

## **ЗМІНИ ВИДОВОГО СКЛАДУ МІКРООРГАНІЗМІВ ПІД ЧАС ЛІКУВАННЯ РІЗНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЕВОЇ ДІЛЯНКИ**

**Лихота А.М., Лихота Т.Ф., Горобець О.В.**

Українська військово-медична академія

**Резюме.** У роботі проведено дослідження анаеробної мікрофлори з використанням ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) при генералізованому пародонтиті. Виявлено, що кількість представників анаеробної флори збільшується у відповідності з важкістю перебігу пародонтиту. ПЛР може бути використана для ранньої діагностики генералізованого пародонтиту.

**Ключові слова:** полімеразна ланцюгова реакція, анаеробна мікрофлора, пародонтит, його важкість.

**Вступ.** Запальні реакції захворювань щелепно-лицевої ділянки і порожнини рота часто провокуються мікроорганізмами. За даними А.І.Грудянова [1], Н.В.Зирянової та співат. [2], В.Н.Царева та співат. [3] основна роль в розвитку деструктивно-запальних процесів належить анаеробній флорі.

Складність ідентифікації анаеробної флори – основна причина недостатнього вивчення патогенності анаеробних бактерій.

На сьогодні найбільш вивчена група анаеробних мікробів, які тісно пов'язані з деструктивними процесами кісткової тканини: *Porphyromonas gingivalis* [4], *Prevotella intermedia* [2], *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [3], *Bacteroides forsythus* [1] і інші. В асоціації мікроорганізмів нерідко присутні *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros* [1] та інші. Часто вони присутні як сапрофіти в порожнині рота. Найбільш вивчені патогенні властивості *Porphyromonas gingivalis* і *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Porphyromonas gingivalis* продукує велику кількість аргінін- і лізинспецифічних протеїназ в розчинній мембранозв'язаній формі. Ці ферменти об'єднанні під назвою гінгіпаїн. Ця група ферментів приймає участь в руйнуванні сполучних тканин пародонту, приймає участь в апоптозі клітин і розвитку запальних процесів. Також велика роль відводиться і фібрилін-філаментозному компоненту клітинної поверхні. Компонент фібріліну відіграє важливу роль в колонізації і проникненні в тканини пародонту *Porphyromonas gingivalis*. В вивченні патогенної флори полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) дозволяє виявити коло патогенних факторів білкового походження, що дасть можливість вибрати оптимальну тактику лікування.

**Метою роботи** явилось вивчення видового складу мікрофлори до і після лікування хворих із захворюваннями ЩЛД, зокрема, генералізованим пародонтитом, шляхом ідентифікації білків патогенних мікроорганізмів методом ПЛР.

**Матеріали і методи.** Для дослідження матеріал брали у хворих з різним ступенем ураження тканин пародонту, одонтогенними абсцесами, фурункулами. Всього обстежено 20 хворих. Контрольну групу склали 6 добровольців.

**Методика:** стерильні адсорбери занурювали в патологічну кишеню або розтин тканин з гнійним вмістом на 2-3 сек., переносили в середовище для

виділення ДНК при температурі  $-2-8^{\circ}\text{C}$ . Проби швидко доставляли в лабораторію. Обробку проб проводили в максимально короткі строки після їх доставки.

**Результати і обговорення.** Вивчено 6 проб з інтактним пародонтом, з легкою формою пародонтиту - 3 проби, 6 - середньою формою генералізованого пародонтиту, 4 проби з важким ступенем (3 стадія пародонтиту), 3 проби з одонтогенними абсцесами і 3 - з фурункулами. Пари праймерів для специфічної ПЛР - ампліфікації відповідали фрагментам відповідних генів анаеробних мікроорганізмів. Пародонтопатогенними мікроорганізмами вважають *Prevotella intermedia* (16S рРНК), *Prevotella nigrescens* (16S рРНК), *Prevotella endodontalis* (16S рРНК), *Peptostreptococcus micros* (16S рРНК), *Fusobacterium nucleatum* (16S рРНК), *Bacteroides forsythus* (16S рРНК), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (CdtB), *Porphyromonas gingivalis* (FimA) [1,2,4,5,6].

ДНК представляє собою подвійну нитку, скручену в спіраль. Кожна з них складається із зв'язаних послідовно нуклеотидів. Унікальною якістю ДНК є її можливість подвоюватися. В ПЛР ці процеси проходять в пробірці в циклічному режимі. Перехід від однієї реакції до другої досягається змінами температури інкубаційної суміші. Під час нагрівання розчину до  $93-95^{\circ}\text{C}$  відбувається денатурація ДНК. Для переходу до слідуєчого етапу приєднання або "відпалювання" праймерів - інкубаційну суміш охолоджують до  $-50-65^{\circ}\text{C}$ . Далі суміш нагрівають до  $70-72^{\circ}\text{C}$  - оптимум роботи tag-ДНК-полімерази, на цій стадії відбувається добування нової нитки ДНК. Далі цикл повторюється знову.

Збільшення ниток ДНК повинно йти одночасно на обох ланцюгах материнської ДНК, тому для реплікації другого ланцюга також потрібен свій праймер. Таким чином, в реакційну суміш вводять два праймери: один для "+" ланцюга, другий для "-" ланцюга. Приєднавшись до протилежних ланцюгів молекули ДНК, праймери обмежують собою той її відрізок, який буде в подальшому багатократно подвоєним або ампліфікованим. Довжина такого фрагмента, який зветься ампліконом складає декілька сот нуклеотидів.

Реакцію (ПЛР) проводили в ампліфікаторі Applied Biosystems 2720, з використанням пластикових одноразових пробірок об'ємом 500 мкл, в кожній з яких знаходилось 20 мкл Tag IX Master Mix ("Biolabs", USA) з відповідною матрицею ДНК. Умови реакції: початкова денатурація при  $94^{\circ}\text{C}$  протягом 2 хв., потім 30 циклів, включаючих в себе денатурацію протягом 30с. при  $94^{\circ}\text{C}$ , відпал праймерів протягом 2 хвилини при  $55^{\circ}\text{C}$ , синтез фрагмента ДНК - 2 хвилини при  $68^{\circ}\text{C}$ .

Аналіз продуктів ампліфікації. Отримані амплікати аналізували в агарозному буфері (1 % агароза в ТАЕ-буфері) в порівнянні з набором ДНК-фрагментів відомого розміру амплікону з даними літератури [6]. Апарат для електрофорезу (ISCO-493) створював поле 120 мА протягом 40-60 хвилини. Гель забавлювали бромистим етидієм і проявляли при УФ-освітленні.

Отримані результати електрофорезу продуктів ампліфікації зразків пародонтальних тканин від добровольців анаеробних мікроорганізмів не отримано. Негативні результати отримані після лікування хворих легкого і середнього ступеню важкості генералізованого пародонтиту. При III стадії генералізованого пародонтиту до лікування ми відмічали такі ДНК збудники: *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* та інші, після лікування кількість

збудників зменшилась до одного (*Prevotella intermedia*). Результати досліджень одонтогенних абсцесів виявили наступних ДНК збудників - *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, після ліквідації запального процесу ДНК збудників не виявлено.

#### **Висновки:**

Під час обстеження матеріалів, взятих з фурункулів обличчя, анаеробних мікроорганізмів нами не виявлено. Таким чином, проведений молекулярно-генетичний метод дослідження дає змогу у більш короткий термін ідентифікувати збудників захворювань щелепно-лицевої ділянки і проконтролювати ефективність вибраних методів лікування.

#### **Література:**

1. Грудянов А.И. Заболевания пародонта /А.И. Грудянов.-М.: "Медицинское информационное агенство", 2009.-336 с.
2. Зырянова Н.В. Видовой состав анаэробной микрофлоры пародонтального кармана в зависимости от стадии пародонтита / Н.В. Зырянова, А.С. Григорян, А.И. Грудянов и др.// Стоматология.-2009.-№4-с 43-47.
3. Цепов В.Н. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и контроля эффективности лечения генерализованного пародонтита / В.Н. Царев, Е.Н. Николаев, Ю.М. Максимовский и др.// Российский журнал.-2002.-№2.-с. 12-19.
4. Amono A, Prevalence of spesifite genotypes of *Porphyromonas gingivalis* Fim A und periodontal health status/ A.Amono, M. Kuboniva, I. Nukagrwa et al.// J.Dent.Res.-2000-79-1664-1668.
5. Brugd I. The capabilty of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides interniedins* to indicate progressive periodontitis: a retrospective study/ I. Brugd, Q Denlen, M. Wiestrom, J. Slots// J.Clin. Periodontal/-1987/-14.-95-99.
6. Found A.G. PCK-based indification of Bacteria Asociated with Endodontic infection/ A.G. Found, M Caimanwo et al.//J. Clin. Microbiol. 2002.40,93223-3231.

### **ИЗМЕНЕНИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАТИ**

**Лихота А.Н., Лихота Т.Ф., Горобец Е.В.**

**Резюме.** В работе проведены исследования анаэробной микрофлоры с использованием ПЦР (полимеразной цепной реакции) при генерализованном пародонтите. Обнаружено, что количество представителей анаэробной флоры увеличивается в соответствии с тяжестью течения пародонтита. ПЦР может быть использована для ранней диагностики генерализованного пародонтита.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, анаэробная микрофлора, пародонтит, его тяжесть.

### **A SPECIFIC COMPOSITION'S CHANGES OF MICROORGANISMS THAT ARE DURING DIFFERENT DISEASES'S TREATMENT OF MAXILLUFACIAL AREA**

**A.Lyhota, T.Lyhota, E.Gorobets**

**Summary.** The researches of anaerobic microflora are represented at generalized parodontitis, conductet with the use of PCR (polymerase chain reaction) in this work. It is discovered, that amount of anaerobic microflora representatives increases due to hard flows of parodontitis. PCR can be used for early diagnostics of generalized parodontitis.

**Keywords:** polymerase chain reaction, anaerobic microflora, parodontitis, its severity.