**ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«Санкт-Петербургский государственный университет»

Кафедра стоматологии

Допускается к защите

Заведующий кафедрой стоматологии

*Д.м.н. Соколович Наталия Александровна*

*\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (подпись)*

*«\_\_\_ »\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2018 г.*

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

НА ТЕМУ: «Влияние воспалительных заболеваний полости рта на местный противовирусный иммунитет»

|  |  |
| --- | --- |
|  | Выполнила студенткаНиколаева Валерия Андреевна524 группыНаучный руководительД.м.н., вед. н.с. отдела вирусологии ФГБНУ "ИЭМ" Дешева Юлия Андреевна |

Санкт-Петербург

2018

**Список сокращений**

ВОЗ (WHO) – Всемирная Организация Здравоохранения

ГВ,ВГ (HV) – Герпес-вирусы, вирус герпеса

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

иРНК – информационная РНК

мРНК – малоядерная РНК

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ВПГ-1 (HSV-1) – вирус простого герпеса 1 типа

ВПГ-2 (HSV-2) – вирус простого герпеса 2 типа

ВВЗ, ВОГ (VZV) – вирус Варицелла-Зостер, вирус опоясывающего герпеса, вирус простого герпеса 3 типа

ЦМВ (CMV) - Цитомегаловирус

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр, вирус герпеса человека 4 типа

ВГЧ-8 – вирус герпеса человека 8 типа

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

IgAs, sIgA – секреторный иммуноглобулин А

СОПР – слизистая оболочка полости рта

ПЦР (PCR) – полимеразная цепная реакция

МРО – миелопероксидазы

ММР – матриксные металлопротеиназы

ИФА(Eliza – enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ

АГ – антиген

АТ –антитело

ГАГ – гликозаминогликаны

ОГГС (AHGS) – острый герпетический гингивостоматит

ОК – отрицательный контроль

ОКО – отрицательный контрольный образец

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

ХРГС – хронический рецидивирующий герпетический стоматит

Оглавление

Cписок сокращений.--------------------------------------------------------------стр.2

**I ГЛАВА. Введение.**

1.1.Актуальность темы исследования выпускной квалификационной работы.------------------------------------------------------------------------------------------стр.5

1.2. Цель и задачи исследования.----------------------------------------------стр.6

1.3. Научная новизна и практическая значимость.------------------------стр.7

**II ГЛАВА. Обзор литературы.**

2.1.1. Пародонт. Строение.------------------------------------------------------стр.8

2.1.2. Клеточное строение тканей пародонта и их функциональная значимость.-------------------------------------------------------------------------стр.8

2.2.1. Классификация воспалительных заболеваний полости рта.-----стр.10

2.2.2. Связь вирусов с этиологией заболевания при пародонтите.-----стр.12

2.3.1. Строение и классификация вирусов герпеса.-----------------------стр.13

2.3.2. Патогенез вирусов герпеса и механизм проникновения в организм человека.----------------------------------------------------------------------------стр.15

2.3.3. Иммунные реакции тканей пародонта, стадии воспалительного процесса и их динамика.--------------------------------------------------------стр.17

2.4.1. Понятие противовирусного иммунитета слизистой оболочки.-----------------------------------------------------------------------------------------------------стр.21

2.4.2. Факторы местного иммунитета слизистой оболочки.-----------стр.21

2.4.3. Строение секреторной системы IgAs.--------------------------------стр.23

2.4.4. Функции и механизмы действия sIgA.-------------------------------стр.24

2.5. Выявление возбудителей инфекций полости рта методом ПЦР-стр.25

2.5.1. Метод ПЦР(полимеразная цепная реакция) -----------------------стр.25

2.5.2. Этапы метода. Тест-системы для ПЦР.------------------------------стр.26

2.6. Метод ИФА (иммуноферментный анализ).---------------------------стр.28

2.6.1. Принцип метода ИФА.---------------------------------------------------стр.28

2.6.2. Тест-системы для ИФА.--------------------------------------------------стр.30

2.7. Актуальные научные исследования на тему взаимосвязи вирусов герпеса с заболеваниями пародонта и их результаты.------------------------------стр.30

2.7.1. Методика проведения исследований взаимосвязи вирусов герпеса с заболеваниями пародонта.------------------------------------------------------стр.30

2.7.2. Обзор исследования на тему взаимосвязи ВПГ-2 типа и развития острого герпетического гингивостоматита.--------------------------------стр.32

**III ГЛАВА. Материалы и методы исследования.**

3.1.Организация исследования.------------------------------------------------стр.34

3.2. ИФА(иммуноферментный анализ, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), принцип проведения.---------------------------------------------------стр.36

3.2.1. Определение общих IgA в слюне.------------------------------------стр.36

3.3. ПЦР(полимеразная цепная реакция, PCR), принцип постановки метода.-------------------------------------------------------------------------------------------стр.38

3.3.1. Выделение вирусной ДНК из клинических проб-----------------стр.38

3.3.2. Последовательность проводимой ПЦР реакции.-----------------стр.39

3.4. Статистическая обработка результатов.-------------------------------стр. 43

**IV ГЛАВА. Собственные результаты**.------------------------------------стр.44

3.5.Изучение этиологической значимости вирусов герпеса в течении пародонтита.------------------------------------------------------------------------стр.50

3.6.Изучение местного иммунитета слизистой полости рта.------------стр.51

**V ГЛАВА. Заключение и выводы**

4.1.Заключение--------------------------------------------------------------------стр.54

4.2.Выводы-------------------------------------------------------------------------стр.55

Список использованной литературы -----------------------------------------стр.56

**I ГЛАВА. Введение.**

Вирусы герпеса являются наиболее распространенной группой вирусов, патогенных для человека. По данным ВОЗ, опубликованным 28 октября 2015 года в журнале PLOS ONE о распространенности вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1), этим вирусом инфицированы более 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет, или 67% населения. Болезни, вызванные ВПГ-1 и 2, занимают 2-ое место после гриппа в причинах человеческих смертей. Широкая распространенность и многообразие вирусов герпеса может приводить не только к классическим проявлениям инфекции в организме человека, но и усугублять уже имеющиеся патологические изменения, даже незначительные. Также вирусы герпеса способны благоприятствовать развитию новых заболеваний в различных системах органов человека, что несомненно должно быть тщательно изучено во избежание еще большего распространения вирусов герпеса.

**1.1. Актуальность темы выпускной квалификационной работы**

На сегодняшний день прослежена и доказана связь между наличием в полости рта в десневых и пародонтальных карманах штаммов вирусов герпеса и развитием заболеваний тканей пародонта. Целый ряд исследований показал, что, вирусы герпеса человека, в особенности вирусы простого герпеса (ВПГ-1, ВПГ-2), цитомегаловирус (ЦМВ) и вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) играют роль в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта [Contreras A, 2000; Slots J, 1999; Saygun I, 2008].

Очевидно, развитие пародонтита и пародонтоза зависит от взаимодействий между вирусами герпеса, специфическими патогенными бактериями и деструктивными медиаторами воспаления. Вирусы могут играть роль в усилении тяжести заболеваний пародонта путем стимуляции продукции цитокинов и хемокинов, которые могут негативно сказаться на местной иммунной защите пародонта [Sunde PT, 2008] в результате чего могут возникать формы бактерий - возбудителей периодонтита, обладающих повышенной вирулентностью [Kamma JJ, 2001]. Таким образом, вирусно-бактериальная сочетанная инфекция может стать причиной осложненных форм заболевания. Изучение локального иммунитета полости рта при хроническом пародонтите будет способствовать разработке новых способов профилактики и лечения этого социально-значимого заболевания.

Данная работа посвящена разработке методики исследования жидкости из пародонтальных карманов и слюны методами ПЦР и ИФА на наличие вирусов герпеса и оценки общего и противовирусного локального иммунитета у группы пациентов с различной тяжестью течения, воспалительных заболеваний полости рта.

**1.2. Цель и задачи исследования**

Целью данного исследования являлось выявление роли вирусов герпеса в течении в воспалительных заболеваниях пародонта, а также влияние тяжести течения заболевания на состояние местного иммунитета полости рта.

Для ее выполнения необходимо решение нижеперечисленных задач:

1. Получение биологического материала у отобранной группы пациентов с хроническим рецидивирующим герпетическим стоматитом.
2. Изучение этиологической значимости вирусов при воспалительных заболеваниях пародонта разной степени тяжести.
3. Разработка методики для количественной оценки локальных IgA в пробах слюны.
4. Изучение содержания локальных общих и вирус-специфических IgA в образцах слюны.

**1.3. Научная новизна и практическая значимость**

**Научная новизна.**

Выполнение проекта позволит получить ряд новых фундаментальных знаний о роли вирусных инфекций в развитии хронических воспалительных заболеваний пародонта, влияния вирусов на состояние местного иммунитета слизистой оболочки рта, а также вирусно-бактериальных взаимодействиях. При этом будут разработаны инновационные подходы к диагностике и терапии соответствующей патологии.

**Практическая значимость.**

Полученные данные будут способствовать разработке наиболее эффективных и доступных мер специфической диагностики вирусных инфекций при хронических воспалительных заболеваниях пародонта, которая в настоящее время не является широко доступной. Лечебно-профилактические мероприятия, спланированные с учетом участия вирусов герпеса в течении хронического периодонтита могут снизить потери зубов, связанных с этой патологией.

**II ГЛАВА. Обзор литературы**

**2.1.1. Пародонт. Строение.**

Пародонт (др.-греч. παρα- — около, ὀδούς — зуб) – комплекс функционально связанных тканей, окружающих зуб, которые представляют собой опорную систему зуба.



**Рисунок. 1.** 1. коронка зуба, покрытая эмалью; 2. десна; 3. корень зуба, покрытый цементом; 4. периодонт, представленный комплексом связок; 5. надкостница; 6. костные стенки альвеолы [Барер Г. М., Немецкая Т. И. - Болезни пародонта. Клиника, диагностика и лечение: Учебное пособие. 1996 г.].

Все перечисленные структуры объединены между собой следующим образом: волокна соединительнотканного слоя десны связываются с периодонтом, а коллагеновые волокна, из которых состоит периодонт входят в костную ткань стенок зубной альвеолы и клетки цемента, из которых состоит корень. Все ткани, входящие в пародонт связаны общей иннервацией и кровоснабжающей системой. [Барер Г., 1996 г]

**2.1.2. Клеточное строение тканей пародонта и их функциональная значимость.**

*Десна*

Делится на свободную и прикрепленную, вплетающуюся в рядом находящиеся ткани путем сочленения волокон собственной оболочки десны с надкостницей костных альвеол. В области шейки с ней связывается циркулярная связка зуба, образующая мембрану, защищающую периодонт от повреждений. Свободная часть десны прилежит к зубу и между этими образованиями открывается десневая борозда.
Регуляторами защитной функции эпителия десны являются гликозаминогликаны (ГАГ), входящие в состав вещества между клетками эпителия. ГАГ являются высокомолекулярными соединениями и осуществляют трофику соединительной ткани и регенераторных процессов, предотвращая проникновение АГ в десневую ткань. ГАГ делятся на кислые - хондроитинсерная кислота А и С, гиалуроновая кислота, гепарин, и нейтральные – гликоген.

*Зубодесневое соединение и десневая жидкость*

Зубодесневое соединение является первым местом локализации воспалительного процесса при поражениях пародонта. В зоне зубодесневого соединения находится зубодесневая борозда, которая представляет собой щель между десной и поверхностью зуба в области шейки, глубина примерно 1-2мм, критерием образования пародонтального кармана является нарушение целостности прикрепления эпителия к кутикуле эмали.

Десневая борозда наполнена десневой жидкостью, которая представляет собой транссудат сыворотки крови, обладающей фагоцитарной активностью и иммунологическими свойствами. В состав десневой жидкости входят : лейкоциты, слущенные эпителиальные клетки, электролиты, белковые компоненты, ферменты.

Лейкоциты : увеличиваются в десневой жидкости в зависимости от развития воспалительного процесса. При остром процессе увеличивается в 4 раза по сравнению с нормой, при хронизации процесса увеличивается в 2 раза. Лейкоциты являются продуцентами лизосомальных ферментов – лизоцима, фосфатаз.

Эпителиальные клетки: в норме в десневой жидкости обнаруживаются слущенные эпителиальные клетки. При возникновении воспалительного процесса количество слущенных эпителиальных клеток увеличивается, из-за увеличения митотической активности десны при начале воспаления.

Микроорганизмы: постоянными в десневой борозде определяются стрептококки, стафилококки и спирохеты. При развитии патологического процесса усиливаются их болезнетворные действия, изменяется их число и состав в такую сторону, что они становятся аналогичными микроорганизмам, образующим зубной налет.

Белковые компоненты: состав десневой жидкости аналогичен составу сыворотки крови, обнаруживаются альбумины, глобулины и белки системы комплемента. В десневой жидкости продуцируются иммуноглобулины и АТ в сходной с кровью концентрации.

Ферменты: показатель увеличения концентрации лизоцима, гиалуронидазы(участвует в деполимеризации кислых ГАГ, вызывая деструкцию тканей), фосфатаз является следствием увеличения развития воспалительных заболеваний тканей пародонта.

Важная роль отводится коллагену, который входит в состав соединительной и костной ткани пародонта. При ситуации нормы коллаген устойчив к воздействиям ферментов антигенного и тканевого происхождения. Расщепляющий коллаген фермент называется коллагеназа. При развитии патологических процессов пародонта активность десневой жидкости увеличивается, что приводит к возрастанию количества коллагена и его расщепления [Караков К.Г., 2012.]

**2.2.1. Классификация воспалительных заболеваний полости рта**

Заболевания полости рта можно классифицировать в зависимости от структур ,которые они поражают:

* Заболевания слизистой оболочки полости рта
* Заболевания тканей пародонта
* Заболевания слюнных желез
* Заболевания костных структур полости рта
* Заболевания зубов

II. Заболевания тканей пародонта

1. Гингивит

Представляет собой воспалительное заболевание десны, которое вызывается отрицательным действием местных и общих причин, протекает без изменения целостности зубодесневого прикрепления.

Среди них выделяют несколько форм:

* Катаральный
* Язвенно-некротический
* Гипертрофический – фиброзный
* Отечный

По тяжести течения делится на 3 степени : легкая, средняя, тяжелая

По распространенности процесса : локализованный и генерализованный

По стадиям: острая, хроническая, обострение хронической, ремиссия

По степени разрастания мягких тканей по уровню высоты коронки: до 1/3, до ½ и более ½.

1. Пародонтит

Представляет собой видоизменение тканей пародонта, характеризующееся деструкцией костной ткани и периодонта, сопровождающееся воспалением.

По уровню деструкции костной ткани выделяют 3 степени тяжести течения: легкая (до 1/3 высоты), средняя(до ½ высоты), тяжелая(более ½ высоты)

По распространенности : локализованный и генерализованный

По стадиям: острый, хронический, обострение хронического, ремиссия

1. Пародонтоз

Представляет собой дистрофическое поражение тканей пародонта.

4) Идиопатические(самопроизвольные) заболевания пародонта, характеризующиеся лизисом тканей

5) Пародонтомы – опухолеподобные заболевания тканей пародонта

[Боровский Е.В. и др. 2001 г.].

**2.2.2. Связь вирусов с этиологией заболевания при пародонтите.**

*Пародонтит* – заболевание, которое представляет собой патологическое видоизменение тканей пародонта, характеризующееся деструкцией костной ткани и периодонта, сопровождающееся воспалением. Классифицируется на локализованный, в области одного зуба или нескольких зубов и генерализованный.

Пародонтит – это многофакторное, хроническое заболевание, ведущее к уничтожению окружающих зубы тканей, при отсутствии лечения приводит к потере альвеолярной кости и эксфолиации вовлеченных зубов. Главным этиологическим фактором развития пародонтита является пероральная биопленка, содержащая анаэробные микроорганизмы, число которых насчитывает более 1200 бактериальных видов. Хотя роль бактериальной бляшки в возникновении воспалительных заболеваний пародонта в целом доказана, роль вирусов в значительной степени остается неисследованной.

В 1996 году было продемонстрировано, что вирусы герпеса, ВИЧ и папиллома вирусы достаточно часто выявляются при хронических пародонтитах [Parra B, 1996]. Целый ряд исследований показал, что, вирусы герпеса человека, в особенности вирусы простого герпеса (ВПГ-1, ВПГ-2), цитомегаловирус (ЦМВ) и вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) играют роль в патогенезе воспалительных заболеваний тканей пародонта [Contreras A, 2000; Slots J, 1999; Saygun I, 2002].

Предположительно, развитие пародонтоза зависит от взаимодействий между вирусами, специфическими патогенными бактериями и деструктивными медиаторами воспаления. Резорбция костной ткани является следствием высвобождения макрофагами ферментов миелопероксидазы (МРО) и матриксной металлопротеиназы (ММР). Определение активности ММР различных подклассов имеют большое клиническое значение в патогенезе периодонтального воспаления вследствие их способности активировать латентные формы такие эффекторных белков, как антимикробные пептиды, цитокины и хемокины. Предполагается, что определение активности МРО и ММР-8 может служить предиктивным биомаркером прогрессирования воспалительных заболеваний пародонта [Mc Crudden, 2017]. Обнаружено, что вирусы могут играть роль в увеличении тяжести заболеваний пародонта путем стимуляции продукции цитокинов и хемокинов, которые могут негативно сказаться на местной иммунной защите пародонта [Sunde PT, 2008] в результате чего могут возникать формы бактерий - возбудителей периодонтита, обладающих повышенной вирулентностью [Kamma JJ, 2001].

Таким образом, вирусно-бактериальная сочетанная инфекция может стать причиной осложненных форм заболевания.

**2.3.1. Строение и классификация вирусов герпеса**

Вирусы герпеса объединены в семейство Herpesviridae, включают в себя 3 подсемейства:

1)Альфа-герпес вирусы

2)Бета-герпес вирусы

3)Гамма-герпес вирусы

Строение ГВ

Размер вирионов вирусов герпеса около 100 – 300 нм, форма вирионов – сферическая. Структура вириона: сердцевина, капсид , внутренняя оболочка (tegument), внешняя оболочка (envelope). Сердцевина вириона содержит двуцепочечную линейную вирусную ДНК, которая имеет молекулярную массу 84-160 мД. В составе вирионов выделяют около 30 гликопротеидов, семь из которых (gB, gC, gD, gE, gG, gF, gX) находятся на поверхности внешней оболочки и отвечают за выработку вируснейтрализующих антител.



**Рисунок 2. Общее строение вируса герпеса**

Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) и вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ-2), имеющие общие антигены и похожие биологические признаки

* Вирус Варицелла - Зостер (вирус опоясывающего герпеса и ветряной оспы) (ВВЗ, ВОГ, вирус герпеса 3 типа)

Бета-герпесвирусы

Представители: Цитомегаловирус (ЦМВ) , вызывает врожденные патологии ЦНС, ретинопатии, пневмопатии, гепатиты. ЦМВ содержит более крупную ДНК по массе, имеет более длительный цикл репродукции. Активация латентной ЦМВ-инфекции наблюдается, как правило, при иммунодепрессивных состояниях, СПИДе, иммунодепрессивной терапии. Пути передачи: транс плацентарный, воздушно-капельный.

Гамма-герпесвирусы

Представители:

* Вирус Эпштейна-Барр (ВДВ, вирус герпеса 4 типа)
* Вирус герпеса человека 8 типа (ВГЧ-8) [Павлов И.П.,2005 г.].

**2.3.2. Патогенез герпес-вирусных инфекций и механизм проникновения в организм человека**

Процесс проникновения вируса в организм представляет собой многоэтапный процесс:

1) прикрепление вирионов к клеточным рецепторам

2) эндоцитоз

3) слияние мембран вириона и клетки.

Далее капсид освобождается от белков внешней оболочки и вирусный комплекс ДНК-белок встраивается в ядро клетки. ДНК вируса оказывается в нуклеоплазме, происходит транскрипция клеточной РНК-полимеразой. Транскрипция делится на 3 вида: сверхранняя, ранняя, поздняя. Далее происходят процессы: процессинг мРНК, синтез кодируемых продуктов, затем обратный их транспорт их в ядро, репликация ДНК, а затем формирование дочерних молекул. Те незрелые капсиды, которые образовались в ядре, путем почкования проникают через ядерную мембрану в цитоплазму, далее в ЭПР формируются зрелые капсиды и внешняя оболочка вируса, далее происходит транспорт к поверхности клетки и выход из нее.

Вирусные белки начинают синтезироваться через 2 часа после заражения, и самое большое их число обнаруживается через 8 часов. Инфекционные вирионы образуются через 10 часов и их максимальный титр проявляется через 15 часов. В связи с этими процессами подавляется синтез собственных белков клетки.

Особенность инфекций, вызываемых вирусами герпеса - способность долго персистировать в организме, в результате вызывая хронические и латентные формы инфекции с обострениями. При этом вирус остается в клетке интегрировано с геномом клетки.

Все семейство Herpesviridae характеризуется иммуносуперссивным действием, подавлением реакций иммунитета .

*Этапы развития герпетической инфекции в организме*:

* Первичное инфицирование кожи и слизистых оболочек
* Острое инфекционное поражение ганглиев, сопровождающееся колонизацией, с дальнейшим развитием латентности , при которой вирусная ДНК, которая находится в нейронах, свидетельствует о наличии инфекционного поражения.

Далее происходит переход инфекции из острой фазы, этот переход идет одновременно с развитием иммунных факторов: иммунная система организма снижает размножение вируса на коже и далее ганглии становятся непермиссивными (создаются условия, в которых вирусы не могут размножаться) – и инфекция переходит в латентное состояние.

При наличии в клетке ВПГ происходит снижение количества цАМФ. Происходит снижение баланса между клеткой и ВПГ, в результате которого происходит усиление репликации вируса, которое приводит к обострению. Далее баланс между клеткой и ВПГ восстанавливается до периода, пока провоцирующий фактор не вызовет повторную репликацию вируса.

ДНК вируса транскрибируется в ядре, атрансляция иРНК, которые образуются из транскриптов, проходит в цитоплазме клетки. Репликация вирусной ДНК происходит в ядре, далее она соединяется с незрелыми нуклеокапсидами. Способность вируса инфицировать клетки усиливается по мере приобретения капсидами оболочки в результате почкования через внутренние ламеллы ядерной мембраны. Выход вирусных частиц осуществляется их транспортом к поверхности клетки через модифицированный ЭПР.

Вирусы герпеса обладают способностью размножаться в десневой ткани, оказывая прямое цитопатическое действие на эндотелиальные клетки, полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты, макрофаги и клетки костной ткани. Обладая иммуносуппрессивным действием, вирусы герпеса могут влиять на состояние местного иммунитета ротовой полости, участвуя в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. Вирусная инфекция может способствовать усилению адгезии и колонизации патогенных бактерий. Таким образом, участие вирусов герпеса в патогенезе пародонтита может иметь важные терапевтические последствия. В связи с этим специфическая диагностика вирусных инфекций полости рта и своевременно назначенная противовирусная терапия может стать новым способом профилактики и лечения хронического пародонтита. Это является особенно актуальным в свете недавно полученных данных об успешном использовании противовирусных препаратов для лечения тяжелых запущенных форм хронического пародонтита. Учитывая, что противовирусная терапия у пациентов со сниженным иммунным статусом может приводить к формированию вирусов герпеса, резистентных к базовым препаратам, актуальным является поиск мишеней для противовирусного действия новых универсальных препаратов. Вакцинация против вирусных инфекций может также играть положительную роль в профилактике прогрессировании пародонтита. [Исаков.В.А. и др., 1999 г.].

**2.3.3. Иммунные реакции тканей пародонта, стадии воспалительного процесса и их динамика**

Основная роль в местном иммунном ответе отводится цитокинам – группе белков, подобных гормонам, которые вырабатываются макрофагами, лимфоцитами и иными клетками моноцитарно-макрофагального ряда. Цитокины синтезируются клетками только при наличии в организме АГ и регулируют активацию и торможение воспалительных реакций, инициируя иммунный ответ. Еще одним производителем цитокинов в слюне является сывороточный транссудат, а так же слюнные железы и эпителиальные клетки слизистой оболочки при взаимодействии с АГ.

*Классификация цитокинов*

* Интерлейкины – это медиаторы воспаления, которые активируются при тканевых дефектах и инфекционном поражении тканей, активируют Т-клетки
* Интерфероны – белки, которые активируют нейтрофилы, синтез ферментов, которые в свою очередь активируют макрофаги за счет «дыхательного взрыва»
* Факторы некроза опухоли (ФНО) – стимулируют фагоцитарную функцию и активируют систему свертывания крови
* Хемокины – освобождают медиаторы из тромбоцитов, вызывают дегрануляцию лейкоцитов и усиливают проницаемость сосудов
* Факторы роста – белки, которые способствуют регенераторным процессам, активируют рост мезенхимных клеток и образование новых кровеносных сосудов

Динамику процессов пародонтального воспаления можно разделить на 4 стадии:

- начальная стадия

- стадия раннего воспаления

- стадия установившегося воспаления

- стадия развивающегося (прогрессирующего) воспаления

*Начальная стадия пародонтального воспаления:*

По клиническим проявлениям соответствует острому иммунопатологическому воспалению кровеносных сосудов – васкулиту. На данной стадии происходит резкое увеличение проницаемости стенок капилляров десневой борозды и увеличение ОЦК в пародонте. Через эпителий сосудов выходит большое количество ПМЯЛ – полиморфно-ядерных лейкоцитов.

Изменение целостности эпителия десневой борозды является одной из ведущих причин развития десневого воспаления. Этот процесс происходит в связи с распадом гликозаминогликанов межклеточного вещества тканей пародонта, а так же из-за активности провоспалительных цитокинов, хемокинов и активированных С-реактивных белков системы комплемента. Наряду с этими процессами в кровеносных сосудах из-за деполяризации эпителия происходит адгезия лейкоцитов к стенкам клеток эпителия.

Цель всех перечисленных реакций и процессов – максимальное ускорение движения ПМЯЛ к АГ с целью уничтожения. Но это сопровождается побочными эффектами: потеря сосудами плазменных белков, около сосудистый отек, растворение основного вещества и коллагена, что приводит к тяжелой ишемии тканей пародонта.

Функция основной защиты пародонта от АГ принадлежит ПМЯЛ, но первыми в цепочке механизмов защиты являются макрофаги, которые расположены под эпителием десневой борозды и преобладающие в очаге воспаления в течении 8-12 часов. Из –за действия АГ макрофаги активируются и выделяют цитокины, ферменты и прочие факторы, целью которых является выведение ПМЯЛ в ткани через стенки капилляров.

В начальной стадии воспаления тканей пародонта отсутствуют видимые клинические признаки, но при зондовой пробе обнаруживается повышенная кровоточивость.

*Стадия раннего воспаления пародонта:*

Клинические проявления: незначительное воспаление краевой десны и кровоточивость десен при чистке зубов.

Морфологические проявления: лимфоцитарные инфильтраты, разрушение волокон коллагена и соединительной ткани, из которой состоит циркулярная связка, патологические изменения фибробластов – клеток, продуцирующих волокнистые структуры.

Изменение целостности строения эпителия в стадии раннего воспаления является наиболее важной деталью в развитии патологии пародонта. Все перечисленные процессы необходимы для максимально быстрого продвижения ПМЯЛ к месту начального повреждения тканей пародонта, но противодействием ПМЯЛ (особенно при усугублении процесса повреждения пародонтальных тканей) является стимуляция тучных клеток, которые продуцируют гистамин, активация системы кининов, усиление образования простагландинов и лейкотриенов. Все эти этапы пролонгируют процесс воспаления и усугубляют его течение.

*Стадия установившегося воспаления:*

Усиливается степень поражения сосудов краевого пародонта, усиливается нарушение кровотока тканей, следствием чего является отечность и цианоз маргинальной части десны, что является доказательством нарушений в венозном отделе и лимфатичеких образованиях и наличии выпота в ткани и распада эритроцитов.

На данной стадии дифференцируется смешанный инфильтрат: ПМЯЛ, лимфоциты разного размера, плазматические клетки. Это доказательство того, что в тканях одновременно присутствует картина как острого, так и хронического воспаления. На данной стадии активируются остеокласты ,но масштабного разрушения кости еще не происходит, поэтому при надежных условиях устранения действия повреждающих агентов и прекращения воспалительной реакции явления остеопороза(разрушения и убыли кости) прекращаются.

*Стадия развивающегося (прогрессирующего) воспаления:*

Происходит глубокое поражение сосудов пародонта, с нарушением его кровоснабжения. Происходит усиление разрушения коллагеновых тканевых элементов и утяжеляется процесс резорбции кости. Основное клеточное отличие этой стадии от предыдущих заключается в том, что плазматические клетки составляют до 80% всех клеток в экссудате. Количество плазматических клеток увеличивается пропорционально утяжелению процесса и степени деструкции пародонтальных тканей. Это говорит о хронизации процесса воспаления и активных иммунных механизмах воспаления.

Изменения сосудов микроциркуляторного русла, которые происходят в результате хронического воспаления, часто сохраняют свою структуру и в стадии ремиссии. [Барер Г. М. и др. 1996 ].

Длительный контакт между АГ и тканями пародонта ведет к активации аутоиммунных процессов, которые вызывают активацию цепной реакции с прогрессирующими изменениями пародонтальных тканей. Соответственно, большая роль в этиологии воспалительно-деструктивных процессов тканей пародонта отводится иммунопатологическим влияниям [Афанасьев У.В. и др., 2001.]

**2.4.1. Понятие противовирусного иммунитета слизистой оболочки.**

Местный иммунитет представляет собой образующуюся специфическую резистентность организма к данному возбудителю в пределах тех тканей, где он локализован. Местный иммунитет слизистых оболочек представлен классом иммуноглобулинов А (IgAs). В связи с наличием в этих иммуноглобулинах секреторного компонента S, вырабатываемого эпителиальными клетками, данные антитела остаются устойчивыми к воздействию на них ферментов слизистой оболочки, так как при прохождении молекул IgA через слизистую оболочку секреторный компонент S прикрепляется к их стенкам [Бабичев С.А., 2010 г. ]

**2.4.2. Факторы местного иммунитета слизистой оболочки.**

*Компоненты слюны:*

1) Лизоцим – это фермент, обнаруживаемый в полости рта, который обладает бактерицидной активностью – превращает бактериальную клетку в сферопласт, который в дальнейшем разрывается осмотическим давлением

2) IgAs – секреторные иммуноглобулины А, которые ингибируют адгезию вирусов к эпителиальным клеткам. Их выделяют плазмоциты подслизистого слоя миндалин

3) Лактоферрин – бактериостатичный белок, связывающий железо. В результате, железо становится недоступным для метаболизма бактерий и размножение микроорганизмов снижается. Выделяется лактоферрин из десневых борозд и секретируется в полиморфных нейтрофилах

4) Муциновый (гликопротеиновый) слой – муцин выделяют подъязычная, подчелюстная и малые слюнные железы. Нити муцина образуют гликокаликс и примыкают к поверхности слизистого покрова, на поверхности которого так же расположены липиды и белки ,в результате чего формируется гликопротеиновый слой слизистой оболочки полости рта. Через липиды и гликокаликс проходят питательные вещества, но эти образования являются барьером для бактериальных и вирусных агентов.

*Неспецифический иммунитет полости рта представляют:*

5) Полиморфные нейтрофилы и макрофаги – обеспечивают неспецифическую защиту полости рта

6) γ интерферрон – выделяется CD4 лимфоцитами, способствует образованию на мембранах антигенов гистосовместимости II класса, которые необходимы для взаимодействия иммунокомпетентных клеток

7)Интерлейкин-2 – стимулирует местный иммунный ответ, который действует на В-лимфоциты, Т-хелперы и цитотоксины

Также, в полости рта имеется лимфоидная ткань, представляющая *специфический иммунитет слизистой оболочки полости рта*:

* миндалинами(небные и язычная) – представлены Т- и В-лимфоцитами, которые усиливают действие местного иммунитета, или же уничтожают антиген
* плазмоциты и лимфоциты слюнных желез – участвуют в синтезе IgAs. Эффективны при наличии Т-лимфоцитов и фагоцитов(хелперы)
* лимфоидное скопление десен, включающее в себя лимфоциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты, основная роль которых – имунный ответ на действие бактерий зубных отложений

Специфический гуморальный иммунитет слизистой оболочки полости рта:

* IgA, IgM, IgG – синтезируются плазмоцитами, далее направляются в зону иммунного конфликта [Луцкая И.К., 2007 г.]

**2.4.3. Строение секреторной системы IgAs.**

Cекреторный IgA (sIgA) является основным иммуноглобулином во внешних биологических жидкостях млекопитающих. Поверхность слизистой оболочки подвергается воздействию множества антигенных веществ, таких как микробы и продукты питания; sIgA обеспечивает иммунологический барьер посторонним веществам, предотвращая как абсорбцию этих антигенов эпителием слизистой оболочки, так и проникновение в организм и препятствует прикреплению микробов и их токсинов к эпителию.

25 лет назад было выяснено, что поверхности слизистой оболочки содержат преимущественно IgA, который отличается от IgA в сыворотке крови молекулярным размером и содержит дополнительные антигенные компоненты.

IgA во внешних выделениях состоит из двух молекул IgA, связанных J цепью (димерный IgA) в комплексе с секреторным компонентом (SC). Интересно, что эти компоненты IgA во внешних выделениях (секреторный IgA, sIgA) получены из двух разных типов клеток, таких как плазматические клетки в прослойке ламины и железистых эпителиальных клетках слизистой оболочки кишечника. Напротив, большинство циркулирующих IgA находится в мономерной форме, особенно у человека. J-цепь синтезируется в тех же плазматических клетках, которые продуцируют димерный IgA. Таким образом, J-цепь участвует и, вероятно, необходима для образования димера в плазматической клетке. Согласно иммуноцитохимическому методу было ясно установлено, что комплексообразование J-цепи с мономерными звеньями цепи до димера происходит до секреции. J-цепь дает конформацию к IgA, которая требуется для непротиворечивости комплексообразования с SС.

Секреторный IgA (sIgA) является основным иммуноглобулином поверхности слизистой оболочки, которая подвергается воздействию множества антигенов. sIgA обеспечивает иммунологический барьер, предотвращая как абсорбцию возбудителей эпителием слизистой оболочки, так и проникновение в организм, и препятствует прикреплению микробов и их токсинов к эпителию. С другой стороны, слизистые оболочки полости рта и верхних дыхательных путей тесно связаны с лимфоидной тканью, при этом контакт между антигенами на поверхности слизистой оболочки и лимфоидными образованиями инициирует разнообразные каскады иммунологических реакций. В связи с этим настоящим проектом предусматривается изучение состояние местного иммунитета при хронических заболеваниях пародонта в динамике инфекционного процесса, связанного с вирусной инфекцией [Hiroshi Nagura., 1989].

**2.4.4. Функции и механизмы действия sIgA**

К основным функциям sIgA относят:

* Предупреждение адгезии микроорганизмов к слизистой оболочке
* Предупреждение проникновения антигенов через слизистую оболочку
* Нейтрализация вирусов, токсинов и ферментов

Этому способствуют рецепторы к секреторному компоненту SC, расположенные на поверхности эпителиоцитов, которые удерживают sIgA на поверхности эпителия. Также sIgA связываются с муцинами, способны предавать мукофильность бактериям, снижать их отрицательный заряд и гидрофобность. Эти свойства обеспечивают очищение поверхности слизистой оболочки от АГ.

Механизмы нейтрализации вирусов sIgA:

1. связываясь с вирусной частицей, блокирует ее прикрепление к клеточным рецепторам
2. подавляют прикрепление и репликацию вирусов
3. могут нейтрализовать внутриклеточные вирионы во время трансцитоза J-содержащих полимеров IgA
4. полимерный IgA способен улавливать проникшие антигены в подслизистом слое и возвращать их на поверхность слизистой оболочки. [Царев В.Н., 2013 г.]

**2.5. Выявление возбудителей инфекций полости рта методом ПЦР**

**2.5.1. Метод ПЦР (полимеразная цепная реакция).** 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 ПЦР был разработан в 1983 году Кэри Мюллисом. Как известно, ПЦР имеет целый ряд достоинств: высокая чувствительность, хорошая воспроизводимость результатов, сочетающаяся с необычайно широким динамическим диапазоном. Она позволяет количественно оценивать концентрацию вируса в конкретный момент времени, изучать динамику вирусной пролиферации, оценивать ответ организма на предлагаемое лечение вирусного заболевания, способность вируса воспроизводиться в разных типах клеток, различия между активной и латентной инфекциями.

В основе метода лежит принцип многократного увеличения микроскопических концентраций фрагментов ДНК возбудителя в биологической пробе пациента в искусственных условиях. В результате сложного процесса, называемого амплификацией(АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК- это любой процесс, увеличивающий число копий какого-либо гена или последовательности ДНК гораздо выше обычного для организма уровня), под воздействием ферментов и изменения температуры (от 50 до 95°С) из одной молекулы ДНК образуется две. При этом происходит копирование участка ДНК, который присутствует только у того вида патогенного микроорганизма, который интересует врача. Таким образом ПЦР – метод, позволяющий выявить в исследуемом биологическом материале определенный участок генетической информации любого вида организма среди остального количества представленных генетических участков и увеличить его количество многократно. [Костюк С.А. и др., 2006г.]

**2.5.2. Тест-системы для ПЦР. Этапы метода.**

Для анализа методом ПЦР в стоматологии используют следующие тест-системы:

1. «Мультидент-5» для выявления 5 пародонт патогенных микроорганизмов в 1 пробирке. Используется для ДНК-диагностики возбудителей заболеваний пародонта
2. «Дентоскрин» - тест-система для раздельного генотипирования
3. «Micro-Ident» для единовременного молекулярно-генетического определения пародонт патогенных бактерий, так же существует улучшенная версия «Micro- Ident plus 11»
4. Bio-Rad C1000
5. «Терцик»

Этапы исследования методом ПЦР:

1)Забор биоматериала.

Процедура, предшествующая непосредственному анализу, которая осуществляется в процедурном кабинете соответствующего профиля. Забор делается с помощью стерильного оборудования только в стерильные пробирки.

2)Хранение и транспортировка биоматериала.

Хранить образцы можно при комнатной температуре не более 2 часов. Если необходимо длительное хранение, то пробы помещают в холодильник с температурой 2-8°С на срок не более одних суток. Допустимо хранение некоторых биоматериалов в течении двух недель в замороженном виде при температуре -20°С. Оттаивание и повторное замораживание проб запрещено. Транспортировка, если она необходима, должна проводиться в специальных термоконтейнерах или термосах с соблюдением всех правил хранения и перевозки биоматериалов.

3)Выделение ДНК из образца.

Способ выделения зависит от вида определяемого микроорганизма и от вида биологического образца. Если, например, анализируется соскоб эпителиальных клеток, используется так называемы метод твердофазной сорбции, заключающийся в добавлении в образец специального вещества, концентрации ДНК на сорбенте и его многократной отмывке буферным составом.

1. Проведение ПЦР.

Некоторое количество образца из биологической пробы переносится в специальную микроцентрифужную пробирку. Туда же добавляется амплификационная смесь, имеющая сложный состав, в объеме 25 мл. Пробирки устанавливают в программируемый термостат, и автоматическом режиме проводится амплификация. Время ее проведения зависит от заданной программы и составляет 2-3 часа. Одновременно с опытными пробами проводятся контрольные – положительные, включающие в себя контрольный препарат ДНК исследуемого возбудителя, и отрицательные, не содержащие исследуемую ДНК. Количество циклов амплификации варьирует от 30 до 40, более 40 циклов проводить не рекомендуется, так как это способствует увеличению количества неспецифических продуктов в пробе.

5)Регистрация результатов.

Фрагмент ДНК, характерный для возбудителя инфекции выделяют методом электрофореза в присутствии специального вещества -бромистого этидия. Его соединение с фрагментами ДНК дает светящиеся полосы при облучении УФ излучением. Образец помещают в камеру для электрофореза и в течение 35-40 минут проводят разделение продуктов амплификации. После этого образец просматривают в УФ свете – наличие оранжевой светящейся полосы свидетельствует о положительном результате.

6)Интерпретация результатов исследования.

Результат ПЦР-диагностики может быть либо положительным, либо отрицательным. Положительный результат говорит о том, что в организме человека обнаружены следы инфекции, причем именно в данный момент времени. Количественный результат ПЦР-анализа оценить может только врач, они индивидуальны для разных типов инфекций. На основании количественного результата можно сделать вывод о степени активности заболевания и определить характер лечения. [Долгих В.В. и др., 2012 г., Покровский В.В. и др., 1995 г.].

**2.6. Метод ИФА (иммуноферментный анализ)**

**2.6.1. Принцип метода**

Иммуноферментный анализ (ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) широко используется в различных сферах медицины, используется для диагностических и аналитических целей и представляет собой лабораторный метод диагностики, который построен на принципе «антиген-антитело». ИФА применяется как для выявления антигенов, так и антител к этим антигенам. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью фермента, который представляет собой метку для регистрирования сигнала. ИФА в настоящее время представляет собой наиболее развивающийся раздел энзимологии – биохимического учения, которое занимается изучением механизма каталитического действия и молекулярную структуру ферментов [Егоров А.М. и др., 1991 г.]

Метод основывается на специфическом связывании антитела с антигеном с образованием комплекса, при котором один из компонентов конъюгирован с ферментом, и в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт(осадок),объем которого можно определить спектрофотометрически
На данный момент существует большое количество вариантов проведения иммуноферментного анализа, но объединяющий их принцип это применение ферментов как метки и возможность их обнаружения в анализируемом веществе с применением субстратных систем.

Каждый метод ИФА включает 3 стадии:

1. Распознание исследуемого субстрата специфичным к этому субстрату антителом
2. Образование связи отмеченного ферментом субстрата со специфическим комплексом или со свободными центрами связывания
3. Переход ферментной метки в сигнал из-за реагирования фермента с субстратом, сигнал измеряется химическими и физическими способами.

На Рис. 3 приведена схема наиболее часто используемой классификации ИФА методов по принципу количественной оценки иммунных комплексов – продуктов реакции антиген-антитело.

МЕТОДЫ ИФА

ТИП II

Определение оставшихся свободных центров специфического связывания

ТИП I

Определение специфического иммунного комплекса анализируемого соединения

Неконкурентные

Конкурентные

Неконкурентные

Гетерогенные

Гомо-

Генные

Гетеро-

генные

Гетерогомогенныеые

Твердофазныееые

Гетерогенные

Гомогенные

Твердофазные

Гетеро

Гомогенные

Твердо

фазные

Различные схемы проведения анализа

**Рисунок. 3. Наиболее популярная в настоящее время классификации методов ИФА [ 8] по Б.Б. Дзантиеву, А.П. Осипову.**

Выделяют 2 подхода для такой оценки:

1 тип – определение количества появившихся антиген-антитело комплексов

2 тип – определение количества не вступивших в реакцию компонентов, которые содержат метку. В таком случае количество новообразовавшихся иммунных комплексов определяют по принципу: общее количество компонентов(добавленных), которые содержат метку - количество свободных(оставшихся) компонентов с меткой [Круглов С.В., 2010 г.]

**2.6.2. Тест-системы для ИФА**

В настоящее время ИФА развит во всех медицинских сферах, в том числе и в стоматологической. Для диагностики и анализа вирусов в стоматологии применяются следующие тест-системы для ИФА:

1. «ВектоЦМВ -IgG – стрип», пр-во компании «Вектор-Бест»
2. «ИФА-ВПГ-1-IgG» для определения HSV-1, «ИФА-ВПГ-2-IgG» для определения HSV-2
3. Tест-система для выявления антител класса M к обоим типам вируса - «ИФА-ВПГ-1,2-IgM»

Примечательно, что среди представленных методик отсутствуют тест-системы для оценки локального иммунитета, опосредованного секреторными IgA. Таким образом, разработка таких тест-систем является актуальной.

**2.7. Актуальные научные исследования на тему взаимосвязи вирусов герпеса с заболеваниями пародонта и их результаты.**

**2.7.1. Методика проведения исследований взаимосвязи вирусов герпеса с заболеваниями пародонта.**

В исследовании, проводившемся в стоматологическом колледже и больнице города Пуна, Индия в 2015 году были отобраны 75 пациентов с пародонтитом, подтвердившие свое участие в эксперименте добровольным согласием. Каждая группа включала в себя 25 человек, которые были поделены по степени тяжести пародонтита: легкая - от 1 до 2 мм от клинической убыли костной ткани, средняя - от 3 до 4 мм клинической убыли костной ткани, тяжелая – более 5 мм убыли костной ткани.

Критериями включения были:

* отсутствие истории курения,
* отсутствие приема противовирусных препаратов в течение последних шести месяцев
* отсутствие системных заболеваний, таких как диабет и сердечно-сосудистые заболевания

Критериями исключения были:

* пациенты, которые имели в анамнезе курение,
* прием антибиотиков в последнее время
* наличие каких-либо системных заболеваний, таких как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания

У всех испытуемых были собраны образцы поддесневого налета, в которых после была проведена экстракция ДНК и последующий анализ с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции(ПЦР). Далее был проведен анализ полученных данных. Проведенное исследование выявило обнаружение вирусов герпеса во всех классах хронического периодонтита. Распространенность вирусов герпеса в тяжелых формах хронического пародонтита была выше по сравнению с легкой и средней степенями тяжести хронического пародонтита. Настоящее исследование показывает сильную ассоциацию вирусов герпеса и тяжести хронического пародонтита - ВПГ-1 был выявлен у 52% и ВПГ-2 был выявлен у 56% пациентов с тяжелыми формами хронического пародонтита, таким образом был сделан вывод о том, что вирусы простого герпеса 1 и 2 типа играют роль в увеличении степени тяжести заболевания.

[Kazi M, 2015]

**2.7.2. Обзор исследования на тему взаимосвязи ВПГ-2 типа и развития острого герпетического гингивостоматита.**

В 2014 году был зарегистрирован случай острого герпетического гингивостоматита, выявленный при проведенных исследованиях на базе кафедры пародонтологии города Терувалла, штата Керала, Индия, и кафедры пародонтологии и стоматологии на базе Королевского Саудовского Университета города Эр-Рияд, при котором оролабиальный герпес был вызван ВПГ-2: у исследуемого пациента, мужчины 32-лет обнаруживались многочисленные болезненные изъязвления десны и твердого неба.

На основании анамнеза и клинических проявлений, предварительный диагноз был связан с герпетической вирусной инфекцией.

План дальнейшего обследования:

1. анализ крови
2. исследование на гепатит В
3. исследование на ВИЧ
4. посев с поражений, с дальнейшим проведение тестов на наличие вирусов
5. предварительная биопсия поражения в зоне межзубного сосочка, в направлении к 27 зубу

Но все вышеперечисленные исследования не выявили положительных результатов, после чего был проведен ИФА(ELISA) на наличие АТ Ig G и IgM для HSV-1 и HSV-2 в сыворотке крови. АТ для IgМ HSV-2 показатель был равен 1,7, а АТ для IgG HSV-2 составляло 1,15, в то время, как анализ сыворотки на наличие АТ IgМ для HSV-1 составил 0,14, АТ IgG для HSV-1 составил 0,17 – данные показатели подтверждают, что пациент не реактивен на ВПГ-1. Исходя из показателей, диагноз был подтвержден как острый герпетический гингивостоматит ,вызванный вирусом герпеса 2 типа(ВПГ-2, HSV-2). [[Annie Kitty George](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=George%20AK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25083042), 2014]

Эти данные позволяют судить о том, что развитие поражений полости рта напрямую связано с вирусной активностью ВПГ, а также о том, что вирусы усугубляют процессы течение воспалительных заболеваний полости рта.

Таким образом, можно заключить:

1. В настоящее время новым направлением является изучение связи вирусных инфекций полости рта с воспалительными изменениями пародонта.
2. Факторы местного противовирусного иммунитета играют значительную роль в поддержании гомеостаза полости рта, и изучение факторов местного противовирусного иммунитета будет способствовать лучшему пониманию взаимодействия патогенных микроорганизмов и защитных механизмов хозяина.
3. В настоящее время тест-системы для изучения общих локальных IgA не разработаны. Разработка подобных методик будет иметь не только исследовательское, но и практическое значение.

**III ГЛАВА. Материалы и методы исследования.**

**3.1. Организация исследования.**

Были отобраны 4 группы пациентов, которые, подписав добровольное информированное согласие, подтвердили свое участие в данном исследовании.

1 группа – пациенты со здоровыми тканями пародонта, без патологий.

2 группа – пациенты с ХГП(хронический генерализованный пародонтит) легкой степени тяжести

3 группа – с ХГП средней степени тяжести

4 группа – с ХГП тяжелой степени тяжести

Для каждого пациента было проведено клиническое обследование, которое определило стоматологический статус. В данное обследование были включены: выявление жалоб, сбор анамнеза жизни и анамнеза заболевания, внешний осмотр и осмотр полости рта (интенсивность кариеса постоянных зубов, уровень гигиены полости рта, состояние тканей пародонта). Использован комплекс основных и дополнительных методов обследования.

1. Сбор анамнеза жизни
* Место жительства
* Семейный анамнез(наследственность)
* Возраст
* Вредные привычки
* Профессиональный статус
* Наличие аллергических заболеваний
* Наличие сопутствующих заболеваний
1. Анамнез заболевания:
* Давность возникновения патологии
* Предполагаемая причина патологии
* Проводившееся раннее лечение и имело ли оно эффективность
1. Внешний осмотр
2. Осмотр полости рта
* Запись зубной формулы
* Определение вида прикуса и его состояния
* Наличие съемных протезов в полости рта
* Наличие нависающих краев коронок и пломб
* Уровень прикрепления уздечек верхней и нижней губы, языка, уровень прикрепления тяжей слизистой оболочки полости рта
* Наличие и характер экссудата из пародонтальных карманов и десневой борозды
* Наличие КПП(клинической потери прикрепления) – расстояние между границей эмали и цемента и клинически зондируемым дном пародонтального кармана
* Наличие рецессии десны и характеристика десны
* Наличие зубных отложений
* Оценка подвижности зубов
1. Определение индексов гигиены полости рта
* Индекс КПУ(Klein, 1938)
* Индекс РМА(папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс, Parma, 1960)
* Оценка зубного налета была произведена с помощью растворов Шиллера-Писарева и фуксина
* Определение над- и под-десневых минерализованных зубных отложений проведено с помощью стоматологического зонда или кюрет.

Далее был проведен сбор образцов у каждой из исследуемых групп пациентов. В группах пациентов с различными степенями тяжести пародонтита сбор образцов производился до, во время и после лечения, т.е. по 3 пробы на каждого пациента из группы.
Был проведен сбор слюны для проведения ИФА, а также жидкость из десневых карманов для проведения ПЦР в реальном времени.

Материалы были получены из десневых борозд или из пародонтальных карманов(в зависимости от диагноза пациента), при помощи стерильных бумажных эндодонтических абсорберов Absorbent Paper Points, фирмы Euronda (размер №25 по ISO), которые были введены на 15 секунд с обеспечением минимального контакта с атмосферным воздухом.

Далее абсорберы помещались в стерильную герметичную пробирку «Эппендорф», после чего адсорберы в пробирке помещались в устройство для охлаждения с температурой -20, в котором хранились до транспортировки материала в лабораторию.

Биологические материалы у каждой из групп пациентов с заболеваниями пародонта были отобраны в количестве 3 раз: до лечения, во время лечения, после лечения данного заболевания. Это необходимо для наблюдения за динамикой развития воспалительного процесса.

Пробы слюны обрабатывались PMSF (сериновая протеаза) (Thermo Fisher Scientific Inc, США).

**3.2. ИФА (иммуноферментный анализ, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), принцип проведения.**

**3.2.1. Определение общих IgA в слюне.**

*Реактивы:*

фосфатный буфер с 0,05 % Tween-20(ФБ-Т),

блокирующий буфер(100 мл ФБ-Т, 4 мл ФБС),

разводящий буфер(100 мл ФБ-Т, 4 мл ФБС),

96-луночные планшеты для иммунологических реакций с плоским дном, субстрат – тетраметилбензидин(ТМБ), готовится за 15 мин до использования, стоп-реагент – 1Н H2SO4( добавить 28 мл концентрированной серной кислоты в 1 литр воды).

*Ход эксперимента.*

Для сенсибилизации в лунки 96-луночных планшетов для иммунологических реакций вносили рекомбинантный полипептид стрептококка группы В (СГВ) Р6, содержащий IgA связывающий участок [ ] в концентрации 2 мкг/мл. Адсорбция антигена протекала при температуре 4ºС в течение ночи. Затем следовала трехкратная промывка планшетов ФБ-Т и контакт с 200 мкл блокирующего буфера (4-% раствор эмбриональной бычьей сыворотки в ФБ-Т) в течение 1 часа при комнатной температуре для предотвращения неспецифической сорбции добавляемых на следующей стадии антител на не занятых антигеном участках поверхности твердофазного носителя.

После двукратной промывки планшетов в лунки вносили серии двух-или четырехкратных падающих разведений сывороток крови в ФБ-Т-буфере, содержащем 1% эмбриональную бычью сыворотку, в объеме 100 мкл(начальное разведение тестируемых сывороток 1:10). Инкубация происходит при температуре 37ºС в течение 1,5 часов. По окончании процедуры трехкратной промывки в каждую лунку добавляли по 100 мкл конъюгата – меченных пероксидазой хрена антител к IgA человека, разведенных с помощью ФБ-Т буфера с 1% содержанием эмбриональной бычьей сыворотки, и оставляют для контакта при комнатной температуре на 1 час. Затем планшеты 4 раза отмывали ФБ-Т буфером и вносят по 100 мкл ТМВ-субстрата для пероксидазы. Спустя 5 минут ферментативную реакцию останавливали 100 мкл 1Н серной кислоты, результаты считывали на спектрофотометре «Мультискан» при длине волны 450 нм.

Для определения вирус-специфических IgA 96-луночные панели сенсибилизировали 100 мкл раствора очищенного ультрацентрифугированием вируса А/Нью Йорк/61/15(H1N1)pdm в фосфатно-солевом буфере в концентрации 20 агглютинирующих единиц (АЕ).

**3.3. ПЦР (полимеразная цепная реакция, PCR).**

**3.3.1. Выделение вирусной ДНК из клинических проб пациентов.**

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «РИБО-сорб» (компания АмплиПрайм).

1. В каждую из используемых микропробирок «Эппендорф» вносили по 450 мкл лизирующего раствора. После внесения лизиса перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течении 5 минут.
2. Плотно закрытые пробы тщательно перемешивали на вортексе и затем процентрифугировали в течение 5 секунд при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель со внутренней поверхности крышки пробирки.
3. Тщательно ресуспендировали сорбент на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавили по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Перемешивали на вортексе, оставляли на 1 мин, еще раз перемешали и оставляли на 5 мин при комнатной температуре.
4. Центрифугировали микропробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удаляли надосадочную жидкость вручную используя микродозатор и одноразовые наконечники объемом 1000 мл.
5. Добавляли в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 1. Перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировали 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удаляли надосадочную жидкость вручную используя отдельный наконечник для каждой пробы.
6. Добавляли в пробирки по 500 мкл буфера для отмывки 2. Тщательно ресуспендировали сорбент на вортексе. Центрифугировали 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удаляли надосадочную жидкость вручную с отдельным наконечником для каждой пробы.
7. Повторяли отмывку раствором для отмывки 2, следуя п.6.
8. Добавляли в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4. Тщательно ресуспендировали сорбент на вортексецентрифугировали 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником вручную.
9. Помещали пробирки в термостат при температуре 60º С на 12-15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
10. В пробирки добавляли по 50 мкл РНК-буфера, используя наконечник с аэрозольным барьером, свободный от РНК-аз. Перемешивали на вортексе и центрифугировали пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержала очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации.

Очищенная ДНК хранилась при температуре -20º С.

**3.3.2. Последовательность проводимой ПЦР реакции.**

ПЦР с пробами десневой жидкости из пародонтальных карманов пациентов проводили с использованием коммерческого диагностического набора «АмплиПрайм® HSV / CMV» («НекстБио»)

СОСТАВ Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК HSV и CMV c гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате.

Амплификация с детекцией в режиме «реального времени».

А. Подготовка пробирок для амплификации.

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитывали количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требовалось 10 мкл ПЦР-смеси HSV / CMV и 5 мкл ПЦР-буфера-H. Смесь готовили на общее число исследуемых и контрольных образцов (см. контрольные реакции в п. 7) плюс запас на несколько реакций.
2. Перемешивали содержимое пробирок с ПЦР-смесью HSV / CMV и ПЦР-буфером-H, осадили капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовили реакционную смесь. Смешали необходимое количество ПЦР-смеси HSV / CMV и ПЦР-буфера-H, осадили капли на вортексе.
4. Отобрали необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внесли в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросили.
6. В подготовленные пробирки внесли по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставили контрольную реакцию для качественного определения ДНК:

а) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внесли 10 мкл K2 complex.

б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внесли 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».

1. Программировали амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

**Таблица 1. Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного и планшетного типа.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Цикл | Температура°С | Время | Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров | Количество циклов |
| 1 | 50 | 15 мин | - | 1 |
| 2 | 95 | 15 мин | - | 1 |
| 3 | 95 | 10 с | - | 45 |
| 60 | 20 с | FAM, JOE, ROX |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX.

2. Установили пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадили капли со стенок пробирок на вортексе.

3. Запустили выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступили к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов.

Анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР c детекцией в режиме «реального времени».

**Таблица 2. Анализ кривых накопления флуоресцентного сигнала по 3 каналам.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Канал для флуорофора | FAM | JOE | ROX |
| Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации | ДНК HSV | ДНК CMV | ДНК ВКО-FL |

Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Сt) в соответствующей графе таблицы результатов.

**Таблица 3. Интерпретация результатов при проведении качественного исследования.**

|  |  |
| --- | --- |
| Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Сt) | Результат |
| FAM | JOE | ROX |
| отсутствует | отсутствует | определено меньше граничного | ДНК HSV и CMV НЕ обнаружены |
| **определен**о | отсутствует | не учитывается | **ДНК HSV обнаружена** |
| отсутствует | **определено** | не учитывается | **ДНК CMV обнаружена** |
| отсутствует | отсутствует | отсутствует или определено больше граничного | Невалидный |

Результат качественного ПЦР-исследования считали достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей ниже и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

**Таблица 4. Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Контроль | Контролируемый этап ПЦР исследования | Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Сt) |
| FAM | JOE | ROX |
| ОК | Экстракция ДНК | отсутствует | отсутствует | определено меньше граничногоK |
| K– | ПЦР | отсутствует | отсутствует | отсутствует |
| K+ | ПЦР | определено меньше граничногоK | определено меньше граничногоK | определено меньше граничногоK |

**3.4 Статистическая обработка результатов.**

Обработка результатов исследования проводилась с помощью статистического пакета «Statistica» (версия 6.0). Для представления полученных данных использовали показатели описательноий статистики: среднее арифметическое, среднегеометрические титры (СГТ), среднеквадратичное отклонение. Сравнение двух независимых групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при р <0.05.

**Глава IV. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.**

**4.1 Характеристики групп пациентов и динамика воспалительного процесса.**

Всего было отобрано 4 группы пациентов, из которых 57 %женщин и 43 % мужчин, средний возраст участников составил 39,5 лет.

Были обследованы пациенты 4 различных групп: со здоровыми тканями пародонта, с легкой степенью ХГП, со средней степенью ХГП, с тяжелой степенью ХГП.

Характеристики каждой из данных групп представлены в таблицах 5-9.

**Таблица 5. Количественная и качественная характеристика исследуемой группы пациентов со здоровым пародонтом (1 группа)\***

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Пол | Возраст | ХРГС, частота | Сопутствующие заболевания | Вид прикуса |
| 1 | М | 27 | Да, 2-3 р.в.г | Нет | Глубокий травмирующий |
| 2 | Ж | 20 | Да, 1 р.в.г | Нет | Скученный |
| 3 | М | 28 | Да, 1-2 р.в.г | Нет | Ортогнатический |
| 4 | М | 28 | Да, 2-3 р.в.г | Нет, но отмечает наличие ХГП у родителей в течении 5 лет | Ортогнатический |
| 5 | Ж | 18 | Да, 2-3 р.в.г | Нет | Скученность |

\* У данной группы пациентов были проведены следующие мероприятия:

1) Обследование (клиническое, рентгенологическое- Конусно-лучевой компьютерный томограф GALILEOS (Sirona, Германия), микробиологическое, иммунологическое).

2) Лечение

-Обучение и коррекция ИГПР с последующим неоднократным контролем, ПГПР.

-Консервативное лечение :использование антисептиков и т.д.

-Устранение местных факторов, способствующих накоплению микробной бляшки, в том числе устранение дефектов пломб, восстановление контактных пунктов, избирательное пришлифовывание.

-Лечение кариеса и осложненного кариеса.

3) В дальнейшем планируется ортодонтическое и/или ортопедическое лечение по показаниям.

Клинические материалы, полученные от пациентов.

- пробы слюны: здоровый пародонт.

- десневая жидкость из десневой борозды

**Таблица 6. Количественная и качественная характеристика исследуемой группы пациентов с легкой степенью тяжести ХГП (2 группа)\***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Пол | Возраст | ХРГС, частота | Жалобы | Сопутствующие заболевания | Прикус |
| 6 | Ж | 35 | Да, 2-3 р.в.г. | Кровоточивость при чистке, отек, воспаление десен | Аллергия | Открытый перекрестный |
| 7 | М | 52 | Да, 1 р.в.г | Кровоточивость при чистке, неприятный запах из п/рта, отек, воспаление десен | ГБ, ИБС | Скученность зубов |
| 8 | Ж | 53 | Да, 3-4 р.в.г. | Кровоточивость при чистке, во время приема пищи, зуд и жжение в деснах, смещение зубов, отек, воспаление десны | Отсутствуют | Аномалии положения зубов |
| Итого: 2Ж/1М, средний возраст 46,6 лет, наличие ХРГС 100%, сопутствующие заболевания присутствуют у 2/3 исследуемой группы, патологии прикуса 100% |

\*У данной группы пациентов были проведены следующие мероприятия:

 1)Обследование (клиническое, рентгенологическое- Конусно-лучевой компьютерный томограф GALILEOS (Sirona, Германия), микробиологическое, иммунологическое и т.д.).

 2)Лечение

-Обучение и коррекция ИГПР с последующим неоднократным контролем, ПГПР.

-Консервативное лечение: использование антисептиков.; антибактериальная

терапия – местная и/или общая и т.д.

-Устранение местных факторов, способствующих накоплению микробной бляшки, в том числе устранение дефектов пломб, восстановление контактных пунктов, шинирование подвижных зубов, избирательное пришлифовывание.

-Лечение кариеса и осложненного кариеса.

-Хирургическое лечение заболеваний пародонта (лоскутная операция, коррекция уздечек, тяжей СОР). Изготовление иммедиат протезов.

 3)В дальнейшем планируется ортопедическое лечение по показаниям.

**Таблица 7. Количественная и качественная характеристика исследуемой группы пациентов со средней степенью тяжести ХГП (3 группа)\***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Пол | Возраст | ХРГС, частота | Жалобы | Сопутствующие заболевания | Прикус |
| 9 | М | 42 | Да, 1 р.в.г | Кровоточивость, подвижность, отек, воспаление десен | Аллергия на ЛС | Ортогнатический |
| 10 | М | 49 | Да, 2-3 р.в.г | Кровоточивость во время пищи, отек, воспаление десен | Отсутствуют | Ортогнатический, с аномалиями зубов |
| 11 | Ж | 45 | Да, 1-2 р.в.г | Кровоточивость, подвижность, отек, воспаление десен | Отсутствуют | Ортогнатический |
| Итого: 2М/1Ж, средний возраст 45,3 года, наличие ХРГС 100%, сопутствующие заболевания отсутствуют, прикус ортогнатический у 100%.  |

\*У данной группы пациентов были проведены следующие мероприятия:

 1)Обследование (клиническое, рентгенологическое- Конусно-лучевой компьютерный томограф GALILEOS (Sirona, Германия), микробиологическое, иммунологическое и т.д.).

 2)Лечение

-Обучение и коррекция ИГПР с последующим неоднократным контролем, ПГПР.

-Консервативное лечение: использование антисептиков.; антибактериальная

терапия – местная и/или общая и т.д.

-Устранение местных факторов, способствующих накоплению микробной бляшки, в том числе устранение дефектов пломб, восстановление контактных пунктов, шинирование подвижных зубов, избирательное пришлифовывание.

-Лечение кариеса и осложненного кариеса.

-Хирургическое лечение заболеваний пародонта (лоскутная операция, коррекция уздечек, тяжей СОР). Изготовление иммедиат протезов.

 3)В дальнейшем планируется ортопедическое лечение по показаниям.

**Таблица 8. Количественная и качественная характеристика исследуемой группы пациентов с тяжелой степенью ХГП (4 группа)\***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Пол | Возраст | ХРГС, частота | Жалобы | Сопутствующиезаболевания | Прикус |
| 12 | Ж | 52 | Да, 1-2 р.в.г. | Кровоточивость при чистке, во время приема пищи, смещение зубов, попадание пищи м/у зубами, отек, воспаление десен | Хронический гастрит | Скученность зубов |
| 13 | Ж | 49 | Да, 2-3 р.в.г. | Смещение зубов | Аллергия | Дистальный прикус |
| 14 | Ж | 55 | Да, 1-2 р.в.г. | Кровоточивость при чистке, во время приема пищи, подвижность зубов, смещение зубов, отек, воспаление десен | Аллергия на АБ пенициллинового ряда | Аномалии положения зубов |
| Итого: 3Ж, средний возраст 52 года, наличие ХРГС 100%, сопутствующие заболевания 100, патологии прикуса у 100%. |

\*У данной группы пациентов были проведены следующие мероприятия:

 1)Обследование (клиническое, рентгенологическое- Конусно-лучевой компьютерный томограф GALILEOS (Sirona, Германия), микробиологическое, иммунологическое и т.д.).

 2)Лечение

-Обучение и коррекция ИГПР с последующим неоднократным контролем, ПГПР.

-Консервативное лечение: использование антисептиков.; антибактериальная

терапия – местная и/или общая и т.д.

-Устранение местных факторов, способствующих накоплению микробной бляшки, в том числе устранение дефектов пломб, восстановление контактных пунктов, шинирование подвижных зубов, избирательное пришлифовывание.

-Лечение кариеса и осложненного кариеса.

-Хирургическое лечение заболеваний пародонта (лоскутная операция, коррекция уздечек, тяжей СОР). Изготовление иммедиат протезов.

 3)В дальнейшем планируется ортопедическое лечение по показаниям.

Таким образом, можно отметить следующее: в исследовании принимали участие 14 человек, у каждого из которых, вне зависимости от выраженности патологии, имеется ХРГС, выраженный с различной частотой. У 71 % пациентов имелись разного рода патологии прикуса, что является одним из факторов развития пародонтита. У остальных 28 % прикус без патологий.

У 57 % исследуемых отсутствовали сопутствующие заболевания, что свидетельствует о том, что данный критерий не является значимым при развитии заболеваний пародонта, однако при тяжелом течении ХГП сопутствующие заболевания встречались в 100%.

64 % исследуемых предъявляют жалобы на «Кровоточивость при чистке, во время приема пищи, смещение зубов, попадание пищи между зубами, подвижность, отек, воспаление десен», остальные 46% относятся к группе пациентов со здоровыми тканями пародонта и жалоб не предъявляют.

Исходя из данных показателей, можно сделать вывод о том, что для исследования влияния воспалительных вирусных заболеваний на местный противовирусный иммунитет данная группа пациентов подходит, так как в анамнезе у всех имеется герпетическая вирусная инфекция, которая проявляется с различной частотой в виде ХРГС.

**4.2.Изучение этиологической значимости вирусов герпеса в течении пародонтита.**

Пробы содержимого десневой борозды были изучены методом ПЦР в реальном времени с помощью гидролизируемых молекулярных зондов. Измерение выделенной ДНК из проб на спектрофотометре (NanoView) показало, что в среднем выход ДНК составил 350 нГ. Для ОК амплификация отсутствует. Для положительных контролей по каналам FAM, JOE, ROX зарегистрировано значение порогового цикла меньше граничного. Это свидетельствует о получении правильных результатов для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК (Рис. 4).



**Рисунок 4. Кривые амплификации .**

В лунках с исследуемыми пробами амплификация не зарегистрирована, что свидетельствует об отсутствии в исследованных пробах генетического материала ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ в необходимой концентрации. В связи с этим было высказано предположение, что сайт забора материала для этого вида анализа не является оптимальным. Однако аналогичные результаты были получены после анализа этим же методом проб слюны. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии активной герпетической инфекции полости рта ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ на момент обследования. В связи с этим планируется изучить пробы на другие разновидности вирусов герпеса. В дальнейшем рекомендовано расширить группы обследованных, уделив внимание пациентам с рецидивирующей герпетической инфекции.

**4.3 Изучение местного иммунитета слизистой полости рта.**

Содержание IgA определяли в пробах слюны, полученных от пациентов на различных стадиях лечения . Пробы хранили при - 20° С

На рисунке 5 представлены кривые, представляющие зависимость усредненных значений оптической плотности лунок с анализируемыми пробами, обработанными или не обработанными ингибитором пептидазы PMSF, от разведения проб.

**Рисунок 5. Зависимость усредненных значений оптической плотности лунок с анализируемыми пробами, обработанными или не обработанными ингибитором пептидазы PMSF, от разведения проб. По оси абсцисс представлена кратность разведений, по оси ординат – оптическая плотность при длине волны 450 нм (OD450).**

Показано, что обработка ингибитором пептидазы PMSF приводила к увеличению значений OD450, которое было выражено при наименьших разведениях, однако эти различия не были статистически значимыми.

На Рис. 6 представлены результаты изучения общих и противовирусных IgA в слюне у всех групп пациентов до, в процессе и после лечения. В контрольную группу входили пациенты без воспалительных заболеваний пародонта. В качестве антигена для изучения противовирусного иммунитета использовали эпидемически актуальный вирус гриппа пандемического подтипа A(H1N1)pdm. Показано, что уровень общих IgA был в среднем в 4 раза выше по сравнению с противовирусными антителами (Рис. 5). В норме титры общих IgA были постоянными и составили 1:512. У нескольких пациентов в процессе лечения наблюдалось повышение общих IgA, которое впоследствии возвращалось к первоначальным значениям. В отношении противовирусных антител к вирусу пандемического гриппа А/Нью Йорк/61/15(H1N1)pdm показано, что и в норме, и при патологии их количество существенно варьировало от пороговых значений (1:16) до 1:1024, так как уровень противовирусного иммунитета зависит от предыдущих контактов с вирусами. После лечения количество противовирусных антител возрастало статистически значимо (Р=0,02), что может свидетельствовать о положительном влиянии проведенного курса лечения на местный противовирусный иммунитет вследствие активации антитело-продуцирующих клеток памяти.



**Рисунок 6. Результаты иммуноферментного анализа с образцами слюны пациентов.**



**Рисунок 7. Содержание общих локальных IgA в слюне пациентов в зависимости от тяжести течения ХГП.**

Как видно из Рис. 7, содержание общих локальных IgA, при легкой степени тяжести ХГП приближалось к показателям у пациентов без патологии. Разброс значений наблюдался в случаях среднего и тяжелого течения. Эти данные могут свидетельствовать о влиянии тяжести течения хронического воспалительного процесса пародонта на уровень неспецифического местного иммунитета слизистой оболочки рта, опосредованного секреторными IgA.

**V ГЛАВА. Заключение и выводы**

**4.1.Заключение.**

Показано, что у 71% пациентов из исследуемых групп хронические заболевания пародонта были связаны с аномалиями прикуса. При тяжелом течении пародонтита в 100% наблюдались сопутствующие заболевания.

При исследовании методом ПЦР биоматериала, полученного из десневых борозд и пародонтальных карманов пациентов с ХГРС, в исследованных пробах было не выявлен генетический материал вирусов герпеса 1 типа, вирусов герпеса 2 типа и цитомегаловируса, способных активно влиять на процессы развития заболеваний пародонта. Из этого следует, что данная выборка пациентов оказалась недостаточной для доказательства влияния вирусной ДНК на возникновение и усиление заболеваний полости рта.

При попытке исследовать методом ПЦР пробы слюны результаты на графиках были схожими, что подтвердило отсутствие вирусной активности герпетической инфекции в полости рта, представленной вирусами герпеса 1 и 2 типа, а также цитомегаловирусом.

Исследование местного иммунитета слизистой оболочки полости рта на наличие и количество локальных IgA, прошло успешно. Было выявлено, что при среднем и тяжелом течении хронического генерализованного пародонтита, содержание локальных антител IgA увеличивается в среднем от значения нормы. Это свидетельствует о том, что воспалительные патологические заболевания полости рта имеют связь с противовирусным иммунитетом слизистой оболочки полости рта, и способны оказывать влияние на тяжесть течения и развития заболеваний тканей пародонта, посредством угнетения его функций.

Более подробное исследование позволит глубже изучить проблемы пародонтологических заболеваний, рассмотрев их с более широкой точки зрения, а именно через зависимость функционирования иммунитета полости рта от присутствия и патогенности вирусного агента в десневой жидкости и слюне.

**4.2. Выводы.**

1. В группе обследованных пациентов у 100% в анамнезе имелась герпетическая инфекция, представленная ХРГС, который проявляется с разной частотой и в разные периоды. При воспалительных заболеваниях пародонта не была выявлена корреляция степени тяжести заболевания с рецидивами герпетической инфекции. В большинстве случаев воспалительные заболевания пародонта были связаны с аномалиями прикуса.

2. Проведенное исследование проб десневой жидкости и слюны методом полимеразной цепной реакции не выявило вирусного генетического материала, что свидетельствует об отсутствии вирусной инфекции в активной фазе у конкретной выборки пациентов. При последующих исследованиях для установления этиологии герпетической инфекции у пациентов с ХГРС следует производить забор проб в фазу активности вирусной инфекции.

3. Разработана методика выявления локальных и вирус-специфческих IgA в слюне с помощью ИФА при использовании рекомбинантного пептида стрептококка, содержащего IgA-связывающий участок.

1. Изучение проб слюны разработанным методом показало, что в норме содержание общих локальных IgA в слюне является постоянным. Курс лечения хронического оказывает положительное влияние на состояние общего и вирус-специфического локального иммунитета, опосредованного IgA.

Список использованной литературы

1. Афанасьев У. В., Соловьева А. М., Афиногенов Г. Е. - Роль микробного фактора в развитии начальных форм воспалительных заболеваний пародонта. 2001 г.
2. Бабичев С.А., Коротяев А.И. - Медицинская микробиология, иммунология, вирусология. 2010 г.
3. Барер Г. М., Немецкая Т. И. - Болезни пародонта. Клиника, диагностика и лечение: Учебное пособие. 1996 г.
4. Боровский Е.В., Иванов В.С., Максимовский Ю. М., Максимовская Л. Н. - Терапевтическая стоматология, Учебник. – М.: Медицина, 2001 г.
5. Долгих В.В, Кулеш Д.В., Колесникова Л.Р., Мемезова Н.Н. - Выявление пародонтопатогенных микроорганизмов у пациентов с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия методом ПЦР. 2012 г.
6. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилов Е.М. - Теория и практика ИФА. 1991 г.
7. Исаков.В.А, В.В.Борисова. - Герпес. Патогенез и лабораторная диагностика., 1999 г.
8. Караков К.Г., Эльбекьян К.С., Маркарова Г.В. - Основы биохимии тканей и органов полости рта. 2012 г.

# Костюк С.А., Кулага О.К., Хворик Д.Ф. - Новые аспекты клинического применения полимеразной цепной реакции. - «Медицинские новости». - №5. - 2006г.

# Круглов С.В., Малышев И.Ю. – Основы метода иммуноферментного анализа. 2010 г.

1. Луцкая И.К. - Заболевания слизистой оболочки полости рта / – М.: Мед. лит., 2007 г.
2. Павлов И.П., Борисов Л. Б.. - Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. 2005 г.
3. Покровский В.В., Федоров Н.А., Шипулин Г.А., Безруков В.М. - Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения .1995 г.
4. Самойликов П.В. – Принципы иммуноферментного анализа, основные виды ИФА, применение в диагностике, 2009 г.
5. Царев В.Н. - Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. 2013 г.
6. [Annie Kitty George](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=George%20AK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25083042), [Sukumaran Anil](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Anil%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25083042). - Acute Herpetic Gingivostomatitis Associated with Herpes Simplex Virus 2: Report of a Case, 2014
7. Contreras A, Slots J. - Herpesviruses in human periodontal disease. J Periodontal Res, 2000
8. Hiroshi Nagura. - Mucosal Defense Mechanism and Secretory IgA System, Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, 980, 1989
9. Kamma, J. J., Contreras, A., & Slots, J. - Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early‐onset periodontitis. Journal of clinical periodontology, 2001
10. [Lasky LA](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lasky%20LA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=6321120), [Dowbenko DJ](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dowbenko%20DJ%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=6321120). - DNA sequence analysis of the type-common glycoprotein-D genes of herpes simplex virus types 1 and 2., 1984
11. Mc Crudden, M. T. C., Irwin, C. R., Linden, G. J., & Lundy, F. T. - Matrix metalloproteinase‐8 activity in gingival crevicular fluid: development of a novel assay. Journal of periodontal research, 2017
12. Mohammad Mukhit Abdul Gaffar Kazi, Renu Bharadwaj, Kishore Bhat, Daisy Happy, - Association of Herpes Viruses with Mild, Moderate and Severe Chronic Periodontitis, 2015
13. Parra B, and Slots J, - Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction, Oral Microbiol Immunol, 5, 1996
14. Saygun I, Sahin S, Ozdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, et al. - Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. J Periodontol, 2002
15. Slots J. - Herpesviral‑bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. Curr Opin Infect Dis, 2007
16. Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Grinde B.- Patient with severe periodontitis and subgingival Epstein‑Barr virus treated with antiviral therapy. J Clin Virol, 2008
17. Roselyn J. Eisenberg, Deborah Long, Ruth Hogue-Angeletti, Gary H. Cohen. - Amino-Terminal Sequence of Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2, 1984

Благодарности

Выражаю особую благодарность Михайловой Екатерине Станиславовне, к.м.н., доценту кафедры терапевтической стоматологии, врачу-стоматологу терапевту высшей квалификационной категории за помощь в осуществлении проведения клинических этапов исследования.

Выражаю благодарность сотрудникам ФГБНУ «ИЭМ»

1. Аспиранту отдела вирусологии Сычеву И.А., за помощь в постановке практической части исследования.
2. Аспиранту отдела вирусологии Ландграф Г.О., за помощь в разработке методов исследования и проведении исследования.
3. Ведущему научному сотруднику отдела молекулярной микробиологии Гупаловой Т.В.