Санкт-Петербургский государственный университет

***ЖУКОВСКАЯ Екатерина Сергеевна***

**Выпускная квалификационная работа**

***Клинико-микробиологическая оценка эффективности аутопробиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита***

31.05.03 Стоматология

СМ.5059.2015

Научный руководитель: доцент, выполняющий лечебную работу, Кафедры терапевтической стоматологии, к.м.н. Михайлова Екатерина Станиславовна

Научный руководитель: доцент Кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, к.б.н. Королёва Ирина Владимировна

Рецензент: главный врач ООО «Стоматологический центр «Петродент»», к.м.н, доцент Шторина Галина Борисовна

Санкт-Петербург

2020 год

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Введение 4

Актуальность 4

Цель и задачи исследования 5

Научная новизна 7

Практическая значимость 7

Глава 1. Литературный обзор 8

1.1 Особенности этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта 8

1.2 Факторы вирулентности пародонтопатогенов 15

1.2.1 *Porphyromonas gingivalis* 15

1.2.2 *Tannerella forsythia* 17

1.2.3 *Treponema denticola* 17

1.2.4 *Prevotella intermedia* 18

1.3 Клиническая картина течения хронического генерализованного пародонтита 18

1.4 Особенности применения пробиотиков и аутопробиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита 20

Глава 2. Материалы и методы исследования 25

2.1 Клиническая характеристика пациентов 25

2.2 Оценка стоматологического статуса пациентов 26

2.3 Рентгенологическое исследование 31

2.4 Забор материала 31

2.5 Культуральные среды и условия роста 33

2.6 Выделение чистой культуры 33

2.7 Выделение тотальной ДНК из исходного биологического материала 34

2.8 Конструирование олигонуклеотидных праймеров 35

2.9 Электрофорез ДНК 36

2.10 Создание аутопробиотика на основе *S.salivarius* 36

2.11 Методы статистической обработки данных 37

Глава 3. Результаты исследований 40

3.1 Клиническая оценка пациентов основных и контрольной

группы с ХГП до лечения 40

3.2 Результаты рентгенологического исследования до лечения 44

3.3 Клиническая оценка пациентов основных и контрольной

групп с ХГП после лечения 44

3.4 Результаты микробиологического исследования 55

3.5 ПЦР-скрининг основных групп на пародонтопатогены 60

3.6 ПЦР-скрининг контрольной группы на пародонтопатогены 67

Заключение и выводы 70

Заключение 70

Выводы 73

Практические рекомендации 74

Список литературы 75

Приложения 81

**Перечень условных обозначений:**

ВΟЗ – Всемирная организация здравоохранения

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

CPITN – Community Periodontal Index of Treatment Needs

OHI–S – Oral Hygiene Indices–Simplified

РНР – индекс эффективности гигиены полости рта

РМА – папиллярно–маргинально–альвеолярный индекс

**Введение**

Актуальность:

Интерес к исследованию лекарственных средств, применяемых в комплексном лечении заболеваний пародонта, обусловлен высокой распространённостью заболеваний пародонта среди населения.

В пародонтологической помощи нуждаются более 70% населения Российской Федерации, при этом с возрастом только увеличивается степень тяжести заболевания, то есть его интенсивность и распространённость (Князева Э.Б., 2014). По данным ВОЗ уже в возрасте 15-19 лет наблюдались заболевания пародонта в 60% случаях, а в группе 35-44 лет в 80% случаях.

В основе современных взглядов на возникновение заболеваний пародонта лежит микробная инфекция. При исследовании микрофлоры полости рта, в том числе наддесневого и поддесневого налёта, были выделены более 530 видов бактерий, однако заболевания пародонта появляются при обнаружении пародонтопатогенов. «Большинство из них — грамотрицательные, в том числе *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, P. intermedia, T. forsythia, Tr. denticola*»[1, с. 47]*.* Следовательно, ранняя диагностика микробиоты пародонтальных карманов помогает эффективно подобрать лечение заболеваний пародонта.

Существуют также в развитии заболеваний пародонта экзогенные факторы, которые приводят к дисбиозам и имуннодефицитным состояниям. В этом случае степень дисбиоза полости рта имеет прямую зависимость от степени тяжести заболеваний пародонта, при этом изменяется качественный и количественный состав нормальной микробиоты ротовой полости. Это приводит к увеличению концентрации патогенных микроорганизмов, поскольку нормальная микрофлора «становится частью экологического барьера и блокируют рецепторы эпителиоцитов от адгезии на нём болезнетворных бактерий»[2].

В связи с этим, в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта следует использовать препараты, которые содействуют восстановлению нормальной микрофлоры ротовой полости. После эффективного внедрения пробиотиков в практическую деятельность врача-стоматолога стали проводиться исследования, направленные на изучение эффективности аутопробиотиков для лечения заболеваний тканей пародонта [3; 4; 5]. Первые исследования Хачатуряна А.П. (1999) по разработке аутопробиотиков основывались на том, что пробиотики, выращенные на искусственных питательных средах, будут являться для организма инородными телами и в дальнейшем отторгаться. Патент по созданию аутопробиотиков Хачатуряна А.П. (1999) положил основу для дальнейшего исследования эффективности аутопробиотиков в комплексном лечении различных заболеваний. На основании этого актуальным является изучение воздействия аутопробиотика на состав микробиоты пародонтальных карманов и состояния тканей пародонта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Цель исследования: клинико-микробиологическая оценка эффективности аутопробиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита.

Задачи исследования:

1. Изучить качественный и количественный состав микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести.
2. Изучить динамику клинико-микробиологических показателей у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта в ходе комплексного лечения ХГП лёгкой степени тяжести с применением аутопробиотиков или пробиотиков на основе *S.salivarius*.
3. На основании клинико-микробиологических данных оценить эффективность местного применения аутопробиотиков и пробиотиков на основе *S.salivarius* в ходе комплексного лечения пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести.

Научная новизна работы:

В процессе работы исследован микробиологический состав пародонтальных карманов пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести. Проведена клиническая и микробиологическая оценка эффективности местного применения ауто- и пробиотика на основе *S.salivarius* в составе комплексного лечения пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести.

Практическая значимость:

В результате исследования была доказана эффективность местного применения аутопробиотика на основе *S.salivarius* в составе комплексного лечения пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести.

**Глава 1. Литературный обзор**

1.1 Особенности этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта

По данным ВОЗ за 2012 год 15-20% взрослого населения мира уже в возрасте от 35 до 44 лет имеет пародонтит тяжелой степени тяжести, а остальные 75. Пародонтит – это воспалительное заболевание тканей пародонта, сопровождающееся прогрессирующей деструкцией пародонта.

Увеличение распространения и интенсивности пародонтита является следствием того, что пародонтит — многофакторное заболевание. Данный подход к этиологии пародонтита поддерживается многими как российскими [6; 7], так и зарубежными авторами [1]. «Заболевания пародонта могут развиваться под влиянием как местных причин (микроорганизмы зубного налета, окклюзионная травма и т.д.), так и сочетанного воздействия местных и общих (эндогенных) факторов на фоне изменений реактивности организма» [8, с. 153].

Пародонтит можно отнести к оппортунистическим инфекциям при которой микроорганизмы проявляют свою патогенность при снижении защитных свойств макроорганизма, количественный состав возбудителя превышает норму в «активных» участках заболевания тканей [9]. Только связанный с *A.actinomycetemcomitans* пародонтит можно отнести к классической инфекции [1, с. 46].

Основным фактором местного воздействия на ткани пародонта являются микроорганизмы зубной бляшки. Заселение недесквамированной гладкой поверхности начинается с образования биопленки, в которой начинает происходить примитивная «циркуляция» и увеличение количественного и качественного состава в ней микроорганизмов. Через 2-3 часа после чистки зубов образуется зубная бляшка в пришеечной зоне и в промежутках между зубами. Образование зубной бляшки проходит в несколько этапов. С развитием формирования зубной бляшки меняется видовой её состав, который чаще всего индивидуален. На начальном этапе количественное превосходство имеют аэробы, а в сформированной зубной бляшке также можно обнаружить анаэробные микроорганизмы.

На первом этапе происходит формирование пелликулы, которая покрывает поверхность зуба. «Пелликула образуется из компонентов слюны и десневой жидкости, бактерий, тканей и пищевых остатков. Состав специфических компонентов пелликулы в разных участках полости рта сильно различается» [10].

Через 2-3 часа после окончания первого этапа происходит первичное микробное обсеменение. На этом этапе из микроорганизмов можно обнаружить *S. sanguis и Act. viscosus*, поскольку они имеют адгезивные субстраты к пелликуле. В результате размножения этих бактерий происходит количественная и качественная перестройка зубного налёта, создавая условия для проникновения и оседания в ней облигатных анаэробных микроорганизмов.

Окончательное созревание бляшки происходит совместно с вторичным обсеменением микроорганизмами. В результате клинических исследований при полном формировании зубной бляшки появляются новые микроорганизмы, которые оказывают патогенное влияние на пародонт. Среди этих микробов выделяют *P. intermedia, P. gingivalis, F. nucleatum, C. saprofytum*. «При пародонтите выявляется значительный сдвиг в сторону грамотрицательных анаэробных палочковидных форм и спирохет, количество которых возрастает до 40%» [11].

Под действием фосфатов кальция из слюны происходит минерализация мягкого зубного налёта. В результате этого образуется зубной камень, который будет являться источником размножения и распространения микроорганизмов, поскольку при обычной индивидуальной гигиене полости рта зубной камень удалить невозможно [12]. С течением времени наддесневой налёт распространяется под десну, где отсутствие кислорода создаёт благоприятные условия для увеличения в составе поддесневого зубного камня облигатных анаэробов.

До 70х годов прошлого века основной теорией возникновения пародонтита господствовала теория неспецифического зубного налета. «Согласно неспецифической гипотезе зубного налета, степень повреждения тканей пародонта зависит только от количества скопившегося налета» [13].

Однако с появлением новых методов исследования была предложена в 80х годах прошлого века гипотеза специфических микроорганизмов. Начались исследования в области выделения отдельных пародонтопатогенных бактерий. Как отечественные, так и зарубежные учёные начали представлять список патогенных микроорганизмов. Среди них были выделены микроогранизмы, которые обладают высокой патогенностью. К ним относят:

* *A. аctinomycetemcomitans;*
* *P. gingivalis;*
* *T. denticola.*

По мнению Дунязиной Т.М. к этой группе также относится *B. forsythus, P. intermedia* [14]. Однако Socransky (1992) эти два вида микроорганизмов относит к организмам с умеренной патогенностью [9]. По его мнению, высокий риск возникновения заболеваний пародонта имеет *T. forsythia*.

Кроме перечисленных микроорганизмов Socransky, Haffajee в 1992 году выделили ряд условий, при возникновении которых может возникнуть воспалительное заболевание пародонта при участии пародонтопатогенных микроорганизмов. Для того, чтобы заболевание возникло в результате возбудителя:

* 1. Возбудитель должен быть вирулентного клонального типа;
  2. Он должен обладать хромосомными и внехромосомными генетическими факторами, чтобы инициировать заболевание;
  3. Человек должен быть восприимчив к этому патогену;
  4. Количество патогена должно быть достаточным, чтобы превышать пороговое значение для индивида;
  5. Должна быть определенная локализация патогена;
  6. Другие виды бактерий должны стимулировать или, по крайней мере, не тормозить процесс;
  7. Местная среда должна быть такой, которая способствует выражению свойств вирулентности вида [9].

Кроме выделения микроорганизмов полости рта по степени пародонтопатогенности, их подразделяют на комплексы, которые соответствуют определенному порядку и обозначаются определенным цветом [10]. К красному комплексу (I порядок) относят микроорганизмы, которые соответствуют высокой степени пародонтопатогенности (*P.gingivali, T.forsythia,* *T.denticola, A. actinomycetemcomitans*). Они вызывают симптомы гингивита и пародонтита взависимости от вида заболевания: кровоточивость дёсен, боли, образование пародонтальных карманов и подвижности зубов. II порядок соответствует «оранжевому комплексу» пародонтопатогенов и включает в себя *P. intermedia, P. micros, F. periodonticum*. *Е. corrodent, Capnocytophaga spp., A. actinomycetemcomitans* составляют зелёный комплекс микроорганизмов, которые также вызывают заболевания пародонта и слизистой оболочки полости рта. К жёлтому комплексу относятся *S. mitis, S. israilis, S. sanguis*, к пурпурному - *V. parvula, A. odontolyticus*, а к оранжевому – *P. intermedia, P. micros, С. Rectus, Campylobacter spp.*. Все эти комплексы оказывают отрицательное воздействие на ткани пародонта, вызывая их повреждение и развитие заболеваний [10].

К местным этиологическим факторам относится не только влияние микроорганизмов, но и местные травматические причины, в том числе перегрузка пародонта. Когда адаптационный порог пародонта превышает допустимый уровень, происходит нарушение кровоснабжения, что в дальнейшем может привести к резорбции кости и возникновению воспалительно-деструктивных изменений в тканях. Причинами такого местного механического воздействия могут быть нарушения изготовления и постановки съёмных и несъёмных ортопедических конструкций, при скученности зубов, при аномалии расположения зубов, при различных ортодонтических конструкциях.

Кроме того, некоторые авторы выделяют как фактор, влияющий на возникновение хронического генерализованного пародонтита, состав и свойства слюны [15]. Этот фактор можно обнаружить при обследовании пациентов с вредными привычками. При этом особое внимание уделяется такой вредной привычке как курение. Составляющие табачного дыма оказывают негативное влияние на ткани пародонта за счет нарушения микроциркуляции в тканях, снижения уровня фибробластов, продуцирующих коллаген [16]. Кроме того, «курение активирует рост актиномицетов, за счет микроциркуляторных расстройств подавляет местные и общие защитные реакции организма, снижает бактерицидную активность слюны» [9]. Повышенная склонность к образованию зубных камней у курильщиков ведёт к увеличению колонизации микроорганизмов.

К общим факторам развития пародонтита относятся те факторы, которые влияют на изменение реактивности организма. К ним можно отнести:

* заболевания сердечнососудистой системы;
* заболевания эндокринной системы, среди которых можно выделить сахарный диабет, диффузный токсический зоб, гормональные нарушения;
* гиповитаминозы;
* ожирение, заболевания желудочно-кишечного тракта;
* беременность;
* ревматизм;
* заболевания, связанные с нарушением обмена веществ;
* нарушения нейрогенного влияния на ткани пародонта.

Помимо перечисленных общих факторов «учеными выявлены генетические факторы, предрасполагающие к развитию заболеваний пародонта, такие как наличие антигенов hLA-A24; фактор DR4 на 6-й хромосоме; III группа крови из-за пониженного количества лизоцима и секреторного иммуноглобулина А; полиморфизм ацетилтрансферазы; анатомические особенности строения челюстей у лиц арабской, еврейской, татарской, некоторых кавказских национальностей» [17].

Существует концепция аутоиммунного патогенеза заболеваний пародонта. Простое присутствие антител к собственным компонентам не обязательно ведет к заболеванию. Патологические изменения, по-видимому, происходят в тех случаях, когда физиологический аутоиммунный ответ в противном случае приводит к инициации дальнейшей гуморальной и/или клеточной иммунной активности, способной вызвать повреждение или заболевание. В некоторой степени патологический потенциал аутоантител может быть определен знанием их природы, их класса и подкласса. Следует отметить, что природные аутоантитела, как правило, относятся к классу IgM. При пародонтите у взрослых существует местное антитело к коллагену типа I, которое является преимущественно типом IgG, а не IgM, что противоположно тому, что присутствует в сыворотке, что указывает на то, что продолжающаяся антигенная стимуляция может привести к переключению класса и дальнейшему увеличению IgG4и уменьшению IgG1 и IgG3. IgG4 является защитным по своей природе тем, что он не образует комплексы с антигеном для стимуляции комплемента. Тем не менее, существуют предположения, что эта система, созданная для борьбы с последствиями повреждения тканей, может в определенных обстоятельствах стать агрессивной и вносить реальный вклад в процесс заболевания. При рассмотрении представленной концепции часто используют систему HLA.

Система HLA, вероятно, содержит так называемые гены иммунного ответа (Ir), которые контролируют специфическую чувствительность к различным антигенам. Эти гены, скорее всего, находятся в неравновесном сцеплении с генами HLAA и B, и, в одном случае, возможно, что ген Ir, контролирующий аутоиммунитет, мог бы объяснить полученные данные; в другом случае отсутствие специфического гена Ir может привести к хронической инфекции. Некоторые микробные антигены могут напоминать некоторые антигены HLA, которые делают людей, несущих эти антигены, менее способными к иммунологической реакции против рассматриваемых микроорганизмов. Антигены HLA выполняют биологическую функцию в качестве рецепторов для чужеродных антигенов, которые они представляют адекватным образом для иммунокомпетентных клеток. Этот механизм может привести как к аутоиммунитету, так и к отсутствию соответствующего антигена HLA, к восприимчивости к инфекции [18].

Кроме того стресс играет большую роль не только в повседневной жизни, но и в развитии различных заболеваний. В результате исследований была обнаружена зависимость между постоянным воздействием стрессорных факторов на человека и развитием у этого человека заболеваний пародонта [19; 20]. Повреждение пародонта происходит по одному из выявленных механизмов. «Нарушения нейрогуморальной регуляции; активация процессов перекисиого окисления липидов; стимуляция протеолиза; расстройства гемоциркуляции; снижение специфической и неспецифической резистентности организма» [19].

Таким образом, поражение пародонта происходит при сложении трёх китов. Это пародонтопатоген, чувствительный организм и дефект нормальной микрофлоры.

* 1. Факторы вирулентности пародонтопатогенов

Вирулентность — полифакториальное проявление. Она зависит от внутреннего потенциала патогенности микроорганизмов, окружающей среды и человека. Для того чтобы воздействовать на макроорганизм бактерии должны противостоять защитным механизмам человека, близко и крепко прикрепиться к тканям, получить достаточное количество питательных веществ. Для этих целей у бактерий существуют специфических факторы, которые мы рассмотрим в данной главе. Для данного исследования наибольшее значение имеют следующие пародонтопатогены: *P. gingivalis, T. forsythia*, *T. denticola*  и *P. intermedia.* Именно эти пародонтопатогены имеют самую большую частоту встречаемости в пародонтальных карманах у пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести [21; 22; 23].

1.2.1 *Porphyromonas gingivalis*

Они представляют из себя грамотрицательные неподвижные палочки, которые являются облигатными анаэробами. К факторам патогенности *P.gingivalis* относят протеазы, липополисахариды, фимбрии, везикулы наружной мембраны и полисахаридная капсула.

* Протеазы

Ослабление защитных свойств хозяина происходит за счёт разрушения его белков. Среди протеаз выделяют аргинин- и лизинспецифические цистеиновые протеиназы (гингипарины R и К). цистеиновые протеиназы, аминопептидазы. В результате действия протеаз происходит распад белков внеклеточного матрикса и фибриногена и разложение коллагена I, III, IV и V.

Это приводит к снижению защитных реакций организма, в частности к снижению уровня иммуноглобулинов, системы комплемента, цитокинов и хемокинов.

* Гемагглютинины

Они способствуют осуществлении прикрепление бактерий к клеткам организма через их рецепторы. Способность к гемагглютинации обеспечивается фимбриями, липополисахаридами, липидами на поверхности клетки и протеинами HagA, HagB, HagC [11, с. 388].

* Липополисахариды

Липополисахариды клеточной стенки подавляют выработку E-селектина. В отличие от энтеробактерий липополисахариды не содержат в себе гептозы и слабее активируют цитокины фибробластов, белок 1 хемотаксиса моноцитов.

* Фимбрии

Фимбрии покрывают бактерию перитрихиально. Они обеспечивают адгезию к клеткам организма хозяина. «Фимбрии P. gingivalis способны соединяться со слюнными энзимами, белками внеклеточного матрикса и бактериями-симбионтами, а также адгезировать с клеточным alpha5beta1-интегрином. После адгезии с alpha-5beta1-интегрином *P.gingivalis* захватывается клеточной псевдоподией, что способствует инвагинации через актинопосредованный путь. После прохождения через эпителиальный барьер интрацеллюлярный патоген *P. gingivalis* нарушает клеточную функцию» [24, с. 109].

* Везикулы наружной мембраны

В пузырьках содержатся протеазы, липополисахариды, гемагглютинины, которые могут целенаправленно достигать клетку-мишень. Кроме того, везикулы играют большую роль в сцеплении *P. gingivalis* с красными кровяными тельцами, гидроксиапатитом и другими микроорганизмами.

* Полисахаридная капсула

В зависимости от расположения полисахаридной капсулы может изменяться активность липополисахаридов клетточной стенки. В зависисмоти от этого расположения выделяют 6 серотипов полисахаридного слоя.

В результате взаимодействия всех факторов патогенности *P.gingivalis* с клетками тканей пародонта обеспечивается адгезия, колонизация и токсическое действие на костную ткань и местные защитные системы. При этом можно выделить, что «штаммы *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* при совместном культивировании проявляют α-гемолитическую активность, чаще чем их монокультуры»[25, с. 75].

* + 1. *Tannerella forsythia*

*T.forsythia* — анаэробная грамотрицательная бактерия. Относится к пародонтопатогенному виду первого порядка. Немногочисленные исследования сделали выводы о наличии фактора патогенности в виде гидролаз. Среди гидролаз выделяют сиалидазу и аргининспецифическую цистеиновую протеазу. Сиалидаза (нейраминидаза) отщепляет сиаловые кислоты, которые находятся почти во всех тканях и биологических жидкостях. Протеиназы оказывают патогенное воздействие за счёт гемолитической активности.

Чаще всего происходит связывания с *P. gingivalis.*

* + 1. *Treponema denticola*

Эта бактерия является пародонтопатогеном второго порядка, относится к облигатным анаэробам. *T.denticola* — грамотрицательные подвижные бактерии. К факторам патогенности относят:

* Msp-белок

Этот белок относится к пориноподобным, которые влияют на метаболизм фибробластов и кальция.

* Гемин- и лактоферринсвязывающие белки

Благодаря этим белкам происходит механизм захвата железа из эритроцитов и биологических жидкостей. Кроме того, происходит связывания лактоферрина слюны с *T.denticola*.

* Протеазы

Эпителиальные клетки подвергаются цитотоксической активности и коадгезии с T.denticola в результате токсического действия протеаз (например, дентилизин). Происходит гидролиз фибриногена, трансферрина, желатина, коллагена IV, снижается активность ингебиторов протеаз, антикоагуляционной системы.

Под действием лизат снижается пролиферация лимфоцитов за счёт моноцитов, что приводит к иммуносупрессорной реакции.

* + 1. *Prevotella intermedia*

Она относится к грамотрицательной анаэробной бактерией, которая может вызывать заболевания пародонта. Были выделены следующие факторы патогенности:

* Фимбрии

В зависимости от конкретного штамма бактерии возможно различное расположение фимбрий: от перитрихиального до монотрихиального, а иногда и без образования фимбрий. Фимбрии могут осуществлять термолабильную агглютинацию эритроцитов.

* Липополисахариды

Липополисахариды вызывают активацию лимфокинов воспаления (IL-1,IL-6, IL-8), которые вызывают резорбцию костной ткани, пролиферацию Т- и В-лимфоцитов.

* Гидролазы

Гидролиз осуществляют гидролитическую способность благодаря цистеиновым протеазам, которые были описаны у предыдущих пародонтопатогенных бактерий.

* Гемолизин и гемагглютинин

Осуществление лизиса эритроцитов происходит с помощью везикул наружной мембраны, в которых находится гемолизин и гемагглютинин.

Пародонтопатоген *P.intermedia* является одним из первых колонизаторов ротовой полости в начале воспалительных и инфекционных заболеваний. Из биоплёнки бактерии проникают в соединительную ткань за счёт фимбрий.

* 1. Клиническая картина течения хронического генерализованного пародонтита

Особенности течения хронического генерализованного пародонтита зависят от степени. Выделяют три степени тяжести: лёгкую, среднюю и тяжёлую. «Степень тяжести пародонтита определяется в основном тремя ведущими симптомами — глубиной пародонтального кармана, степенью резорбции костной ткани и, как следствие, подвижностью зубов» [26].

Пародонтит лёгкой степени тяжести характеризуется наличием пародонтального кармана до 3,5 мм, снижением высоты межзубной перегородки на 1/3 длины корня, кровоточивостью и болью во время приёма пищи. Пациенты дополнительно отмечают жалобу на галитоз. При объективном осмотре подвижность зубов не отмечается.

Средняя степень тяжести пародонтита соответствует наличию пародонтальных карманов до 5 мм, резорбции межзубной перегородки от 1/3 до ½ длины корня, I-II степени подвижности зубов. Пациенты предъявляют жалобы на кровоточивость при чистке зубов и во время приёма пищи, на изменение цвета десны, на подвижность некоторых зубов. Часто имеется хроническая общесоматическая патология.

Хронический генерализованный пародонтит тяжелой степени тяжести можно охарактиризовать рядом симптомов. К ним относятся острая зубная боль, изменение положения зубов и наличие у них II-III степени подвижности, наличие пародонтального кармана глубиной более 5 мм и деструкцией межзубной перегородки более ½ длины корня. Кроме того, можно отметить повяление трем и диастем, образование супраконтактов и выпадение зубов.

При генерализованном пародонтите при рентгенологическом исследовании обнаруживаются костный карман, соответствующий по глубине степени тяжести пародонтита, а также вертикальную убыль костной ткани с деструкцией кортикальной пластинки.

1.4 Особенности применения пробиотиков и аутопробиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита.

В течение развития хронического генерализованного пародонтита происходит изменение качественного и количественного состава микрофлоры полости рта в определенных участках. Преобладание условно-патогенных микроорганизмов над нормальной микрофлорой происходит в начале заболевания, затем происходит быстрое размножение парадонтопатогенных бактерий. Смешанная микробиота пародонтальных карманов может иметь разную чувствительность к применяемым лекарственным средствам и, следовательно, может быть резистентна к используемым антибактериальным препаратам. «В связи с этим перспективным направлением в лечении заболеваний пародонта стало использование микробных биопрепаратов, действующим началом которых являются штаммы представителей нормальной микрофлоры с высокими антагонистическими, ферментативными и иммуностимулирующими свойствами» [27].

Такого рода препаратами являются пробиотики и аутопробиотики. Аутопробиотики представляют собой культивирование in vitro личных штаммов микробиоты и подготовку лекарственного средства для использования в восстановлении микробиома [28].

В основе пробиотиков заложена микробная природа, которая способствует разнонаправленному пробиотическому действию. Прямое пробиотическое воздействие заключается в нарушении механизмов образования зубного налёта и в воздействии антимикробных соединений пробиотиков на микроорганизмы. К таким соединениям относят органические кислоты, перекись водорода и пептиды, которые образуют молочнокислые бактерии. Усиление работы защитных систем организма лежит в основе непрямого пробиотического воздействия. Доказано, что молочнокислые бактерии при взаимодействии с макрофагами и Т-клетками наблюдается увеличение синтеза цитокинов [28]. Таким образом, накопленные результаты исследований указывают на следующие варианты активности пробиотиков в полости рта человека:  
антагонизм с пародонтопатогенами, агрегация с оральными бактериями и   
взаимодействие с оральным эпителием [29]. Антагонизм с пародонтопатогенами и агрегация с оральными бактериями приводит к снижению патогенности и кариогенного потенциала микроорганизмов биопленки [30], а также к снижению потенциальной нагрузки патогенов в биопленке полости рта [31]. При взаимодействии с эпителием полости рта пробиотики способны усиливать функцию эпителиального барьера и активизировать иммунные реакции [32; 33].

Современные исследования направлены на изучение эффективности использования пробиотиков как в роли монотерапии, так и в комплексном лечении. Teughels W. (2011) в результате своего исследования сделал вывод о том, что действие пробиотика в качестве одного лекарственного средства оказывает слабое воздействие на течение ХГП [34]. Тем не менее, эффективность применения пробиотиков именно в комплексном лечении ХГП подтверждена в большинстве исследований. Например, исследование индийского учёного Penala S. (2016) показало, что полоскание дважды в день раствором с *L. salivarius* и *L. reuteri* привело через три месяца к улучшению состояния тканей пародонта, уменьшению симптомов воспаления и ХГП [35]. При микробиологическом анализе пародонтальных карманов было отмечено отсутствие пародонтапатогенных микроорганизмов. Схожие результаты были получены при исследовании влияния *L.rhamnosus* при лечении ХГП (Morales A., 2016) [36]. Положительный эффект после использования лактобацилл в комплексном лечении ХГП был доказан и отечественными учёными. Бактимерова О.О. (2014) в исследовании в качестве пробиотика применяла “Эуфлорин-L”, состоящего из живых *L.acidophilus.* «Спустя 6 месяцев после проведенного лечения в группе сравнения, где для орошения пародонтальных карманов использовался только 0,05% раствор хлоргексидина, клинические показатели сохранились на исходном уровне, а в слюне существенно уменьшилось содержание иммуноглобулина А. В то же время в основной группе в этот срок все клинические показатели были лучше исходных значений: так, индекс эффективности гигиены полости рта был в 1,6 раза ниже исходного значения, папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА) уменьшился почти в 2 раза, а индекс, отражающий кровоточивость десен, - в 4 раза» [37].

Современные исследования по изучению влияния пробиотиков на состояние ротовой полости имеют тенденцию к изучению влияния пробиотика на основе *S.salivarius*. *S.salivarius* является исключительно оральным стрептококком, составляющим основу нормальной микробиоты ротовой полости и не оказывающим отрицательное влияние на организм человека. Повышенный интерес к пробиотическому потенциалу *S. salivarius* связан с тем, что некоторые штаммы продуцируют разнообразный набор бактериоцинов, экзоферментов декстраназу и уреазу, активность которых может помочь ограничить прогрессирование кариеса зубов, уменьшая накопление зубного налета и подкисление зубного налета. «Бактериоциноподобные ингибирующие субстанции, синтезируемые S. salivarius, являются разнонаправленными по спектру активности и, как полагают, играют важную роль как в стабилизации состава микробиоты полости рта, так и в профилактике избыточного роста потенциальных патогенов и развития инфекционных заболевании» [38]. В соответствии с этим на основе набора бактериоцинов и ферментов были выделены штаммы *S.salivarius:* M18 – потенциальный штамм *S.salivarius* для лечения кариеса и заболевания тканей пародонта, К12 – потенциальный штамм *S.salivarius* для лечения инфекций верхних дыхательных путей. В исследовании [Jeremy P. Burton](https://www.microbiologyresearch.org/search?value1=Jeremy+P.+Burton&option1=author&noRedirect=true) (2013) применение пробиотика на основе *S.salivarius* M18 привело к снижению уровня зубного и поддесневого налёта через 1 месяц после начала применения [39]. Андреева И.В. (2019) в своём исследовании доказала не только эффективность пробиотика на основе *S.salivarius* К12 при лечении заболеваний верхних дыхательных путей, но и значительное уменьшение неприятного запаха изо рта у пациентов с галитозом [38]. Это подтверждают исследования швейцарского учёного [L. Masdea](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Masdea+L&cauthor_id=22405584), которые показали активность *S.salivarius* по отношению к бактериям, которые вызывают галитоз [40].

В составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита возможно применение эубиотиков. Отличительной особенностью эубиотиков является наличие в них высушенных представителей нормальной микрофлоры. Доказано, что *L.acidophilus* в виде эубиотика «Ацилакта» также оказывают положительное воздействие при лечении воспалительных заболеваний пародонта. Данную эффективность подтвердило исследование Мельничука Г.М. (1995), результатом которого было достижение стабильной ремиссии ХГП после десятикратного применения препарата «Ацилакт». Эубиотик «Ацилакт» вводился в виде суспензии в пародонтальный карман до 20 минут каждые 2-3 дня [41]. Улучшение состояния тканей пародонта в исследовании было достигнуто также при применении Бифидумбактерина в виде масляной эмульсии, которую вводили в пародонтальные карманы.

Современным направлением в пробиотической комплексной терапии является рассмотрение эффективности аутопробиотиков, которые получены на основе аутологичных штаммов микроорганизмов [3; 4; 5]. Аргументация данной идеи состояла в том, что промышленные препараты не индивидуализированы и могут отторгаться в результате отсутствия гистосовместимости, так как они «являются биотехнологическими, поскольку выращены на искусственных питательных средах» [42]. Наряду с этим, не индивидуальные пробиотики оказывают непредсказуемое влияние на резидентную микрофлору. Их взаимодействие может быть основано на биосовместимости или на основе антагонизма по типам ««пробиотик против хозяина» и... «хозяин против пробиотика»» [43].

Несмотря на многие положительные стороны концепции по использованию аутопробиотиков в комплексном лечении ХГП, исследования по данному направлению единичны. При этом существующие исследования доказывают положительное влияние аутологичных микроорганизмов на ткани пародонта. Была доказана профилактическая эффективность аутопробиотиков против инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и глотки в исследовании Ильина В.К. И Суворова А.Н. [44]. Изучение воздействия аутопробиотического препарата проводилось у четырёх здоровых мужчин после их девятидневного пребывания в замкнутом пространстве, которое провоцирует размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Аппликация препарата в виде пластины с аутопробиотиком на основе аутолактобацилл выполнялась дважды в день в течение семи дней. Отсутствие патогенной и условно-патогенной микрофлоры было отмечено через 7 и 9 дней после окончания аппликаций препарата.

Таким образом, наличие высокой распространённости заболеваний пародонта, персонализированного подхода к выбору пробиотического препарата для высокоэффективного влияния на пародонтопатогены и небольшое число исследований по применению аутопробиотиков при лечении заболеваний пародонта обуславливает необходимость исследования эффективности аутопробиотика в комплексном лечении ХГП.

**Глава 2. Материалы и методы исследования**

2.1 Клиническая характеристика пациентов

В соответствии с поставленными задачами было проведено обследование 37 пациентов (19 женщин и 18 мужчин) в возрасте от 29 до 64 лет (со средним возрастом 44,3±1,5 лет) с ХГП лёгкой степени тяжести без тяжелой сопутствующей патологии.

Критерии включения пациентов в исследование: достоверный диагноз хронического генерализованного пародонтита; информированное согласие больного.

Критерии исключения пациентов из исследования: курильщики; наличие ортодонтических аппаратов; тяжелая сопутствующая патология внутренних органов в субкомпенсированной или декомпенсированной форме, сахарный диабет, доброкачественные или злокачественные новообразования любой локализации и этиологии; ВИЧ-инфекция и другие иммунодефициты, активный туберкулез; отказ больного от обследования.

Всем пациентам было проведено обследование, предусматривающее сбор анамнеза жизни и анамнеза заболевания, оценку стоматологического статуса, с занесением полученных данных в карту обследования стоматологического пациента (Приложение 1, 2, 3, 4). Также был проведён забор материала для лабораторного анализа из пародонтальных карманов.

37 пациентов были разделены на 2 основные группы и контрольную группу для оценки эффективности применения аутопробиотиков в комплексном лечении ХГП. Первая группа включала пациентов, лечение которых проводилось с использованием аутопробиотиков, вторая – пробиотиков. Кроме того, каждая группа подразделялась на 2 подгруппы. В 1 подгруппе лечение проводилось в виде ирригации пародонтальных карманов ауто- или пробиотиком, а 2 подгруппе - с помощью ротовых ванночек. Применение ауто- или пробиотика на основе *S.salivarius* дважды с перерывом в 3-4 дня. Контрольная группа состояла из пациентов, у которых лечение ХГП лёгкой степени тяжести включало проведение профессиональной гигиены полости рта и коррекцию индивидуальной гигиены. В таблице 1 представлено распределение пациентов по группам.

Таблица 1. Количественный состав подгрупп исследования по способу проведения лечения.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Аутопробиотик | | Пробиотик | | Контрольная группа |
|  | Ирригация пародонтальных карманов | Ротовые ванночки | Ирригация пародонтальных карманов | Ротовые ванночки |
| Количество пациентов | 7 | 7 | 7 | 6 | 10 |

2.2 Оценка стоматологического статуса пациентов

Клиническое обследование пациентов включало в себя сбор анамнеза, внешний осмотр и осмотр полости рта (приложение 1, 2, 3, 4).

В анамнезе жизни отмечаются ФИО, возраст и профессия пациента. Необходимо также указать наличие вредных привычек и аллергических реакций. Отдельно при сборе анамнеза жизни требуется выяснить наличие общесоматических, перенесенных инфекционных и других заболеваний. В карте больного следует указать лекарственные препараты, которые пациент принимает постоянно и на момент лечения.

При опросе больного с ХГП необходимо выяснить следующие факты:

* с чем связывает пациент возникновение данного заболевания;
* как давно появились симптомы, и были ли периоды обострений;
* отмечалось ли улучшение симптомов после проведенного лечения;
* когда последний раз проводилась профессиональная гигиена полости рта.

После тщательного опроса необходимо приступить непосредственно к внешнему осмотру пациента, при котором оценивается кожный покров пациента, лимфотические узлы и температура тела. Лимфатические узлы оцениваются по степени пальпируемости, болезненности и спаянности с окружающими тканями.

При осмотре полости рта составляется зубная формула, отмечается состояние прикуса, уровень прикрепления уздечек губ и языка, наличие в ротовой полости пломб, ортопедической или ортодонтической конструкции. Также при осмотре ротовой полости можно выявить наличие деформаций в установленных пломбах, кариозные и некариозные поражения твёрдых тканей зубов, покрывающий зубы мягкий зубной налёт, а также над- и поддесневые зубные отложения. Кроме твёрдых тканей ротовой полости следует обратить внимание на цвет дёсен, наличие рецессий и экссудата из патологического пародонтального кармана.

Многие литературные источники предлагают вместо определения глубины пародонтального кармана использовать ВПП (величину потери прикрепления) [45]. Её определяют от эмалево-цементной границы и до дна пародонтального кармана. В зависимости от её глубины можно определить степень тяжести хронического генерализованного пародонтита. Лёгкой степени соответствует потеря прикрепления 1-2 мм, 3-4 мм при средней, а при тяжёлой степени ВПП составляет более 5 мм.

Степень подвижности зубов определяется по шкале Миллера (Miller S.C. 1938 г.) в модификации Флезара (Fleszar 1980 г.):

0 степень - зуб устойчив, возможна физиологическая подвижность;

1-я степень - зуб смещается относительно оси не более чем на 1 мм;

2-я степень — смещение зуба в вестибуло-оральном направлении на 1-2 мм без нарушения его функции;

3-я степень — выраженная подвижность зуба во всех направлениях с нарушением его функции.

Для оценки гигиены полости и эффективности исследования и лечения используются специальные стоматологические индексы, которые позволяют оценить различные аспекты, необходимые для контроля и определения эффективности во время лечения хронического генерализованного пародонтита.

* Индекс КПУ зубов (Klein, 1938)

Индекс КПУ применяется для определения интенсивоности кариеса зубов как у определённого одного пациента, так и группы пациентов. Расшифровывается индекс по первым буквам в названии: К-отмечются зубы, подверженные кариозному процессу, П-запломбированные зубы (не требуют лечения), У-количество удаленных зубов/количество корней зубов, подлежащих удалению.

* Индекс гигиены полости рта ИГР-У, OHI-S (J.C.Green, J.R.Vermillion)

OHI-S используется для дифференциальной оценки выраженности зубного налёта и зубного камня. В качестве обследуемых зубов используются вестибулярные поверхности 16, 11, 26, 31 зубов и язычные поверхности первых моляров нижней челюсти. По какому принципу оценивается гигиена полости рта представлено в таблице 2.

Таблица 2. Коды и критерии определения зубного налёта и зубного камня при определении индекса OHI-S.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Критерии оценки | | | |
| код | Зубной налёт (ЗН)  (с помощью раствора Шиллера-Писарева) | код | Зубной камень (ЗК)  (с помощью стоматологического зонда) |
| 0 | Зубной налёт не выявлен. | 0 | Зубной камень не выявлен. |
| 1 | Мягкий ЗН < 1/3 поверхности зуба. | 1 | Наддесневой ЗК, покрывающий до 1/3 поверхности зуба . |
| 2 | Мягкий ЗН, покрывающий 1/3 - 2/3 поверхности зуба. | 2 | 3 варианта:  1. Наддесневой ЗК, покрывающий 1/3 — 2/3 поверхности зуба;  2. Незначительный поддесневой ЗК в пришеечной зоне;  3. Обнаружение сразу двух вариантов. |
| 3 | Мягкий ЗН, который покрывает >2/3 поверхности зуба. | 3 | 3 варианта:  1.Наддесневой ЗК, который покрывает >2/3 поверхности зуба;  2. Выраженные отложения поддесневого ЗК вокруг пришеечной области зуба;  3. Обнаружение сразу двух вариантов. |

«Для каждого компонента индекса складывают коды, полученные для каждой обследуемой поверхности, и делят на количество зубов» [46, с. 39]. Для определения суммарного значения индекса OHI-S складываются полученные значения отдельных критериев. Уровень гигиены пациента сопоставляется с суммой баллов после оценки индекса (таблица 3).

Таблица 3. Интерпретация результатов индекса гигиена OHI-S

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Интерпритация индексов | | |
| Уровень гигиены | Значение показателей ЗН или ЗК | Суммарное значение индекса OHI-S |
| хороший | 0,0-0,6 | 0,0-1,2 |
| удовлетворительный | 0,7-1,8 | 1,3-3,0 |
| плохой | 1,9-3,0 | 3,1-6,0 |

* Папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс - РМА (Parma, 1960)

Благодаря этому индексу оценивается состояние десны. Сначала десну около каждого зуба окрашивают раствором Шиллера-Писарева. Участок воспаления приобретает коричневую окраску. На основе расположения коричневого компонента участку десны у каждого зуба присваиваются баллы.

0 — отсутствие воспаления;

1 — воспаление только десневого сосочка;

2 — воспаление маргинальной десны;

3 — воспаление альвеолярной десны.

Затем производится рассчёт по формуле индекса РМА:

РМА = (Сумма баллов) / (3 \* число зубов) \* 100%

В конце исследования вродится оценка результатов:

менее 30% - легкая степень тяжести гингивита;

31—60 % - средняя степень тяжести гингивита;

больше 61% - тяжелая степень тяжести гингивита.

* Кровоточивость при зондировании (ВОР) (Аinаmo, Вау, 1975)

Для оценки индекса ВОР проводится обследование десны в области каждого зуба.

0 баллов — отсутствие кровоточивости;

1 балл — есть кровоточивость.

Интерпретация результатов:

ВОР = (количество кровоточащих точек=количесвто баллов)/(количество точек замера) \*100%

* Индекс нуждаемости в пародонтологическом лечении CPITN (ВОЗ, 1978, Аinаmo et al., 1982).

Этот индекс был рекомендован ВОЗ как индекс нуждаемости в лечении заболеваний пародонта [46, с. 46]. Для этого индекса используется специальный пуговчатый зонд c отметками 3,5, 5,5, 8,5 и 11,5 мм. На конце зонда находится шарик диаметром 0,5 мм. Проводится исследование тканей пародонта в области определенных областей (секстранов) с выделением индексных зубов (таблица 4).

Таблица 4. Индексные зубы для определения индекса CPITN [46, с. 46].

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 17/16 | 11 | 26/27 |
| 47/46 | 31 | 36/37 |

Если в определённой области нет этих перечисленных зубов, то в этой области осматриваются все сохранившиеся зубы.

Осмотр проводится осторожно в плоскости оси зуба. В результате осмотра в каждый секстант ставится код на основании следующих признаков:

Код 0 – интактная десна;

Код 1 – во время зондирования или через 10-30с появляется кровоточивость;

Код 2 – наличие зубного камня или других факторов, ощущающиеся во время зондирования (нарушение прилегания пломбы или ортопедической конструкции);

Код 3 – определяется пародонтальный карман от 4 до 5 мм (скрывается отметка на зонде в 3,5мм);

Код 4 – пародонтальный карман более 6 мм (в пародонтальный карман погружается отметка в 5,5 мм, а также чёрная метка).

Результатами индекса CPITN является определение нуждаемости пациента в пародонтологическом лечении:

Код 0 — если код 0 присутствуется во всех областях, то пациент не нуждается в пародонтологическом лечени;

Код 1 или больше — проводится обучение пациента основам гигиены полости рта, в дальнейшем проводится контроль навыков гигиены;

Код 2 или больше - пациенту назначается профессиональная гигиена полости рта, а также санация полости рта;

Код 3 и выше — проводится профессиональная гигиена полости рта и кюретаж;

Код 4 и выше — комплексное лечение с глубоким кюретажем.

2.3 Рентгенологическое исследование

Состояние тканей пародонта оценивалось с помощью конусно-лучевого компьютерного томографа Galileos (Sirona, Германия). С помощью компьютерного томографа проводилась оценка степени деструкции костной ткани альвеолярной кости, уровня деструкции кортикальной пластинки альвеолярной кости и наличия или отсутствия костных карманов в ротовой полости у пациента.

2.4 Забор материала

Для проведения микробиологического и генетического исследования у каждого пациента проводился забор материала из пародонтальных карманов с помощью стерильных бумажных эндодонтических абсорберов Absorbent Paper Points, фирмы Euronda (размер №25) в течение 15 секунд. Полученный материал немедленно, с созданием минимального контакта с атмосферным воздухом, помещался в стерильную герметичную пробирку типа Eppendorf, которую подвергали охлаждению перед дальнейшей транспортировкой в лабораторию.

Проведение забора материала осуществлялось в 2 пробирки Eppendorf. В пробирке для культивирования микроорганизмов находился физиологический раствор. Такие пробирки транспортировались в лабораторию в один день с забором материала. Материал в пробирках без физиологического раствора был заморожен до дальнейшего его исследования с помощью ПЦР.

Кроме забора материала из пародонтальных карманов проводился забор материала со слизистой оболочки щеки с помощью стерильного ватного тампона для выделения штаммов *S.salivarius*, которые использовались для создания аутопробиотика. Ватный тампон помещался в стерильную пробирку Eppendorf с физиологическим раствором, которая транспортировалась в лабораторию в день забора материала. Полученный аутопробиотик или пробиотик применялся в качестве раствора для ирригации пародонтальных карманов или в виде ротовых ванночек.

Забор материала и клинический осмотр пациентов проводился по определенной схеме, включающий 5 посещений:

* + - первичный осмотр пациентов с забором материала из пародонтальных карманов и слизистой оболочки щеки для культивирования микроорганизмов для создания аутопробиотика;
    - через 4-5 дней после первичного посещения были проведены профессиональная гигиена полости рта, коррекция индивидуальной гигиены полости рта, проведение ауто- или пробиотикотерапии;
    - через 3-4 дня после второго посещения был проведён повторный осмотр пациента, забор материала и ауто- или пробиотикотерапия;
    - через 6-7 дней после третьего посещения проводился осмотр полости рта и забор материала из пародонтальных карманов;
    - через 27-28 дней после четвёртого посещения проводился повторный осмотр полости рта пациента и забор материала из пародонтальных карманов для оценки эффективности применения аутопробиотиков и пробиотиков.

2.5 Культуральные среды и условия роста

Культивирование факультативных анаэробов осществлялось на 1.5% плотной среде THB (Difco, США) с добавлением 0.5% дрожжевого экстракта (Helicon, Россия) и 5% крови барана при температуре 37°С и 5% СО2. Продолжительность культивирования составляло 18 часов.

2.6 Выделение чистой культуры

Выделение культур микроорганизмов из пародонтальных карманов проводился с помощью посева материала на чашках Петри с агаризованной средой. В стерильных условиях с использованием газовой горелки пинцетом материал с адсорберов переносился на первую зону чашки Петри. Обсеменённый микроорганизмами из пародонтальных карманов физиологический раствор из пробирки после центрифугирования также переносился в первый сектор рассева. В дальнейшем использовался метод истощающего штриха, в ходе которого из первой зоны чашки Петри петлей производится рассев в виде параллельных штрихов. Таким образом, во втором секторе были нанесены 40 параллельных штрихов петлей из первого сектора. После стерилизации петли из второго сектора проводили 4 параллельных штриха, создавая 3 сектор. Четвёртый сектор включал в себя 4 параллельных штриха, нанесённых стерильной петлей, из 3 сектора. После этого чашку Петри помещают в термостат для дальнейшего роста колоний в течение 18 часов.

Благодаря данному виду рассева можно определить количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в первом секторе. Для этого необходимо знать, что в каждом последующем секторе разведение материала 1 сектора увеличивалось в десять раз.

Определив КОЕ можно выяснить КОЕ/мл, используя информацию о том, что впитываемость одного адсорбера 2 мкл (в исследовании использовалось 3 адсорбера для одного посева). Таким образом, можно выделить формулу для определения КОЕ/мл в данном исследовании:

КОЕ/мл =

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью системы MALDI-TOF Microflex LT (Brucker Daltonics, Германия).

2.7 Выделение тотальной ДНК из исходного биологического материала

Выделение тотальной ДНК производилось из микроорганизмов на адсорберах, помещенных в стерильные сухие пробирки Eppendorf во время осмотров пациента. Для выделения ДНК применялась система для ПЦР «Экспресс-ДНК-Био» согласно инструкции по применению.

Лизирующий раствор по 120 мкл добавлялся в каждую пробирку. После этого пробирки устанавливались на центрифугу-встряхиватель (Vortex, Biosan), благодаря которой происходило в течение 10 с перемешивание и стряхивание микроорганизмов с адсорберов (8 адсорберов) в лизирующий раствор. С помощью стерильного пинцета в стерильных условиях при включённой газовой горелке производилось выведение адсорберов из пробирки. После осаждения пены после перемешивания пробирки инкубировались в термостате при 980С в течение 5 мин. После двухминутной выдержки при комнатной температуре их далее центрифугировали 1 минуту при 13 тыс. об/мин.

2.8 Конструирование oлигонуклеотидных праймерoв

Посредством программ Primer 3 и OLIGO 4.0 был произведено создание олигонуклеoтидных праймерoв с определением их температур плавления (таблица 5).

Таблица 5. Олигонуклеoтидныепраймеры: *P. gingivalis, P. intermedia, T. forsythia,* *T. denticola, S.salivarius*.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название | 5’→3’ | Тотж. | Размер фрагмента  (п.н.) |
| *P. gingivalis* | | | |
| Gin1 | GTATATGCTCGACGAGGTGGAA | 57,0 | 334 |
| Gin2 | ATTGTCCAGGGTAACTTCTTCG |  |  |
| *P. intermedia* | | | |
| Int 1 | AATACAGCCTTCGAGGGTTT | 55,0 | 335 |
| Int 2 | TTCGGTCAAGACAGTAGGGA |  |  |
| *T. forsythia* | | | |
| For1 | CGAGGGTTCAATACGCTGTT | 54,0 | 572 |
| For2 | ATAAAAATCGCATCGCAAGG |  |  |
| *T. denticola* | | | |
| Den1 | TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT | 59,0 | 311 |
| Den2 | TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA |  |  |
| *S.salivarius* | | | |
| Salv3 | TTCTTGAAGTTGCTGGTGTGCCTC | 60,6 | 453 |
| Salv4 | GTCAGGAAGAAATCACAGCGGGC | 61,5 |  |

В основе полимеразной цепной реакции лежит копирование и многократное воспроизведение исходного участка ДНК при наличии его в исследуемом образце.

После создания амплификационной смеси поверх неё помещалось 30 мкл минерального масла. Далее происходило встряхивание пробирок вручную, после которого они размещались в амплификаторе (Терцик, Россия) для дальнейшей инкубации в течение 3 минут при температуре 94оС. Денатурация проводилась в течение 15 секунд при температуре 94оС. Отжиг праймеров проводили в течение 15 секунд при температуре, индивидуальной для каждого праймер (таблица 5). Цикл синтеза ДНК проводился при 72oС 20 секунд. Данные три цикла повторяли 35 раз, после которых происходила дальнейшая пятиминутная инкубация при 72oС.

2.9 Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК проводили в 1,0% агарозном геле в горизонтальном аппарате «Hoefer HE 33» (Pharmacia, Швеция) с использованием ТАЕ буфера втечение 30 минут и под напряжением 70В. Добавление бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в гель позволило визуализировать ДНК в ультрафиолетовых лучах. Получение результатов электрофореза осуществляли с помощью системы видеoзахвата «VersaDoc MP 4000» (BioRad). Для вычисления молекулярных масс фрагментов ДНК применяли ДНК-маркер «100 bp Plus DNA ladder».

2.10 Создание аутопробиотика на основе *S.salivarius*.

Основу аутопробиотика или пробиотика для комплексного лечения ХГП составлял S. salivarius. Перед началом аутопробиотикотерапии производился забор материала со слизистой оболочки щеки пациента. С помощью стерильного ватного тампона брали мазок, который в дальнейшем помещался в пробку Eppendorf с физиологическим раствором для дальнейшей транспортировки в этот же день в лабораторию.

В тот же день производился высев микроорганизмов с ватного тампона на плотную среду методом «истощающего штриха». Культивирование факультативных анаэробов проводили на 2,5% плотной среде THB (Difco, США) с добавлением 0,5% дрожжевого экстракта (Helicon, Россия) и 5% крови барана при температуре 37°С и 5% СО 2 в течение 18 часов.

После культивирования смешанной культуры с ватного тампона выделяли чистую культуру путём определения S. Salivarius по морфологической схожести. Чистая культура S. Salivarius культивировалась в новой чашке на той же среде и в тех же условиях. Для дальнейшего применения стрептококка необходимо было подтвердить принадлежность микроорганизма к S. Salivarius, для чего был произведён анализ с помощью ПЦР-системы с применением специфицеских праймеров (таблица 5). Для выделения ДНК из бактериальных клеток использовали набор «Экспресс-ДНК-Био» (Алкор Био, Россия) в соответствии с инструкцией. Дополнительно подтвердили идентификацию четырех культур S. salivarius с помощью MALDI TOF. Выделенные культуры хранили на плотной среде или же в жидкой среде THB с 0,5% дрожжевого экстракта с добавлением глицерина при -70°С.

Для приготовления аутопробиотического препарата выделенную культуру S. salivarius от конкретного пациента высевали на 14 мл THB, обогащенного 0,5% дрожжевым экстрактом.

Культивирование стрептококка проводили при 37°С и 5% СО2 в течение 18 часов. После культивирования при 37°С и 5% СО2 в течение 18 часов бактериальные клетки подвергали центрифугированию при 3,5 тыс оборотов в секунду в течение 8 мин. После чего осажденные клетки однократно отмывали физиологическим раствором и суспендировали в исходном объеме.

Концентрацию бактериальной суспензии (К) определяли количественным высевом и измерениями ОД 600 . Приблизительно К равнялась от 4\*108 до 9\*108КОЕ/мл. Для создания общего пробиотика применяли штамм S. Salivarius который ранее был выделен у здорового пациента.

Способы применения аутопробиотика и пробиотика:

В исследовании для сравнения эффективности препаратов на основе Streptococcus salivarius проводилось их применение двумя способами: с помощью ирригации пародонтальных карманов и ротовых ванночек. Процедуры проводились два раза с перерывом в 3-4 дня. При первом способе введения на ирригацию одного пародонтального кармана использовали 0,5-1,0 мл аутопробиотика.

2.11 Методы статистической обработки данных

В ходе исследования были получены данные, которые были систематизированы в программе Microsoft Excel. На основании полученных данных были получены статистические показатели, «…которые позволяют оценить достоверность различия, корреляцию и взаимное влияние анализируемых факторов…» [47].

Среднее арифметическое совокупности (М) рассчитывали как путём деления суммы значений переменной на количество значений:

Мd = , где:

Md – Средняя арифметическая совокупности, d – значение показателей совокупности, n – численность выборки.

Стандартное отклонение (σ) «отражает изменчивость значений переменной и оценивает степень их отличия от среднего» [47].

σ = при n>30;

σ = при n≤30, где:

σ – стандартное отклонение, d – отклонение варианты от средней арифметической, p – частота наблюдения варианты, n – количество наблюдений.

Средняя (стандартная) ошибка (m) средней величины отражает величину ошибку, которая случайно может произойти в процессе выборки. Расчёт средней ошибки проводился по формуле:

m = ± , где:

m – средняя ошибка, – стандартное отклонение, n – численность выборки.

Статистическая значимость различий и достоверность различий показателей определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Для расчёта t-критерия Стьюдента применялась формула:

t = , где:

t – критерий Стьюдента, M1 – средняя арифметическая первой совокупности, M2 – средняя арифметическая второй совокупности, m1 – средняя ошибка первой средней арифметической, m2 – средняя ошибка второй средней арифметической.

**Глава 3. Результаты исследований**

3.1 Клиническая оценка пациентов основных групп и контрольной группы с ХГП до лечения

В ходе первичного осмотра пациентов были собраны и проанализированы данные, которые характеризовали состояние полости рта у пациентов до лечения. При сборе жалоб все пациенты указывали на кровоточивость во время чистки зубов (100%), 13 (35%) обследованных предъявляли жалобы на кровоточивость дёсен во время приёма пищи, и самопроизвольная кровоточивость десен была выявлена у 11 (29,7%) пациентов. Пациенты в 48,6% случаев предъявляли жалобы на наличие неприятного запаха изо рта, 13,5% обследованных отмечали зуд и жжение в области десен. Жалобу на попадание пищи между зубами отмечали 12 (32,4%) пациентов. 36 (97%) пациентов указывали на отёчность и воспаление дёсен и 3 (8,1%) пациента – на смещение зубов. Жалобы всех пациентов и жалобы пациентов в подгруппах до начала лечения представлены в таблицах 6.1 и 6.2.

Таблица 6.1. Жалобы обследованных пациентов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Жалобы | Количество пациентов, предъявляющих жалобу | |
|  | Абс. (n) | Отн. (%) |
| Кровоточивость при чистке зубов | 37 | 100% |
| Кровоточивость при приёме пищи | 13 | 35% |
| Кровоточивость самопроизвольная | 11 | 29,7% |
| Отёк и воспаление дёсен | 36 | 97% |
| Неприятный запах из ротовой полости | 18 | 48,6% |
| Попадание пищи в межзубной промежуток | 12 | 32,4% |
| Зуд и жжение в дёснах | 5 | 13,5% |
| Смещение зубов | 3 | 8,1% |

Таблица 6.2. Жалобы обследованных пациентов 4 подгрупп.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Жалобы | I группа 1-ая подгруппа | I группа 2-ая подгруппа | II группа 1-ая подгруппа | II группа 2-ая подгруппа | Контро-льная группа |
| Кровоточивость при чистке зубов | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Кровоточивость при приёме пищи | 71,4% | 28,6% | 28,6% | 33,3% | 30% |
| Кровоточивость самопроизвольная | 28,6% | 14,3% | 28,6% | 33,3% | 30% |
| Неприятный запах из ротовой полости | 42,8% | 42,8% | 57,1% | 66,7% | 40% |
| Смещение зубов | 0% | 14,3% | 0% | 0% | 10% |
| Попадание пищи в межзубной промежуток | 14,3% | 28,6% | 42,8% | 50% | 30% |
| Зуд и жжение в дёснах | 28,6% | 28,6% | 0% | 0% | 10% |
| Отёк и воспаление дёсен | 85% | 100% | 100% | 100% | 100% |

При выяснении анамнеза заболевания 26 (70,3%) пациентов не могли указать причину возникновения симптомов и самого заболевания. Остальные 11 (29,7%) пациентов в качестве предполагаемой причины выделяли наследственную предрасположенность. 7 пациентов указывали, что в течение 10 лет наблюдают у себя симптомы ХГП. Лечение заболеваний пародонта проводилось только у 3 (8,1%) обследованных пациентов.

По данным анамнеза жизни заболевания сердечно-сосудистой системы выявлены у 3 (8,1%) пациентов. 13 (35,1%) обследованных отметили наличие аллергии.

При контрольной чистке зубов было обнаружено, что 35 (95%) пациентов проводят индивидуальную гигиену 2 раза в день с применением зубной щётки и зубной пасты. Из них только 8 (23%) обследованных пользуются зубными нитями для очищения межзубных промежутков.

При осмотре ротовой полости у всех пациентов до лечения была выявлена экссудация из пародонтальных карманов (100%), гиперемия маргинальной и прикреплённой десны и межзубных сосочков (100%). У 35 (95%) пациентов был отмечен толстый биотип тканей пародонта. Также у 6 (16,2%) пациентов были выявлены некариозные поражения зубов – клиновидные дефекты. Необходимо также отметить, что у пациентов были выявлены нависающие края и коронок (13,5%). Потеря клинического пародонтального прикрепления в среднем составила 2,96±0,03 мм.

Ортогнатический прикус диагностирован в 78,4% случаях. У остальных пациентов наблюдались аномалия прикуса или аномалия расположения отдельных зубов. У 6 пациентов был выявлен глубокий прикус, у 1 пациента – открытый, у 5 пациентов – скученность зубов.

Во время осмотра ротовой полости у пациентов определялся индекс КПУ, который отражает наличие кариеса и его осложнений. Среднее значение индекса КПУ у обследованных пациентов 18,3±0,85. Это значение отражает очень высокую интенсивность кариеса (>16,3).

Показатели индексов гигиены, кровоточивости и состояния тканей пародонта представлены в таблице 7. Для оценки уровня гигиены был применён упрощённый индекс гигиены Green-Vermillion (OHI-S), который включал суммарную оценку зубного налёты и зубного камня. Среднее значение индекса OHI-S пациентов 3,72±0,19, что соответствует плохому уровню гигиены полости рта (>3,1). Плохой уровень гигиены полости рта пациентов подтверждается индексом Silness-Loe, высокое среднее значение которого (1,73±0,09) доказывает наличие у пациентов зубного налёта. Значение индекса CPITN 2,27±0,07 показывает потребность пациентов в проведении профессиональной гигиены полости рта и назначении местной противоспалительной терапии. Воспаление десны и десневого сосочка можно оценить не только визуально, но и проанализировать с помощью индекса PMA. Значение индекса PMA 43,3±1,8% говорит о наличии у пациентов средней степени тяжести гингивита. На основании высокого значения индекса BOP (70,3±2,4%) можно сделать вывод о высокой степени кровоточивости в области всех зубов пациентов.

Таблица 7. Показатели индексов гигиены и состояния тканей пародонта у обследованных пациентов до лечения.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Индекс | I группа 1 подгруппа | I группа 2 подгруппа | II группа 1 подгруппа | II группа 2 подгруппа | Контрольная группа | Общий показатель |
| Green-Vermillion (OHI-S) | 4,13±0,50 | 3,19±0,32 | 4,06±0,40 | 3,80±0,57 | 3,53±0,39 | 3,72±0,19 |
| Silness-Loe | 1,88±0,28 | 1,59±0,19 | 1,80±0,22 | 1,70±0,31 | 1,69±0,18 | 1,73±0,09 |
| CPITN | 2,19±0,17 | 2,31±0,14 | 2,50 ±0,10 | 2,19±0,17 | 2,17±0,15 | 2,27±0,07 |
| PMA, % | 40,47±4,56 | 45,56±3,07 | 48,22±2,47 | 38,3±6,36 | 42,87±3,55 | 43,3±1,8 |
| ВОР, % | 62,56±3,38 | 77,02±3,60 | 81,90±7,12 | 62,62±6,38 | 67,67±4,07 | 70,3±2,4 |

Таким образом, на основании жалоб пациентов, клинической картины, значений индексов гигиены и состояния тканей пародонта можно сделать вывод о наличии у пациентов ХГП лёгкой степени тяжести. Высокие значения пародонтальных индексов свидетельствуют о воспалении в тканях пародонта, которому способствует плохая гигиена полости рта. Наличие над- и поддесневого зубного камня способствует росту и размножению бактерий, в том числе пародонтопатогенных, способных усиливать воспаление в тканях пародонта (коэффициент корреляции r=0,74, p<0,05)

3.2 Результаты рентгенологического исследования до лечения

С помощью конусно-лучевого компьютерного томографа фирмы GALILEOS - проводилось рентгенологическое исследование пациентов основных и контрольной групп до начала лечения. У всех пациентов была выявлена деструкция альвеолярной части верхней и нижней челюсти на 1/3 длины корня зуба (100%) и компактной пластинки в области всех зубов (100%). Костные пародонтальные карманы были у всех пациентов (100%) в области в среднем 13,8±6,9 зубов. В 29,6% случаев были определены изменения в периапикальных тканях.

Таким образом, рентгенологическая картина подтверждает наличие у пациентов хронического генерализованного пародонтита лёгкой степени тяжести.

3.3 Клиническая оценка пациентов основных групп и контрольной группы с ХГП после лечения

Одной из задач нашего исследования являлась оценка динамики клинических показателей, а также гигиенических и пародонтальных индексов до и на этапах проведения ауто- и пробиотикотерапии на основе *S.salivarius.* В таблицах 8.1, 8.2 и 8.3 представлены данные опроса пациентов разных подгрупп по предъявляемыми ими жалобами на разных этапах лечения.

Таблица 8.1 Динамика жалоб пациентов I группы на этапах лечения аутопробиотиками.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | До лечения, % | | Через 3-4 дня после первого применения, % | | Через неделю после второго применения, % | | Через 4 недели после лечения, % | |
| Жалобы | I(1)\* | I(2)\*\* | I(1) | I(2) | I(1) | I(2) | I(1) | I(2) |
| Кровоточивость при чистке зубов | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Кровоточивость при приёме пищи | 71,4 | 28,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Кровоточивость самопроизвольная | 28,6 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Неприятный запах из ротовой полости | 42,8 | 42,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Смещение зубов | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Попадание пищи в межзубной промежуток | 14,3 | 28,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Зуд и жжение в дёснах | 28,6 | 28,6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Отёк и воспаление дёсен | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Примечание: \* - I(1)- I группа 1-ая подгруппа; \*\* - I(2)- I группа 2-ая подгруппа.

Таблица 8.2 Динамика жалоб пациентов II группы на этапах лечения общим пробиотиком.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | До лечения, % | | Через 3-4 дня после первого применения,% | | Через неделю после второго применения,% | | Через 4 недели после лечения, % | |
| Жалобы | II(1)\* | II(2)\*\* | II(1) | II(2) | II(1) | II(2) | II(1) | II(2) |
| Кровоточивость при чистке зубов | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Кровоточивость при приёме пищи | 28,6 | 33,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Кровоточивость самопроизвольная | 28,6 | 33,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Неприятный запах из ротовой полости | 57,1 | 66,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Смещение зубов | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Попадение пищи в межзубной промежуток | 42,8 | 50 | 14,3 | 0 | 14,3 | 0 | 14,3 | 0 |
| Зуд и жжение в дёснах | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Отёк и воспаление дёсен | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Примечание: \* - II(1)- II группа 1-ая подгруппа; \*\* - II(2)- II группа 2-ая подгруппа.

Таблица 8.3 Динамика жалоб пациентов в контрольной группе.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Жалобы | До лечения, % | Через 4 недели послелечения лечения, % |
| Кровоточивость при чистке зубов | 100 | 20 |
| Кровоточивость при приёме пищи | 30 | 0 |
| Кровоточивость самопроизвольная | 30 | 0 |
| Неприятный запах из ротовой полости | 40 | 0 |
| Смещение зубов | 10 | 10 |
| Попадение пищи в межзубной промежуток | 30 | 30 |
| Зуд и жжение в дёснах | 10 | 0 |
| Отёк и воспаление дёсен | 100 | 10 |

Через 3-4 дня после начала лечения у пациентов I и II групп практически все жалобы исчезли. У пациентов контрольной группы после проведённого лечения сохранялись жалобы на кровоточивость при чистке зубов, отёк и воспаление дёсен, смещение зубов и попадение пищи в межзубной промежуток.

В таблице 9 представлены результаты оценки экссудации из пародонтальных карманов в процессе лечения пациентов основных и контрольной группы. У пациентов II группы 1 подгруппы и I группы после лечения отмечалось отсутствие экссудации. Сравнение результатов лечения I и II групп показало отсутствие статические значимых различий (р>0,05). Снижение количества зубов с экссудацией из пародонтальных карманов в процессе лечения с применением ауто- или пробиотика на основе S.salivarius или без него статистически достоверно.

Таблица 9. Динамика экссудации из пародонтальных у пациентов основных и контрольных групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Среднее количество зубов с экссудацией из пародонтальных карманов | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 15,71±3,31 | 2,00±1,31\* | 0 | 0 |
| I группа 2-ая подгруппа | 12,57±2,37 | 3,14±2,30\*\* | 0 | 0 |
| II группа 1-ая подгруппа | 15,43±2,43 | 0,71±0,31\* | 0 | 0 |
| II группа 2-ая подгруппа | 15,50±2,70 | 5,83±3,78\*\*\* | 4,00±2,50\*\* | 4±2,50\*\* |
| Контрольная группа | 15,30±2,17 | - | - | 5,00±1,64\*\* |

Примечание: р — достоверность различий между признаком до лечение и на разных этапах после лечения: \* - р<0,001; \*\* - р<0,05; \*\*\* - p>0,05.

В ходе лечения пациентов отмечена тенденция к восстановлению клинического прикрепления (таблица 10). Статистически значимых различий между результатами основных подгрупп не выявлено (p>0,05). Однако при сравнении результатов лечения подгрупп с контрольной группой статистически различия значимы (р <0,001). Снижение глубины клинического прикрепления в процессе лечения основных групп и контрольной группы статистически достоверно (р<0,05).

Таблица 10. Уровень утраты пародонтального клинического прикрепления у пациентов основных и контрольных групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Утрата пародонтального прикрепления, мм | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 2,91±0,07 | 2,45±0,06\* | 2,08±0,02\* | 2,03±0,02\* |
| I группа 2-ая подгруппа | 2,96±0,06 | 2,49±0,07\* | 2,16±0,07\* | 2,04±0,02\* |
| II группа 1-ая подгруппа | 2,99±0,04 | 2,58±0,07\* | 2,07±0,04\* | 2,04±0,02\* |
| II группа 2-ая подгруппа | 2,89±0,13 | 2,55±0,09\*\*\* | 2,15±0,05\* | 2,09±0,05\* |
| Контрольная группа | 2,98±0,07 | - | - | 2,77±0,06\*\* |

Примечание: р — достоверность различий между признаком до лечение и на разных этапах после лечения: \* - р<0,001; \*\* - р<0,05; \*\*\* - p>0,05.

Уже после первого применения аутопробиотика или общего пробиотика (I и II группа) с предварительным проведением профессиональной гигиены полости рта наблюдается снижение более чем на 90% значения индекса Green-Vermillion (таблица 11). Индекс Green-Vermillion подтверждает наличие хорошей гигиены ротовой полости после начала лечения.

Значимого статистического различия между результатами лечения основных подгрупп и контрольной группы не выявлено (p>0,05). Снижение индекса в процессе лечения основных групп и контрольной группы статистически достоверно (р<0,05).

Таблица 11. Динамика индекса Green-Vermillionn у пациентов основных и контрольной групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Индекс Green-Vermillionn | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 4,13±0,5 | 0,17±0,08\* | 0 | 0 |
| I группа 2-ая подгруппа | 3,19±0,32 | 0,17±0,07\* | 0,03±0,02\* | 0 |
| II группа 1-ая подгруппа | 4,06±0,4 | 0,26±0,06\* | 0,05±0,04\* | 0,05±0,04\* |
| II группа 2-ая подгруппа | 3,8±0,57 | 0,14±0,11\* | 0 | 0 |
| Контрольная группа | 3,53±0,39 | - | - | 0,19±0,04\* |

Примечание: р — достоверность различий между значением индекса до лечение и на разных этапах после лечения: \* - р<0,001; \*\* - р<0,05.

В таблице 12 представлено изменение индекса Silness-Loe до и во время лечения пациентов основных и контрольной групп. Через 3-4 дня после начала лечения пациентов I группы значение индекса Silness-Loe снизилось на 93% от значения до лечения, а у пациентов II группы на 90,9%. Статистически значимых различий между результатами основных групп не было выявлено (р>0,05). Но различия между результатами после лечения между основными подгруппами и контрольной группой статистически оказались значимы (р<0,05). Снижение индекса в процессе лечения основных групп и контрольной группы статистически достоверно.

Таблица 12. Динамика индекса Silness-Loe у пациентов основных и контрольных групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Индекс Silness-Loe | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 1,88±0,28 | 0,1±0,05\* | 0,01±0,01\* | 0 |
| I группа 2-ая подгруппа | 1,59±0,19 | 0,14±0,04\* | 0,03±0,02\* | 0,01±0,007\* |
| II группа 1-ая подгруппа | 1,80±0,22 | 0,14±0,03\* | 0,01±0,01\* | 0 |
| II группа 2-ая подгруппа | 1,70±0,31 | 0,19±0,07\* | 0,02±0,01\* | 0,01±0,006\* |
| Контрольная группа | 1,69±0,18 | - | - | 0,20±0,04\* |

Примечание: р — достоверность различий между значением индекса до лечение и на разных этапах после лечения: \* - р<0,001.

Значение индекса CPITN на разных этапах лечения пациентов основных и контрольной групп показано в таблице 13. Результатом лечения пациентов основных групп является отсутствие необходимости в дальнейшем лечении (значение индекса <1). Несмотря на снижение индекса CPITN контрольной группы, пациентам необходима коррекция индивидуальной гигиены полости рта (1<значение индекса<2). Статистически значимых различий между результатами основных групп не было выявлено (р>0,05). Но различия между результатами после лечения между основными подгруппами и контрольной группой статистически оказались значимы (р<0,05). Снижение индекса в процессе лечения основных групп и контрольной группы статистически достоверно.

Таблица 13. Динамика индекса CPITN у пациентов основных и контрольных групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Индекс CPITN | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 2,19±0,17 | 1,45±0,19\*\* | 0,43±0,12\* | 0,19±0,09\* |
| I группа 2-ая подгруппа | 2,31±0,14 | 1,86±0,13\*\* | 0,95±0,18\* | 0,33±0,10\* |
| II группа 1-ая подгруппа | 2,50±0,10 | 1,86±0,08\* | 0,69±0,18\* | 0,14±0,07\* |
| II группа 2-ая подгруппа | 2,19±0,17 | 1,61±0,22\*\*\* | 0,72±0,20\* | 0,10±0,05\* |
| Контрольная группа | 2,17±0,15 | - | - | 1,65±0,18\*\* |

Примечание: р — достоверность различий между значением индекса до лечение и на разных этапах после лечения: \* - р<0,001; \*\* - р<0,05; \*\*\* - р>0,05.

В таблице 14 представлено значение индекса PMA до и в процессе лечения пациентов основных и контрольной групп. Через 3-4 дня после начала лечения состояние тканей пародонта улучшилось, поскольку индекс PMA соответствовал лёгкой степени тяжести пародонтита. При применении как аутопробиотика, так и общего пробиотика в комплексном лечении ХГП лёгкой степени тяжести наблюдалось снижение индекса PMA. Применение как аутопробиотика, так и пробиотика произвело положительный эффект на ткани пародонта. Статистически значимых различий между I и II группой, а также подгруппами не было обнаружено (р>0,05). Однако при сравнении результатов лечения основных групп с контрольной группой были обнаружены статически значимые различия (р<0,05). Снижение индекса в процессе лечения с применением ауто- или пробиотика на основе *S.salivarius* или без него статистически достоверно.

Таблица 14. Динамика индекса PMA у пациентов основных и контрольных групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Индекс PMA, % | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 40,47±4,56 | 5,94±1,10\* | 0,5±0,33\* | 0,30±0,25\* |
| I группа 2-ая подгруппа | 45,56±3,07 | 8,09±1,09\* | 1,95±0,75\* | 0,61±0,45\* |
| II группа 1-ая подгруппа | 48,22±2,47 | 7,49±1,02\* | 1,33±0,87\* | 0,95±0,85\* |
| II группа 2-ая подгруппа | 38,3±6,36 | 8,06±1,09\*\* | 0,78±0,49\* | 0 |
| Контрольная группа | 42,87±3,55 | - | - | 8,60±1,23\* |

Примечание: р — достоверность различий между значением индекса до лечение и на разных этапах после лечения: \* - р<0,001; \*\* - р<0,05.

В таблице 15 отображены значения индекса ВОР до лечения и на разных стадиях лечения основных и контрольной групп. До лечения у пациентов наблюдался высокий уровень кровоточивости межзубного сосочка и маргинальной десны. После лечения наблюдается постепенное снижение уровня кровоточивости.

При применении как аутопробиотика, так и общего пробиотика на основе *S.salivarius* в составе комплексного лечения наблюдался положительный эффект, заключающийся в снижение индекса BOP. При сравнении результатов после лечения между I и II группами статистически значимые различия были подтверждены (p<0,05). Различия между результатами после лечения между основными подгруппами и контрольной группой статистически значимы (р<0,05). Снижение индекса в процессе лечения с применением ауто- или пробиотика или без него статистически достоверно.

Таблица 15. Динамика индекса BOP у пациентов основных и контрольных групп.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Индекс BOP, % | | | |
|  | До лечения | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 62,56±3,38 | 10,32±1,93\* | 1,36±0,69\* | 0,74±0,49\* |
| I группа 2-ая подгруппа | 77,02±3,60 | 14,24±1,93\* | 4,22±1,94\* | 2,61±1,33\* |
| II группа 1-ая подгруппа | 81,90±7,12 | 13,03±2,44\* | 0,57±0,57\* | 0\* |
| II группа 2-ая подгруппа | 62,62±6,38 | 13,99±2,56\* | 0,74±0,74 | 0\* |
| Контрольная группа | 67,67±4,07 | - | - | 17,13±2,30\* |

Примечание: р — достоверность различий между значением индекса до лечение и на разных этапах после лечения: \* - P<0,001; \*\* - P<0,05.

Таким образом, при применении аутопробиотика и общего пробиотика в составе комплексного лечения наблюдается уменьшение симптомов ХГП лёгкой степени тяжести. Полное устранение жалоб пациентов обеспечивается уменьшением воспаления тканей пародонта на фоне комплексного лечения. Улучшение показателей индексов гигиены и состояния тканей пародонта (PMA, ВОР) подтверждают факт купирования воспалительного процесса. При сравнении с контрольной группой статистически доказаны различия результатов лечения основных групп. Данные отличия в результатах лечения основных и контрольной групп доказывают клиническую эффективность применения ауто- или общего пробиотика на основе *S.salivarius* в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита. Анализ результатов клинической и индексной оценки состояния тканей пародонта указывает на сопоставимую эффективность применения ауто- и пробиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита лёгкой степени тяжести.

3.4 Результаты микробиологических исследований

В ходе микробиологического исследования материал из пародонтальных карманов пациентов был культивирован на чашках Петри с плотной питательной средой. После первичной инкубации микроорганизмов были получены смешанные культуры (рисунок 1, 2, 3, 4). В ходе применения аутопробиотика/пробиотика с помощью высева содержимого пародонтальных карманов пациентов контролировали присутствие *Streptococcus salivarius*. Для количественного анализа *S.salivarius* в смешанных культурах проводили подсчет КОЕ/мл в ходе комплексного лечения (таблица 17). До лечения подсчёт КОЕ/мл не проводили, поскольку в первичных посевах наблюдали лишь единичные колонии *S.salivarius*, которые были использованы для создания аутопробиотика. При отсутствии *S salivarius* в первичных посевах у пациентов в ходе комплексного лечения применяли общий пробиотик на основе *S.salivarius*, выделенного от здорового пациента. Доминирующие культуры из смешанных культур идентифицировали с помощью MALDI-TOF Microflex LT (Brucker Daltonics, Германия) (таблица 16).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | |  | |
|  | | Рисунок 1 | |
|  |  | |
| Рисунок 1.1 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №10 до ирригации аутопробиотиком. | | Рисунок 1.2 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №10 через 4 недели после ирригации аутопробиотиком. | |
|  | |  | |
|  | | Рисунок 2 | |
|  | |  | |
| Рисунок 2.1 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №18 до ротовых ванночек аутопробиотиком. | | Рисунок 2.2 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №18 через 4 недели после ротовых ванночек с аутопробиотиком. | |
|  | | Рисунок 3 | |
|  | |  | |
| Рисунок 3.1 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №9 до ирригации пародонтальных карманов пробиотиком. | | Рисунок 3.2 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №9 через 4 недели после ирригации пародонтальных карманов пробиотиком. | |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  | Рисунок 4 |
|  |  |
| Рисунок 4.1 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №25 до ротовых ванночек с пробиотиком. | Рисунок 4.2 Фотография смешанных культур, выделенных из пародонтальных карманов пациента №25 через 4 недели после ротовых ванночек с пробиотиком. |

Таблица 16. Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF Microflex LT

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № чашки | № пробы | Наименование микроорганизма |
| 1 | 1.11 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.12 | *Streptococcus oralis* |
| 1.13 | *Streptococcus constellatus* |
| 2 | 1.23 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.31 | *Candida albicans* |
| 3 | 1.41 | *Streptococcus salivarius* |
| 1.42 | *Candida albicans* |
| 1.43 | *Candida albicans* |
| 6 | 1.142 | *Gemella haemolysans* |
| 1.161 | *Rothia dentocariosa* |
| 1.162 | *Rothia mucilaginosa* |
| 8 | 1.292 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.294 | *Neisseria macacae* |
| 9 | 1.302 | *Gemella haemolysans* |
| 1.303 | *Streptococcus mitis* |
| 1.304 | *Streptococcus salivarius* |
| 10 | 1.311 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.312 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.321 | *Streptococcus vestibularis* |
| 11 | 1.322 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.323 | *Streptococcus vestibularis* |
| 1.324 | *Streptococcus vestibularis* |

Одним из способов действия аутопробиота/пробиотика в ходе комплексной терапии являлся подсчёт колоний *S. salivarius* в смешанных культурах, выделенных из пародонтальных карманов пациентов.

После проведенного лечения в большинстве случаев в пародонтальных карманах пациентов наблюдали преобладание *S. salivarius,* что позволяет говорить о вкладе аутопробиотика/пробиотика в восстановление процесов в тканях пародонта. Идентификацию *S. salivarius* осуществляли с помощью ПЦР-диагностики.

В таблице 12 представлена динамика роста *S.salivarius* в посевах из пародонтальных карманов после ауто- или пробиотикотерапии. При сравнении КОЕ/мл *S. salivarius* не было обнаружено значимых различий в результате применения аутопробиотиков и пробиотиков как в виде ирригации пародонтальных карманов, так и в виде ротовых ванночек (р>0,05).

Таблица 17. Динамика обнаружения *S. salivarius* в посевах из пародонтальных карманов после лечения основных групп.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Через 3-4 дня после первого применения | Через неделю после второго применения | Через 4 недели после лечения |
| I группа 1-ая подгруппа | 2,1\*106 КОЕ/мл | 0,9\*105 КОЕ/мл | 5,6\*106КОЕ/мл |
| I группа 2-ая подгруппа | 3,7\*106 КОЕ/мл | 1,4\*107 КОЕ/мл | 1,5\*107 КОЕ/мл |
| II группа 1-ая подгруппа | 8,2\*106 КОЕ/мл | 1,2\*107 КОЕ/мл | 2,6\*107 КОЕ/мл |
| II группа 2-ая подгруппа | 6,3\*106 КОЕ/мл | 2,9\*106 КОЕ/мл | 5,6\*106 КОЕ/мл |

3.5 ПЦР-скрининг основных групп на парoдонтопатогены

До начала комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита лёгкой степени тяжести у всех пациентов при ПЦР-скрининге были выявлены пародонтопатогены «красного комплекса» (*P.gingivalis, T.forsythia, T.denticola*). Преимущественно выявлялся пародонтопатоген *P.gingivalis*  (в 73% случаев). Реже определялись *T.fоrsythia* в 43,2% случаеви *T.denticola* в 29,7% случаев. Пародонтопатоген *P.intermedia,* относящийся к пародонтопатогенам «оранжевого комплекса», выявлялся в 27% случаев.

При исследовании посевов I группы 1 подгруппы до комплексного лечения с применением ирригации пародонтальных карманов аутопробиотиком чаще всего определялись пародонтопатогены «красного комплекса» *P.gingivalis* и *T.denticola* по 57,1% случаев соответственно (приложение 5). Пародонтопатоген *T.forsythia* выделялся в 14,3% случаев. Представители только «красного комплекса» определялись у всех пациентов этой подгруппы, поскольку пародонтопатогены «оранжевого комплекса» не были обнаружены (рисунок 5). Также была отмечена тенденция к образованию комплексов из трёх (14,3% случаев) пародонтопатогенов (*P.gingivalis, T.forsythia, T.denticola)* (рисунок 6) .

Исследование образцов I группы 2 подгруппы до комплексного лечения с применением ротовых ванночек аутопробиотиком показало, что наиболее часто выделялся пародонтопатоген «красного комплекса» *P.gingivalis* (71,4% случаев) (приложение 5). Другие представители «красного комплекса» *T.denticola* и *T.forsythia* выявлялись в 28,6% и 14,3% случаев соответственно. Наличие пародонтопатогена «оранжевого комплекса» *P.imtermedia* было подтверждено в 42,8 % случаев (рисунок 5). Присутствие представителей только «красного комплекса» обнаружено в 42,9% случаев. Наблюдалась тенденция к образованию комплексов из двух (14,3% случаев), из трёх (28,6%) и четырёх (14,3%) пародонтопатогенных микроорганизма (рисунок 7).

Рисунок 5. Частота встречаемости пародонтопатогенных микроорганизмов до комплексного лечения ХГП ЛСТ с применением аутопробиотика.

Комплексная терапия пациентов с ирригацией пародонтальных карманов аутопробиотиками (I группа 1 подгруппа) приводила к полной элиминации *P. gingivalis,* *T. fоrsythia* и увеличением обнаружения *T. denticola* с 57,1%до 85,7% случаев. Таким образом, вместо комплексов пародонтопатогенов выявляли лишь одиночных представителей *T. denticola* (рисунок 6, рисунок 7).

Рисунок 6. Динамика обнаружения пародонтопатогенных микроорганизмов у пациентов I группы.

Рис. 7. Динамика обнаружения комплексов пародонтопатогенов у пациентов I группы 1 подгруппы.

Комплексная терапия пациентов с применением ротовых ванночек на основе аутопробиотика (I группы 2 подгруппа) приводила к полной элиминации *P. intermedia* и *T. fоrsythia*, но сохранялся небольшой процент присутствия *P. gingivalis*  и *T. denticola* (28,6% и 28,6% случаев, соответственно) (рисунок 7)*.* Наблюдали снижение частоты обнаружения *P. gingivalis*: у половины пациентов с выявленным *P. gingivalis*  патоген элиминировался в результате комплексной терапии. Кроме того, в 28,6% случаев были обнаружены комплексы из двух пародонтопатогенов «красного комплекса» (рисунок 8).

Рис. 8. Динамика обнаружения комплексов пародонтопатогенов у пациентов I группы 2 подгруппы.

ПЦР-скрининг посевов II группы 1 подгруппы показал, что у пациентов преобладает «красный комплекс» пародонтопатогенов (приложение 6). Из этого комплекса чаще всего выявлялся пародонтопатоген *P.gingivalis* (71.4% случаев). Микроорганизмы *T.forsythia* и *T.denticola* определялись в 14,3% и 28,6% случаев соответственно. Представитель «оранжевого комплекса» *P.intermedia* выявлялся в 28,6% случаев (рисунок 9). При этом наблюдалось образование комплексов из трёх (14,3% случаев) и четырёх (14,3% случаев) пародонтопатогенов (рисунок 10). У двух пациентов (29,1% случаев) пародонтопатогены не были обнаружены.

Рис. 9. Частота встречаемости пародонтопатогенных микроорганизмов до комплексного лечения ХГП ЛСТ с применением общего пробиотика.

Рис. 10. Частота встречаемости комплексов пародонтопатогенных микроорганизмов II группы 1 подгруппы до комплексного лечения ХГП ЛСТ.

У пациентов до начала комплексного лечения легкой степени пародонтита с применением общего пробиотика в виде ротовых ванночек (II группа 2 подгруппа) при исследовании выявили преобладание пародонтопатогенов «красного комплекса» (приложение 6). Преимущественно встречались пародонтопатогены *P.gingivalis* (83.3% случаев)и *T.forsythia* (50% случаев). Однако, ещё один представитель «красного комплекса» *T.denticola* определялся у наименьшего количества пациентов (16,7% случаев) (рисунок 11). Представленные микроорганизмы образовывали комплексы, которые включали два (33,6% случаев) и три (16,7% случаев) пародонтопатогена в пародонтальных карманах пациентов до начала комплексного лечения (рисунок 12).

В результате комплексного лечения с ирригацией пародонтальных карманов общим пробиотиком (II группа 1 подгруппа) в пародонтальных карманах пациентов наблюдалась полная элиминация обнаруженных ранее пародонтопатогенов (рисунок 11). Очень наглядным является пример у пациентов 1.9 и 1.12, у которых до лечения идентифицировали комплексы из трех-четырех пародонтопатогенов (приложение 6). После проведенного лечения все пародонтопатогены были элиминированы, что гарантирует продолжительный и стойкий эффект выздоровления тканей пародонта.

Комплексная терапия с применением ротовых ванночек на основе общего пробиотика приводила к элиминации *T.forsythia* и *P.intermedia* (рисунок 11, рисунок 12).

Рис. 11. Динамика обнаружения пародонтопатогенных микроорганизмов у пациентов II группы.

Рис. 12. Динамика обнаружения комплексов пародонтопатогенов у пациентов II группы 2 подгруппы.

3.6 ПЦР-скрининг контрольной группы на пародонтопатогены

У пациентов контрольной группы проводилась ПЦР-диагностика, направленная на выявление пародонтопатогенов «красного комплекса» *P.gingivalis и T.forsythia* и пародонтопатогена «оранжевого комплекса» *P.intermedia* до лечения ХГП ЛСТ (приложение 7). В результате исследования было определено доминирование пародонтопатогенов «красного комплекса» над «оранжевым». *P.gingivalis и T.forsythia* выявлялись в 80,0% и 100,0% случаях соответственно. Наличие *P.intermedia* было определено лишь в 30,0%.случаев (рисунок 13). При анализе результатов ПЦР-скрининга контрольной группы была обнаружена тенденция к образованию комплексов из двух (70,0% случаев) и трёх (20,0%) пародонтопатогенов разных комплексов (рисунок 14).

В ходе лечения контрольной группы без применения аутопробиотика или общего пробиотика произошло снижение количественного состава исследуемых пародонтопатогенов. Определено снижение пародонтопатогенов «красного комплекса» и «оранжевого комплекса» (рисунок 13). Но несмотря на это, комплексы из двух (20,0%) и трёх (10,0%) пародонтопатогенов также определялись после лечения контрольной группы (рисунок 14).

Рисунок 13. Динамика обнаружения пародонтопатогенных микроорганизмов у пациентов контрольной группы.

Рисунок 14. Динамика обнаружения комплексов пародонтопатогенов у пациентов контрольной группы.

Таким образом, комплексная терапия с применением аутопробиотика или пробиотика на основе *S.salivarius* приводила к существенному снижению частоты обнаружения или полной элиминации исследуемых пародонтопатогенов «красного комплекса» и «оранжевого комплекса» по сравнению с контрольной группой. Кроме того, после применения ирригации пародонтальных карманов аутопробиотиком или пробиотиком в составе комплексной терапии была выявлена полная элиминация комплексов пародонтопатогенов. Этот результат микробиологического исследования позволяют говорить о более высокой эффективности применения ирригации пародонтальных карманов аутопробиотиком/пробиотиком в составе комплексной терапии.

**Заключение и выводы**

**Заключение**

Целью исследования являлась клинико-микробиологическая оценка эффективности аутопробиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита.

Для достижения поставленной цели было проведено обследование 37 пациентов в возрасте от 29 до 64 лет с диагнозом хронический генерализованный пародонтит лёгкой степени тяжести без тяжёлой сопутствующей патологии.

В течение исследования было проведено клиническое, рентгенологическое и микробиологическое обследование пациентов. Клиническое обследование пациентов включало в себя сбор анамнеза жизни и заболевания, сбор жалоб, определение индексов гигиены и состояния тканей пародонта. Микробиологическое исследование заключалось в исследовании материала из пародонтальных карманов пациентов с помощью культивирования микроорганизмов и ПЦР-скрининга.

Пациенты были разделены на три группы. В I группу вошли пациенты, комплексное лечение которых включало применение аутопробиотика на основе *S.salivarius* (1-ая подгруппа – пациенты, у которых проводили ирригацию пародонтальных карманов аутопробиотиком, 2-ая подгруппа – пациенты, у которых применялись ротовые ванночки с аутопробиотиком). II группу составили пациенты, у которых в комплексном лечении применяли общий пробиотик на основе *S.salivarius* (1-ая подгруппа – пациенты, у которых проводили ирригацию пародонтальных карманов пробиотиком, 2-ая подгруппа – пациенты, у которых применяли ротовые ванночки с пробиотиком). Контрольная группа состояла из пациентов, у которых лечение ХГП лёгкой степени тяжести включало проведение профессиональной гигиены полости рта и коррекцию индивидуальной гигиены.

Клинические и микробиологические исследования проводили до лечения и на разных этапах лечения (через 3-4 дня после первого применения ауто- или пробиотика, через неделю после повторного применения ауто- или пробиотика и через 4 недели после лечения).

При сборе жалоб до начала лечения было установлено, что все пациенты предъявляли жалобы на кровоточивость во время чистки зубов, отек и воспаление дёсен. Показатели индексов гигиены и состояния тканей пародонта подтвердили диагноз ХГП лёгкой степени тяжести. Была установлена корреляционная зависимость между плохой гигиеной полости рта и воспалением тканей пародонта.

Через четыре недели после проведённого комплексного лечения с применением ауто- или пробиотика у пациентов исчезли жалобы на кровоточивость, отёк и воспаление дёсен, зуд, подвижность зубов и наличие неприятного запаха из ротовой полости. У этих пациентов отмечено более выраженное снижение значений стоматологических индексов, характеризующих состояние полости рта. Это подтверждает снижение значения индексов OHI-S (0-0,09), Silness-Loe (0-0,01) до уровня соответствующего хорошей гигиене полости рта, а также пародонтологических индексов (индекса PMA и индекса кровоточивости ВОР), что говорит о купировании воспаления в тканях пародонта. Выявлены статистически значимые различия между клиническими и индексными показателями гигиены полости рта и состояния тканей пародонта с более низкими значениями у пациентов, в комплексное лечение которых входило применение ауто- или пробиотика, что говорит о целесообразности применения ауто- и пробиотика для нормализации качественных и количественных показателей состояния тканей пародонта.

После проведения аутопробиотико- или пробиотикотерапии в посевах из пародонтальных карманов пациентов было отмечено доминирование *S. salivarius*, что характеризует восстановление нормальной микробиоты пародонтальных карманов пациентов.

До начала лечения у всех пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести были выявлены пародонтопатогены «красного комплекса» *P.gingivalis* (73% случаев)*, T.forsythia* (43,2% случаев), *T.denticola* (29,7% случаев) и «оранжевого комплекса» *P. intermedia* (27% случаев). Полученные данные согласуются с результатами ранее проведённых исследований: «Соотношение патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов при пародонтите разной степени тяжести» (Зорина О.А., 2011), «Количественный и качественный состав микрофлоры полости рта больных хроническим генерализованным пародонтитом» (Гайдарова Т.А., 2010).

После комплексного лечения пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести с применением ауто- или проибиотика на основе *S.salivarius* отмечено более выраженное снижение частоты обнаружения представителей пародонтопатогенов «красного комплекса» и «оранжевого комплекса» в отличие от пациентов контрольной группы. Оценка результатов микробиологического исследования показала сопоставимую эффективность применения ауто- или пробиотика на основе *S. salivarius* в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита. При изучении результатов ПЦР-исследования пациентов, лечение которых проводилось с ирригацией пародонтальных карманов аутопробиотиком, эффективность аутопробиотика по отношению к *T. denticola* не была обнаружена, поскольку было отмечено увеличение частоты выявления *T. denticola* в пародонтальных карманах с 57,1%до 85,7% случаев.

После применения ауто- или пробиотика на основе *S.salivarius* в составе комплексного лечении ХГП происходило значительное снижение частоты обнаружения комплексов пародонтопатогенов. Только у двух (7,4% случаев) пациентов был выявлен комплекс из двух пародонтопатогегов (*P. gingivalis*  и *T. denticola*). В отличие от пациентов, в составе лечения которых применяли ауто- или пробиотик, у пациентов контрольной группы после лечения были выявлены комплексы как из двух (20% случаев), так и из трёх (10% случаев) пародонтопатогенов. Эти данные позволяют говорить о наличии эффективности аутопробиотика и пробиотика на основе *S.salivarius* в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита лёгкой степени тяжести.

В результате проведённой работы были выполнены все поставленные задачи и сделаны соответствующие выводы.

**Выводы:**

1. Результаты исследования количественного состава микробиоты пародонтальных карманов показало, что у всех пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести при ПЦР-скрининге преимущественно были выявлены пародонтопатогены «красного комплекса» *P.gingivalis* (в 73% случаев), *T.forsythia* (в 43,2% случаев) *и T.denticola* (в 29,7% случаев)*.* Пародонтопатоген *P.intermedia,* относящийся к пародонтопатогенам «оранжевого комплекса», выявлялся в 27% случаев. У всех пациентов наблюдалась тенденция к образованию комплексов из двух или трёх пародонтопатогенов.
2. Анализ результатов клинической и индексной оценки состояния тканей пародонта показал сопоставимую эффективность местного применения ауто- или пробиотика на основе *S. salivarius* в комплексном лечении ХГП лёгкой степени тяжести, которая заключалась в нормализации качественных и количественных показателей состояния тканей пародонта. Доказана клиническая эффективность местного применения ауто- или общего пробиотика на основе *S.salivarius* в комплексном лечении ХГП лёгкой степени тяжести.
3. У пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести местное применение аутопробиотика или общего пробиотика на основе *S. salivarius* в комплексном лечении воспалительного заболевания пародонта обуславливает снижение частоты встречаемости пародонтопатогенов в пародонтальных карманов по сравнению с контрольной группой.
4. У пациентов с ХГП лёгкой степени тяжести применение аутопробиотика или общего пробиотика на основе *S. salivarius* в виде ирригации пародонтальных карманов приводит к полной элиминации комплексов исследованных пародонтопатогенов и снижению частоты обнаружения отдельных пародонтопатогенов.

**Практические рекомендации:**

В составе комплексного лечения ХГП лёгкой степени тяжести рекомендовано местное применение ауто- и/или пробиотика, которые способствуют улучшению состояния тканей пародонта за счёт снижения количества пародонтопатогенов и восстановления нормальной микробиоты в пародонтальных карманах пациентов. Применение ауто- и/или пробиотика в виде ирригации пародонтальных карманов наиболее эффективно в комплексном лечении ХГП лёгкой степени тяжести.

**Список литературы**

1. Герберт Ф. Вольф, Пародонтология / Герберт Ф. Вольф, Эдит М. Ратейцхак, Клаус Ратейцхак; под ред. Г. М. Барера. - М.: МЕДпресс-информ, 2014. - 548 с.: ил.
2. Кренделев М.С. Нормальная микрофлора ротовой полости человека/ Кренделев М.С // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.
3. Кузнецов А.О., Кузнецова Л.А., Борисова Е.М., Сафонова М.А. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобактерии // Патент России № 2505304. 2014. Бюл. № 3.
4. Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Донец В.Н., Соловьева О.И. Способ получения аутопробиотика на основе Enterococcus faecium, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина // Патент России № 2460778. 2010. Бюл. № 25.
5. Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г. Способ получения банка аутоштаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека // Патент России № 2126043. 1999.
6. Люговская А.В. Значение периодонтопатогенной микрофлоры в этиологии и патогенезе болезней периодонта // Проблемы здоровья и экологии. - 2009. - №4 (22).
7. Цепов Л.М. Хронический генерализованный пародонтит: от патогенеза к лечению / Л.М. Цепов, Н.А. Голева, М.М. Нестерова // Дентал Юг. − 2010. − №9. − С. 32-34.
8. Фукс Е. И. Современные аспекты этиологии и патогенеза заболеваний пародонта / Фукс Е. И., Карева Ю.А., Гализина О.А., Таболина Е.С. // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. - 2013. - № 3.
9. Socransky S.S. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts / Socransky S.S., Haffajee A.D // Journal of Periodontology. – 1992. – Р.322-331.
10. Грудянов А.И. Заболевания пародонта / А. И. Грудянов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2009. – 336 с.
11. Царёв В.Н. Микробиология полости рта(издание третье)/ Царёв В.Н., Давыдова М.М. // УФО МЗ РФ — М. – 50 с.
12. Дмитриева Л.А. Пародонтит / Под ред. проф. Л.А.Дмитриевой. – М. : МЕДпресс информ, 2007. – 504 с. : ил.
13. [Ковалевский А.М.](https://elibrary.ru/author_items.asp?refid=595023680&fam=Ковалевский&init=А+М) Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта / [Ковалевский А.М.](https://elibrary.ru/author_items.asp?refid=595023680&fam=Ковалевский&init=А+М), [Ковалевский В.А.](https://elibrary.ru/author_items.asp?refid=595023680&fam=Ковалевский&init=В+А) //[Институт стоматологии](https://elibrary.ru/contents.asp?titleid=8735). - 2017. - № 4.
14. Дунязина Т.М. Микроорганизмы зубной бляшки / Т.М.Дунязина / Под ред. проф. А.К.Иорданишвили. - М.: МЕДпресс-информ, 2008. - С.178-183.
15. Иорданишвили А.К. Клиническая стоматология: официальная и интегративная : К49. руководство для врачей / под ред. проф. А. К. Иорданишвили. — СПб. : СпецЛит, 2008. — 431 с.
16. Орехова Л.Ю., Осипова М.В. Прогнозирование состояния пародонта у курильщиков / Орехова Л.Ю., Осипова М.В. // Пародонтология. - 2012. – С.42—45.
17. Лукиных Л. М. Хронический генерализованный пародонтит. Часть I. современный взгляд на этиологию и патогенез / Лукиных Л. М., Круглова Н. В. // Соврем. технол. Мед.. - 2011. - № 1.
18. Nair, S. Role of autoimmune responses in periodontal disease / S. Nair, M. Faizuddin, J. Dharmapalan // Autoimmune Diseases. – 2014.
19. Аширбекова Ж.Ж. Психоэмоциональный стресс как фактор развития заболеваний пародонта / Аширбекова Ж.Ж. // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 6.
20. Гожая И.Н. Риск развития заболеваний пародонта при наличии хронических социальных стрессов у клинически здоровых лиц / И.Н. Гожая // Пародонтология. − 2012. − №1. − С.21-25.
21. Гайдарова Т.A.. Количественный и качественный состав микрофлоры полости рта больных хроническим генерализованным пародонтитом / Гайдарова Т.A., Попова Н. В. // Сиб. мед. журн. (Иркутск). - 2010. - № 4. - С.95-98.
22. Зорина О.А. Соотношение патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов при пародонтите разной степени тяжести / Зорина О. А., Кулаков А. А., Борискина О. А., Ребриков Д. В. // Acta Naturae. - 2011. - № 2. – С.103-106.
23. Шибаева А. В. Изучение роли Prevotella intermedia в развитии хронического пародонтита методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / Шибаева А. В., Аймадинова Н. К., Трубникова Е. В., Кузнецова Т. В., Зорина О. А., Кудыкина Ю. К., Шевелев А.Б. // Вестник РГМУ. - 2015. - № 4.
24. Губайдуллин А.Г. Особенности патогенеза заболеваний пародонта, вызванных Porphyromonas gingivalis / Туйгунов М.М., Булгаков А.К., Савченко Т.А. // Успехи современной науки. - 2015. - № 5 (59). - С.108-110.
25. Губайдуллин А.Г. Факторы патогенности монокультур Porphyromonas gingivalis и Aggregatibacter actinomycetemcomitans, выделенных у больных пародонтитом, и их сокультивируемых штаммов / Губайдуллин А.Г., Туйгунов М.М., Градусова М.Ю., Лазарева А.Ю., Хуснаризанова Р.Ф., Габидуллин Ю.З., Гибазов Н.Н. // Медицинский вестник Башкортостана. - 2017. - №6 (72).
26. Иванов, В. С. Заболевания пародонта / Иванов В. С. – Изд. 2-е. – М. : Медицина, 2009. – 272 с.
27. Грудянов А.И. Применение пробиотиков в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / Грудянов А.И., Дмитриева Н.А., Фоменко Е.В. - М: ООО "Медицинское информационное агентство" - 2006. - 112 с.
28. Suvorov A. Autoprobiotics as an Approach for Restoration of Personalised Microbiota / Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., et al // Front Microbiol. - 2018.
29. Mahasneh S.A., Mahasneh AM. Probiotics: A Promising Role in Dental Health / Mahasneh S.A., Mahasneh AM. // Dent J (Basel). – 2017. - 26.
30. Ben Taheur F. Antibacterial and antibiofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens / Ben Taheur F., Kouidhi B., Fdhila K., Elabed H., Ben Salama R., Mahduan K., Bakharouf A., Chaieb K. // Microb. Pathog. – 2016. – Р.213–220.
31. Singh V.P. Assessment and management of halitosis / Singh V.P., Malhotra N., Apratim A., Verma M. // Dent. Update. - 2015. – P.346–353.
32. Gruner D. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis / Gruner D., Paris S., Schwendicke F. // J. Dent. - 2016. – P.16–25.
33. Roberts F.A. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: Symbiosis and dysbiosis / Roberts F.A., Darveau R.P. // Periodontology. – 2015. – P.18–27.
34. Teughels W. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? / Teughels W., Loozen G., Quirynen M. // J Clin Periodontol. - 2011. – Р.159–177.
35. Penala S. Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: a randomized controlled trial / Penala S. // J Res Pharm Pract. - 2016. – P.86–93.
36. Morales A. Clinical effects of Lactobacillus rhamnosus in non-surgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled trial with 1-year follow-up / Morales A. // J Periodontol. - 2016. - 94.
37. Биктимерова О.О. Изменение клинических и иммунологических показателей полости рта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при лечении пробиотиками / Биктимерова О.О., Рединова Т.Л., Зорин А.Ю. // ТМЖ. - 2014. - № 3.
38. Андреева И.В. Новый пробиотический штамм *Streptococcus salivarius* K12 в клинической практике / Андреева И.В., Стецюк О.У. // КМАХ. - 2019. - № 2.
39. Burton J.P. Influence of the probiotic Streptococcus salivarius strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial / Drummond BK, Chilcott CN // J Med Microbiol. - 2013. – P.875‐884.
40. Masdea L. Antimicrobial activity of Streptococcus salivarius K12 on bacteria involved in oral malodour / Masdea L., Kulik E.M., Hauser-Gerspach I., Ramseier A.M., Filippi A., Waltimo T. // Arch Oral Biol. - 2012. – P.1041‐1047.
41. Мельничук Г.М. Применение эубиотика «Ацилакт» в комплексном лечении пародонтита./ Дисс . канд. мед. наук. М. - 1995. - 25 с.
42. Чичерин И.Ю. Аутопробиотикотерапия / Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Гаврилов К.Е., Шабалина М.Р., Дармов И.В. // Журнал инфектологии. - 2013. – С.43-54.
43. Глушанова Н.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования in vitro / Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2003. - № 5. – С.56–61.
44. Ильин В.К. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания / В.К. Ильин, А.Н. Суворов и др. // Вестник РАМН. – 2013. – № 2. – С.56–62.
45. Крайнов С.В. «Глубина пародонтального кармана» или «Величина потери прикрепления», какой параметр выбрать в геронтостоматологии ? / Крайнов С.В., Михальченко В.Ф., Яковлев А.Т., Попова А.Н., Алеханова И.Ф. // Проблемы стоматологии. - 2017. - № 4.
46. Кузьмина Э.М. Профилактическая стоматология : Учебник / Э.М. Кузьмина, О.О. Янушевич.— М.: Практическая медицина, 2016. — 544 с.
47. Румянцев П.О. Статистические методы анализа в клинической практике. Часть I. Одномерный статистический анализ / Румянцев П.О., Саенко В.А., Румянцева У.В. // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55. - № 5. – С.48-55.
48. **Приложения**

Приложение 1

Карта обследования стоматологического пациента (страница 1)



Приложение 2

Карта обследования стоматологического пациента (страница 2)



Приложение 3

Карта обследования стоматологического пациента (страница 3)



Приложение 4

Карта обследования стоматологического пациента (страница 4)



Приложение 5

Определение пародонтопатогенов с помощью ПЦР-диагностики до лечения и после лечения с применением аутопробиотиков.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | *P. gingivalis* | *T. forsythia* | *P. intermedia* | *T. denticola* |
| Проба | Ирригация пародонтальных карманов аутопробиотиком | | | |
| **1.1 (пациент №1 до лечения)** | + | - | - | - |
| 1.64 (пациент №1 после лечения) | - | - | - | + |
| **1.2 (пациент №2 до лечения)** | + | - | - | - |
| 1.65 (пациент №2 после лечения) | - | - | - | + |
| **1.3 (пациент №3 до лечения)** | - | - | - | + |
| 1.66 (пациент №3 после лечения) | - | - | - | + |
| **1.4 (пациент №4 до лечения)** | + | - | - | - |
| 1.105 (пациент№4 после лечения) | - | - | - | +/- |
| **1.10 (пациент №10 до лечения)** | + | + | - | + |
| 1.69 (пациент №10 после лечения) | - | - | - | - |
| **1.16 (пациент №14 до лечения)** | - | - | - | + |
| 1.97 (пациент №1 после лечения) | - | - | - | + |
| **1.17 (пациент №15 до лечения)** | - | - | - | + |
| 1.98 (пациент №15 после лечения) | - | - | - | +/- |
|  | Ротовые ванночки с аутопробиотиком | | | |
| **1.18** **(пациент №16 до лечения)** | + | - | + | + |
| 1.101 (пациент №16 после лечения) | + | - | - | + |
| **1.19** **(пациент №17 до лечения)** | + | - | + | - |
| 1.107 (пациент №17 после лечения) | - | - | - | - |
| **1.20** **(пациент №18 до лечения)** | + | - | - | - |
| 1.102 (пациент №18 после лечения) | + | - | - | +/- |
| **1.21** **(пациент №19 до лечения)** | + | + | + | + |
| 1.108 (пациент №1 после лечения) | - | - | - | - |
| **1.22** **(пациент №20 до лечения)** | - | - | - | - |
| 1.104 (пациент №20 после лечения) | - | - | - | - |
| **1.23** **(пациент №21 до лечения)** | - | - | - | - |
| 1.96 (пациент №21 после лечения) | +/- | - | - | - |
| **1.34** **(пациент №27 до лечения)** | + | - | - | - |
| 1.103 (пациент №27 после лечения) | - | - | - | - |

Приложение 6

Определение пародонтопатогенов с помощью ПЦР-диагностики до лечения и после лечения с применением пробиотиков.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | *P. gingivalis* | *T. forsythia* | *P. intermedia* | *T. denticola* |
| **Проба** | Ирригация пародонтальных карманов пробиотиком | | | |
| **1.5 (пациент №5 до лечения)** | **+** | **-** | **-** | **-** |
| 1.67 (пациент №5 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.6(пациент №6 до лечения)** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 1.68 (пациент №6 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.7(пациент №7 до лечения)** | **+** | **-** | **-** | **-** |
| 1.85 (пациент №7 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.8(пациент №8 до лечения)** | **+** | **-** | **-** | **-** |
| 1.86 (пациент №8 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.9(пациент №9 до лечения)** | **+/-** | **-** | **+** | **+** |
| 1.106 (пациент №9 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.11(пациент №11 до лечения)** | **-** | **-** | **-** | **-** |
| 1.99 (пациент №11 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.12(пациент №12 до лечения)** | **+** | **+** | **+** | **+** |
| 1.100 (пациент №12 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
|  | Ротовые ванночки с пробиотиком | | | |
| **1.13(пациент №13 до лечения)** | **-** | **+** | **+** | **+** |
| 1.90 (пациент №13 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.24(пациент №22 до лечения)** | **+** | **+** | **-** | **-** |
| 1.91 (пациент №22 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **+/-** |
| **1.25(пациент №23 до лечения)** | **+** | **+** | **-** | **-** |
| 1.92 (пациент №23 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.26(пациент №24 до лечения)** | **+** | **-** | **+/-** | **-** |
| 1.93 (пациент №24 после лечения) | **-** | **-** | **-** | **-** |
| **1.27(пациент №25 до лечения)** | **+** | **-** | **-** | **-** |
| 1.94 (пациент №25 после лечения) | **+** | **-** | **-** | **-** |
| **1.33 (пациент №26 до лечения)** | **+** | **-** | **-** | **-** |
| 1.95 (пациент №26 после лечения) | **+** | **-** | **-** | **-** |

Приложение 7

Определение пародонтопатогенов с помощью ПЦР-диагностики до лечения и после лечения у пациетов контрольной группы.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *P. gingivalis* | *T. forsythia* | *P. intermedia* |
| **Проба** | Ирригация пародонтальных карманов пробиотиком | | |
| **пациент №28 до лечения** | + | + | + |
| пациент №28 после лечения | +/- | - | - |
| **пациент №29 до лечения** | + | + | - |
| пациент №29 после лечения | + | + | + |
| **пациент №30 до лечения** | + | + | + |
| пациент №30 после лечения | + | + | - |
| **пациент №31 до лечения** | + | + | - |
| пациент №31 после лечения | - | - | - |
| **пациент №32 до лечения** | - | + | + |
| пациент №32 после лечения | - | - | - |
| **пациент №33 до лечения** | + | + | - |
| пациент №33 после лечения | + | + | - |
| **пациент №34 до лечения** | - | + | - |
| пациент №34 после лечения | - | - | - |
| **пациент №35 до лечения** | + | + | - |
| пациент №35 после лечения | - | - | - |
| **пациент №36 до лечения** | + | + | - |
| пациент №36 после лечения | - | - | - |
| **пациент №37 до лечения** | **+** | **+** | **-** |
| пациент №37 после лечения | **+** | **-** | **-** |