

А.А. Оганесян,
д.м.н., профессор, зав. кафедрой
стоматологии общей практики, врач-
стоматолог-хирург Межрегионального
центра стоматологических инноваций
им. Б.В. Трифонова

А.С. Рапута,
аспирант кафедры стоматологии общей
практики

Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет

Молекулярно-генетическая диагностика планирования дентальной имплантации

Резюме. Проведен сравнительный анализ клинико-лабораторных показателей у 65 пациентов с диагнозом «частичная вторичная адентия», обратившихся с целью дентальной имплантации. У пациентов определен тип риска развития воспалительных осложнений периимплантатных тканей с помощью молекулярно-генетического теста GenoType IL-1. Выявлены основные группы микроорганизмов, участвующие в воспалительных процессах периимплантатных тканей с помощью молекулярно-генетического теста Micro-IDent 11 plus. Определена эффективность методов молекулярно-генетической диагностики при планировании дентальной имплантации для профилактики воспалительных осложнений дентальной имплантации.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы диагностики, дентальная имплантация, периимплантационный мукозит, периимплантит, интерлейкин-1, неспорообразующие микроорганизмы

Summary. A comparative analysis of clinical and laboratory parameters in 65 patients with the diagnosis of “partial secondary adentia” who applied for dental plantation was carried out. In patients, the risk type of inflammatory complications of peri-implant tissues was determined using the molecular genetic test GenoType IL-1. The main groups of microorganisms involved in the inflammatory processes of peri-implant tissues using the molecular genetic test Micro-IDent 11 plus were identified. The efficiency of molecular genetic diagnosis methods in the planning of dental implantation for the prevention of inflammatory complications of dental implantation was determined.

Key words: molecular genetic methods of diagnosis, dental implantation, peri-implantation mucositis, peri-implantitis, interleukin-1, non-sporeforming microorganisms

Наряду с положительными результатами дентальной имплантации наблюдаются и различные осложнения, сокращающие сроки функционирования имплантатов.

Одним из осложнений, возникающим как в ранний период после имплантации, так и в отдаленный, является воспалительный процесс мягких тканей периимплантатной зоны. Вначале воспалительный процесс ограничивается периимплантационным мукозитом, но развивающийся в дальнейшем периимплантит приводит к полной дезинтеграции имплантата [7, 8].

Периимплантационный мукозит и периимплантит могут возникать в результате недооценки факторов риска, ошибки в планировании лечения, ненадлежащего ухода. Однако одним из ведущих этиологических факторов риска развития этих осложнений является микробная флора. Причем определяющую роль играют ассоциации микроорганизмов нескольких видов с преобладанием анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий. Большая часть из них отличается высокой адгезивностью, инвазивностью и токсичностью [1, 2, 5, 9].

Некоторые вирулентные виды бактерий невозможно идентифицировать традиционным бактериологическим методом даже с применением техники анаэробного культивирования [1, 5–9].

В связи с этим большой интерес представляет молекулярно-генетический метод диагностики бактерий полости рта. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), лежащая в основе данного метода, позволяет многократно умножить за несколько часов специфический фрагмент молекулы ДНК возбудителя и обнаружить его в исследуемом материале. При этом нет необходимости соблюдать особые условия стерильности взятия материала, практически нет ограничений по времени и способу его доставки в лабораторию [2, 6, 7, 10].

Помимо этого, риск развития периимплантита генетически детерминирован. Семейство интерлейкинов-1 (IL-1) относится к первичным провоспалительным цитокинам. В него входят интерлейкин-1 α (IL-1 α) и интерлейкин-1 β (IL-1 β), а также антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RN). Данные цитокины связываются с одним и тем же видом рецептора на клетках-мишенях. При этом IL-1 α и IL-1 β оказывают синергичное воздействие и при связывании с рецептором активируют воспалительную реакцию, что способствует усиленной пролиферации остеокластов и приводит к разрушению костной ткани, а IL-1RN тормозит ее путем конкурентного связывания с аналогичным рецептором [12, 13].

Выявление полиморфизмов IL-1 α -889, IL-1 β +3953 и IL-1RN+2018 позволяет отнести пациента к риску типа А, В, С или D, что соответствует генотипу 1, 2, 3 или 4, и позволяет прогнозировать вероятность развития воспалительной реакции и ее интенсивность [3, 12, 13].

Цель работы — определение и изучение состава патогенных и условно-патогенных неспорообразующих микроорганизмов, определение степени генетической предрасположенности к развитию воспалительных осложнений по IL-1 α , IL-1 β и IL-1RN на этапе планирования дентальной имплантации с помощью молекулярно-генетических методов исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Межрегионального центра стоматологических инноваций им. Б.В. Трифонова НИУ БелГУ. Обследовано и принято на лечение 65 больных с диагнозом «частичная вторичная адентия» в возрасте от 21 до 60 лет, обратившихся по поводу дентальной имплантации. Чаще обращались пациенты в возрасте 31 года — 40 лет (37,5%) и 41 года — 50 лет (28,1%). Наибольшее количество дефектов зубного ряда относилось к III (38,8%) и II классу (26,7%) по Кеннеди. Всего установлено 128 дентальных имплантатов.

Клиническое обследование включало сбор анамнеза, анализ жалоб пациентов и осмотр полости рта. Дополнительно определяли состояние полости рта по упрощенному индексу гигиены ОНI-S и по индексу гингивита РМА.

Первую группу составили 45 пациентов, у которых выявлены воспалительные явления в пародонте при клиническом обследовании и на основании показателей пародонтальных индексов. Индивидуальная гигиена полости рта до начала лечения у всех пациентов являлась неудовлетворительной, среднее значение ОНI-S до лечения составило 4,4 \pm 0,4.

В контрольную II группу включили 20 пациентов со здоровым пародонтом, хорошим гигиеническим состоянием полости рта и значением ОНI-S, равным 1,86 \pm 0,40 (удовлетворительная гигиена полости рта).

Пациентам I группы предварительно назначали коррекцию индивидуальной гигиены полости рта и сеанс профессиональной гигиены. Проводили кюретаж пародонтальных карманов, назначалась антибактериальная терапия.

Из рентгенологических методов исследования применялись ортопантомография, трехмерная дентальная компьютерная томография.

Молекулярно-генетические методы

Выявление пародонтопатогенных микроорганизмов осуществляли с тестом Micro-IDent plus 11 (Hain-Lifescience, Германия). Набор состоит из 5 стерильных бумажных штифтов, 4 разноцветных туб,

пенала и сопроводительного письма. Метод позволяет выявить не сами 11 видов основных пародонтопатогенных бактерий, а определенные маркерные последовательности их нуклеиновых кислот. Тест основан на ПЦР с последующей обратной гибридизацией, которая включает в себя раскручивание ампликонов на одиночные нити, связывание меченых ампликонов с зондом, перемещение связанной ДНК из пробы, удаление несвязанного зонда, идентификацию связанного зонда. Анализ обратной гибридизации включал денатурацию ампликона ДНК и нанесение полученного образца на нитроцеллюлозную полоску, содержащую специфические зонды 11 пародонтопатогенов, контрольный зонд для выделенной ДНК и контроль конъюгата. Ампликоны, связавшиеся с комплементарным зондом, визуализировали после добавления конъюгата стрептавидина с щелочной фосфатазой. Результаты считывали по предоставленному шаблону.

В I группе проводили повторный анализ через 1 месяц после пародонтологического лечения перед дентальной имплантацией.

Для определения генетической предрасположенности к воспалению пользовались набором GenoType IL-1 (HAIN-Lifescience, Германия). Комплект состоит из стерильной тубы с аппликатором, сопроводительного письма. Тест основан на DNA-strip-технологии и характеризуется полиморфизмом IL-1 α -889, IL-1 β +3953 и IL-1RN+2018. Процедура состоит из изоляции ДНК, многократной амплификации и обратной гибридизации. ДНК выделяли кипячением биоматериала с последующим использованием раствора щелочи. Амплификацию осуществляли на амплификаторе ТП4-ПЦР-01-Терцик (НПО «ДНК-Технология», Россия). Результаты теста позволяют отнести пациента к одному из 4 генотипов:

- 1 — нормальная воспалительная реакция с нормальной выработкой IL-1 и IL-1RN;
- 2 — ослабленное подавление воспалительной реакции с нормальной выработкой IL-1 и сниженной выработкой IL-1RN;
- 3 — интенсивная воспалительная реакция с повышенной выработкой IL-1 и нормальной выработкой IL-1RN;
- 4 — невероятно интенсивная воспалительная реакция с повышенной выработкой IL-1 и сниженной выработкой IL-1RN.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы определили риск развития воспалительных периимплантационных осложнений и генетическую предрасположенность к ним (табл. 1). Результаты анализа Micro-IDent 11 plus приведены в табл. 2.

Спустя 1 месяц после проведенного пародонтологического лечения и антибактериальной терапии при повторном анализе

Таблица 1. Результаты теста GenoType IL-1

Генотип IL-1	I группа		II группа		Всего
	абс.	%	абс.	%	
1	8	17,8	11	55	19
2	7	15,6	8	40	15
3	16	36,5	1	5	17
4	14	31,1	—	—	14

Таблица 2. Результаты теста Micro-IDent

Микроорганизм	I группа		II группа	
	абс.	%	абс.	%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	12	26,7	1	5
<i>T. forsythia</i>	32	71,1	2	10
<i>P. gingivalis</i>	24	53,5	—	—
<i>T. denticola</i>	11	24,4	1	5
<i>P. intermedia</i>	30	66,7	1	5
<i>P. micros</i>	10	22,2	4	20
<i>C. rectus</i>	2	4,4	—	—
<i>E. nodatum</i>	4	8,9	—	—
<i>E. corrodens</i>	3	6,7	—	—
<i>Capnocytophaga spp.</i>	3	6,7	—	—
<i>F. nucleatum</i>	22	48,9	3	15

в I группе также обнаружены маркеры пародонтопатогенных комплексов, но в концентрации значительно ниже пороговых значений.

У 15 (75%) человек контрольной группы с интактным пародонтом в области зубодесневой борозды не выявлено ни одного из исследуемых нами видов пародонтопатогенов 2-го порядка и у 5 (25%) выявлена маркерная ДНК одного вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для обеспечения долгосрочного успеха при дентальной имплантации требуется предоперационная диагностика для определения индивидуальной генетической предрасположенности к развитию интенсивных воспалительных процессов, видового состава и количества пародонтопатогенных бактерий. Тест GenoType IL-1 позволяет определить генотип, прогнозировать вероятность развития воспалительной реакции, ее интенсивность.

Тест-система Micro-IDent обладает высокой информативностью, позволяя выявлять ДНК 11 наиболее клинически значимых возбудителей пародонтита в одном биологическом образце.

Использование в практической деятельности современных молекулярно-генетических систем позволяет быстро идентифицировать пациентов из групп риска с благоприятным генетическим и бактериальным фоном для развития заболеваний периимплантатных тканей, провести раннюю диагностику заболеваний на стадии малых клинических проявлений, разработать индивидуальную программу пародонтологического лечения, а также дает ценную информацию для выбора целенаправленной антибактериальной терапии.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Давыдова М.М., Плахтий Л.Я., Царев В.Н. Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии. — В кн.: Царев В.Н. (ред.) Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — С. 223—273.
2. Зорина О.А., Кулаков А.А., Борискина О.А., Ребриков Д.В. Метод ПЦР «в реальном времени» для анализа количественного и качественного соотношений микробиоценоза пародонтального кармана. — *Стоматология*. — 2011; 3: 31—3.
3. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. — *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2015; 60 (12): 59—64.
4. Максимовский Ю.М. и др. Новое понимание патогенеза болезней пародонта в свете работ о роли распознающих рецепторов. — *Стоматология для всех*. — 2006; 2: 24—9.
5. Николаева Е.Н. и др. Ассоциативные связи пародонтопатогенных видов бактерий I и II порядков в смешанных биопленках у пациентов с периимплантатами. — *Стоматология для всех*. — 2014; 4: 38—42.
6. Олейник Е.А., Трифионов Б.В., Денисова Е.Г. Использование молекулярно-генетических систем для диагностики воспалительных заболеваний пародонта. — *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. — 2013; 11-1 (154): 57—60.
7. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. — М.: Бином, 2014. — С. 223.
8. Царев В.Н. Антимикробная терапия в стоматологии. Руководство. — М.: МИА, 2019. — С. 207—209.
9. Царев В.Н. Лабораторная диагностика анаэробной (неклостридиальной) инфекции. — В кн.: Лабинская А.С., Костюкова Н.Н. (ред.) Руководство по медицинской микробиологии. — Кн. 3, т. 1. — М.: Бином, 2013. — С. 439—454.
10. Царев В.Н. и др. Перспективы применения молекулярно-генетических методов исследований в диагностике пародонтита. — *Вестник Медицинского стоматологического института*. — 2016; 3 (38): 8—13.
11. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита. — *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2017; 5: 101—12.
12. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Царева Т.В. Цитокиновый профиль десневой жидкости у пациентов после внутрикостной дентальной имплантации и при развитии периимплантита. — *Стоматология*. — 2013; 3: 52—5.
13. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Царева Т.В. Экспрессия цитокинов в секрете зубодесневой борозды у пациентов после дентальной имплантации и при развитии периимплантитов. — *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2012; 6: 110—4.
14. Sellman H.H. Kariesrisikotest jetzt auch als DNS-Sonden-Test. — *Dental Spiegel*. — 2003; 1: 44—5.
15. Socransky S.S., Smith C., Haffajee A.D. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. — *J Clin Periodontol*. — 2002; 29 (3): 260—8.
16. Takeuchi Y. et al. Immunoglobulin G subclass antibody profiles in Porphyromonas gingivalis-associated aggressive and chronic periodontitis patients. — *Oral Microbiol Immunol*. — 2006; 21 (5): 314—8.