

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Тамарова Э.Р.¹, Швец К.Ю.^{1,2}, Мавзютов А.Р.¹, Баймиев Ал.Х.^{1,2}, Булгакова А.И.¹

СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 450000, Уфа, Россия;

²ФГБНУ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, 450075, Уфа, Россия

Воспалительные заболевания пародонта представляют серьезную стоматологическую и общемедицинскую проблему в связи с высокой распространенностью среди взрослого населения, наличия клинических форм, приводящих к разрушению зубочелюстной системы и потере зубов, недостаточной эффективности лечения и частоты возникновения рецидивов заболевания, в том числе в связи с формированием биопленок.

*Разработана молекулярно-генетическая тест-система для оценки содержания пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в содержимом пародонтальных карманов. Определены аналитические характеристики тест-системы, а также проведена апробация на клинических образцах больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Сконструированный диагностический набор позволил провести сравнительный анализ эффективности различных видов лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе количественных данных содержания бактерий в содержимом пародонтальных карманов.*

Ключевые слова: пародонтит; пародонтопатогены; RT-PCR; количественный анализ; контроль эффективности лечения.

Для цитирования: Тамарова Э.Р., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Баймиев Ал.Х., Булгакова А.И. Создание молекулярно-генетической тест-системы для ранней диагностики и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 55-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60>

Tamarova E.R.¹, Shvets K.Yu.^{1,2}, Mavzyutov A.R.¹, Baimiev Al.H.^{1,2}, Bulgakova A.I.¹

CREATION OF A MOLECULAR GENETIC TEST SYSTEM FOR EARLY DIAGNOSTICS AND EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF TREATMENT OF INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;

² Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center RAS, Ufa, Russia

*Inflammatory periodontal diseases represent a serious dental and general medical problem due to the high prevalence among the adult population, the presence of clinical forms leading to the destruction of the dentition and tooth loss, insufficient treatment effectiveness and the frequency of relapse, including in connection with the formation of biofilms. A molecular genetic test system has been developed to evaluate the content of periodontopathogenic microorganisms *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus sobrinus* in the contents of periodontal pockets. The analytical characteristics of the test system were determined, and testing was carried out on clinical samples of patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity. The constructed diagnostic kit allowed us to conduct a comparative analysis of the effectiveness of various types of treatment of inflammatory periodontal diseases based on quantitative data on the content of bacteria in the contents of periodontal pockets.*

Key words: periodontitis; periodontopathogens; RT-PCR; quantitative analysis; treatment effectiveness control.

For citation: Tamarova E.R., Shvets K.Yu., Mavzyutov A.R., Baimiev Al.Kh., Bulgakova A.I. Creation of a molecular genetic test system for early diagnosis and evaluation of the effectiveness of treatment of inflammatory periodontal diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (1): 55-60 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60>

For correspondence: Mavzyutov A.R., professor, chief of Department of Fundamental and Applied Microbiology; e-mail: ufalab@mail.ru

Information about authors:

Tamarova E.R. – orcid.org/0000-0002-4871-0832

Shvets K.Yu. – orcid.org/0000-0001-8147-5566

Mavzyutov A.R. – orcid.org/0000-0001-5943-1882

Baimiev Al. H. – orcid.org/0000-0003-0605-6740

Bulgakova A.I. – orcid.org/0000-0001-7295-2877

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.11.2019
Accepted 09.12.2019

Для корреспонденции: Мавзютов Айрат Радикович, д-р мед. наук, зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии, проф. каф. лаб. диагностики; e-mail: ufalab@mail.ru

Введение. Воспалительные заболевания пародонта представляют серьезную стоматологическую и общемедицинскую проблему в связи с высокой распространенностью среди взрослого населения, наличия клинических форм, приводящих к разрушению зубочелюстной системы и потере зубов, недостаточной эффективности лечения и частоты возникновения рецидивов заболевания, в том числе в связи с формированием биопленок [1-3]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) у лиц в возрасте 15–19 лет пародонтит регистрируется в 55–89% случаев, в возрасте 35–44 лет и в старших возрастных группах заболеваемость пародонтитом регистрируется уже в 65–98% [4-5].

Проблемы профилактики и повышения эффективности комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта представляют актуальную проблему современной стоматологии, поскольку все чаще встречаются клинические случаи, имеющие агрессивное, практически непрерывно рецидивирующее течение. Пародонтит как комплексное мультифакториальное заболевание характеризуется наличием медленных прогрессирующих процессов, в конечном итоге приводящих к утрате зубодесневого прикрепления [6]. С учетом анализа современных научных представлений о регулирующей роли иммунной системы в развитии патологических состояний в тканях пародонта, предопределяющим является формирование локального и системного иммунодефицитного состояния [7,8].

Между тем считается, что важнейшим пусковым фактором в инициации деструктивных процессов в тканях пародонта является постепенно формирующаяся в придесневых областях и межзубных промежутках бактериальная биопленка, представляющая стабильный микробиоценоз из нескольких сотен микроорганизмов. Входящие в состав биопленок бактерии покрывают каждую из анатомических поверхностей полости рта и отличаются интенсивной межклеточной коммуникацией и высоким уровнем горизонтальной передачи генов. В таком состоянии микроорганизмы лучше противостоят неблагоприятным факторам, защитным механизмам иммунной системы организма, а также действию антибактериальных веществ [9].

По мнению ряда авторов, главными патогенными микроорганизмами, вызывающими воспалительные заболевания пародонта, являются виды *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* [10-13]. Также к маркерам воспалительных заболеваний пародонта следует отнести облигатно анаэробные виды *Streptococcus spp.* (*S. mutans*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. downei*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*), составляющие около половины резидентной микрофлоры ротовой полости человека и являющиеся единственным видом бактерий полости рта, демонстрирующих высокую как внутриродовую, так и межродовую коаггрегацию [14].

В настоящее время количество идентифицированных видов бактерий на поверхности зубов и слизистой оболочки полости рта, находящихся в динамическом равновесии и формирующих соответствующий микробиоценоз, превышает 700 [8,15,16]. Более половины представителей микробиоты полости рта не поддаются культивированию, поэтому данные о количественных соотношениях бактерий в настоящее время практически отсутствуют. Во многом последнее обусловлено недо-

статочной информативностью применяемых на современном этапе методов (микроскопических, бактериологических и др.), не позволяющих выявлять весь спектр анаэробных, микроаэрофильных и некультивируемых бактерий. Такая диагностика пародонтита в настоящее время ограничивается констатацией очага уже необратимой инфекционной деструкции ткани. В этой связи представляется целесообразным использование методов молекулярной биологии.

Современные высокопроизводительные молекулярно-генетические методы открывают широкие возможности в плане получения в короткий срок больших объемов количественных данных о содержании пародонтопатогенных микроорганизмов в клиническом материале, пригодных для статистического анализа. Соответственно подобные методы молекулярного анализа могут быть применены в диагностике, оценке и прогнозировании лечения пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

Цель исследования – разработка молекулярно-генетической тест-системы для оценки содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в содержимом пародонтальных карманов, подбора адекватной антибиотикотерапии и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта.

Материал и методы. В группу наблюдения были включены 220 пациентов (79 мужчин и 141 женщина) в возрасте от 29 до 74 лет с диагнозом хронический генерализованный пародонтит (ХГП) средней степени тяжести. Критериями включения пациентов в исследование являлись: отсутствие выраженной сопутствующей соматической патологии и аллергических реакций, информированное согласие пациента на участие в исследовании и высокая степень комплаентности пациента. Критериями исключения из исследования явились: онкологические заболевания в анамнезе, беременность и лактация, острые инфекционные и вирусные заболевания, обострение хронических заболеваний, наличие аллергических реакций на компоненты используемых препаратов, прием лекарственных препаратов, влияющих на уровень костной резорбции и гипертрофию десен, низкая комплаентность больного, отказ больного от обследования.

Контрольную группу составили 100 пациентов (46 мужчин и 54 женщины) со здоровым пародонтом после санации полости рта.

Все пациенты, включенные в исследование, в полном объеме и в доступной форме были проинформированы о проводимых методах обследования и лечения. Каждым участником исследования было подписано добровольное информированное согласие на участие в нем.

Пациентам был проведен стандартный стоматологический осмотр с определением степени воспалительно-деструктивных процессов в тканях пародонта, характеризующихся наличием пародонтальных карманов, патологической подвижности зубов и кровоточивости десен при чистке зубов. Для объективной оценки клинического состояния пародонта врачом-пародонтологом дополнительно проводилась оценка гигиенических индексов (индекс Грина-Вермиллиона, индекс РМА, индекс СРITN), характеризующих гигиеническое состояние пародонта.

На следующем этапе был проведен инструктаж по чистке зубов, подбору индивидуальных средств гигиены полости рта, а также информирование и мотивирование по предстоящему лечению. Убедившись в правильности всех манипуляций, приступали к лечению.

Пациенты группы наблюдения были разделены на 3 группы в зависимости от выбранной тактики лечения. Пациентам первой группы ($n=70$) назначался стандартный курс антибиотикотерапии. Схема лечения – ежедневно однократное введение 1 мл 30% р-ра линкомицина гидрохлорида с 0,2 мл 2% р-ра лидокаина гидрохлорида (ex tempore) по переходной складке полости рта один раз в день, по 0,6 мл с правой и левой стороны, поочередно на верхней и нижней челюсти.

Пациентам второй группы ($n=80$) назначалось однократное терапевтическое воздействие ультразвуком при помощи прибора «Vector» («DurrDental», Германия) на поверхности зубодесневых карманов и корня. Данная терапия предназначена для минимально инвазивного лечения воспалительных заболеваний пародонта, а также для микроинвазивного препарирования твердых тканей зуба и финишной обработки реставраций. Стоит заметить, что Vector-терапия не назначалась пациентам, имевшим следующие противопоказания: наличие кардиостимуляторов, заболеваний крови, первые 6 мес после перенесенного инфаркта миокарда, операции на сетчатке глаза, тяжелый сахарный диабет, операции по трансплантации органов, хронические инфекционные заболевания. В подобных случаях перед назначением соответствующей терапии пародонтита проводилась консультация с лечащим врачом.

Третьей группе пациентов ($n=80$) назначалась комплексная терапия, включающая ультразвуковое воздействие при помощи прибора «Vector» и стандартный курс антибиотикотерапии. Курс лечения во всех трех группах составлял 14 дней.

В ходе проведения лечения у пациентов с ХГП делался забор клинического материала – содержимого пародонтальных карманов для проведения молекулярно-генетического исследования. Содержимое пародонтального кармана отбирали стерильным бумажным эндодонтическим штифтом (размер № 25), который вводили пинцетом в пародонтальный карман в наиболее глубокие участки на 10 секунд и затем помещали в стерильную пластиковую пробирку типа Errendorf (1,5 мл), содержащую 1 мл физиологического раствора. Отбор проводили в двукратно для каждого пациента. Транспортировали образцы в лабораторию при +4°C в течение 2 ч в термоконтейнерах с хладагентом. Молекулярно-генетическое исследование с целью количественного определения содержания пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в содержимом пародонтальных карманов проводили в момент включения пациентов в исследование и через 10 дней после начала курса терапии.

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRIS-HCl (pH 9,1, 100 мМ), крезоловый красный, ddH₂O. Для постановки ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) использовали пары видоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых микроорганизмов и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»), согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch «REAL TIME» (Bio-Rad, США). Учет результатов проводи-

ли с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5х реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH₂O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК. Процедуру проведения ПЦР-анализа оптимизировали путем использования в качестве матрицы десятикратных разведений ДНК рекомбинантной плазмиды pAL-TAStrSob16S (концентрация двухцепочной ДНК 2,48 мкг/мл ($7,08 \times 10^{11}$ ГЭ/образец)), сконструированной путем встраивания участка гена 16S рРНК пародонтопатогенного микроорганизма *Streptococcus sobrinus* в вектор pAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E. coli* XL1Blue.

Результаты и обсуждение. Определение аналитических характеристик диагностической тест-системы. Первым этапом совершенствования диагностической тест-системы, разработанной для количественного определения содержания пародонтопатогенных бактерий *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в клиническом материале, стало проведение оценки аналитической чувствительности и специфичности диагностического набора.

Оценку аналитической чувствительности проводили с использованием

созданных стандартных контрольных образцов, содержащих фрагменты ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus*. Аналитическую чувствительность диагностической тест-системы определяли методом пробит-анализа. Результаты оценки аналитической чувствительности РТ-ПЦР представлены на рис. 1.

По результатам ПЦР десятикратных разведений пяти стандартных контрольных образцов в буферном растворе, содержащих от 70 до 10⁷ копий фрагментов ДНК каждого возбудителя в 1 мл. На уровне доверительной вероятности 95% ($p < 0,05$) чувствительность анализа составила 70 геном-эквивалентов в исследуемой пробе при эффективности амплификации 98 % (рис. 2).

Далее была проведена работа по определению аналитической специфичности тест-системы. Для этого тестировали образцы, содержащие ДНК микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. При пятикратном исследовании каждой пробы получили только отрицательные результаты. Отрицательные результаты РТ-ПЦР анализа с каждым из вышеперечисленных образцов позволяют оценить специфичность тест-системы по использованной выборке образцов как 100%.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами был разработан и сконструирован новый диагностический набор реагентов для выявления и количественного определения содержания пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в клиническом материале от больных пародонтитом методом ПЦР в режиме реального времени. Показано, что данный набор обладает высокой специфичностью, чувствительностью и позволяет надежно выявлять ДНК указанных выше пародонтопатогенов в концентрации 70 ГЭ/образец в клинических образцах.

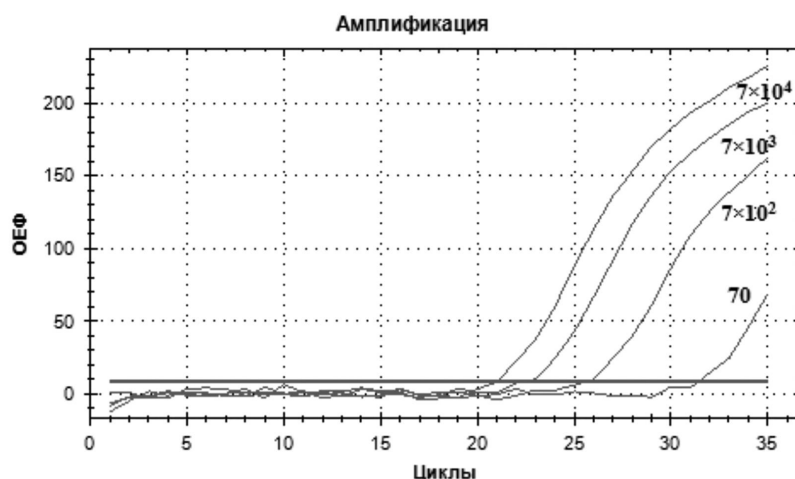


Рис. 1. Флуоресцентный профиль четырех разведений ($70-7 \times 10^4$ ГЭ/образец) стандартного образца фрагмента генома *Streptococcus sobrinus* в зависимости от количества циклов ПЦР при оценке чувствительности выявления ДНК *Streptococcus sobrinus* и линейный диапазон ее измерения методом РТ-ПЦР.

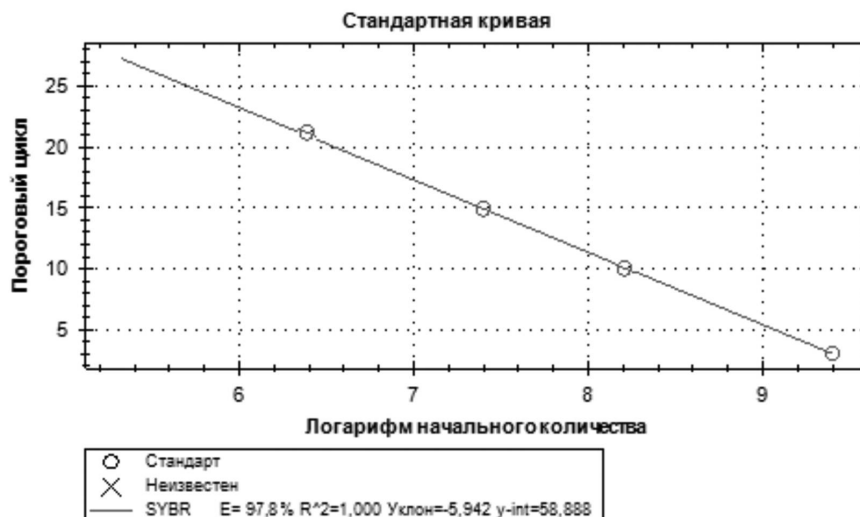


Рис. 2. Стандартная кривая корреляции между значениями C_t и \log_{10} концентрации специфической матрицы при оценке чувствительности выявления ДНК *Streptococcus sobrinus* и линейный диапазон ее измерения методом РТ-ПЦР.

Апробация диагностической тест-системы на клинических образцах больных ХГП средней степени тяжести. Исследование количественного содержания пародонтопатогенных бактерий в выравненных по объему клинических образцах методом ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе, откалиброванном тремя разведениями сконструированной рекомбинантной плазмиды pAL-TAStrSob16S (концентрация двухцепочной ДНК составила 2,48 мкг/мл или $7,08 \times 10^{11}$ копий ДНК/мл). Использование калибровочных образцов позволяло определять абсолютное количество ген-эквивалента ДНК возбудителя в образце (ГЭ/образец).

Расчет абсолютной концентрации пародонтопатогенных бактерий *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в исследуемых образцах проводили с учетом объемов клинических образцов при заборе материала по модифицированной нами формуле:

$X_o = 1,7 \times X_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_o}$, где:
 $1,7$ – коэффициент для соответствующего перерасчета;
 X_o – концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);
 X_{or} – стандартная начальная концентрация (копий ДНК/мл);
 E – эффективность РТ-ПЦР;
 Ct_o – пороговый цикл для стандартного образца;
 Ct_{or} – пороговый цикл для исследуемого образца.

Количественное определение содержания пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов позволило сделать вывод о том, что по мере утяжеления клинических признаков заболевания наблюдается тенденция к увеличению видового состава и количественного содержания бактерий в клиническом материале. Количественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в группах больных ХГП с разными схемами лечения позволила установить

Изменение абсолютного количества (ГЭ/образец) пародонтопатогенных бактерий в СПК у больных ХГП средней степени тяжести в ходе использования различных тактик лечения

Бактерии	Содержимое пародонтальных карманов	
	до лечения	Через 10 дней
	Антибиотикотерапия (n=70)	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7,18×10 ⁷	2,1×10 ^{5*}
<i>Treponema denticola</i>	6,3×10 ⁷	1,2×10 ^{5*}
<i>Streptococcus oralis</i>	3,8×10 ⁸	4,3×10 ^{5*}
<i>Streptococcus sanguis</i>	4,7×10 ⁸	3,9×10 ⁷
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1,4×10 ⁹	4,01×10 ⁸
	Ультразвуковая терапия при использовании прибором «Vector» (n=80)	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,6×10 ⁷	7,1×10 ^{5*}
<i>Treponema denticola</i>	9,3×10 ⁸	2,9×10 ^{6*}
<i>Streptococcus oralis</i>	8,7×10 ⁸	1,3×10 ⁷
<i>Streptococcus sanguis</i>	9,8×10 ⁸	8,3×10 ^{5*}
<i>Streptococcus sobrinus</i>	1,5×10 ⁹	7,3×10 ^{5*}
	Комплексная терапия (курс антибиотиков и ультразвуковое лечение прибором «Vector») (n=70)	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,04×10 ⁸	5,7×10 ^{5*}
<i>Treponema denticola</i>	2,5×10 ⁹	4,8×10 ^{6*}
<i>Streptococcus oralis</i>	2,4×10 ⁸	9,7×10 ^{4*}
<i>Streptococcus sanguis</i>	4,3×10 ⁸	1,7×10 ^{5*}
<i>Streptococcus sobrinus</i>	4,4×10 ⁹	8,8×10 ^{5*}

Примечание. * – достоверность различий показателей в ходе лечения (p< 0,05).

связь между изменением представленности пародонтопатогенных видов в пародонтальных карманах и прогрессированием инфекционно-воспалительных процессов в тканях пародонта.

В группе больных, проходивших курс системной антибиотикотерапии, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации пародонтопатогенов *Porphyromonas gingivalis* в содержимом пародонтальных карманов. После проведения курса терапии средняя концентрация пародонтопатогенного вида составляла 2,1×10^{5*} ГЭ/образец. Аналогичные изменения концентраций наблюдались и в отношении видов *Treponema denticola* и *Streptococcus oralis*. Усредненные концентрации при этом составляли 1,2×10^{5*} ГЭ/образец и 4,3×10^{5*} ГЭ/образец соответственно (см.таблицу). Таким образом, нами в количественном варианте подтверждается значение *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*, выступающих в качестве важнейших этиологических агентов, способных инициировать воспалительные процессы в тканях пародонта, а возможно и других тканей челюстно-лицевой области [17-19].

При обработке результатов количественного молекулярно-генетического анализа содержания пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов у группы пациентов, пролеченных с использованием ультразвуковой стоматологической системы Vector (DurrDental, Германия), были получены данные, указывающие на статистически значимое снижение абсолютного количества пародонтопатогенных видов

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* (см.таблицу).

Существенное уменьшение концентрации исследуемых видов бактерий происходило сразу на несколько порядков. Последнее еще раз подтверждало все сведения об эффективности применения ультразвукового лечения для разрушения бактериальной биопленки при лечении воспалительных заболеваний пародонта. По мнению большинства авторов [4,21,22], действенность аппарата обеспечивается за счет эффекта кавитации, при котором antimicrobial эффект обеспечивается ультразвуковыми волнами, а промывающий раствор при этом удаляет из пародонтальных карманов микробную массу.

Проведенный анализ клинической эффективности применения ультразвукового лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести показал, что по окончании курса терапии у пациентов наблюдается улучшение пародонтограммы: уменьшение глубины пародонтальных карманов (от 5 до 2 мм), уменьшение подвижности зубов, приобретение упругости десны, отсутствие гиперемии десны, появления уплотненного зубодесневого прикрепления.

Включение в ультразвуковое лечение больных ХГП средней степени тяжести антибиотикотерапии позволило не только существенно снизить общую бактериальную нагрузку на ткани пародонта, но и значительно уменьшить количественное содержание в составе пародонтальных карманов всех исследуемых пародонтопатогенов. Аналогично наблюдалось снижение общей бактериальной обсемененности пародонтальных карманов и снижение концентрации пародонтопатогенов на несколько порядков.

Заключение. Анализируя результаты клинического обследования пациентов после лечения, мы отмечали, прежде всего, сокращение сроков купирования воспалительных процессов в десне и достижение стабильной ремиссии. Терапевтическое воздействие ультразвуком при помощи прибора «Vector» на поверхности корня и зубодесневых карманов в сочетании с антибиотикотерапией привело к эрадикации или к достоверному снижению абсолютного количества пародонтопатогенных микроорганизмов, а также более быстрому восстановлению физиологической функции пародонта. Таким образом, разработанная диагностическая тест-система для количественного определения содержания пародонтопатогенных микроорганизмов позволила провести сравнительный анализ эффективности различных видов лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе количественных данных содержания пародонтопатогенных видов в содержимом пародонтальных карманов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5, 10-19 см. REFERENCES)

1. Безрукова И.В. Агрессивные формы пародонтита. М.: МИА; 2002.
2. Грудянов А.И., Овчинникова В.В. Частота выявления различных представителей пародонтопатогенной микрофлоры при пародонтите различной степени тяжести. *Стоматология*. 2009; 3: 34-7.
3. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 59-64.
6. Ламонт Р.Дж. Микробиология и иммунология для стоматологов. М.: Практическая медицина; 2010.
 7. Луцкая И.К. Болезни пародонта. М.: Медицинская литература; 2010.
 8. Зайрятыанц О.В., Бойкова С.П., Смольяникова В.А. Роль иммунокомпетентных клеток десны, Toll-like рецепторов и других молекулярных механизмов в патогенезе воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта. *Пародонтология*. 2007; 3(44): 12-20.
 9. Грудянов А.И., Фоменко Е.Ф. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта. М.: МИА; 2010.
 20. Миронов А.Ю., Пашков Е.П., Черноглазова Е.М. Видовой и количественный показатели микрофлоры при флегмонах челюстно-лицевой области. *Стоматология*. 1988; 67(5): 42-43.
 21. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии. М.: Литтерра; 2004.
 22. Баймиев А.Х., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Тамарова Э.Р., Булгакова А.И. Количественный анализ микробиоты пародонтальных карманов и слюны ПЦР в режиме реального времени до и после лечения пародонтита. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(3): 103-8.
-
- REFERENCES
1. Bezrukova I.V. *Aggressive forms of periodontitis*. Moscow: MIA; 2010. (in Russian)
 2. Grudyanov A.I., Ovchinnikova V.V. Frequency of revelation of different representatives of parodontopathogenic microflora in cases of parodontitis of different severity. *Stomatologiya*. 2009; 3: 34-7. (in Russian)
 3. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsaryov V.N. The morphology of the periodontal biofilm in inflammatory gum diseases (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(12): 59-64. (in Russian)
 4. Kolenbrander P.K., Andersen R.N., Blehert D.S. Communication among Oral Bacteria. *Journal microbiology and molecular biology reviews*. 2002; 66(3): 486-505.
 5. Corraini P., Baelum V., Pannuti C.M., Romito G.A., Aquino D.R., Cortelli S.C., Cortelli J.R. Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: A clinical epidemiology study. *Pustiglioni Acta Odontol. Scand*. 2012; 4: 167-71.
 6. Lamont R.D. Microbiology and immunology for dentists [Mikrobiologiya i immunologiya dlya stomatologov]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2010. (in Russian)
 7. Lutskaya I.K. Periodontal Disease [Bolezni parodonta]. Moscow: Meditsinskaya literatura; 2010. (in Russian)
 8. Zayratyants O.V., Boykova S.P., Smolyannikova V.A. Role of immunocompetence gingiva cells, Toll-like receptors and other molecular mechanisms in inflammatory-destructive periodontal diseases pathogenesis. *Parodontologiya*. 2007; 3(44): 12-20. (in Russian)
 9. Grudyanov A.I., Fomenko E.F. Etiology and pathogenesis of inflammatory periodontal diseases [Etiologiya i patogenez vospalitel'nykh zabolevaniy parodonta]. Moscow: MIA; 2010. (in Russian)
 10. Eke PI. High PCR copy-counts of periodontal pathogens in saliva are associated with periodontal disease status. *J. Evid Based Dent. Pract*. 2011; 11(4): 208-9.
 11. Mori Y., Yoshimura A., Ukai T. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol*. 2003; 18(1): 54-8.
 12. Redanz S.A., Standar K., Podbielski A., Kreikemeyer B. Five-Species Transcriptome Array for Oral Mixed. *Biofilm Studies*. 2011; 6(12): 178-82.
 13. Amin M., Ho A.C.S., Lin J.Y., Batista da Silva A.P., Glogauer M., Ellen R.P. Induction of de novo subcortical actin filament assembly by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect. Immun*. 2004; 72: 3650-4.
 14. Gamboa F., Garcia D.A., Acosta A. Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis. *Acta Odontol. Latinoam*. 2013; 26(1): 24-30.
 15. Rasmussen L., Hanstrom L., Lerner U.H. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J. Clin. Periodontol*. 2000; 27(1): 41-52.
 16. Tedjosasongko U., Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. *ASDC. J. Dent. Child*. 2002; 69: 284-8.
 17. Conrads G., de Soet J.J., Song L., Henne K. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *Journal of Oral Microbiology*. 2014; 6: 1-13.
 18. Salvetti E., Torriani S., Felis G.E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics & Antimicro. Prot*. 2012; 4: 217-26.
 19. Amano A., Nakagawa I., Okahahi N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of Periodontal Research*. 2004; 39(2): 136-42.
 20. Mironov A.Yu., Pashkov E.P., Chernoglazova E.M. Species and quantitative indicators of microflora in phlegmons of the maxillofacial region. *Stomatologiya*. 1988; 67(5): 42-3. (in Russian)
 21. Tsaryov V.N., Ushakov R.V. Antimicrobial therapy in dentistry [Antimikrobnaya terapiya v stomatologii]. Moscow: Litterra; 2004. (in Russian)
 22. Baymiev A.K., Shvets K.Y., Mavzyutov A.R., Tamarova Ye.R., Bulgakova A.I. Quantitative analysis of the microbiota of periodontal pockets and saliva by real-time PCR before and after treatment of periodontitis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 32: 155-9. (in Russian)

Поступила 19.11.19
Принята к печати 09.12.19