

УДК 616.314.17-002-07:616.31-022

Соотношение патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов при пародонтите разной степени тяжести

О. А. Зорина^{1*}, А. А. Кулаков¹, О. А. Борискина¹, Д. В. Ребриков^{2,3}¹ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития России, 119034, Москва, ул. Тимура Фрунзе, 16²Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3³ЗАО «НПФ ДНК-Технология», 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

*E-mail: zorina-cniis@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Широко распространенное заболевание – пародонтит – считается одним из проявлений нарушения соотношения нормальной и условно-патогенной микрофлоры пародонтального кармана. В представленной работе методом количественной ПЦР в реальном времени определено соотношение шести наиболее важных пародонтопатогенов и суммарной микрофлоры пародонтального кармана в группах здоровых индивидов и у лиц с пародонтитом разной степени тяжести. Установлено, что по мере развития пародонтита в суммарной микрофлоре пародонтального кармана устойчиво увеличивается относительное содержание *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и при тяжелой степени хронического генерализованного пародонтита более чем на два порядка превышает значения в контрольной группе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА экосистема, биотоп, пародонтит, пародонтопатогенная микрофлора, пародонтальный карман, количественная полимеразная цепная реакция.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЦР – полимеразная цепная реакция; ХГП – хронический генерализованный пародонтит.

ВВЕДЕНИЕ

Полость рта – это одна из наиболее сложных по составу микроорганизмов экосистема организма человека. Слюна, десневая жидкость, пародонтальный карман, биопленка и ряд других биотопов содержат примерно 700 различных видов микроорганизмов [1, 2], которые условно можно разделить на три большие группы: 1) нормофлора, 2) условно-патогенные и 3) патогенные микроорганизмы [3].

Бактериальный профиль биоценоза полости рта определяется рядом экзогенных и эндогенных факторов. Защитные механизмы организма хозяина в значительной степени влияют на вирулентность условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в каждом из биотопов. Не секрет, что нарушение соотношения нормальной и условно-патогенной флоры приводит к развитию дисбактериозов и характеризуется относительным снижением содержания лактобактерий и бифидобактерий. Одно из проявлений такого дисбаланса представляет широко распростра-

ненное заболевание – пародонтит. Известно, что существенная роль в развитии пародонтита принадлежит *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Fusobacterium* spp. и ряду других микроорганизмов [4–6].

С развитием методов молекулярной биологии и, в частности методов качественной и количественной оценки содержания нуклеиновых кислот, стало возможным быстро и точно определять как состав, так и относительное количество микроорганизмов в различных суббиотопах ротовой полости [6–8]. Отличительная особенность современных молекулярно-генетических методов (в частности, количественной ПЦР) – их высокая чувствительность и возможность количественного определения анаэробных микроорганизмов (что зачастую невозможно сделать с помощью классических методов культивирования) [9]. ПЦР в реальном времени позволяет одновременно определять качественный

Таблица 1. Возрастной состав исследованных групп (%)

Возраст	Здоровый контроль (n = 30)	ХГП		
		легкая степень (n = 10)	средняя степень (n = 29)	тяжелая степень (n = 35)
До 35 лет	21	80	24	17
35–44 года	27	20	35	29
45–54 года	33	0	31	34
Старше 55 лет	19	0	10	20

и количественный состав микробиоценоза в любом выбранном биотопе полости рта.

Цель данной работы состояла в количественной оценке соотношения наиболее важных (согласно [9–11]) представителей пародонтопатогенной микрофлоры десневых карманов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Candida albicans*, у здоровых лиц и у индивидов с пародонтизом разной степени тяжести.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование проводилось в отделении пародонтологии ФГУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздравсоцразвития РФ. Обследовано 104 человека в возрасте от 18 до 65 лет без тяжелой соматической патологии.

Основным критерием для постановки диагноза хронический генерализованный пародонтит (ХГП) служило отсутствие зубодесневого прикрепления. Степень тяжести устанавливали на основании глубины пародонтальных карманов и степени деструкции костной ткани.

Так, при ХГП легкой степени глубина пародонтальных карманов составляла до 3 мм, а рентгенологическая картина подтверждала признаки начальной деструкции межзубных перегородок.

При ХГП средней степени глубина пародонтальных карманов варьировала от 3 до 6 мм, а при обследовании зачастую выявляли патологическую подвижность зубов 1–2 степени. Деструкция кортикальной пластинки и костной ткани межзубных перегородок по данным рентгенологического исследования составляла 1/2–1/3 длины корня.

ХГП тяжелой степени характеризовался наличием пародонтальных карманов более 6 мм, патологической подвижностью зубов 2–3 степени, а при рентгенологическом исследовании выявляли деструкцию кортикальной пластинки и костной ткани более 1/3 длины корня.

Контрольная группа состояла из 30 человек (12 мужчин и 18 женщин) в возрасте от 28 до 55 лет, без жалоб и видимых патологических изменений в тканях пародонта. Данные по возрастному составу групп приведены в табл. 1.

Микрофлору интактного пародонта и пародонтальных карманов изучали с использованием стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размер № 25), которые погружали в десневую бороздку или в патологический карман до его дна и оставляли на 10 с. Затем помещали в пробирку с физиологическим раствором, охлаждали и передавали в лабораторию. Дублировали забор материала у каждого пациента.

С целью выявления инфекционных агентов и определения геномной ДНК пациента (как нормировочного показателя) экстрагировали ДНК из биологического материала с помощью комплектов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Метод основан на сорбции ДНК на носителе, отмывке от примесей и последующей элюции нуклеиновых кислот с сорбента. За счет лизиса клеток сильными хаотропными агентами «Проба-ГС» примерно с равной эффективностью разрушает клетки с клеточной стенкой различного типа (грамположительных, грамотрицательных бактерий, грибов). «Проба-ГС» подходит и для экстракции геномной ДНК эукариот (использована нами в качестве нормировочного показателя).

В работе использованы ранее разработанные наборы реагентов, состоящие из специфичных праймеров и специфичной флуоресцентно меченой разрушаемой пробы (типа TaqMan), к шести пародонтопатогенным агентам (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Candida albicans*). С целью оценки общей бактериальной массы, представленной в образце, параллельно с определением патогенных микроорганизмов проводили ПЦР с детекцией кон-

Таблица 2. Доля положительных образцов в группах здоровых лиц и индивидов с ХГП (%)

Микроорганизм	Здоровый контроль (n = 30)	ХГП		
		легкая степень (n = 10)	средняя степень (n = 29)	тяжелая степень (n = 35)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10	33	48	43
<i>P. gingivalis</i>	47	70	66	86
<i>P. intermedia</i>	33	70	59	71
<i>T. forsythensis</i>	53	80	97	100
<i>T. denticola</i>	60	80	83	83
<i>C. albicans</i>	10	40	38	60

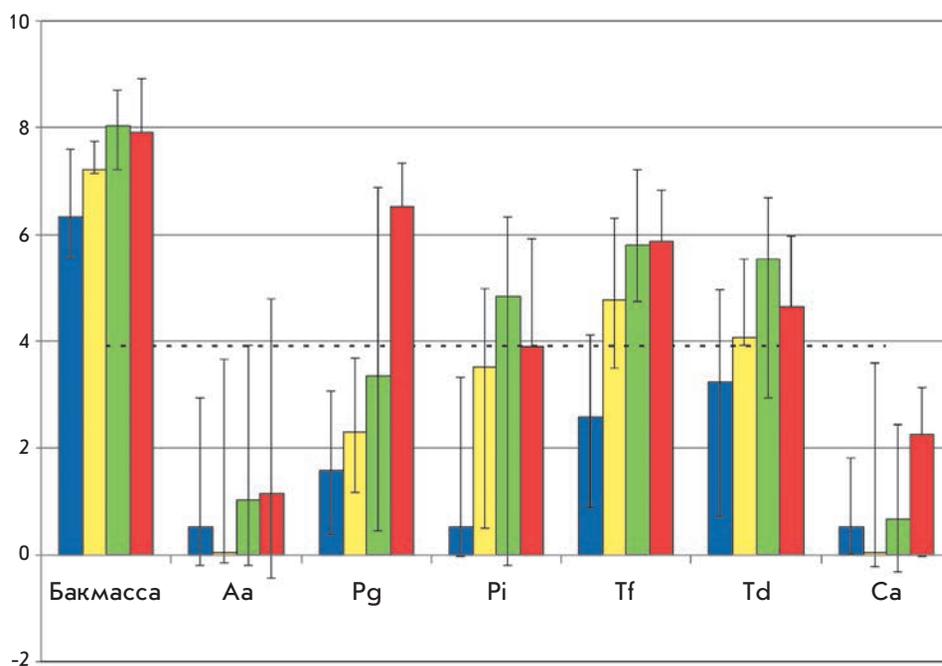
сервативного участка гена 16S рРНК. Для сравнения представленности патогенов в образцах количество копий геном-эквивалентов бактерий каждого вида (а также общую бакмассу) нормировали по количеству геномной ДНК человека (фрагмент гена рецептора гормона роста).

ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Результаты реакции учитывали с помощью программного обеспечения амплификатора «ДТпрайм». Нормированные значения, соответствующие уровню представленности каждого микроорганизма, рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta Ct$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе анализируемую выборку разделили на четыре группы в зависимости от степени тяжести заболевания: 1) здоровый контроль (n = 30); 2) легкая степень ХГП (n = 10); 3) средняя степень ХГП (n = 29); 4) тяжелая степень ХГП (n = 35), где n – численность группы.

Результаты выявления патогенов в каждой группе приведены в табл. 2. Видно, что с развитием заболевания наблюдается тенденция к увеличению числа положительных образцов по всем микроорганизмам. Опубликованные данные по частоте выявления пародонтопатогенов у здоровых лиц и у больных с ХГП существенно различаются [10, 12–14], однако, в боль-



Относительное количество микроорганизмов в норме (синие столбцы) и при ХГП различной степени тяжести (желтые столбцы – легкая степень, зеленые – средняя степень, красные – тяжелая степень и агрессивный пародонтит). Показаны медианы с планками погрешностей 25–75 процентиль. Данные нормированы по содержанию геномной ДНК человека (пунктирная линия). По оси у отложен десятичный логарифм содержания данного компонента в образце (в усл. ед.). Бакмасса – суммарное количество бактерий, Aa – *A. actinomycetemcomitans*, Pg – *P. gingivalis*, Pi – *P. intermedia*, Tf – *T. forsythensis*, Td – *T. denticola*, Ca – *C. albicans*.

шинстве случаев сообщается об аналогичной тенденции. Так, Braga и соавт. [12] выявили *P. intermedia* у 80.0% здоровых ($n = 30$) лиц и у 90.0% индивидов с ХГП ($n = 30$), *P. gingivalis* обнаружена у 46.6% здоровых и у 70.0% лиц с ХГП, а *A. actinomycetemcomitans* – у всех индивидов в обеих группах. Различия в частоте выявления патогенов можно объяснить особенностями формирования групп, возможной (иногда запланированной) штаммоспецифичностью, а также разной чувствительностью используемых тест-систем. Также отметим, что выявление патогенного микроорганизма у всех лиц из контрольной группы может свидетельствовать о контаминации лаборатории продуктами ранее проведенных реакций и должно настораживать авторов.

Мы использовали новый подход к количественной оценке состава микробиоценозов ротовой полости, поэтому смогли найти крайне мало опубликованных данных по относительному содержанию изученных нами патогенов. В работе Нувярinen и соавт. [15], которые определяли относительное содержание *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в образцах слюны лиц с пародонтитом и у здоровых индивидов, достоверных различий не выявлено.

Результаты определения относительного количества микроорганизмов в норме и при ХГП разной

степени приведены на *рисунке*. Для приведения количества взятого в исследование биоматериала к единому знаменателю, данные нормировали по содержанию уникального фрагмента геномной ДНК человека (фрагмент гена рецептора гормона роста) [16, 17]. Из *рисунка* видно, что по мере развития заболевания наблюдается тенденция к увеличению содержания в пародонтальном кармане как бактерий в целом (показатель «бакмасса»), так и большинства представителей патогенной микрофлоры (причем относительное содержание патогенов растет опережающими темпами). Лидерами роста по мере развития пародонтита являются *P. gingivalis*, *P. intermedia* и *T. forsythensis*, относительное содержание которых в общей бактериальной массе устойчиво увеличивается более чем в 100 раз.

Полученные нами данные свидетельствуют о возможности использования количественной оценки соотношения патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов как диагностического инструмента с целью прогнозирования развития пародонтита. В качестве варианта диагностикума можно рекомендовать определение соотношения *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, общей бакмассы и геномной ДНК пациента. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усатова Г.Н. Адгезия и колонизация микроорганизмами полости рта. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 1989. 19 с.
2. Paster B.J., Boches S.K., Galvin J.L., Ericson R.E., Lau C.N., Levanos V.A., Sahasrabudhe A., Dewhirst F.E. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 3770–3783.
3. Kumar P.S., Griffen A.L., Moeschberger M.L., Leys E.J. // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. № 8. P. 3944–3955.
4. Haffajee A.D., Socransky S.S. // *Periodontol* 2000. 1994. V. 5. P. 78–111.
5. Maiden M.F., Cohee P., Tanner A.C. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 2111–2112.
6. Takamatsu N., Yano K., He T., Umeda M., Ishikawa I. // *J. Periodontol.* 1999. V. 70. № 6. P. 574–580.
7. Behl Y., Siqueira M., Ortiz J., Li J., Desta T., Faibish D., Graves D.T. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 12. P. 8711–8718.
8. Boutaga K., Winkelhoff A.J., Vandenbroucke-Grauls I.C., Savelkoul P. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. № 11. P. 4950–4954.
9. Atieh M.A. // *J. Periodontol.* 2008. V. 79. № 9. P. 1620–1629.
10. Jervøe-Storm P.M., AlAhdab H., Koltzsch M., Fimmers R., Jepsen S. // *Clin. Oral Investig.* 2010. V. 14. № 5. P. 533–541.
11. Naka S., Yamana A., Nakano K., Okawa R., Fujita K., Kojima A., Nemoto H., Nomura R., Matsumoto M., Ooshima T. // *BMC Oral Health.* 2009. V. 9. P. 24.
12. Braga R.R., Carvalho M.A., Bruña-Romero O., Teixeira R.E., Costa J.E., Mendes E.N., Farias L.M., Magalhães P.P. // *Anaerobe.* 2010. V. 16. № 3. P. 234–239.
13. Elamin A., Albandar J.M., Poulsen K., Ali R.W., Bakken V. // *J. Periodontal Res.* 2011. V. 46. № 3. P. 285–291. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01337.x.
14. Rakić M., Zelić K., Pavlica D., Hadzimirhajlović M., Milasin J., Milčić B., Nikolić N., Stamatović N., Matić S., Aleksić Z., Janković S. // *Vojnosanit. Pregl.* 2010. V. 67. № 11. P. 898–902.
15. Hyvärinen K., Laitinen S., Paju S., Hakala A., Suominen-Taipale L., Skurnik M., Könönen E., Pussinen P.J. // *Innate Immun.* 2009. V. 15. № 4. P. 195–204.
16. Zorina O.A., Tumbinskaya L.V., Rebrikov D.V. // *Dentistry for all.* 2011. № 1. P. 46–48.
17. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., De Paepe A., Speleman F. // *Genome Biol.* 2002. V. 3. № 7. Research0034.