

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ – МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ

Докладчик: **Тюрин Сергей Максимович** — очный аспирант кафедры стоматологии факультета ДПО с курсом организации медицинской помощи ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава РФ ФГБОУ ВО СГМУ

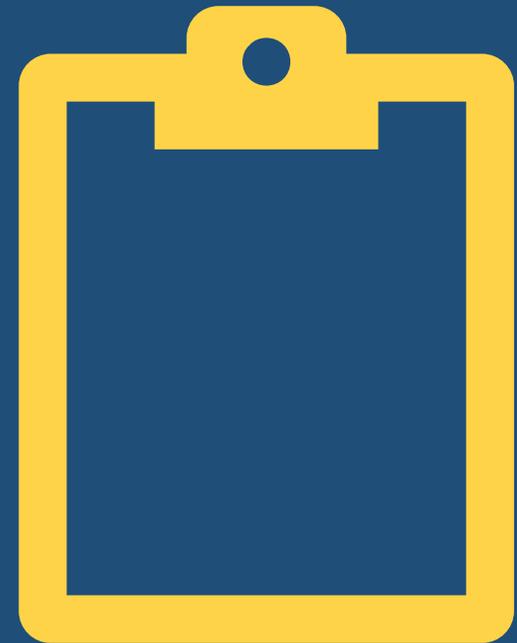
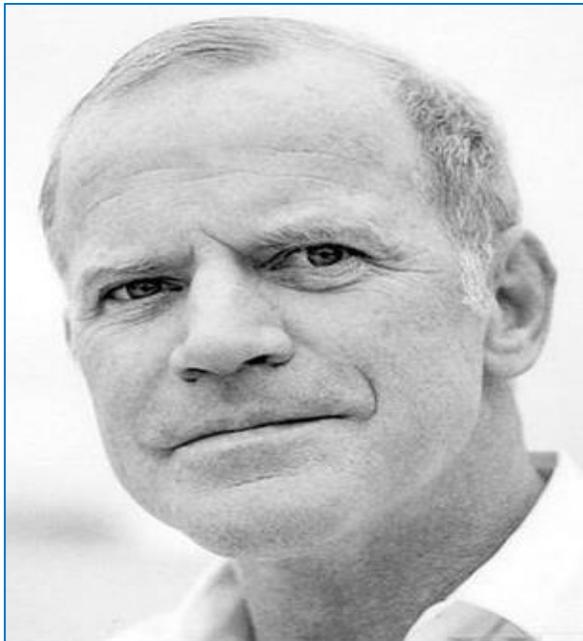
Эйдельштейн Инна Александровна — руководитель лаборатории молекулярной диагностики НИИАХ СГМУ Минздрава России, кандидат биологических наук, НИИ Антимикробной Химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ

Мишутина Ольга Леонидовна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Морозова Т.Г. — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой кафедрой лучевой диагностики и лучевой терапии с курсом ФДПО ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава РФ ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

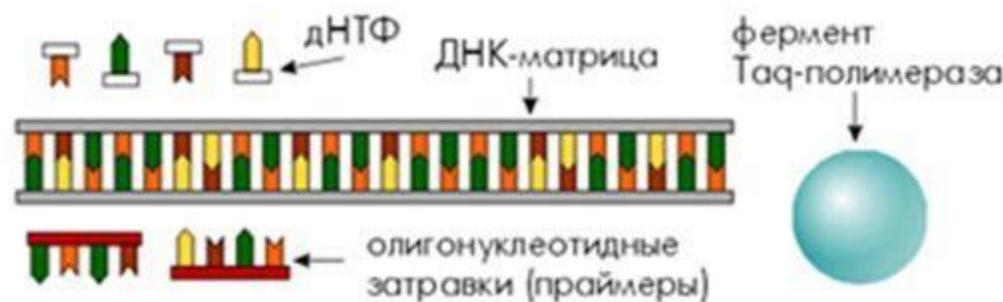


Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного **увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК)** в биологическом материале (пробе) Метод был разработан в 1983 году Кэрри Мюллисом, за что он был удостоен Нобелевской премии



Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР - это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.



Исходные компоненты ПЦР

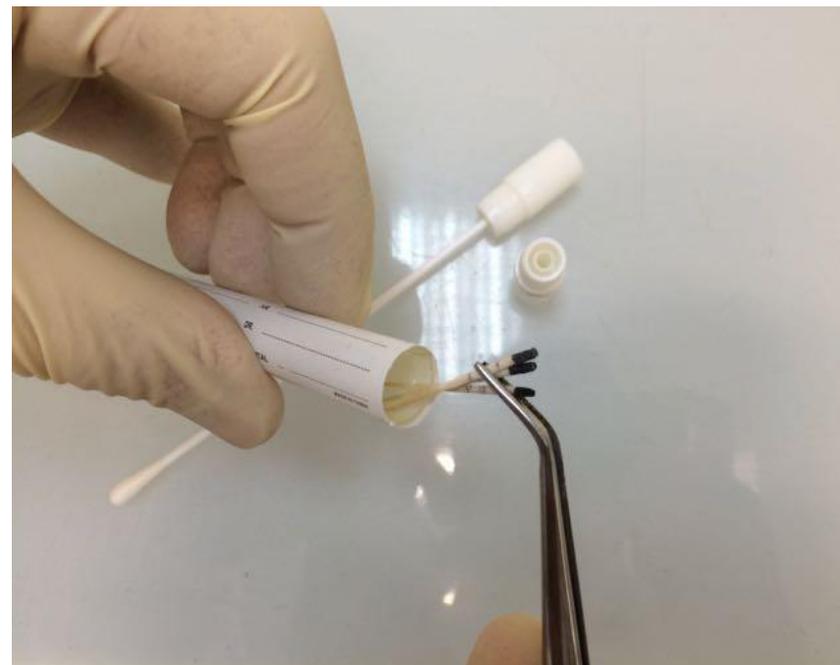
Амплификатор

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР и последующего хранения амплифицированных молекул при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Забор материала и помещение в транспортную среду



Бадрак Е.Ю.,2017, Янушевич О.О. с соавт.,2014

Виды ПЦР

ПЦР с «горячим»
стартом
(hot-start PCR)

Предотвращение
возможности начала
реакции до момента
достижения условий,
которые обеспечивают
специфический отжиг
праймеров

ПЦР с обратной
транскрипцией (ОТ-
ПЦР, RT-PCR)

Предназначен для
амплификации,
выделения или
идентификации
последовательности
РНК



Виды ПЦР

ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR)

модификация позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации, не открывая пробирку

ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ)

используется одновременно для амплификации и измерения количества искомой молекулы ДНК

Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР

амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке одновременно



Полимеразная цепная реакция

- Использование метода ПЦР позволяет точно **анализировать качественный и количественный состав микробиоты пародонтальных карманов**, выявляя ДНК искомым микроорганизмов в сложной смеси нуклеиновых кислот
- Исследование пародонтопатогенных микроорганизмов в различных суббиотопах ротовой полости **целесообразно проводить при выборе терапии и для оценки эффективности проведенного лечения**



Пародонтогены

- **1 порядка:** *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*,
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- **2 порядка:** *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*,
- *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*

Пародонтопатогены 1-го порядка

Пародонтопатогены 2-го порядка



Пародонтогены

- Пародонтогены существуют в так называемом «biofilm» – полупрозрачной пленке, на которой адгезируется биотический массив полости рта с множеством штаммов различных бактерий и грибов
- Орлова Е.С. Этиопатогенетические факторы возникновения и развития воспалительных заболеваний пародонта // Университетская медицина Урала. – 2022. – № 2. – С. 83-85



Этиология и патогенез пародонтита

- Слажнева Е.С., Тихомирова Е.А., Атрушкевич В.Г. (2020) полагают, что к **развитию пародонтита** приводит **сбой в функционировании защитных механизмов организма и изменения в составе и количестве микрофлоры пародонтального кармана**
- При пародонтите выявляется **значительный сдвиг в сторону палочковидных форм и спирохет, количество которых возрастает до 40%**
- Соотношение подвижных форм к неподвижным увеличивается до 1:1 (в норме 1:49)
- К **цементу** прикреплены, в основном, **грамположительные микробы, грамотрицательные** – присутствуют в **неплотных слоях поддесневой бляшки**, которая распространяется до вершечной части кармана
- При пародонтите преобладают **грамотрицательные анаэробные палочки** (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* и др), однако у некоторых больных наблюдается превалирование **актиномицетов**



Пародонтогены и онкогенез

- Существует гипотеза, предполагающая **связь развития рака орофарингеальной области с дисбиозом полости рта**
Опухоли слизистой оболочки напрямую контактируют с бактериями и поэтому подвержены влиянию микробиоты и её микробиома
- Получено значительное количество подтверждений тому, что **микробиота полости рта композиционно и функционально связана с мутационными изменениями при раке полости рта**



Пародонтогены и онкогенез

- Получены экспериментальные доказательства того, что присутствие *T. denticola*, *P. gingivalis* в микросреде опухоли **изменяет поведение опухолевых клеток, развивается агрессивный фенотип клеток** в процессе канцерогенеза полости рта
- ***T. forsythensis*, *T. denticola***, возможно, следует считать **индикаторами риска**, указывающими на уровень значимости их ассоциаций **с раком орофарингеальной области**

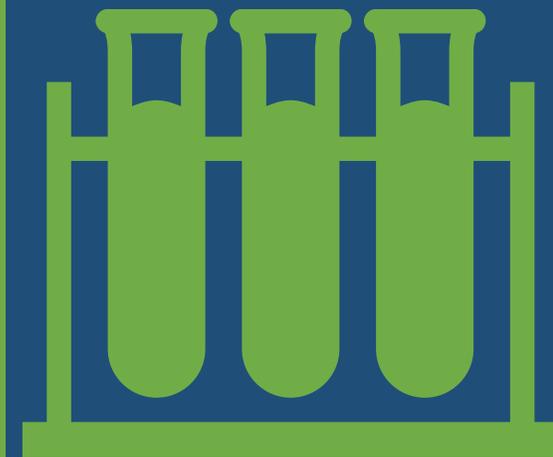
Nieminen M.T., Listyarifah D., Hagstrom J., Haglund C., Grenier D., Nordstrom D. et al. Treponema denticola chymotrypsinlike proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. Br. J. Cancer. 2018; 118(3): 428-34.

Багирова Н.С., Григорьевская З.В., Терещенко И.В., Петухова И.Н., Казимов А.Э., Винникова В.Д., Вершинская В.А. Микробиологическая и молекулярная идентификация анаэробного компонента микробиоты полости рта у больных раком орофарингеальной области. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (5): 301-308. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-301-308>



Набор реагентов «ДЕНТОСКРИН»

- Набор реагентов «ДЕНТОСКРИН» предназначен для обнаружения и количественного определения ДНК возбудителей инфекций пародонта *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* в биологическом материале (содержимое пародонтального кармана, зубной налет, десневая жидкость) методом **полимеразной цепной реакции**



Материалы и методы исследования

- У 30 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом забор материала проводился с помощью стерильных бумажных штифтов 25 размера, которые погружают в специальную транспортную среду с мукалитиком
- Выделение нуклеиновых кислот микроорганизмов проводили с использованием набора «АмплиПрайм РИБОпреп»® («NextBio», Россия)
- Качественная и количественная оценка микрофлоры пародонтальных карманов была выполнена методом ПЦР в реальном времени с помощью набора реагентов «ДЕНТОСКРИН»® (ООО НПФ «Литех», Россия)



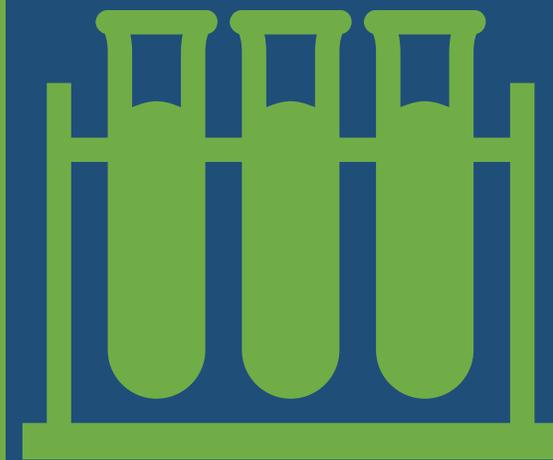
Результаты исследования

- У пациентов с заболеваниями пародонта были выявлены *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* в разных количественных соотношениях
- Чаще всего встречались либо *Fusobacterium nucleatum*, либо ассоциации всех вышеперечисленных видов. Ведущую роль занимал *Fusobacterium nucleatum*, так как это микроорганизм диагностировался у 90,3% пациентов с пародонтитом
- Наличие *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* свидетельствовало о тяжелом течение процесса



Данные научных исследований

- Решение о выборе материала для исследования принимается врачом-стоматологом на основании **совокупности жалоб пациента и клинических проявлений хронического генерализованного пародонтита**
- Включение в ультразвуковое лечение больных хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжёлой степени тяжести **антибиотикотерапии** позволило не только существенно снизить общую бактериальную нагрузку на ткани пародонта, но и значительно **уменьшить частоту выявления и количественное содержание** в составе пародонтальных карманов и слюны всех исследованных пародонтопатогенов



Преимущества ПЦР

- Преимуществами метода ПЦР являются:
- высокая специфичность и чувствительность
- быстрый результат, за счет автоматической интерпретации полученных результатов
- отсутствует проблема субъективной оценки





Технология ПЦР продолжает активно развиваться и совершенствоваться, что позволяет проводить диагностику хронического пародонтита на ранних стадиях и оценивать в динамике развитие инфекционного процесса в тканях пародонта

