видовой принадлежности, как уже было сказано ранее. В составе высокомолекулярного компонента ЛПС *A.actinomycetemcomitans* имеется иммунодоминантный антиген. Кроме того, известно, что ЛПС данного вида пародонтопатогенов вызывает резорбцию костной ткани, агрегацию тромбоцитов и некроз кожи. Он также может активировать макрофаги и активно связывает гемоглобин, выступающий, как и для *P.gingivalis*, необходимым для роста источником

железа. У макрофагов низкие концентрации ЛПС *A.actinomycetemcomitans* стимулируют продукцию IL-1 α , IL-1 β и TNF – цитокинов, участвующих в воспалении и деструкции тканей пародонта, в то время как высокие – продукцию системных про- и противовоспалительных цитокинов. Учеными высказано предположение, что пропорция этих двух типов цитокинов может определять исход болезней пародонта. ЛПС *E.corrodens* агглютинирует эритроциты, что указывает на возможную роль в адгезии к эпителиальным клеткам. Установлено, что в органной культуре ЛПС данных микроорганизмов также вызывает резорбцию костной ткани. Термостабильная агглютинация эритроцитов пародонтальных бактерий вида *P.intermedia* по-видимому обусловлена ЛПС-подобными структурами [28].

Изучение многих штаммов *P.gingivalis* продемонстрировало несходство химической структуры их ЛПС и молекул ЛПС энтеробактерий: ЛПС *P.gingivalis* не содержат в своем составе гептозы или содержат их в малом количестве; кроме того, жирные кислоты ЛПС *P.gingivalis* являются более длинными и разветвленными. Существенно различаются ЛПС этих бактерий и по биологическим свойствам: например, ЛПС *P.gingivalis* отвечает довольно низкой эндотоксичностью, что, по-видимому, обусловлено разной ролью данных структур в патогенезе [13,14].

P.gingivalis способен как активировать, так и подавлять неспецифический воспалительный ответ организма-хозяина. Бактериальные клетки *P.gingivalis* и их компоненты могут индуцировать продукцию нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, фибробластами и эпителиоцитами различных цитокинов и хемокинов. Такие цитокины, как IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-8, способствуют воспалению и деструкции тканей, в том числе и костной. Однако, в то же время, *P.gingivalis* стимулируют и синтез противовоспалительных цитокинов (свободные рецепторы IL-1, IL-4), разрушают имеющиеся цитокины и нарушают продукцию IL-8 эпителиальными клетками [11].

ЛПС *P.gingivalis* не стимулирует экспрессию эндодонтальными клетками E-селектина, а наоборот подавляет его синтез, индуцированный ЛПС других бактерий зубной бляшки. Как было описано выше, бактерии вида *P.gingivalis* являются слабыми активаторами цитокинов IL-1 β и TNF- α моноцитов, являющихся непрямыми активаторами селектина), по сравнению с *E.coli*. К тому же, на мышинных экспериментальных моделях раннего воспаления было показано более слабое индуцирование цитокинов фибробластов, E- и P-селектинов, белка 1 хемотаксиса моноцитов молекулами ЛПС *P.gingivalis*, чем *E.coli* [20,21].

Часто микробспецифичные иммуностимуляторы, к которым относятся и молекулы ЛПС, встречаются в виде повторяющихся структур и поэтому их называют патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (РАМР). Такие паттерны опознаются нацеленными на них рецепторами организма-хозяина нескольких типов, совокупно называемых паттерн-распознающими рецепторами, одним из которых и является семейство мембранносвязанных Toll-подобных рецепторов. Являясь компонентом врожденной защиты организма-хозяина, Toll-подобные рецепторы его клеток распознают неизменные бактериальные продукты, в числе которых и находится и ЛПС. Взаимодействие с данными молекулами Toll-подобных рецепторов TLR-2, ответственных конкретно за связывание липополисахаридов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, в обязательном порядке приводит к развитию воспаления. Так, показано, что связывание ЛПС *P.gingivalis* с десневыми фибробластами человека активирует ряд вторичных сигнальных систем. Кроме прочего, после суточной стимуляции ЛПС богатые Toll-подобными рецепторами фибробласты секретируют значительно больше IL-1 и IL-6. Однако установлено, что более продолжительная стимуляция рецепторов снижает экспрессию TLR-2 на поверхности фибробластов, из чего можно заключить способность ЛПС *P.gingivalis* надолго изменять иммунный ответ, «выключая» Toll-подобные рецепторы клеток макроорганизма [32].

Достоверно установлено, что бактерии вида *P.gingivalis* способны не только стимулировать резорбцию и вызывать деструкцию костной ткани челюсти, но и подавлять ее формирование и восстановление. В качестве основных агентов, ответственных за нарушение равновесия деятельности остеобластов (депонирование) и остеокластов (резорбция костной ткани), признают ЛПС, фимбрии и компоненты наружной мембраны *P.gingivalis*. Активированные молекулами ЛПС *P.gingivalis* остеокласты способствуют высвобождению из фибробластов, макрофагов и моноцитов медиаторов костной резорбции, к которым относятся $IL-1\beta$, простагландин E_2 и $TNF-\alpha$. Данные медиаторы также могут индуцировать выработку клетками организма-хозяина протеаз, разрушающих костную и соединительную ткани и подавляющих синтез коллагена остеобластами [34].

Выяснение уникального патогенного механизма факторов воздействия *P.gingivalis* и *P.endodontalis* является трудной и до конца не решенной задачей, решение которой обеспечит более эффективную клиническую терапию пациентов с муко-пародонтальными поражениями.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика пациентов

Для настоящего исследования были обследованы 30 пациентов в возрасте от 28 до 65 лет, отобранные случайным образом, с установленным диагнозом хронический генерализованный пародонтит легкой и средней степени тяжести.

В качестве критериев включения в исследование служили: наличие достоверного диагноза хронический генерализованный пародонтит легкой или средней степени тяжести и наличие информационного согласия на участие в настоящем исследовании. Исключение пациентов из исследования производилось при наличии выраженной сопутствующей соматической патологии, аллергических заболеваний, острых инфекционных и вирусных заболеваний, первичных и вторичных иммунодефицитов, онкологических заболеваний в анамнезе, а также приеме влияющих на уровень костной резорбции и гипертрофию десен лекарственных средств.

Все участвовавшие в исследовании пациенты были в полном объеме и доступной форме проинформированы о проводимых методах обследования, после чего каждым из них было подписано добровольное информационное согласие на участие в исследовании.

Для объективной оценки особенностей проявления и тяжести течения пародонтита врачом-пародонтологом дополнительно проводилась индексная диагностика физиологического состояния тканей пародонта, принятая ВОЗ.

Стоматологическое обследование пациентов производилось по общепринятой методике с использованием комплекса основных и дополнительных методов. Анамнез жизни включал данные о возрасте, профессиональном статусе, вредных привычках (курение), отягощенной наследственности, наличии аллергических и сопутствующих заболеваний.

Под историей болезни понималась информация о наличии стоматологических жалоб, предполагаемой пациентом причины возникновения/обострения пародонтита, его предполагаемом возрасте манифестации, предполагаемой давности течения и прогрессирования заболевания, проводившемся ранее лечение и его эффективности, эффекте оказываемым профессиональной гигиеной полости рта на течение заболевания.

При осмотре полости рта определялись: зубная формула, состояние прикуса, наличие съемных протезов, контактирующих со слюной металлов, а также других ортодонтических или ортопедических конструкций в полости рта, присутствие нависающих над десной краев коронок или пломб, трем или диастем, отсутствие межзубных контактов. Оценка формы и степени поражения тканей пародонта производилась по показателям, описанным ниже.

Отечность десен, выражаемая йодным числом Свракова, оценивалась при помощи пробы Шиллера-Писарева, основанной на выявлении йод-йодидно-калиевым раствором Шиллера-Писарева гликогена в участках глубокого поражения соединительных тканей. Окрашивание десен производили в области всех зубов. Соломенно-желтый цвет десны и светло-коричневый цвет слизистой оболочки соответствовали отрицательной и слабоположительной пробам. Приобретение ярко-коричневой окраски воспаленных участков десен (положительная проба) обусловлено взаимодействием йодного раствора с гликогеном, накапливающимся в большом количестве в местах воспаления в результате проникновения внутрь мягких тканей болезнетворных бактерий, а также отсутствия кератинизации эпителия. В эпителии здоровых десен гликоген содержится в следовой концентрации, либо отсутствует вовсе.

Для объективизации пробу Шиллера-Писарева выражают в баллах, оценивая окраску десневых сосочков в 2 балла, края десны – в 4 балла, альвеолярной десны – в 8 баллов. Сумму полученных баллов делят на

количество зубов, в области которых было проведено исследование, определяя таким образом цифровое значение пробы Шиллера-Писарева, или йодное число Сваркова. Слабовыраженный воспалительный процесс оценивается до 2,3 баллов. Умеренно выраженный процесс воспаления десен соответствует интервалу от 2,4 до 5,0 баллов. Интенсивный воспалительный процесс характеризуется 5,1-8,0 баллами.

Гипертрофия десен, характеризующаяся как патологическое состояние и проявляющаяся в увеличении объема десневых сосочков и свободной десны, подтверждалась визуальной оценкой размера видимой коронки зуба и вертикальным зондированием. Начиная от цементно-эмалевой границы, коронка зуба условно делилась на части в горизонтальной плоскости. Составившее $\frac{1}{3}$ высоты коронки расстояние от цементно-эмалевого соединения до режущего края или жевательной поверхности соответствовало первому уровню (I степень гипертрофии). За второй уровень (II степень гипертрофии) была принята $\frac{1}{2}$ высоты коронки. В случае перекрывания краем десны цементно-эмалевой границы, но отсутствия I степени, гипертрофия десен признавалась неподтвержденной.

Оценка десневой гиперемии, развивающейся при воспалительном процессе вследствие расширения сосудов капиллярной сети, также осуществлялась визуально. При артериальной гиперемии, сопровождаемой десквамацией рогового слоя эпителия, ткани десен имеют яркую окраску с отчетливым красным оттенком, являющимся характерным признаком развивающегося острого воспаления или обострения хронического воспалительного процесса. Венозной гиперемии десен, наблюдаемой при протекании хронического воспалительного процесса, соответствует синеватый оттенок тканей и отсутствие десквамации поверхностного слоя эпителия десен.

Кровоточивость как патологическое состояние, указывающее на повреждение десневого эпителиального покрова при развивающемся воспалении, выявлялось в ходе вертикального и горизонтального

зондирования, а также при пальпации десны. При вертикальном зондировании пародонта, проводимом у каждого зуба, ось стоматологического зонда располагалась параллельно оси исследуемого зуба. В случае появления капиллярного кровотечения симптом кровоточивости десен считался положительным. Горизонтальное зондирование осуществляли при помощи пуговчатого зонда, ось которого располагалась перпендикулярно оси исследуемого зуба. При этом ось зонда не продвигали между десной и зубом, а зондировали только вершину каждого десневого сосочка. Появление капиллярного кровотечения свидетельствовало о положительном симптоме кровоточивости десен.

Наличие клинического кармана, а также его глубина, определялись вертикальным зондированием при помощи специального градуированного пародонтологического зонда, погружение которого осуществлялось в апикальном направлении между поверхностью зуба и тканями десны на глубину 3 мм и более от края десны. Глубина кармана менее 3 мм соответствует клинической десневой борозде. Обследование начиналось с моляров верхней челюсти по средней линии коронки и контактных поверхностей зубов, получая таким образом 6 измерений. В тех же шести точках производилось измерение длины обнаженной поверхности корня зуба, для чего кончик градуированного зонда помещали на край десны, устанавливая ось зонда параллельно оси исследуемого зуба. Деление измерительной шкалы зонда, соответствующее уровню цементно-эмалевой границы, указывало на размер обнаженной поверхности зубного корня.

Зубной налет, наддесневый и поддесневый зубные камни выявлялись визуальной оценкой и вертикальным/горизонтальным зондированием. Мягкий зубной налет без усилий удалялся с поверхности зуба, оставаясь на стержне стоматологического зонда при смещении по его поверхности. Наличие наддесневого зубного камня устанавливалось при зондировании. Зубной камень в пародонтальных карманах выявлялся исключительно вертикальным/горизонтальным зондированием – при движении кончика

зонда по поверхности зуба, находящейся ниже уровня десны, ощущалась шероховатость, препятствующая продвижению зонда. Выявление гнойного экссудата в пародонтальных карманах, а также его характер, осуществлялось визуально при пальпации десны.

Патологическая подвижность зубов, характеризующая степень повреждения тканей пародонта протекающим в них патологическим процессом, определялась при визуальном различимом свободном смещении коронки зуба пинцетом или зондом в различных направлениях и оценивалась по шкале Мюллера в модификации Флезара. I степень патологической подвижности присваивалась при смещении зуба на 1 мм вестибулярно или орально по отношению к коронке соседнего зуба. При II степени патологической подвижности зуб смещался в тех же направлениях, но более чем на 1 мм относительно коронки соседнего зуба или присоединялась подвижность в медиальном и дистальном направлениях, функция зуба при этом не нарушена. Появление подвижности в вертикальном направлении, а также функциональных нарушений, соответствовало III степени патологической подвижности зубов.

В качестве гигиенических индексов использовались упрощенный индекс гигиены Грина-Вермиллиона (ОНИ-S, Green&Wermillion, 1964), заключающийся в оценке площади поверхности зуба, покрытой налетом и/или зубным камнем, без использования специальных красителей, а также интердентальный гигиенический индекс (HYG), фиксирующий в процентном отношении межзубные поверхности, не имеющие зубных отложений, и являющийся наиболее чувствительным среди всех гигиенических индексов ввиду возможности выявления даже незначительного налета на апроксимальных поверхностях зубов, являющихся наиболее труднодоступными для тщательного гигиенического ухода.

Для оценки степени воспаления десны и патологии пародонта использовался пародонтальный индекс Рассела (PI, Russel A., 1956),

учитывающий площадь воспалительного процесса, глубину десневых карманов и степень подвижности зубов. Кровоточивость десен оценивалась индексом кровоточивости Мюллемана в модификации Коуэлла (SBI, Muhlemann&Cowell, 1975).

Использование индекса клинической потери привязанности (CAL) для определения тяжести протекающих деструктивных изменений в тканях пародонта позволило оценить величину потери зубодесневого прикрепления, что наиболее полно согласуется с новой концепцией о роли микроорганизмов в развитии пародонтита с индивидуальным формированием неодинаковых по степени тяжести зон поражения в области отдельных зубов.

2.2. ПЦР-исследование в режиме реального времени (РТ-ПЦР) содержимого пародонтальных карманов пациентов

В день взятия биологического материала обследуемым было рекомендовано воздержаться от полоскания полости рта лекарственными средствами и чистки зубов. Забор клинического материала, в качестве которого выступало содержимое пародонтальных карманов обследуемых, осуществлялся стерильными бумажными конусными эндодонтическими абсорбентами Absorbent Paper Points фирмы META BIOMED (размер №25 по ISO), вводимых стерильным пинцетом в наиболее глубокие участки пародонтальных карманов на 15 секунд. Для проведения молекулярно-генетического скрининга эндодонтические штифты немедленно помещались в стерильные герметичные пластиковые пробирки типа Eppendorf (1,5 мл), содержащие 0,3 мл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» (ООО НПФ «Литех»). Доставка проб осуществлялась в термоконтейнере с хладогентом при +4°C в течение 2 часов непосредственно после забора материала.

Обработка клинических проб производилась в течении 2 часов после доставки материала в лабораторию. Для выделения ДНК пробирки с

реагентом, содержащие анализируемый материал, тщательно перемешивали на мини-центрифуге-вортексе MICROSPIN FV-2400 (BioSan) в течение 10 секунд, после чего эндодонтические абсорбенты удаляли из пробирок, которые затем помещали в предварительно прогретый до +98°C твердотельный термостат «Циклотемп-303» (СИНТОЛ) и инкубировали в течение 20 минут. По завершении инкубации пробирки центрифугировали на CENTRIFUGE CM-50 (ELMI) при комнатной температуре, 12000 об/мин в течение 30 секунд. Полученные супернатанты использовали непосредственно в качестве исследуемых образцов ДНК для постановки реакции амплификации.

Обнаружение в биологическом материале и количественная оценка ДНК *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*, а также других возбудителей заболеваний пародонта (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*), производились с использованием набора реагентов «КОМПЛЕКС ДЕНТОСКРИН» (комплектация OneStep-PB-96, ООО НПФ «Литех») методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Для каждого исследуемого образца готовили по семь пробирок с различными амплификационными смесями. Две отдельные пробирки предназначались для стандартных образцов, рассчитанных под каждый исследуемый возбудитель. Исследуемые образцы ДНК и стандарты St1 и St2, отличные для каждой реакционной смеси из комплекта набора, вносились полуавтоматической пипеткой с использованием индивидуальных наконечников с аэрозольными фильтрами в объеме 7 мкл. Такой же объем разбавителя, выступающего в качестве единого для всех возбудителей отрицательного контроля, вносился в соответствующую пробирку с амплификационной смесью. С целью снижения риска контаминации образцы вносились в указанном в инструкции набора

порядке. После внесения образца пробирка немедленно закрывалась крышкой.

Плотно закрытые пробирки центрифугировали на микро-центрифуге-вортексе при комнатной температуре в течение 3-5 секунд. Процесс амплификации проводили в предварительно прогретом до +94°C амплификаторе с детекцией результатов в режиме реального времени Dtpriime (ДНК-Технология, Россия) по описанной в инструкции набора программе с установлением всех необходимых настроек (таблица 1).

Таблица 1 – Рекомендованная для набора реагентов «КОМПЛЕКС ДЕНТОСКРИН» (комплектация OneStep-PВ-96, ООО НПФ «Литех») программа амплификации участков ДНК пародонтапогенных бактерий

Стадии амплификации	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	+94°C	1 мин 30 сек	1 цикл
Денатурация	+94°C	10 сек	40 циклов
Отжиг (считывание результатов)	+62°C	23 сек	
Элонгация	+72 °C	20 сек	

По завершении программы амплификации анализ и интерпретация полученных результатов проводились с применением указанных в инструкции набора настроек, с использованием которых анализирующая программа (RealTime_PCR 7.9.5.39) автоматически рассчитывала циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct), строила калибровочные кривые и рассчитывала содержание ДНК каждого возбудителя в исследуемых образцах в единицах геном-эквивалент/мл (ГЭ/мл).

2.3. Выделение бактериологическим методом чистых культур

Porphyromonas gingivalis и *Porphyromonas endodontalis*

Для проведения бактериологического посева забор содержимого пародонтальных карманов пациентов также производился стерильными бумажными конусными эндодонтическими абсорбентами Absorbent Paper Points фирмы META BIOMED (размер №25 по ISO), вводимых стерильным пинцетом в наиболее глубокие участки пародонтальных карманов на 15 секунд. С обеспечением минимального контакта с атмосферным воздухом, эндодонтические штифты немедленно помещались в пробирки с тиогликолевой транспортной средой, тупферы с транспортной средой Amies (RUSTECH) с древесным углем и наполненные 1 мл физиологического раствора стерильные герметичные пластиковые пробирки типа Eppendorf 1,5 мл объема для последующего культивирования облигатно анаэробных патогенных микроорганизмов. Транспортировка биологического материала в бактериологическую лабораторию осуществлялась в термконтейнере с хладагентом при +4°C в течение 2 часов непосредственно после забора клинического материала.

Бактериологический посев образцов с положительными результатами молекулярно-генетического скрининга на *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*, осуществляемый немедленно после доставки материала в лабораторию, производился на готовый и предназначенный для выращивания труднокультивируемых патогенных микроорганизмов колумбийский агар с содержанием 5% бараньей крови, без применения селективных добавок, а также на элективные питательные среды желточно-солевой агар Чистовича, среда Сабуро и дифференциально-диагностическую среду Эндо для периферической оценки оральной микрофлоры, сопутствующей диагнозу хронический генерализованный пародонтит легкой/средней степени тяжести.

С целью получения чистых культур микроорганизмов высев нативного материала из транспортных сред и физраствора осуществляли

бактериологической петлей методом истончающего штриха с последующим пересевом выросших смешанных культур. Для этого содержимое пародонтальных карманов распределяли стерильной бактериологической петлей по поверхности плотной питательной среды в области первичного нанесения материала, откуда в область второго сектора наносили четыре штриха под углом 45° . Нанесение еще четырех штрихов из второго сектора в чистую область чашки Петри (третий сектор) производили под углом 90° . Следующие четыре штриха наносили также под углом 90° из области третьего сектора в область четвертого. Стерилизацию бактериологической петли в пламени горелки осуществляли перед каждым нанесением новых четырех штрихов. Таким образом, данная техника посева биологического материала позволяет получать его десятикратное разведение в каждом новом секторе. Следовательно, в последнем, четвертом, секторе содержимое пародонтальных карманов было разведено в 10^3 раз.

Инкубация произведенных посевов осуществлялась в CO_2 -инкубаторе фирмы THERMO SCIENTIFIC при $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 в течение 3 суток (в последующем продолжительность инкубации была увеличена до 5 суток). Количественный учет микроорганизмов проводили чашечным методом путем вычисления для каждого разведения среднего арифметического значения выросших в двух-трех секторах колоний доминирующих чистых культур при большом количестве и равномерном их распределении, умножая полученное значение на соответствующий коэффициент разведения и выражая результат количеством колониеобразующих единиц (КОЕ). В том случае, когда число выросших колоний оказывалось больше 15, подсчитанное их количество умножалось на соответствующий коэффициент разведения, а результат округлялся до числа, кратного 5, при количестве колоний менее 100 и, кратного 10, при количестве колоний более 100.

Видовую идентификацию выделенных чистых культур проводили с использованием масс-спектрометра MALDI-TOF VITEK MS (BIOMERIEUX, Россия) – автоматической системы идентификации микроорганизмов масс-спектрометрическим методом, использующей технологию времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) и обширную базу данных клинически значимых видов микроорганизмов для получения результатов в течение нескольких минут. Свежие чистые культуры микроорганизмов наносили на отражающую поверхность одноразового слайда, который затем загружали в высоковакуумную камеру аппарата. В этом методе не используется сравнение пиков, а в программное обеспечение не включены референсные спектры, поэтому идентификация неизвестных микроорганизмов производилась системой с использованием расширенного классификатора спектров, интерпретация которых осуществлялась системой по серии пиков, определяемых и дифференцируемых по массе и интенсивности.

Ввиду неудовлетворительных результатов произведенного бактериологического посева, в последствии, на этапе взятия клинического материала и его транспортировки в лабораторию транспортные среды (тиогликолевая и среда Amies с древесным углем), а также физиологический раствор, были заменены питательными средами ЮООНА® с нейтрализаторами антибиотиков для культивирования анаэробов во флаконах (25 мл, SCENKER). Забор клинического материала производился непосредственно во флаконы, которые затем выдерживались в термостате в течение трех суток при +37°C.

Бактериологический посев отобранного биоматериала производился методом истончающего штриха на поверхность семи различных плотных питательных сред, подобранных с учетом культуральных особенностей *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*, следующего состава:

1) Агар с сердечно-мозговой вытяжкой (ВНІ-Agar, HiMedia): 37 г сухого вещества сердечно-мозгового бульона (ВНІ-Broth, HiMedia) с добавлением 15 г агара, 5 г дрожжевого экстракта, 60 мл черного альбумина и 1,2 мг менахинона (витамин К2) из расчета на литр питательной среды;

2) Готовый питательный ГРМ-агар для бруцелл (Оболенск, Московская область) с добавлением 60 мл/л черного альбумина и 1,2 мг/л менахинона (витамин К2);

3) Бруцеллагар (Оболенск, Московская область):

- 37 г сухого вещества с добавлением 60 мл черного альбумина и 1,2 мг менахинона (витамин К2) из расчета на литр питательной среды;

- 37 г сухого вещества бульона для бруцелл (Оболенск, Московская область) с добавлением 60 мл черного альбумина и 1,2 мг/л менахинона (витамин К2) из расчета на литр питательной среды;

4) Сборная среда HiMedia бруцеллагар: 37 г сухого вещества агара, 10 г гидролизата казеина, 10 г пептического перевара животной ткани, 5 г дрожжевого экстракта, 1 г глюкозы, 5 г хлорида натрия с добавлением 60 мл черного альбумина и 1,2 мг менахинона (витамин К2) из расчета на литр питательной среды;

5) Эритрит-агар (Махачкала, Республика Дагестан): 37 г сухого вещества эритрит-бульона с добавлением 15 г агара, 60 мл черного альбумина и 1,2 мг менахинона (витамин К2) из расчета на литр питательной среды;

6) Готовый шоколадный агар с добавлением 60 мл/л черного альбумина и 1,2 мг/л менахинона (витамин К2);

7) Кровяной агар: 46,6 г сухого вещества бруцеллагара с добавлением 32 мл крови, 60 мл черного альбумина и 1,2 мг менахинона (витамин К2) из расчета на литр питательной среды.

Важно отметить, что во все используемые среды в обязательном порядке вносились селективные для исследуемых пародонтопатогенов добавки – черный альбумин (аналог гемина) и витамин К (менахинон).

Инкубация произведенных посевов осуществлялась в термостате при +37°C в течение 5 суток. Анаэробные условия были созданы при помощи анаэробной системы с применением газогенераторных пакетов двойного действия HiAnaeroGas Pack™ фирмы HIMEDIA.

2.4. Количественное определение липополисахарида с использованием LAL-теста содержимого пародонтальных карманов обследуемых пациентов

Учитывая сложность выделения чистых культур исследуемых микроорганизмов, обнаружение и измерение концентрации бактериальных липополисахаридов проводили LAL-тестом клинических образцов с применением набора реагентов Limulus Amebocyte Lysate (Nycult Biotech, США) хромогенным методом по конечной точке. В основе теста лежит реакция коагуляции LAL-реагента (лизат амебоцитов крови мечехвоста) при взаимодействии с эндотоксином грамотрицательных бактерий, что вызывает помутнение и образование геля. Настоящий метод основан на активации фермента и развитии в присутствии бесцветного субстрата ферментативной реакции, обуславливающей появление желтого окрашивания по мере расщепления хромофора р-нитроанилин (рNA). Реакция останавливается добавлением уксусной кислоты, а абсорбция измеряется спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Концентрация эндотоксина в исследуемом образце, анализируемом одновременно со стандартами, может быть определена по калибровочной кривой. Калибровочная кривая строится при линейном откладывании средних значений абсорбции каждого стандартного образца (ось Y) против соответствующего значения концентрации эндотоксина (ось X) (логарифмическая шкала).

Проведение анализа начинали с подготовки предварительно нагретых до комнатной температуры используемых компонентов. Для этого во флакон с LAL-реагентом добавляли 4 мл свободной от эндотоксинов воды (EFW), после чего флакон аккуратно перемешивали, не допуская вспенивания, до полного обесцвечивания LAL-реагента. Калибровочный образец готовили путем разведения стандарта внесением во флакон необходимого объема EFW, указанного в сертификате набора. Содержимое флакона перемешивали в течении 5 минут после разведения, достигая концентрации 50 единиц эндотоксина в мл калибровочного образца (ЭЕ/мл). Для приготовления стоп-раствора, 10 мл концентрированного стоп-реагента 2.5x вносили в 15 мл дистиллированной воды. Для исследуемых образцов с неизвестными концентрациями липополисахаридов готовились серийные разведения 0x (неразбавленный образец), 100x и 10 000x в EFW.

С целью предотвращения образования конденсата микропланшет из пакета с осушителем извлекали только после его нагревания до комнатной температуры. Используемые в анализе стрипы подвергались маркировке. Для анализа калибраторов в 16 лунок микроплшета в дублях вносили по 50 мкл EFW. Разведенного в два раза путем внесения в отдельный флакон 50 мкл калибратора и 50 мкл EFW реконституированного калибровочного образца концентрацией 25 МЕ/мл и объемом 33 мкл вносили в лунку A1 и далее проводили серию разведений 1:1,5, перенося по 33 мкл раствора из лунки A1 в лунку B1 и последующие до G1. Лунка H1 использовалась в качестве контроля, ввиду чего из лунки G1 удаляли 33 мкл раствора. Описанный метод разведения повторяли для лунок A2-H2.

Используя чистые одноразовые наконечники для каждого переноса, в соответствующие лунки в дублях вносили по 50 мкл контрольных и разведенных образцов с неизвестной концентрацией липополисахаридов. Добавляли аналогичный объем (50 мкл) растворенного LAL-реагента, при этом внося в лунки с контрольными образцами EFW вместо реагента.

Закрытый микропланшет инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации спектрофотометром измеряли оптическую плотность (ОП) в лунках при длине волны 405 нм. В случае, если значения ОП для калибровочных образцов с концентрациями 10 и 4 МЕ/мл отличались более чем на 10%, инкубацию микропланшета продолжали еще в течении 5 минут. Если же различие ОП калибровочных образцов с концентрациями 10 и 4 МЕ/мл составляло менее 10%, реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-реагента 1х, сохраняя при этом последовательность и скорость внесения LAL-реагента. Для смешивания раствора в лунках и устранения воздушных пузырей аккуратно постукивали по держателю стрипов. Абсорбцию измеряли спектрофотометром Microplate Reader 680 (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм, следуя инструкциям производителя оборудования.

При интерпретации результатов вычисляли средние значения светопоглощения для дублей стандартных, контрольных и исследуемых образцов. В случае, когда индивидуальное значение абсорбции отличалось от соответствующего среднего значения более чем на 15%, результат считался сомнительным, а образец подвергался повторному анализу. Полученные для анализируемых образцов результаты учитывали только в том случае, если среднее значение поглощения нулевого стандартного образца при 405 нм оказывалось меньше 0,1 ОП, а среднее значение стандарта 10 ЕЭ/мл – больше 0,6 ОП. Построение калибровочной кривой осуществлялось с использованием соответствующего программного обеспечения. Для разведенных образцов полученные по калибровочной кривой значения концентрации эндотоксинов умножали на соответствующие коэффициенты разведения. При отсутствии обнаружения липополисахаридов в случае низкого их содержания в исследуемых образцах, значение концентрации принималось ниже 0,04 ЕМ/мл (минимально измеряемый уровень).

2.5. Статистическая обработка результатов клинических, молекулярно-генетических и количественных LAL-исследований

За основу принималась нулевая гипотеза H_0 , отвергающая влияние липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* на развитие деструктивных заболеваний пародонта. Альтернативная гипотеза H_1 предполагала участие липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* в развитии муко-пародонтальных поражений.

Для проведения статистического анализа использовался пакет программ Statistica 10 (StatSoft Russia). Ввиду малого объема выборки, не позволяющего оценить нормальность распределения данных, использовалась непараметрическая статистика, как независимая от распределения и влияния отклонений.

Для проверки гипотез применялся ранговый корреляционный анализ Спирмена, позволяющий оценить степень взаимосвязи параметров. Корреляция считалась статистически значимой при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Результаты клинической характеристики пациентов

Из общей выборочной совокупности (30 человек) диагноз хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести имели 10 пациентов (33%), средней степени тяжести – 20 пациентов (67%). Из них 7 человек (23%) обратились за помощью впервые, 23 человека (77%) – ранее обследовались и проходили курс лечения не менее раза в год.

Для решения поставленных задач у обследуемых пациентов были определены основные клинические проявления заболевания. Общее количество клинических проявлений у обследуемых пациентов изменялось в количестве от пяти до десяти по мере ухудшения клинической картины (рисунок 1).



Рисунок 1 – Распределение клинических проявлений пародонтита у обследуемых пациентов в выборке

Легкая степень тяжести пародонтита характеризовалась стоматологическими жалобами на болезненность десен, зуд и жжение,

наличием зубного налета и наддесневого зубного камня, венозной гиперемией десен с проявлениями кровоточивости. Глубина клинического кармана не превышала 3,5 мм, а длина обнаженной поверхности зубного корня – 1/3. Глубина воспалительного процесса (проба Шиллера-Писарева) оценивалась от 2,0 до 2,3 баллов.

Ухудшение клинической картины сопровождалось гипертрофией десен, их венозной гиперемией, углублением пародонтальных карманов, увеличением длины обнаженной поверхности зубного корня, а также появлением поддесневого зубного камня и патологической подвижности зубов. Проба Шиллера-Писарева оценивалась от 4,0 до 4,8 баллов.

У пациентов с наиболее тяжелой клинической картиной отмечалось появление жалоб на сухость полости рта. Глубина пародонтальных карманов достигала 5,5 мм, поверхность зубного корня обнажалась на 1/2 длины. Патологическая подвижность зубов достигала второй степени, а проба Шиллера-Писарева – 5 баллов. Ни у одного из обследуемых пациентов не наблюдалось гнойного экссудата в пародонтальных карманах (таблица 2, рисунок 2).

Таблица 2 – Распределение клинических проявлений пародонтита у обследуемых пациентов в выборке

Степень тяжести пародонтита	Кол-во клин. проявлений	Проба Шиллера - Писарева (баллов)	Глубина клин. карманов (мм)	Обнаженная пов. зубного корня	Патол. подвиж. зубов (степень)	Кол-во пациентов (человек)
Легкая степень	5 - 7	2,0 - 2,3	<3,5	<1/3	-	10
Средняя степень	9	4,0 - 4,8	3,5 - 5,5	1/3 - 1/2	I - II	8
Средняя степень	10	4,2 - 5,0	≤5,5	<1/2	II	12

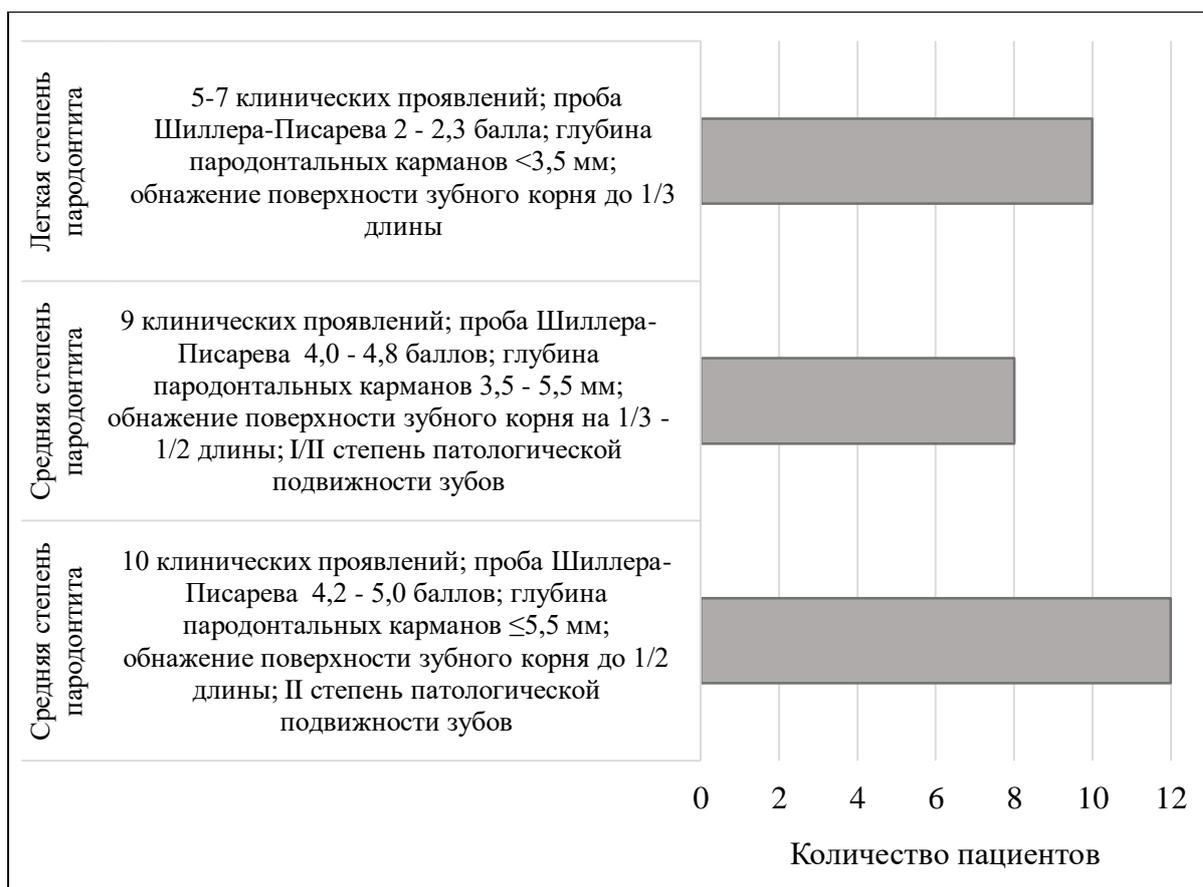


Рисунок 2 – Распределение клинических проявлений пародонтита у обследуемых пациентов в выборке

Таким образом, из 10 исследуемых признаков заболевания у пациентов с легкой степенью пародонтита отмечалось от пяти до семи клинических проявлений, у пациентов со средней степенью тяжести – 9-10 клинических признаков. При этом наблюдалось увеличение числовых показателей дифференцируемых признаков по мере ухудшения клинической картины.

3.2. Результаты оценки стоматологического статуса пациентов

Состояние тканей пародонта обследуемых пациентов оценивалось при помощи гигиенических (ОHI-S, NYG) и пародонтальных (PI, SBI, CAL) индексов для определения глубины поражения и учета корреляции с детектированными пародонтопатогенами.

Согласно упрощенному индексу гигиены Грина-Вермиллиона (ОHI-S) пациенты с легкой степенью тяжести пародонтита имели хороший и средний уровень гигиены полости рта (0,6 – 1,0). У пациентов с пародонтитом средней степени тяжести уровень гигиены оценивался как средний и плохой (1,2 – 2,5) (рисунок 3). Медианное значение индекса ОHI-S выборки составило 1,6. Стандартное отклонение достигало 0,7 (рисунок 4).

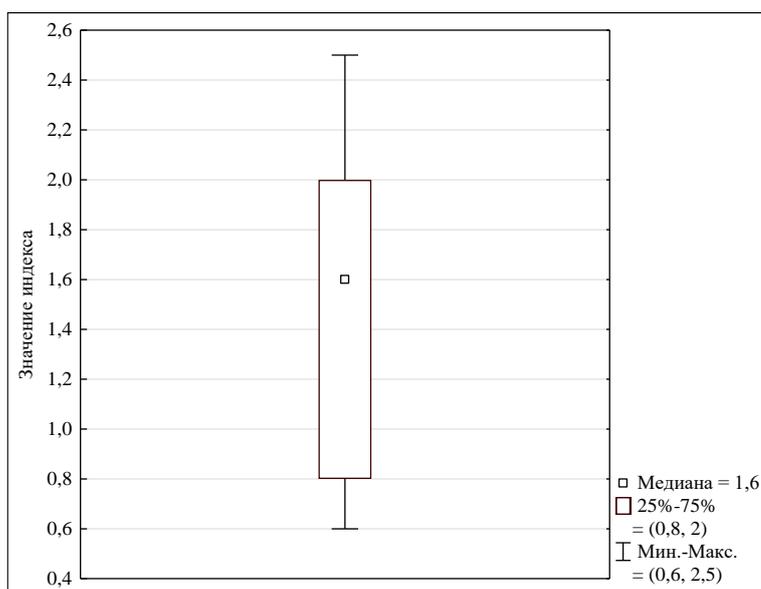
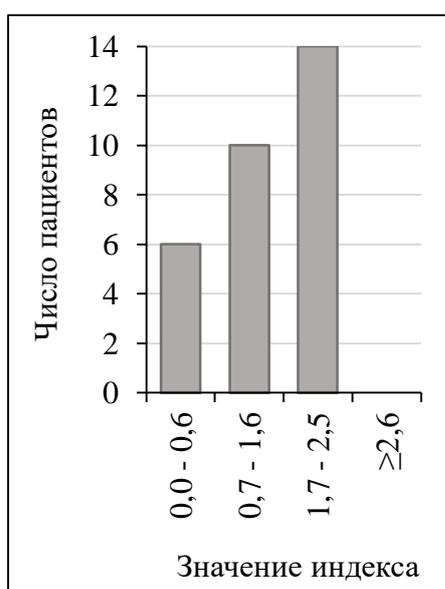


Рисунок 3 – Категориальная оценка выборки по индексу ОHI-S

Рисунок 4 – Изменчивость значений индекса ОHI-S

Примечание:

0,0 – 0,6 – хороший уровень гигиены;

0,7 – 1,6 – средний уровень гигиены;

1,7 – 2,5 – плохой уровень гигиены;

≥2,6 – очень плохой уровень гигиены.

Интердентальный гигиенический индекс (HYG) выявил разброс значений от 0,8 (76%) при легком течении заболевания до 0,2 (20%) при пародонтите средней степени тяжести. Медианное значение равнялось 0,3, стандартное отклонение – 0,2 (рисунок 5, 6).

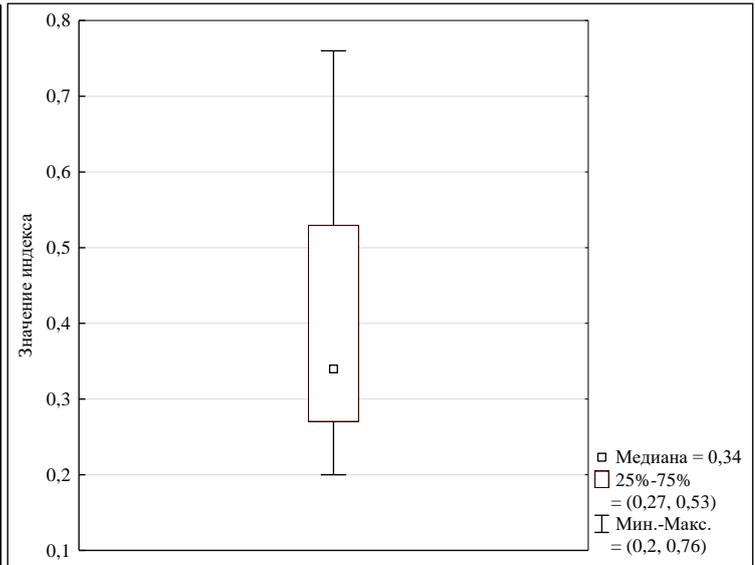
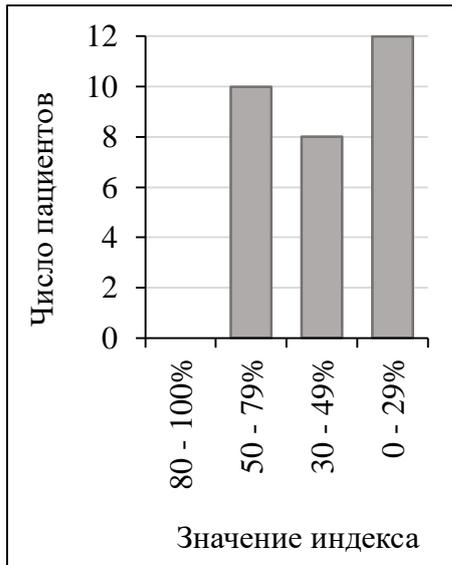


Рисунок 5 – Категориальная оценка выборки по индексу НУГ

Рисунок 6 – Изменчивость значений индекса НУГ

Примечание:

80 – 100% – оптимальная гигиена полости рта;

50 – 79% - удовлетворительная гигиена полости рта, отсутствие риска появления кариеса и патологии пародонта;

50 – 49% – удовлетворительная гигиена полости рта, риск появления кариеса и патологии пародонта;

0 – 29% – неудовлетворительная гигиена полости рта, рекомендуется проведение контроля до установления значения НУГ не менее 30%.

Пародонтальный индекс Рассела (PI) варьировался от 0,3 (легкая степень пародонтита) до 4,0 (средняя степень). Медиана составила 1,6, стандартное отклонение равнялось 1,1 (рисунок 7, 8).

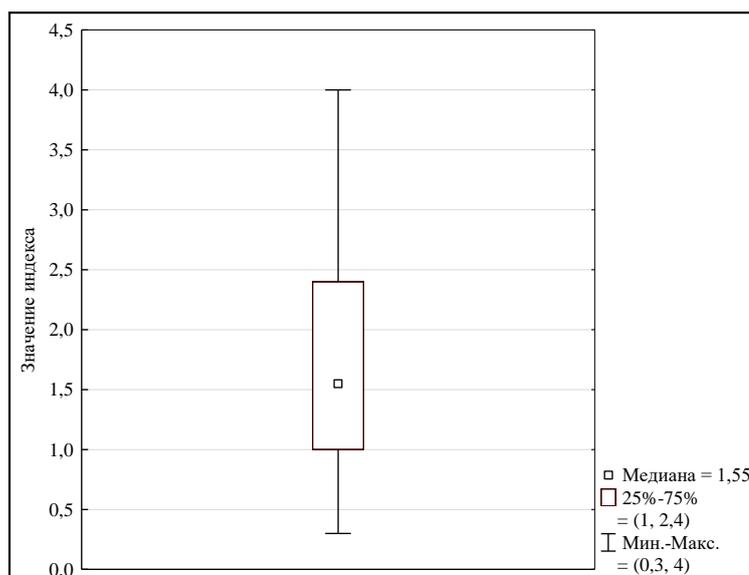
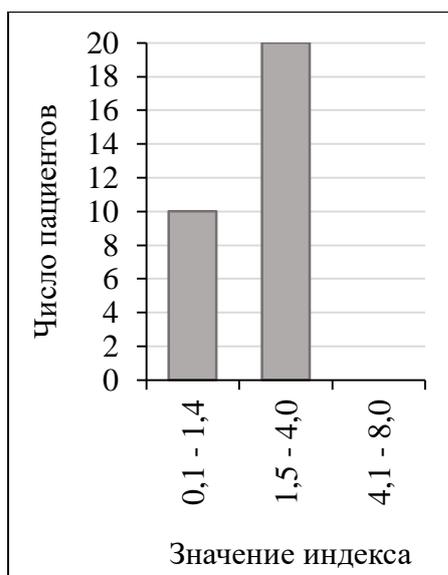


Рисунок 7 – Категориальная оценка выборки по индексу РІ

Рисунок 8 – Изменчивость значений индекса РІ

Примечание:

0,1 – 1,0 – начальная и первая стадии заболевания;

1,5 – 4,0 – наличие деструктивных изменений, характерных для второй стадии заболевания;

4,1 – 8,0 – третья стадия заболевания.

Индекс кровотоковости Мюллемана в модификации Коуэлла (SBI) выявил легкую степень воспаления тканей пародонта у 10 пациентов (33%) и среднюю степень воспаления у 20 пациентов (67%). Медианное значение соответствовало 2,7, стандартное отклонение – 0,7 (рисунок 9, 10).

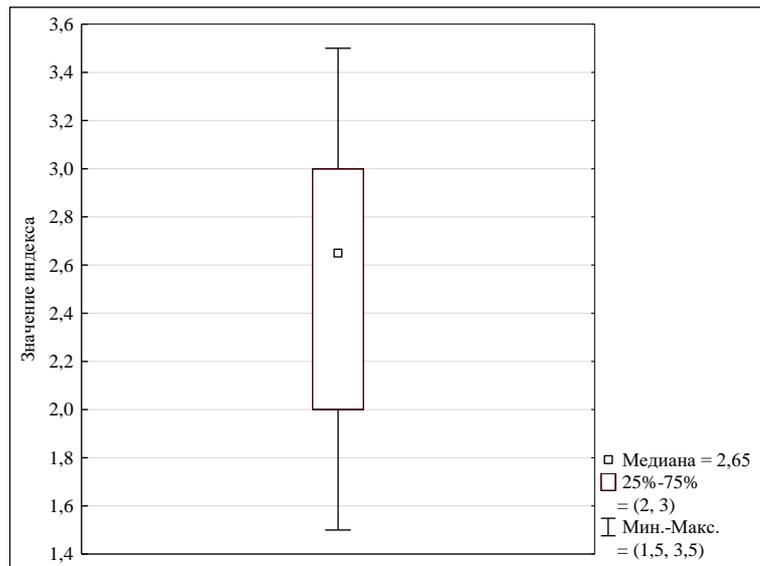
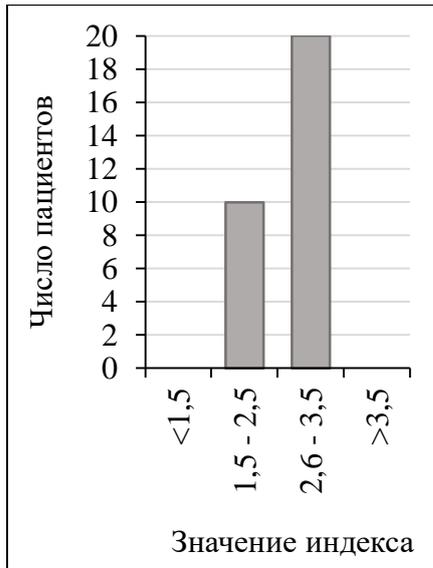


Рисунок 9 – Категориальная оценка выборки по индексу SBI

Рисунок 10 – Изменчивость значений индекса SBI

Примечание:

- <1,5 – воспаление отсутствует;
- 1,5 – 2,5 – легкая степень воспаления;
- 2,6 – 3,5 – средняя степень воспаления;
- >3,5 – тяжелая степень воспаления.

Индекс клинической потери привязанности (CAL) оценил деструктивные изменения в тканях пародонта легкой степени в диапазоне от 1,5 мм до 2,0 мм и умеренной степени в диапазоне от 2,5 мм до 4,0 мм. Медиана и стандартное отклонение составили 3,0 и 0,9 соответственно (рисунок 11, 12).

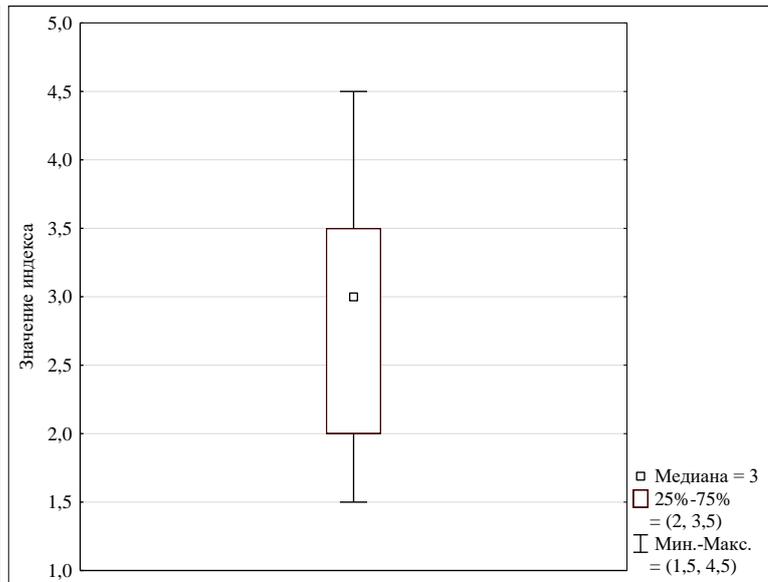
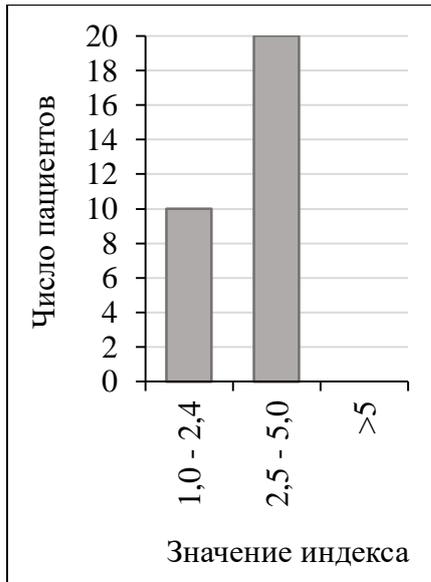


Рисунок 11 – Категориальная оценка выборки по индексу CAL

Рисунок 12 – Изменчивость значений индекса CAL

Примечание:

- 1,0 – 2,4 – легкая степень деструктивных изменений пародонта;
- 2,5 – 5,0 – умеренная степень деструктивных изменений пародонта;
- >5 – тяжелая степень деструктивных изменений пародонта.

Комплексная индексная оценка состояния полости рта пациентов позволила определить масштаб патологического процесса и зафиксировать стоматологический статус пациентов для дальнейшего анализа и математической обработки данных.

3.3. Результаты молекулярно-генетического скрининга содержимого пародонтальных карманов пациентов

Согласно результатам ПЦР-исследования (набор «КОМПЛЕКС ДЕНТОСКРИН», ООО НПФ «Литех») в содержимом пародонтальных карманов обследуемых пациентов были обнаружены ДНК шести пародонтопатогенных бактерий (рисунок 13, 14).

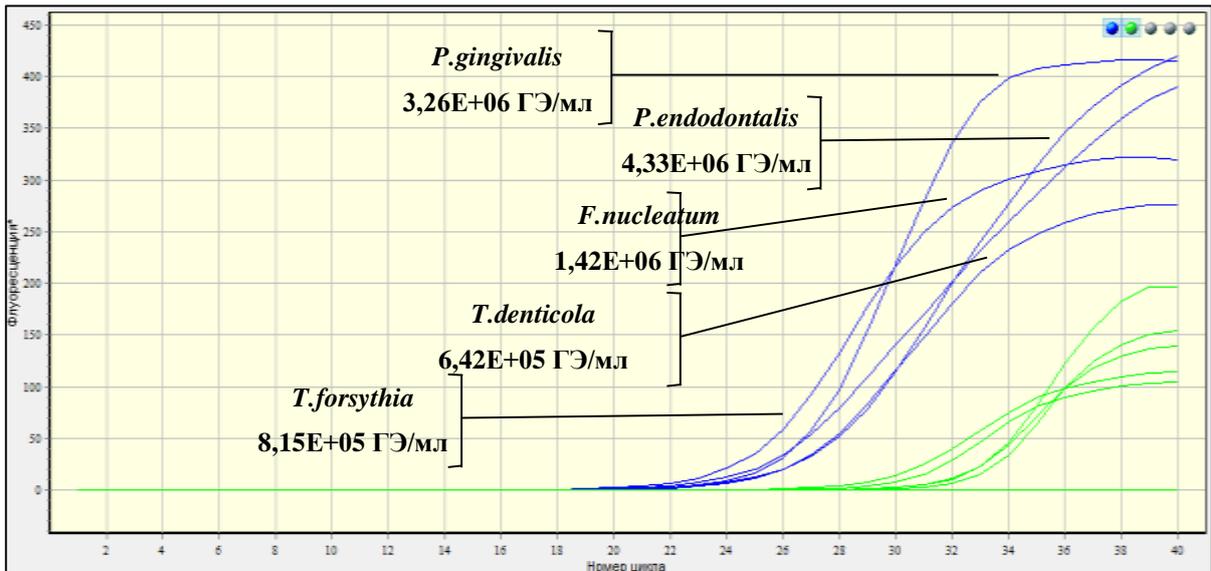


Рисунок 13 – Кривые амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенных видов *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticolla*

Примечание: синий цвет кривых амплификации соответствует каналу детекции флуоресценции FAM, зеленый цвет - соответствует каналу детекции флуоресценции NheX. Положительными признавались образцы с детекцией флуоресценции по каналу FAM или по обоим каналам одновременно

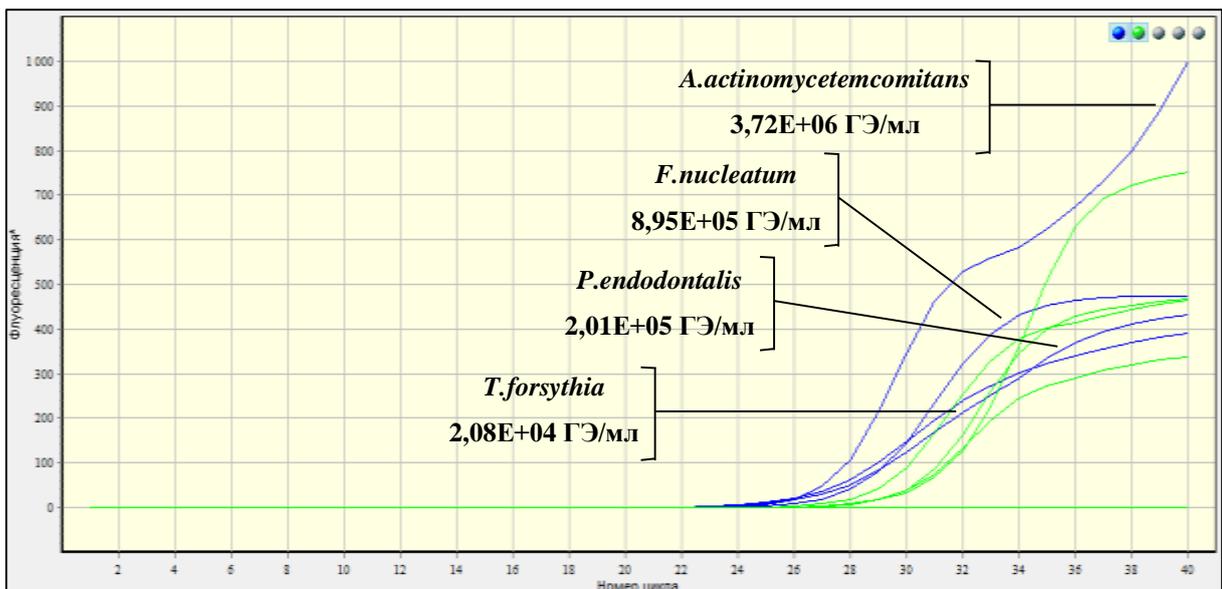


Рисунок 14 – Кривые амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенных видов *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*

Примечание: синий цвет кривых амплификации соответствует каналу детекции флуоресценции FAM, зеленый цвет - соответствует каналу детекции флуоресценции Hex. Положительными признавались образцы с детекцией флуоресценции по каналу FAM или по обоим каналам одновременно

ДНК *Porphyromonas endodontalis* была выявлена в 57% случаев (17 пациентов), а *Porphyromonas gingivalis* – в 53% случаев (16 пациентов). На долю *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Treponema denticola* пришлось 7% (по 2 пациента) и 47% (14 пациентов) соответственно. Частота встречаемости *Fusobacterium nucleatum* и *Tannerella forsythia* составила равный процент случаев – 33% (10 пациентов). ДНК *Prevontella intermedia* не была обнаружена ни в одном из образцов (рисунок 15).

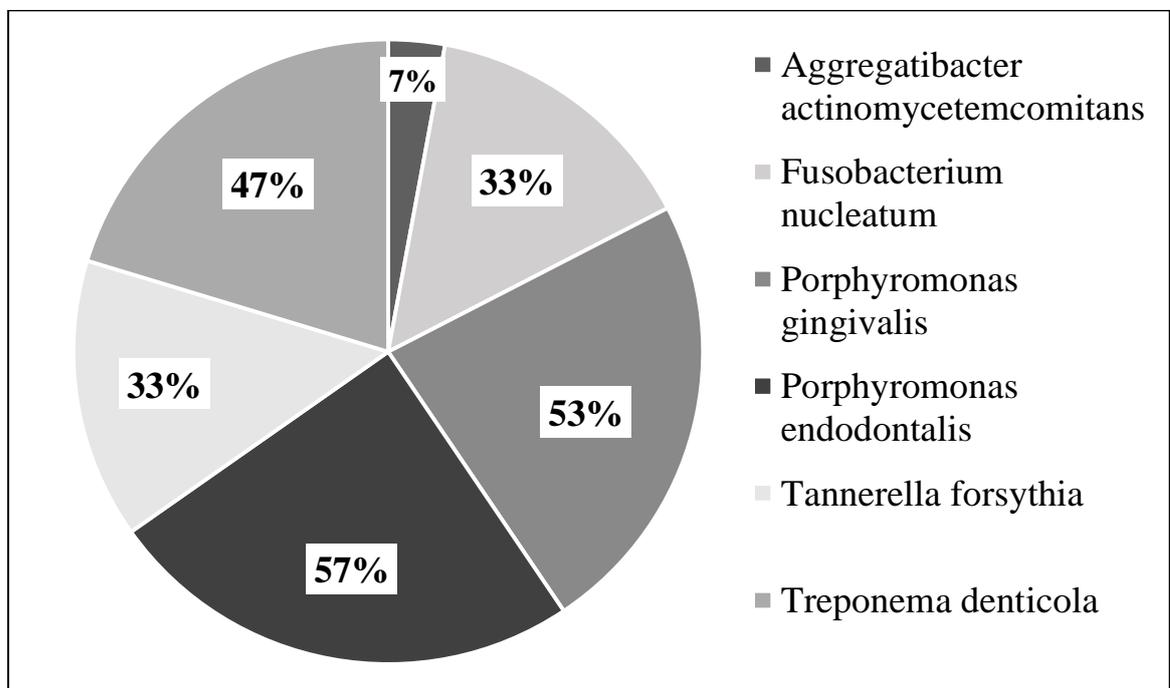


Рисунок 15 – Встречаемость пародонтопатогенов у обследуемых пациентов

Для пациентов, имеющих среднюю степень тяжести пародонтита, было характерно выявление комплекса пародонтопатогенных бактерий, в то время как в образцах пациентов с легкой степенью заболевания отмечались исключительно единичные виды, такие как *P.endodontalis*, *F.nucleatum*, *T.denticola*. У шести пациентов с легкой степенью тяжести искомые пародонтопатогены не были выявлены.

Наиболее часто встречаемым комплексом возбудителей заболеваний пародонта оказалось сочетание *P.gingivalis*, *P.endodontalis* и *T.denticola* (11 случаев, 37%), с присоединением к нему в 13% случаев (по 4 пациента) *T.forsythia* или *F.nucleatum*, а также обоих видов одновременно в 7% случаев (2 пациента). В 13% (4 случая) идентифицирована только ДНК *P.gingivalis*.

P.endodontalis была обнаружена в комплексе с *T.denticola* и *T.forsythia* в 27% случаев (8 обследуемых), аналогичный процент составила встречаемость данного вида микроорганизма с *F.nucleatum*. Единожды (3%) было выявлено сочетание *P.endodontalis* и *A.actinomycetemcomitans*, комбинация *P.gingivalis* с *A.actinomycetemcomitans* не была обнаружена (рисунок 16).

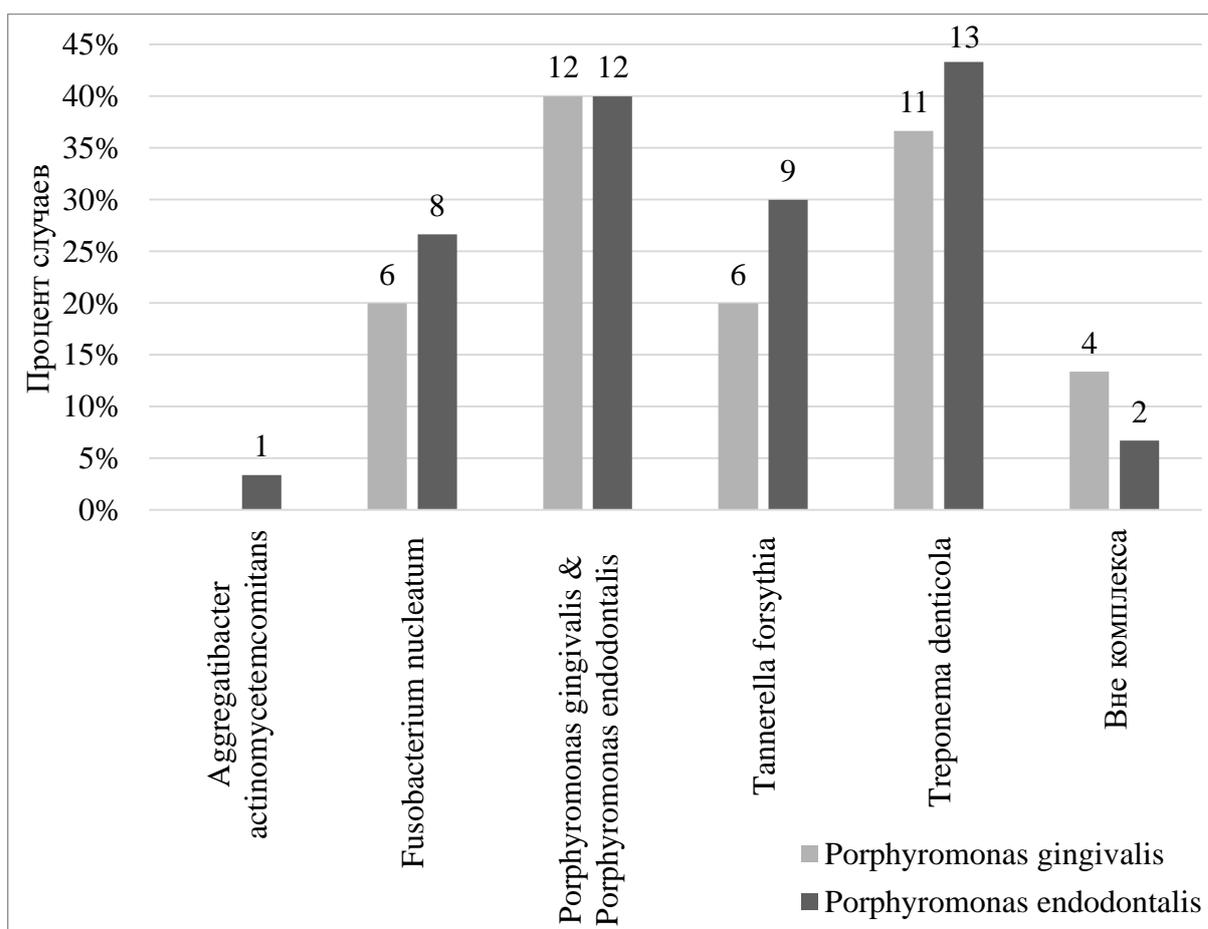


Рисунок 16 – Частота сочетания *Porphyromonas endodontalis* и *Porphyromonas gingivalis* с исследуемыми пародонтопатогенами

Таким образом, можно отметить, что *P.endodontalis* детектирована у пациентов как с легкой, так и со средней степенью тяжести заболевания, тогда как *P.gingivalis* только у пациентов со средней степенью. *P.endodontalis* обнаружена в сочетании со всеми исследуемыми пародонтопатогенами в различных вариантах. *P.gingivalis* не обнаружена в сочетании с *A.actinomycetemcomitans*. Сочетание пародонтопатогенов максимально достигало пяти видов. Просматривалась тенденция одновременного обнаружения у одного и того же пациента *P.gingivalis* и *P.endodontalis* (40% случаев, 12 пациентов).

3.4. Результаты бактериологического посева содержимого пародонтальных карманов пациентов

По результатам бактериологического исследования на колумбийским агаре с 5% бараньей кровью, желточно-солевым агаре Чистовича, среде Сабуро и дифференциально-диагностической среде Эндо на третьи сутки культивирования из содержимого пародонтальных карманов обследуемых пациентов были выделены представители нормальной микрофлоры слизистой оболочки ротовой полости человека *Candida albicans* и непатогенные виды *N.mucosa*, *N.flava*, *N.perflava* в количестве, не превышающем нормальных показателей (10^2 - 10^3 КОЕ/мл). Тем не менее, следует отметить, что выделение *Neisseria* spp. из содержимого пародонтальных карманов свидетельствует об остром серозном воспалении, протекающим с вовлечением тканей периодонта.

В количестве 10^2 - 10^5 КОЕ/мл были выделены *Streptococcus* spp. видов *S.mitis*, *S.oralis*, *S.sanguinis* и *S.gordonii*, относящиеся к «желтому» комплексу пародонтальных микроорганизмов и обладающие наименьшим патогенным потенциалом. Имея высокое сродство к молекулам находящейся на поверхности зубов слюнной пленки, данные виды микроорганизмов способны быстро колонизировать чистые поверхности зубов, выступая первичными колонизаторами пародонтальной среды и в совокупности составляя высокий процент (до 70%) бактериальной биопленки поверхности зубов (зубной налет). Данное сочетание микроорганизмов образует субстрат прикрепления для более поздних колонизаторов поверхности зубов и способно модулировать патогенность основных возбудителей заболеваний пародонта через механизмы межвидовой коммуникации.

Среди представителей непостоянной микрофлоры полости рта, встречающихся довольно редко и не у всех обследуемых (3 пациента), были обнаружены виды энтеробактерий *Escherichia coli* и *Serratia liquefaciens* в количестве 10^3 КОЕ/мл, которых в нормальном состоянии в составе

микрофлоры ротовой полости быть не должно, что, предположительно, обусловлено нарушением физиологического состояния полости рта, так как представители непостоянной (транзиторной) флоры задерживаются в ней, размножаясь и вызывая патологические процессы.

Из образцов биологического материала трех пациентов с пародонтитом средней степени тяжести в количестве 10^2 КОЕ/мл были выделены такие условно-патогенные микроорганизмы как *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus parainfluenzae*. В литературных источниках отмечена способность гемофильной палочки к коагрегации с представителями рода *Treponema*, что обуславливает непрямую адгезию данных бактерий, не имеющих собственных факторов прикрепления, на эпителиоцитах и зубных поверхностях и обеспечивает колонизацию пелликулы, способствуя тем самым развитию зубной бляшки.

Увеличением времени инкубации произведенных посевов содержимого пародонтальных карманов пациентов с трех до пяти суток в CO_2 -инкубаторе, на колумбийском агаре с содержанием 5% бараньей крови удалось получить культуры анаэробных микроорганизмов (рисунок 17, 18).

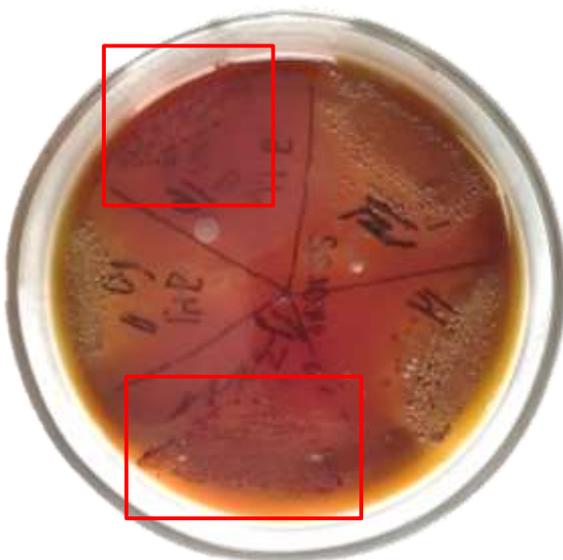


Рисунок 17 – Культуры анаэробных бактерий, полученные на кровяном агаре

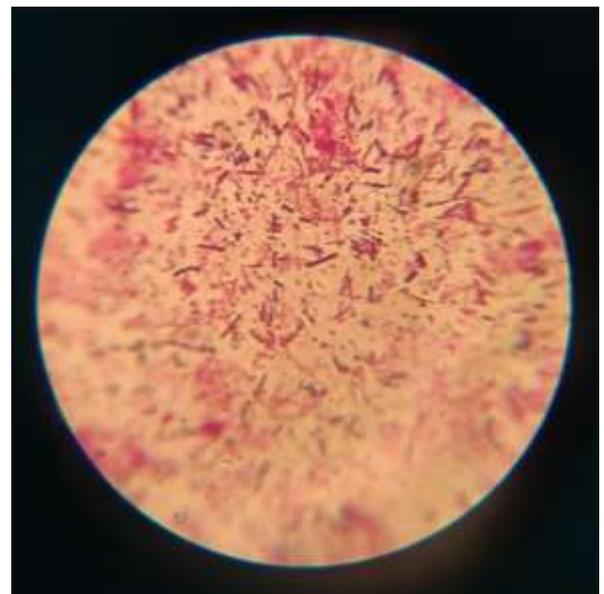


Рисунок 18 – Смешанная культура микроорганизмов. Окраска по Граму

Примечание: красным цветом выделены
темнопигментированные колонии

Идентификацию выделенной чистой культуры темнопигментированной анаэробной грамотрицательной неподвижной палочки при помощи масс-спектрометра MALDI-TOF VITEK MS (BIOMERIEUX, Россия) и биохимических тестов произвести не удалось (рисунок 19, 20).



Рисунок 19 – Рост

темнопигментированной культуры
на пятые сутки культивирования

Рисунок 20 – Рост

темнопигментированной культуры
на седьмые сутки культивирования

Согласно результатам молекулярно-генетического ПЦР-исследования выделенная чистая культура относилась к *Fusobacterium nucleatum*, которому, однако, отводится меньшая роль в развитии деструктивных заболеваний пародонта по сравнению с так называемым «красным» комплексом парадонтопатогенов (рисунок 21).

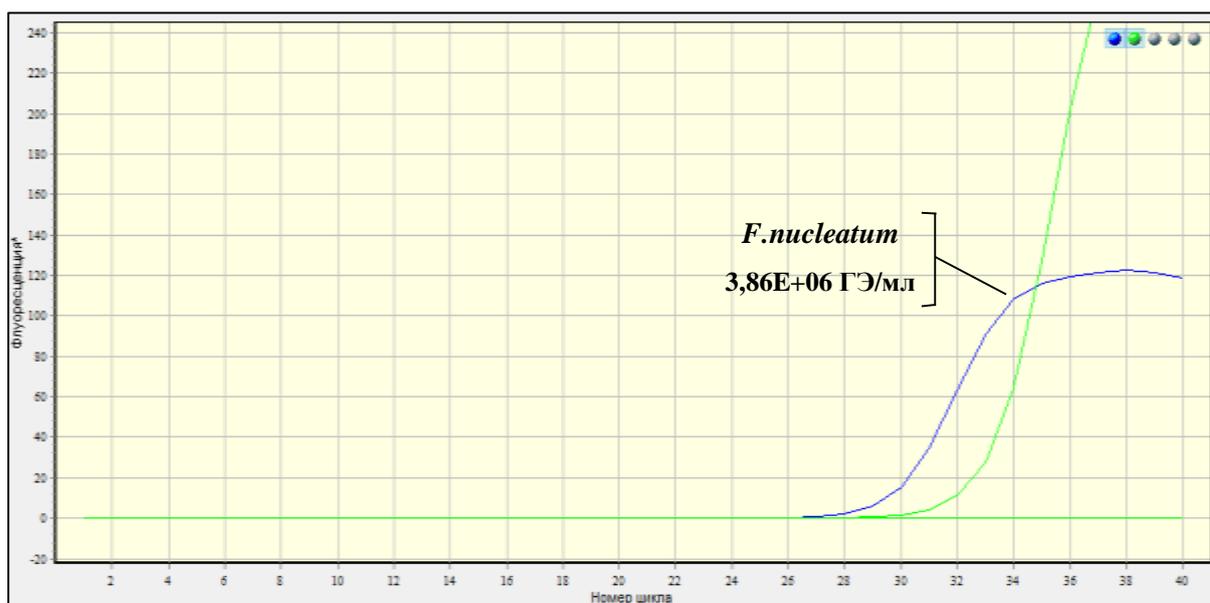


Рисунок 21 – Кривая амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Fusobacterium nucleatum*

Примечание: синий цвет кривых амплификации соответствует каналу детекции флуоресценции FAM, зеленый цвет - соответствует каналу детекции флуоресценции Hex. Положительными признавались образцы с детекцией флуоресценции по каналу FAM или по обоим каналам одновременно

В ходе дальнейшего исследования, учитывая полученные результаты (отсутствие колоний *P.gingivalis* и *P.endodontalis*, несмотря на наличие в образцах ДНК искомым пародонтопатогенов) и данные литературных источников, было решено изменить условия культивирования искомым пародонтопатогенов. Для этого выбрали следующие питательные среды: готовый питательный ГРМ-агар для бруцелл и бруцеллагар производства Оболенск, Московская область, служащий также основой для кровавого агара, готовый шоколадный агар, сборная среда HiMedia бруцеллагар, а также агаризованные сердечно-мозговой бульон (ВНІ-Broth, HiMedia), дагестанский эритрит-бульон (Махачкала, Республика Дагестан) и питательный бульон для бруцелл (Оболенск, Московская область). Учитывая особенности, необходимые для культивирования *P.gingivalis* и *P.endodontalis*, в питательные среды были внесены селективные добавки черный альбумин и менахинон (витамин K2). В результате на бруцеллагаре

(производства Оболенск, Московская область) с добавленными черным альбумином и витамином К2 удалось получить мелкие округлые слизистые темнопигментированные колонии, схожие с описанными в литературных источниках для *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* (рисунок 22). Для подтверждения результата, провели ПЦР-исследование полученных колоний, где детектировали ДНК *P.gingivalis* (рисунок 23).



Рисунок 22 – Темнопигментированные колонии на бруселлагаре (Оболенск, Московская область) на пятые сутки культивирования

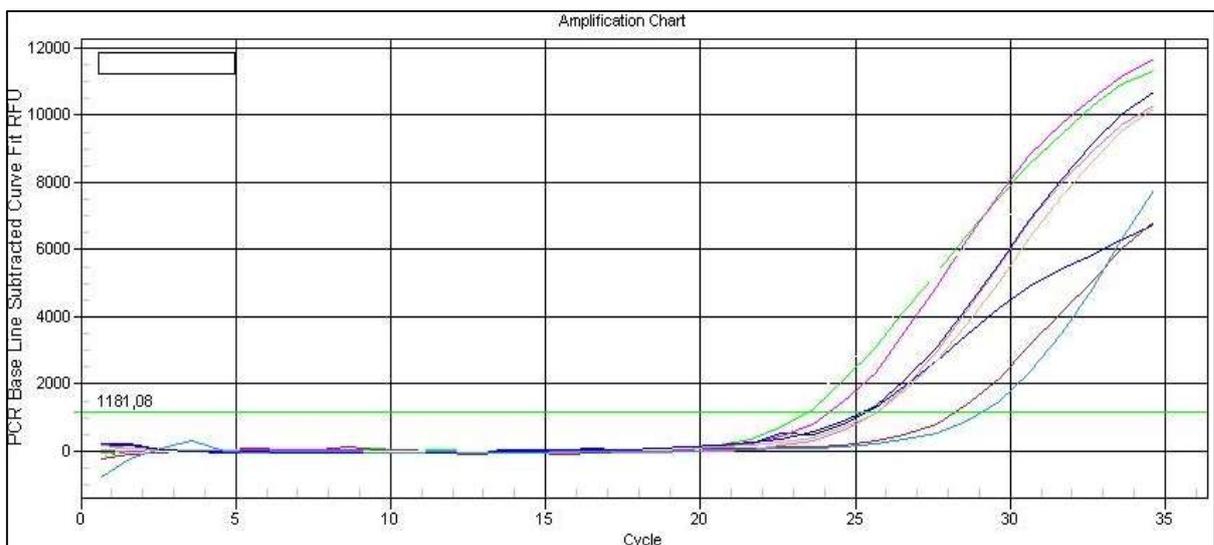


Рисунок 23 – График амплификации участков генов 16S рРНК пародонтопатогенного вида *Porphyromonas gingivalis* образцов темнопигментированных колоний, полученных на бруцеллагаре (Оболенск, Московская область)

Вопреки ожиданиям, на кровяном агаре, основой для которого послужил тот же бруцеллагар, не были получены подобной картины (рисунок 25). На других питательных средах (шоколадный агар, агар с сердечно-мозговой вытяжкой, сборная среда HiMedia бруцеллагар, дагестанский эритрит-агар и питательный ГРМ-агар для бруцелл (Оболенск, Московская область)) также не были обнаружены характерные пигментированные колонии (рисунок 24, 26, 27, 28, 29), что подтвердили ПЦР-исследованием – в полученных колониях не было выявлено ДНК исследуемых микроорганизмов.



Рисунок 24 – Результат



Рисунок 25 – Результат

культивирования на шоколадном агаре культивирования на кровяном агаре



Рисунок 26 – Результат культивирования на сборной среде HiMedia бруцеллагар



Рисунок 27 – Результат культивирования на агаре с сердечно-мозговой вытяжкой (BHI-Agar, HiMedia)

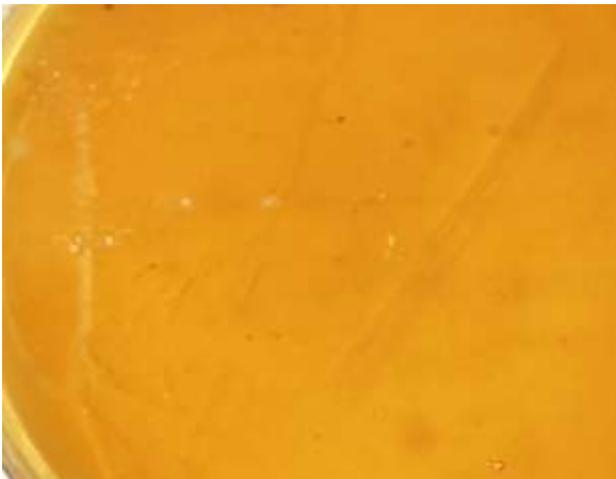


Рисунок 28 – Результат культивирования на эритрит-агаре (Махачкала, Респ. Даг.)

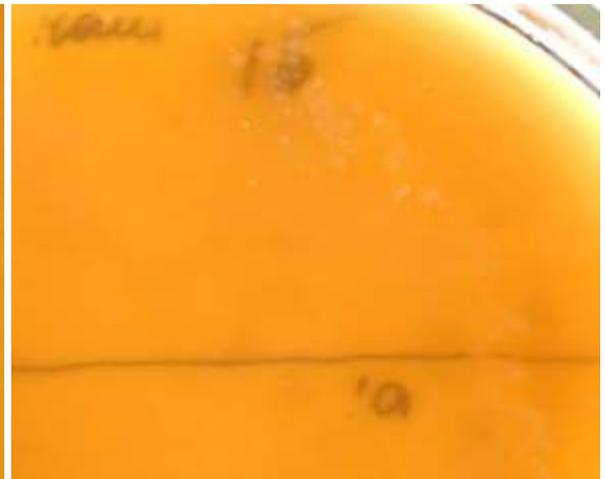


Рисунок 29 – Результат культивирования на питательном ГРМ-агаре для бруцелл (Оболенск, Московская область)

На основании полученных результатов для пересева смешанных культур и дальнейшего выделения чистых культур *P.gingivalis* и *P.endodontalis* используем бруцеллагар (производства Оболенск,

Московская область) с добавлением черного альбумина и менахинона (витамин К2).

3.5. Результаты количественного LAL-исследования содержимого пародонтальных карманов пациентов

Для выполнения поставленной в дипломной работе задачи №5 (количественное LAL-исследование образцов чистых культур *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*), учитывая трудность в ходе исследования выделения чистой культуры *P.gingivalis* и *P.endodontalis* и выделения из нее липополисахарида, использовали LAL-тест. При проведении количественного LAL-теста содержимого пародонтальных карманов пациентов набором реагентов Limulus Amebocyte Lysate (Nycult Biotech, США) не было зафиксировано превышение минимально регистрируемого значения (0,04 МЕ/мл) у пациентов с диагнозом хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (10 человек). Наиболее высокие концентрации ЛПС обнаружены в неразбавленных образцах биологического материала пациентов со средней степенью заболевания: концентрация ЛПС достигала предельных значений (10 МЕ/мл) и равнялась 9,64 МЕ/мл. Минимальное значение концентрации ЛПС составило 1,99 МЕ/мл в исследуемых образцах.

При 100 - кратном и 10 000 - кратном разведении образцов ЛПС продолжал обнаруживаться в диапазоне от 0,85 до 7,29 и от 0,2 до 5,21 соответственно.

Медианное значение концентрации ЛПС неразбавленных образцов составило 5,1 МЕ/мл. В разбавленных образцах медиана имела значение 1,63 МЕ/мл для 100 - кратного разведения и 0,13 МЕ/мл для 10 000- кратного разведения. Величины стандартных отклонений концентрации ЛПС в образцах составили 3,5, 2,2, 1,4 для соответствующих разведений (рисунок 30).

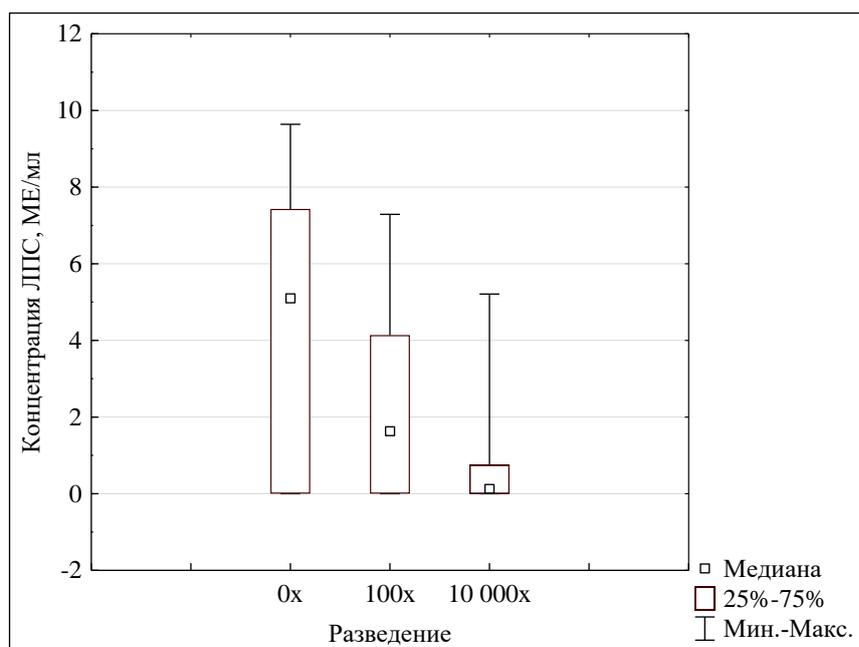


Рисунок 30 – Изменчивость концентрации ЛПС при 0х, 100х и 10 000х разведении клинических образцов

Таким образом, наиболее высокие концентрации ЛПС в образцах были характерны для пациентов с пародонтитом средней степени тяжести.

3.6. Определение роли липополисахарида по результатам статистической обработки клинических, молекулярно-генетических и количественных показателей ЛПС LAL-исследования

Ранговый корреляционный анализ результатов ПЦР-исследования и LAL-теста выявил статистически значимую умеренную корреляцию (по шкале Чеддока [23]) между количеством ЛПС и концентрациями ДНК *A.actinomycetemcomitans* ($R=0,45$, $p=0,01$), *T.forsythia* ($R=0,35$, $p=0,05$), *T.denticola* ($R=0,47$, $p=0,01$) и заметную корреляцию с *P.gingivalis* ($R=0,58$, $p=0,00$) и *P.endodontalis* ($R=0,53$, $p=0,00$) (таблица 3).

Таблица 3 – Корреляции количества липополисахарида и концентрации ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов

	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
R	0,45	0,35	0,53	0,58	0,35	0,47
p	=0,0132	=0,0555	=0,0027	=0,0006	=0,0510	=0,0096

Примечание: p – уровень статистической значимости корреляций количества ЛПС & концентрации ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов в образцах по Спирмену

Вышеуказанное позволяет предположить, что высокие концентрации ЛПС в образцах в большей степени обуславливают *P.gingivalis* и *P.endodontalis*.

Сравнительный анализ пародонтопатогенов и упрощенного индекса гигиены полости рта Грина-Вермиллиона (ОИ-S), учитывающего индексы зубного налета и зубного камня, обнаружил прямую статистически значимую зависимость со следующими микроорганизмами: *P.gingivalis* (R=0,93, p=0,00), *P.endodontalis* (R=0,61, p=0,00), *T.forsythia* (R=0,38, p=0,04), *T.denticola* (R=0,67, p=0,00) (таблица 4).

Таблица 4 – Корреляции концентрации ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов и оценками индекса ОИ-S

	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
R	-0,12	0,24	0,61	0,93	0,38	0,67
p	=0,5152	=0,2042	=0,0004	=0,0000	=0,0403	=0,0001

Примечание: p – уровень статистической значимости корреляций концентрации ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов в образцах & оценками индекса ОИ-S по Спирмену

Обратная статистически значимая зависимость выявилась между interdentalным гигиеническим индексом (HYG), фиксирующем

свободные от зубных отложений межзубные поверхности, и теми же видами патогенов: *P.gingivalis* ($R=-0,90$, $p=0,00$), *P.endodontalis* ($R=-0,61$, $p=0,00$), *T.forsythia* ($R=-0,40$, $p=0,03$), *T.denticola* ($R=-0,70$, $p=0,00$) (таблица 5).

Таблица 5 – Корреляции концентрации ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов и оценками индекса NYG

	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
R	0,09	-0,26	-0,61	-0,90	-0,40	-0,70
p	=0,6263	=0,1609	=0,0004	=0,0000	=0,0284	=0,0000

Примечание: p – уровень статистической значимости корреляций концентрации ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов в образцах & оценками индекса NYG по Спирмену

Важно отметить, что *P.gingivalis*, *T.forsythia*, *T.denticola* образуют коммуникативную систему так называемого «красного» комплекса пародонтопатогенов, характеризующегося специфическим агрессивным воздействием на пародонт. *P.endodontalis* мало описан в научной литературе и является актуальным объектом настоящих исследований в области изучения этиологии пародонтита, однако *P.endodontalis* является родственным видом *P.gingivalis* и в 57% (12-ти образцах из 21, обнаруживших *P.gingivalis* и/или *P.endodontalis*) встречался в сочетании с ним в исследуемых образцах (рисунок 16).

Весьма высокий коэффициент корреляции *P.gingivalis* ($R=0,93$, $R=-0,90$) может служить косвенным подтверждением особой роли *P.gingivalis* в ассоциации микроорганизмов «красного» комплекса.

При анализе взаимосвязи концентрации ЛПС и общего количества клинических проявлений, а также каждого из пародонтальных индексов (PI, SBI, CAL) выявилась статистически значимая корреляция ($p=0,00$).

Высокий корреляционный эффект, полученный при оценке влияния ЛПС на степень воспаления (индекс PI, $R=0,96$), кровоточивости (индекс SBI, $R=0,91$) и деструкции (индекс CAL, $R=0,84$) тканей пародонта, указывает на значительную роль ЛПС, обуславливающего патогенное действие грамотрицательных бактерий в процессе возникновения местной иммунной реакции организма (таблица 6).

Таблица 6 – Корреляции количества липополисахарида и показателями индексной диагностики

	Количество клинических проявлений	Индекс PI	Индекс SBI	Индекс CAL
R	0,68	0,96	0,91	0,84
p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Примечание: p – уровень статистической значимости корреляций ЛПС в образцах & количества клинических проявлений пародонтита, а также оценками пародонтальных индексов по Спирмену

Таким образом, полученное косвенное свидетельство участия ЛПС *P.gingivalis* и *P.endodontalis* в развитии муко-пародонтальных поражений позволяет отвергнуть нулевую гипотезу в пользу альтернативной:

- коэффициент корреляции ЛПС и *P.gingivalis* и *P.endodontalis* выше, чем с другими патогенами;
- более половины образцов (57%) с *P.gingivalis* и *P.endodontalis* обнаружили их содружество;
- значительная роль ЛПС в тяжести клинических проявлений пародонтита подтверждалась высоким коэффициентом корреляции ($R>0,9$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ отечественной и зарубежной литературы указывает на современность и значимость изучения роли липополисахаридов грамотрицательных бактерий в инициации и развитии хронических воспалительно-деструктивных процессов, поражающих опорные ткани зубов.

В ходе нашего исследования было отмечено, что по мере возрастания видового состава пародонтопатогенов в содержимом пародонтальных карманов наблюдалась тенденция увеличения концентрации липополисахаридов и отягощения клинических признаков заболевания. Среди патогенов «красного» комплекса, отвечающего за развитие хронической формы заболевания, обнаружено сообщество микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*, характерное для наиболее тяжелых проявлений пародонтита среди обследуемых пациентов. Вопрос роли *Porphyromonas endodontalis* в развитии муко-пародонтальных поражений представляет настоящий интерес, как малоосвещенный в научной литературе. При выполнении дипломной работы в результате подбора культуральных сред с внесением селективных добавок удалось получить колонии микроорганизмов, при детекции которых методом полимеразной цепной реакции обнаружено ДНК *Porphyromonas gingivalis*, однако вопрос получения чистых культур *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* остался открытым. На основании проведенного корреляционного анализа доказано существование взаимосвязи между числом липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* и степенью клинических проявлений заболевания.

Всестороннее изучение данной проблемы обеспечит разработку профилактических мер, направленных на предупреждение возникновения

деструктивных заболеваний пародонта и предотвращение их перехода в хроническую форму.

ВЫВОДЫ

1. По результатам ПЦР-исследования содержимого пародонтальных карманов 30 обследуемых пациентов ДНК *Porphyromonas gingivalis* была детектирована в 53% случаев (16 пациентов), *Porphyromonas endodontalis* – в 57% случаев (17 пациентов). В 40% случаев (12 пациентов) просматривалась тенденция образования содружества *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*. В комплекс с другими пародонтопатогенами *Porphyromonas gingivalis* вступал в 40% случаев (12 пациентов), а *Porphyromonas endodontalis* – в 50% (15 пациентов).

2. По результатам LAL-исследования среди 30 образцов содержимого пародонтальных карманов липополисахариды были обнаружены в 67% (20 пациентов). Медианное значение концентрации выделенных ЛПС неразбавленных образцов достигало 5,1 МЕ/мл, в разбавленных образцах – 1,63 МЕ/мл для 100 - кратного разведения и 0,13 МЕ/мл для 10 000- кратного разведения. Повышенная концентрация ЛПС наблюдалась в образцах с высоким количеством копий ДНК *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis*.

3. В результате статистической обработки полученных данных доказан высокий корреляционный эффект влияния липополисахаридов *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* на степень воспаления у пациентов (индекс PI, R=0,96), кровоточивости (индекс SBI, R=0,91) и деструкции тканей пародонта (индекс CAL, R=0,84), что характеризует значительную роль липополисахарида в развитие муко-пародонтальных поражений. Выделение чистых культур *Porphyromonas gingivalis* и *Porphyromonas endodontalis* и исследование чистых фракций их липополисахаридов на биологических экспериментальных моделях будет способствовать раскрытию данного вопроса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барер Г.М. (ред.) Терапевтическая стоматология: Учебник: в 3ч. Ч.2. Болезни пародонта / под ред. Г.М. Барера. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 224 с.
2. Блашкова С.Л. Диагностические критерии риска развития воспалительных заболеваний пародонта у лиц, находящихся на ортодонтическом лечении / С.Л. Блашкова, И.Г. Мустафин, Г.Р. Халиуллина // Пародонтология. – 2015. – Т. 20, № 3 (76). – С. 57-60.
3. Боровский Е.В. (ред.) Терапевтическая стоматология: Учебник для студентов медицинских вузов / под ред. Е.В. Боровский. – 2-е изд. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 840 с.
4. Гайсина Ю.Р. Эндотоксинемия и влияние микробных липополисахаридов на систему гемостаза у женщин с бактериальным вагинозом / Ю.Р. Гайсина, Ю.А. Ахмадуллина, А.Ж. Гильманов, А.Р. Мавзютов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 155-159.
5. Грудянов А.И. Заболевания пародонта / А.И. Грудянов. – М.: МИА, 2009. – 331 с.
6. Губайдуллин А.Г. Особенности патогенеза заболеваний пародонта, вызванных *Porphyromonas gingivalis* / А.Г. Губайдуллин, М.М. Туйгунов, А.К. Булгаков, Т.А. Савченко // Медицинский вестник Башкортостана. – 2015. – Т. 10, № 5 (59). – С. 108-110
7. Гуляева О.А. Современные методы в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта: Монография / О.А. Гуляева, Р.Т. Буляков, Л.П. Герасимова, Т.С. Чемикосова. – Уфа: Изд-во «УралПолиграфСнаб», 2016. – 190 с.
8. Дмитриева Л.А. (ред.) Современные аспекты клинической пародонтологии / под ред. Дмитриевой Л.А. – М.: МЕДпресс, 2001. – 128 с.

9. Дунызина Т.М. Современные методы диагностики заболеваний пародонта: Метод. Пособие / Т.М. Дунызина, Н.М. Калинина, И.Д. Никифорова. – СПб.: С.-Петербург. ин-т стоматологии, 2001. – 47 с.: ил..
10. Иванов В.С. Заболевания пародонта: Учебное пособие / В.С. Иванов, В.П. Почивалин, Е.В. Иванова, Е.Г. Сабанцева, Т.В. Басова, Е.Г. Ежова, В.В. Ломагин. – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2017. – 94 с.
11. Калашникова С.А. Использование бактериального липополисахарида для моделирования патологических процессов в медико-биологических исследованиях. Обзор литературы / С.А. Калашникова, Л.В. Полякова // Вестник новых медицинских технологий. – 2017. – Т. 24, № 2. – С. 209-219.
12. Кисельникова Л.П. Роль биопленки в развитии кариеса и заболеваний пародонта и методы ее устранения / Л.П. Кисельникова // Пародонтология. – 2010. – № 2. – С. 74-75.
13. Книрель Ю.А. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. I. Общая характеристика липополисахаридов и структура липида А / Ю.А. Книрель, Н.К. Кочетков // Биохимия. – 1993. – Т. 58, № 2. – С. 166-181.
14. Косенко Ю.В. Патогенетические механизмы взаимодействия липополисахаридов бактерий с моноцитами и лимфоцитами крови человека *in vitro*: Учебное пособие / Ю.В. Косенко. – М.: Рост. гос. мед. ун-т, 2006. – 16 с.
15. Кузьмина И.М. Профилактическая стоматология: Учебное пособие / И.М. Кузьмина. – М.: ГЭОТАР, 2009. – 88 с.
16. Курякина Н.В. Заболевания пародонта: Учебное пособие для студ. стом. фак. мед. вузов / Н.В. Курякина. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: Медицинская книга, 2007. – 297 с.
17. Лукиных Л.М. Болезни пародонта (клиника, диагностика, лечение и профилактика): Руководство / Л.М. Лукиных, Е.Н. Жулев, И.Н. Чупранова. – Н.Новгород: НГМА, 2005. – 321 с.

18. Мавзютов А.Р. Влияние липополисахарида *Escherichia coli* на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом / А.Р. Мавзютов, О.А. Князева, Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Габдрахманова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 3. – С. 84-90.

19. Николаев А.И. Практическая терапевтическая стоматология: Учебное пособие / А.И. Николаев, Л.М. Цепов. – 9-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2014. – 928 с.: ил..

20. Рейзвих О.Э. Липополисахариды и их применение в стоматологии. Обзор литературы / О.Э. Рейзвих, А.П. Левицкий, С.А. Шнайдер // Вестник стоматологии. – 2017. – № 2. – С. 58-65.

21. Рябиченко Е.В. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов / Е.В. Рябиченко, Л.Г. Веткова, В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – № 3. – С. 98-105.

22. Сибиряк С.В. Иммунотропные свойства липополисахаридов грамотрицательных бактерий / С.В. Сибиряк, Е.К. Алехин // Антибиотики и химиотер. – 1988. – Т. 33, № 11. – С. 871-877.

23. Удинцова Н.М. Эконометрика: Учебное пособие в 2ч. Ч.2. Множественная регрессия и корреляция в эконометрических исследованиях / Н.М. Удинцова, Н.А. Коптева. – зерноград: Азово-Черноморский инженерный институт ФГБОУ ВО Донской ГАУ, 2016 – 73 с.

24. Царев В.Н. (ред.) Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: Учебник для студентов стоматологического факультета Медвузов / под ред. В.Н. Царева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – С. 213-576.

25. Цепов Л.М. Современные подходы к лечению воспалительных генерализованных заболеваний пародонта / Л.М. Цепов, А.И. Николаев, Д.А. Наконечный, М.М. Нестерова // Пародонтология. – 2015. – N. 2 (75). – С. 3-9.

26. Янушевич О.О. (ред.) Заболевания пародонта. Современный взгляд на клинико-диагностические и лечебные аспекты / под ред. О.О. Янушевича. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 160 с.
27. Бастендорф К.-Д., Лусси А. GBT: Guided Biofilm Therapy. Методические решения для контроля формирования биопленки: вопросы и ответы // *Dental Times*. – N. 42. – 2021. – май.
28. Ламонт Р.Дж. Микробиология и иммунология для стоматологов / Р.Дж. Ламонт, М.С. Лантц, Р.Л. Лебланк; пер. с англ. под ред. В.К. Леонтьева. – М.: Практическая медицина, 2010. – 504 с.: ил..
29. Demirer, S. Gingival hyperplasia as an early diagnostic oral manifestation in acute monocytic leukemia: a case report / S. Demirer, H. Ozdemir, M. Sencan, I. Marakoglu // *Eur J Dent*. – 2007. – V. 1, N. 2. – P. 111-114.
30. Gutschmann T. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells / T. Gutschmann, A. Wiese // *Infect. Immun*. – 2001. – V. 69, N. 11. – P. 6942-6950.
31. Irshad, M. In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts: role of the capsule / M. Irshad, W.A. van der Reijden, W. Crielaard, M.L. Laine // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 2012. – V. 60, N. 6. – P. 469-476.
32. Jenkinson, H.F. Oral microbial communities in sickness and in health / H.F. Jenkinson, R.J. Lamont // *Trends in Microbiology*. – 2005. – V. 13. – P. 589-595.
33. Jiménez, L.M. Necrotizing ulcerative periodontal diseases in children and young adults in Medellín, Columbia, 1965-2000 / L.M. Jiménez, F.L. Duque, P.N. Baer et al. // *J Int Acad Periodontol*. – 2005. – V. 7. – P. 55-63.
34. Kato, H. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human

periodontal ligament stem cells / H. Kato // Arch. Oral Biol. – 2014. – V. 59, N. 2. – P. 167-175.

35. Kistler, J.O. Bacterial Community Development in Experimental Gingivitis / J.O. Kistler, V. Booth, D.J. Bradshaw, W.G. Wade, M. Glogauer // PLoS One. – 2013. – V. 8, N. 8.

36. Lombardo Bedran, T.B. Porphyromonas endodontalis in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study / T.B. Lombardo Bedran, R.A. Marcantonio, R. Spin-Neto, M.P. Alves Mayer, D. Grenier, L.C. Spolidorio, D.P. Spolidorio // J Oral Microbiol. – 2012. – V. 4.

37. Lundberg, J.O. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease / J.O. Lundberg, M. Carlström, E. Weitzberg, // Cell Metab. – 2018. – V. 28, N. 1. – P. 9-22.

38. Mark Welch, J.L. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale / J.L. Mark Welch, B.J. Rossetti, C.W. Rieken, F.E. Dewhirst, G.G. Borisy // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2016. – V. 113, N. 6. – P. 791-800.

39. Newman, M.G. Clinical periodontology / M.G. Newman, H. Takei, F.A. Carranza et al. – ed. 13. – Philadelphia: W.B. Saunders. – 2018. – 944 p.

40. Parameter on Plaque-Induced Gingivitis // Journal of Periodontology. – 2000. V. 71, S. 5. – P. 851-852.

41. Popova, C. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review / C. Popova, V. Dosseva-Panova, V. Panov // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2013. – V. 27, N. 3. – P. 3754-3759.

42. Preshaw, P.M. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention / P.M. Preshaw // BMC Oral Health. – 2015. – V. 15, S. 1, S. 5.

43. Ryan, M.E. The influence of diabetes on periodontal tissues / M.E. Ryan, O. Carnu, A. Kamer // J Am Dent Assoc. – 2003. – V. 134 Spec No. – P. 34S-40S.

44. Sambunjak, D. Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults / D. Sambunjak, J.W. Nickerson, T. Poklepovic, T.M.

Johnson, P. Imai, P. Tugwell, H.V. Worthington // The Cochrane Library. – 2011. – V. 12.

45. Schätzle, M. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis / M. Schätzle, H. Loe, W. Bürgin, A. Anerud, H. Boysen, N.P. Lang // J Clin Periodontol. – V.30. – P. 887–901.

46. Socransky, S.S. Periodontal microbial ecology / S.S. Socransky, A.D. Haffajee // Periodontol. – 2005. – V. 38. – P. 135-187.

47. Stanford, T.W. Oral mucosal lesions caused by infective microorganisms. II. Fungi and parasites / T.W. Stanford, F. Rivera-Hidalgo // Periodontol. – 2000. – V. 21. – P. 125-144.

48. Taichman, L.S. Oral contraceptives and periodontal diseases: rethinking the association based upon analysis of National Health and Nutrition Examination Survey data / L.S. Taichman, S.A. Eklund // J Periodontol. – 2005. – V. 76, N. 8. – P. 1374-1385.

49. Tovu, S. Recurrent intraoral HSV-1 infection: a retrospective study of 58 immunocompetent patients from Eastern Europe / S. Tovu, I. Parlatescu, M. Tovu, L. Cionca, P.G. Arduino // Med Oral Patol Oral Cir Bucal. – 2011. – V. 16, N. 2. – P. 163-169.

50. Tuganbaev, T. The effects of oral microbiota on health / T. Tuganbaev, K. Yoshida, K. Honda // Science. – 2022. – V. 376, N. 6596. – P. 934-936.

51. Umadevi, M. (B2) Periodontal diseases and other bacterial infections / M. Umadevi, O. Adeyemi, M. Patel, P.A. Reichart, P.G. Robinson // Adv Dent Res. – 2006. – V. 19, N. 1. – P. 139-145.

52. van Winkelhoff, A.J. Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis: its role in endodontal infections / A.J. van Winkelhoff, T.J. van Steenberg, J. de Graaff // J Endod. – 1992. – V. 18, N. 9. – P. 431-434.

53. Weatherspoon, D. International Classification of Diseases Codes and their Use in Dentistry / D. Weatherspoon, A. Chattopadhyay // Journal of dental, oral and craniofacial epidemiology. – 2013. – V.1, N.4. – P. 20–26.

54. Wilbert, S.A. Spatial Ecology of the Human Tongue Dorsum Microbiome / S.A. Wilbert, J.L. Mark Welch, G.G. Borisy // Cell Reports. – 2020. – V. 30, N. 12. – P. 4003–4015.