

І.А. Григорова, О.Р. Єскін, Л.В. Тихонова. Імунологічні та біохімічні показники у хворих прозопалгіями та їх динаміка в процесі мікрохвильової рефлексотерапії. – Стаття.

Анотація. У статті висвітлено імунологічні та біохімічні зміни у хворих прозопалгіями в процесі мікрохвильової терапії. Показано покращення імунологічних та біохімічних показників у процесі НВЧ впливу у хворих із прозопалгіями.

Ключові слова: мікрохвильова рефлексотерапія, прозопалгії.

I. Hryhorova, A. Yeskin, L. Tichonova. The changes of immunological and biochemical data in patients with prosopalgia during microwaves reflexotherapy. – Article.

Summary. The changes of immunological and biochemical data in patients with prosopalgia during microwaves therapy were revealed. Improving of immunological and biochemical features during microwaves therapy was proved.

Key words: microwaves reflexotherapy, prosopalgia.

УДК 616.314-002-022.7+ 616.31-002+ 616-078+577.2.086/087

М.О. Дубина

студентка второго курса стоматологического факультета

Одесский медицинский институт

Международного гуманитарного университета,

г. Одесса, Украина

В.А. Малиновский

кандидат биологических наук,

доцент кафедры общей и клинической фармакологии

Одесский медицинский институт

Международного гуманитарного университета,

г. Одесса, Украина

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОЛОСТИ РТА

Аннотация. Проведен глубокий анализ состояния микрофлоры полости рта человека в норме и патологии. Показано, что ПЦР является незаменимым методом в диагностике возбудителей инфекционных болезней.

Ключевые слова: ПЦР, ДНК-полимераза, праймеры, диагностика возбудителей инфекций.

Ротовая полость человека заселена большим количеством (порядка 700 видов) различных микроорганизмов, находящихся в динамическом равновесии образующим их микробиоценозом [10]. При возникновении условий, нарушающих данное равновесие, может происходить значительный рост патогенных микроорганизмов, приводящих к развитию различных воспалительных заболеваний полости рта, включая кариес, периодонтит (болезнь десен), эндодонтические (корневые) инфекции, альвеолярный остит и тонзиллит. Доказана связь присутствия патогенных бактерий полости рта с рядом системных заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, преждевременные роды, диабет и пневмонию [11]. В некоторых исследованиях также сообщалось о наличии не четко выраженной связи между некоторыми бактериями ротовой полости и таким неинфекционным заболеванием, как рак полости рта. Дело в том, что *Porphyromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum* имеют потенциальные антигены, такие как FimA и FadA-адгезины, которые могут привести к развитию и прогрессированию карциномы (рака эпителиальных клеток) [18]. Болезни пародонта наряду с кариесом зубов и его осложнениями являются самыми распространенными стоматологическими заболеваниями, и поэтому актуальность решения этих проблем не вызывает сомнения. По данным доклада научной группы ВОЗ 1990 года, основанного на обследовании населения 53 стран, в мире имеет место высокий уровень заболеваемости пародонта. У лиц в возрасте 15-19 лет заболевания пародонта встречаются в 55% случаев, в 89%

случаев – в возрасте 35-44 лет, в 65 лет – 98%, а у лиц более старших возрастных групп они достигают 98% случаев [6].

Многочисленными исследованиями продемонстрировано, что в основе патогенеза заболеваний пародонта лежит сложное взаимодействие факторов иммунологической реактивности человека и пародонтопатогенной микрофлоры [9]. Важнейшим этиологическим фактором в развитии заболеваний кариеса и пародонта является зубной налет с присутствующими в нем микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности, которые вызывают местное воспаление. К представителям такой микрофлоры, по рекомендации ВОЗ, относят такие виды, которые наряду с преимущественно анаэробным типом дыхания отличаются высокими адгезивными, инвазивными и токсическими свойствами. Хотя из ротовой полости человека выделено более 700 видов различных бактерий [11], принадлежащих к различным семействам (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* и *Tenericutes*), только небольшая часть из них, такие как *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium species* и *Treponema denticola*, рассматриваются в качестве потенциальной причины развития заболеваний пародонта, наряду с *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Dialister pneumosintes* и *Micromonas micros*, часто высеваемых с поражённых поверхностей полости рта человека [14]. Считается, что *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis* могут быть специфическими маркерами развития острого пародонтита [17], а важнейшей бактерией, ответственной за кариес зубов, является грамположительный факультативный анаэробный стрептококк *Streptococcus mutans*, вызывающий кислотную декальцификацию структуры зуба [16].

Наиболее распространёнными заболеваниями пародонта являются гингивит и пародонтит. Гингивит – это воспаление десен без нарушения целостности зубодесневого соединения. При отсутствии лечения гингивит может прогрессировать в деструктивную форму заболевания пародонта – пародонтит. В качестве специфического бактериального патогена при развитии гингивита в первую очередь рассматривают *Porphyromonas gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, а также *Actinomyces viscosus*. Пародонтит – воспалительное заболевание тканей пародонта, характеризующееся прогрессирующим разрушением нормальной структуры альвеолярного отростка челюсти. Специфическими микроорганизмами ответственными за тяжелое течение пародонтита являются: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *Treponema denticola* [2]. В пародонтальном кармане с активным воспалением доминируют грамотрицательные анаэробные микроорганизмы, которые являются наиболее токсичными для организма. Являясь анаэробами, данные микроорганизмы плохо поддаются культивированию, что является одной из проблем их диагностики. Показано, что при возникновении воспалительных заболеваний пародонта происходит изменение баланса микробиологического состава ротовой полости в сторону патогенных микроорганизмов. В современных условиях при лечении хронического генерализованного пародонтита легкой и средней степени тяжести приоритетный характер приобретают меры по оптимизации консервативного лечения, заключающегося в выборе обоснованного метода лечения. Только основываясь на клинических симптомах и степени их выраженности, результатах микробиологических исследований, возможен правильный выбор лечения [1]. Однако микробиологическое исследование анаэробных микроорганизмов сталкивается с рядом проблем. Необходимость специального оборудования и питательных сред существенно затрудняет применение бактериологических тестов для выявления анаэробов. Диагностика методом ПЦР данных групп микроорганизмов позволяет избавиться от данных ограничений. К тому же, следует добавить, что примерно лишь 50% микробиоты ротовой полости удаётся культивировать с использованием бактериологических методов, другая половина микроорганизмов может быть идентифицирована лишь современными высокочувствительными молекулярно-биологическими методами, такими как ПЦР [11; 15]. Некультивируемость ряда микроорганизмов – вот главная причина, по которой культуральный метод все более и более теряет свои позиции по мере появления альтернативных подходов [5].

Итак, ПЦР, или полимеразная цепная реакция, принцип которой был впервые описан в 1986 г. доктором Муллисом (К. Mullis), получившим за это Нобелевскую премию в 1993 г., – это искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Изящность, простота исполнения, непревзойденные показатели чувствительности и специфичности принесли новому методу небывалую популярность. За короткое время ПЦР-анализ распространился по всему миру, быстро выйдя из лабораторий научных институтов в сферу практического клинического использования. Диагностика инфекционных заболеваний, в том числе вызванных агентами, трудно поддающимися культивированию, генотипирование микроорганизмов, оценка их ви-

рулентности, определение устойчивости микрофлоры к антибиотикам, генодиагностика и генетическая дактилоскопия, пренатальная диагностика, биологический контроль препаратов крови – вот далеко не полный перечень направлений медицины, где с успехом применяется ПЦР.

Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК (матрице), синтезирует комплементарную ей новую последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК «с нуля», ей необходима короткая «затравочная» цепь РНК или ДНК, к которой она может начать присоединять нуклеотиды. Основным принципом ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) инициируется специфическими праймерами (короткими фрагментами «затравочной» ДНК) в каждом из множества повторяющихся циклов. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «узнавать» строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной комплементарности. В обычной реакции ПЦР используется пара праймеров, которые «ограничивают» амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-матрицы. Для многократного увеличения количества копий исходной ДНК нужна цикличность реакции. Как правило, каждый из последовательно повторяющихся циклов ПЦР состоит из трех этапов: 1) денатурации, или «плавления» ДНК, когда двухцепочечная ДНК под действием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние; 2) связывания (отжига) праймеров с матричной ДНК; 3) элонгации, или удлинения цепи [4; 7]. В ПЦР эти процессы осуществляются в пробирке в циклическом режиме специального автоматического прибора – термоциклера. Переход от одной стадии реакции к другой достигается изменением температуры инкубационной смеси. При нагревании раствора до 93-95оС происходит денатурация (плавление) ДНК, водородные связи разрываются, и индивидуальные цепи ДНК расходятся. Для перехода к следующему этапу – присоединению, или «отжигу» праймеров – инкубационную смесь охлаждают до 50-65оС. Далее смесь нагревают до 70-72оС (оптимум работы Таq-ДНК-полимеразы). При этом термостабильный фермент достраивает заданную праймером новую нить ДНК в направлении 5'→3'. Далее цикл повторяется снова. Смена этапов каждого цикла осуществляется путем изменения температуры реакционной смеси. Сначала праймеры могут связаться только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с копиями этой последовательности, синтезированными в предыдущих циклах. При этом количество основного продукта ПЦР (копии последовательности ДНК, ограниченной праймерами) теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально [3; 7].

Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний следующие [8]:

1. Прямое определение наличия возбудителей. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая специфичность. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов.

3. Высокая чувствительность. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе.

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка.

5. Высокая скорость получения результата анализа. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-5 часов.

6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях.

Уже сейчас ПЦР является незаменимым инструментом в диагностике и исследовании многих возбудителей инфекционных болезней, а количество микробиологических приложений ПЦР продолжает стремительно расти. Дальнейшее развитие и внедрение этого метода в практику клинических диагностических лабораторий может быть связано с совершенствованием и стандартизацией самой технологии, особенно этапов подготовки образцов и анализа продуктов реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров М.Т., Прикулс В.Ф., Богданов В.Ю., Васильев Е.Н. Определение антимикробной активности препаратов, используемых в комплексном лечении больных пародонтитом. *Стоматология*. 2009. № 2. С. 13–15.
2. Барер Г.М. *Терапевтическая стоматология. Болезни пародонта*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. Ч. 2. 224 с.
3. Ллуэлин М.Б. Определение нуклеотидной последовательности ДНК. *Молекулярно-клиническая диагностика. Методы*. М.: Мир, 1999. С. 428–447.
4. Лопухов Л.В., Эндельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике // *Клин. микробиол. и антимикр. химиотерапия*. 2000. Т. 2, № 3. С. 96–106.
5. Макреди Б. Дж., Чимера Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами. *Молекулярная клиническая диагностика. Методы*. М.: Мир, 1999. С. 496–506.
6. Маланьин И.В. *Современные методы комплексной терапии заболеваний пародонта: автореф. дисс. докт. мед. наук: 14.00.21 стоматология / Кубанская госмед. академия, Краснодар, 2005. 297 с.*
7. Николаева Е.Н., Царев В.Н., Щербо С.Н. Применение новой тест-системы, основанной на полимеразной цепной реакции, в пародонтологии. *Институт стоматологии*. 2004. № 4. С. 63–66.
8. Поспелова С.В. *Полимеразная цепная реакция: метод. рекомендации / ГОУ ВПО ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава. Пермь, 2007. 35 с.*
9. Янушевич О.О., Гринин В.М., Почтаренко В.А. и др. *Заболевания пародонта. Современный взгляд на клинико-диагностические и лечебные аспекты*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 160 с.
10. Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43, № 11. P. 5721–5732.
11. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J. et al. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. № 19. P. 5002–5017.
12. Frederic L.J., Michel B., Selena T. Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Materials (Basel)*. 2018. V. 11. № 10. P. 2–17.
13. Kumar P.S., Griffen A.L., Barton J.A., Paster B.J., Moeschberger M.L., Leys E.J. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J. Dental Res.* 2003. Vol. 82. P. 338–344.
14. Nonnenmacher C., Dalpke A., Mutters R., Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*. 2004. V. 59, № 1. P. 117–125.
15. Paster B.J., Boches S.K., Galvin J.L. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 2001. V. 183, № 12 – P. 3770–3783.
16. Ravikumar D., Gurunathan D., Gayathri R. DNA profiling of *Streptococcus mutans* in children with and without black tooth stains: A polymerase chain reaction analysis. *Dent. Res. J. (Isfahan)*. 2018. V. 15. № 5. P. 334–339.
17. Slots J., Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol.* 2000. V.1999, № 20. P. 82–121.
18. Whitmore S.E., Lamont R.J. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog.* 2014. V. 10, № 3. e1003933. P. 1–3.

М.О. Дубина, В.О. Малиновський. Застосування полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації патогенних мікроорганізмів порожнини рота. – Стаття.

Анотація. Проведено глибокий аналіз стану мікрофлори порожнини рота людини в нормі та патології. Показано, що ПЛР є незамінним методом у діагностиці збудників інфекційних хвороб.

Ключові слова: ПЛР, ДНК-полімераза, праймери, діагностика збудників інфекцій.

M. Dubina, V. Malinovskii. Use of polymerase chain reaction for identification of pathogens from oral cavity. – Article.

Summary. A deep analysis of human oral cavity microflora in health and pathology was carried out. It is shown that PCR is an indispensable method for diagnosis of pathogens of infectious diseases.

Key words: PCR, DNA polymerase, primers, diagnosis of infectious agents.