DOI: 10.33295/1992-576X-2023-6-14
УДК: 616.314.17-008.1-036-085.281:579.8

Симоненко Р.В.

Сучасні методи діагностики захворювань тканин пародонту в концепції системного підходу лікування.

(Огляд літератури. частина 1)

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, м.Київ, Україна

Резюме. Захворювання тканин пародонту залишаються однією з найбільш актуальних проблем, що вивчаються в стоматології. Однак до цього часу клінічна діагностика пародонтопатій має свої обмеження і часто не дозволяє лікарям-клініцистам визначити причину, механізми розвитку хвороби та зробити прогнози перебігу захворювання. Сучасна концепція системного підходу до лікування дистрофічно-запальних захворювань пародонту потребує інформативних та швидких методів діагностики зрозумілих для лікарів всіх стоматологічних спеціальностей. Тому, пошук ефективних підходів та нових методів діагностики захворювань тканин пародонту є дуже актуальним питанням. Порушення балансу в мікробіомі ротової порожнини вважається провідним чинником, що впливає на виникнення та прогресування цього захворювання. Тому ідентифікація складу біоплівок ротової порожнини та розуміння складних взаємозв'язків, у яких беруть участь мікроорганізми, фактори довкілля та стан здоров'я людини, дозволять покращити діагностику, цілеспрямовану терапію пацієнтів з пародонтитом та прогнозування перебігу захворювання. В огляді описані переваги і недоліки наступних методів: культивування пародонтопатогенів, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), ізотермічна петльова ампліфікація (LAMP), секвенування гена 16S рРНК, секвенування нового покоління (NGS), ДНК-мікрочипи технологія з використанням методу гібридизації у дослідженні пародонтопатогенів.

Сучасні методи молекулярної діагностики все частіше використовують для ідентифікації пародонтопатогенів, що дозволить успішно досліджувати мікробіом порожнини рота, швидко виявляти пародонтопатогени, присутні в діагностичному біоматеріалі навіть у невеликих кількостях, а також ідентифікувати клінічно значущі види мікроорганізмів, що не культивуються або важко культивуються в бактеріологічних лабораторіях та виявляють стійкість до антибіотиків у них. Оптимальним буде комбінація різних методів діагностики пародонтопатогенів для кожного конкретного випадку, що дозволить підбирати найбільш ефективні способи лікування. Однак одного моніторингу мікробіоми порожнини рота недостатньо для ефективного прогнозування перебігу та планування реабілітації пацієнтів з захворюванням тканин пародонту. Необхідність пошуку комбінації молекулярно-генетичних методів діагностики захворювань тканин пародонту є очевидним.

Ключові слова: пародонтит, мікробіом ротової порожнини, пародонтопатогени, молекулярна діагностика, ПЛР, секвенування, ДНК-мікрочипи.

Захворювання тканин пародонту залишаються однією з найбільш актуальних проблем, що вивчаються в стоматології. Однак до цього часу клінічна діагностика пародонтопатій має свої обмеження і часто не дозволяє лікарям-клініцистам визначити причину, механізми розвитку хвороби та зробити прогнози перебігу захворювання. Особливо це стосується генералізованого пародонтиту на пізніх стадіях [1,2,3].

В сучасній практиці, клінічний діагноз пародонтиту значною мірою залежить від таких ознак, як втрата епітеліального прикріплення зуба, глибини зондування кишені, кровоточивості при зондуванні, рухливості зубів, ураження фуркацій та рентгенологічної оцінки кісткових структур [3]. Однак, ці показники не завжди відображають поточний стан хвороби й не дають інформації про ризики та терміни розвитку захворювання, а також не дозволяють робити точні прогнози лікування [4]. Звісно діагностика впирається в складності проведення маніпуляцій, великі затрати часу та коштів на її проведення, відсутність комплаєнтності пацієнтів, а також відсутністю чітких протоколів за умов різноманітності проявів захворювання та поширеною коморбідністю.

Сучасна концепція системного підходу до лікування дистрофічно-запальних захворювань пародонту потребує інформативних та швидких методів діагностики зрозумілих для лікарів всіх стоматологічних спеціальностей. Тому, пошук ефективних підходів та нових методів діагностики захворювань тканин пародонту є дуже актуальним питанням.

З огляду на те, що генералізований пародонтит вважається хронічним запальним захворюванням, яке розвивається здебільше з причини ушкоджуючої дії запальної реакції хазяїна у відповідь на присутність біоплівки та безпосередньо пов'язане зі змінами в під'ясеневій мікробіоті, вивчення ролі мікроорганізмів та імунологічної відповіді є центром уваги багатьох дослідницьких колективів [2,5,6].

Порушення балансу мікробіоти ротової порожнини вважається провідним чинником, що впливає на виникнення та прогресування цього захворювання. Ще одним важливим фактором у розвитку захворювання є індивідуальна відповідь організму господаря [4,6.7].

Відомо, що в порожнині рота виявляють близько 1200 фенотипів, переважна більшість яких є резидентною флорою, що стабілізує дію для існування загальної біоплівки ротової порожнини. Ряд видів резидентної флори, стабілізаційними є лише до певної кількості, при перевищенні якої вони виявляють агресивність і можуть брати участь у запальних процесах [7,8]. Тому точне визначення якісного та кількісного складу мікробіому пародонтальних кишень може відіграти важливу роль у процесі розробки ефективної та адекватної терапії [9].

Попри те, що лише певні види мікроорганізмів можуть бути відповідальними за розвиток хвороб пародонту, всі бактерії біоплівки знаходяться в тісному метаболічному взаємозв'язку один з одним, що підтверджено чисельними дослідженнями [2, 9]. Ці дослідження дозволили переглянути погляди вчених на роль неспецифічної зубної бляшки в етіології запальних захворювань пародонту.

У здоровому стані пародонту кількість бактерій ротової порожнини в середньому становить близько 10^9, тоді як у разі пародонтиту кількість перевищує 10^87 [10,11]. Оцінка складу під'ясеневої біоплівки мікробіологічними та молекулярними методами виявила велику кількість мікроорганізмів, деякі з них здатні руйнувати тканини пародонту [12,13]. Ще в 1998 році S.S. Socransky і співавтори запропонували концепцію бактеріальних комплексів, пов'язаних із тяжкістю пародонтиту та розділили їх на п'ять кольорів: жовтий, червоний, зелений, помаранчевий та фіолетовий за їх патогенністю та здатністю до колонізації в під'ясеневій ділянці [14,16]. Дослідники прийшли до думки, що спочатку непатогенні бактерії, що належать до жовтого, зеленого та фіолетового комплексів, виступають ініціаторами утворення біоплівок [15,17]. Однак було також виявлено, що ці види мікроорганізмів надають адгезивні властивості бактеріям з помаранчевого комплексу, що може призвести до створення сприятливих умов для зростання таких бактерій, як Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola та Tannerella forsythia, які належать до червоного комплексу та викликають пародонтит різного ступеня. Крім бактерій «червоного комплексу», у пародонтальних кишенях знаходять і Aggregatibacter actinomycetemcomitans, який віднесений до фіолетового комплексу та пов'язаний із виникненням агресивних форм запалення пародонту, наприклад, локалізований ювенільний пародонтит або рефрактерний пародонтит (резистентний до лікування). Це грамнегативні бактерії, серотипи A, B та C що відіграють важливу роль у швидкому прогресуванні захворювання [14,15,18]. Інші комплекси мають низький чи помірний вплив на розвиток пародонтиту [16,18]. Серед багатьох інших бактерій, що беруть участь у розвитку хвороби зустрічаються Prevotella intermedia, Campylobacter rectus, Peptostreptococcus micros та види Spirochetes [19].

Всі пародонтопатогени поділяють на два порядки. Пародонтопатогени I порядку, такі як P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans і T. forsythia сприяють швидкому прогресу захворювання, оскільки вони мають внутрішньоклітинну форму життя і містяться в епітелії ясен і тканинах пародонту, а їх фактори вірулентності призводять до руйнування. З іншого боку, пародонтопатогени II порядку (T. denticola, Fusobacterium nucleatum та Prevotella intermedia) відіграють менш важливу роль у розвитку захворювань пародонту. Однак вони можуть утворювати асоціації з P. gingivalis і T. forsythia, більш патогенними видами бактерій, що сприяє поширенню запалення в під'ясенній ділянці. Якщо у пацієнта виявлено лише P. intermedia це може вказувати на початок запального процесу, тоді як наявність асоціацій з іншими пародонтопатогенами свідчить про прогрес захворювання [20, 21].

Встановлено, що різні вірусні агенти, такі як віруси герпесу, беруть активну участь у процесі агресивного пародонтиту [22]. Крім того, в осіб з первинним та набутим імунодефіцитом зустрічаються безліч різних грибкових агентів, включаючи Candida albicans, яка відіграє важливу роль у взаємодіях з іншими пародонтопатогенами, що посилюють клінічний перебіг захворювання [23,24].

Таким чином, моніторинг змін в мікробіомі є перспективним потенційно новим критерієм в діагностиці

та прогнозуванні захворювань тканин пародонту [25].

Відповідно до сучасних концепцій етіопатогенезу пародонтопатій, віддають перевагу аналізу впливу всього мікробіома, а не конкретних патогенів в розвитку захворювань пародонту. Для вивчення ролі бактерій у розвитку пародонтиту потрібні нові методи діагностики, що дозволять виявляти дедалі складніші взаємозв'язки мікроорганізмів, фактори довкілля та стан здоров'я людини. Більшість видів мікроорганізмів неможливо культивувати в бактеріологічних лабораторіях, оскільки бактерії порожнини рота, що неспроможні відтворювати свої трофічні взаємозв'язки одне з одним, які переважають у їх природному середовищі. Тому більшість видів не культивується стандартними мікробіологічними методами [26, 27].

Культивування мікроорганізмів

Довгий час методи культивування вважалися золотим стандартом у діагностиці пародонтопатогенів. Як і будь-які способи діагностики, традиційні мікробіологічні методи мають свої переваги, але також ряд обмежень. Більшість збудників, присутніх у глибоких пародонтальних кишенях, є анаеробами та, відповідно, потребують специфічних умов культивування, умов відбору проб і транспортування. Тому недотримання певних правил потенційно може призвести до помилкового діагностичного результату. До труднощів методу відносяться вибір відповідних середовищ для культивування, низька концентрація виділених бактерій, тривалі періоди зростання бактерій і очікування перед постановкою точного діагнозу. Також мікробіологічний метод не дозволяє диференціювати до виду між близькими таксонами. Крім того, цей метод не підходить для ідентифікації багатьох клінічно значущих мікроорганізмів, наприклад, T. forsythia [28]. Незважаючи на ці недоліки, цілком неможливо відмовитись від даного методу, оскільки культивування мікроорганізмів застосовується для визначення чутливості до антибіотиків, що має велике значення у призначенні антибактеріальних препаратів.

Сучасна потреба в точності, швидкій ідентифікації та кількісному визначенні пародонтальних патогенів вимагали розробки інших ефективних методів. [29]. Такими методами стали методи молекулярної діагностики:полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), ізотермічна петльова ампліфікація (LAMP), секвенування, ДНК-мікрочип технології.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Поява ПЛР призвела до створення точнішого інструменту для ідентифікації загальної кількості патогенів внаслідок розробки видоспецифічних праймерів, які ампліфікують лише цільові послідовності [30]. Наприклад, розроблені різні тест-системи ПЛР-діагностики для більш точної та швидкої детекції множини пародонтопатогенів. Важливо, що крім здатності виявляти анаеробні бактерії ротової порожнини, ПЛР дозволяє виявити ДНК життєздатних і нежиттєздатних клітин, тим самим забезпечуючи повнішу інформацію про мікробіоту ротової порожнини, що дає можливість корекції поточного стану захворювання [30, 8]. Однак для ПЛР також є деякі обмеження у вигляді інгібіторів ДНК-полімерази, присутніх у клінічних зразках – гемоглобін, гепарин та етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), спирти, детергенти та солі, присутні у процесі виділення ДНК, які можуть знижувати ефективність реакції або навіть гальмувати. Іншим обмеженням є потреба у дорогому спеціалізованому устаткуванні добре оснащеними лабораторіями [30, 28].

За багато років методика ПЛР зазнала багатьох модифікацій, що дозволило розширити її можливості. Наприклад, ЗТ-ПЛР (зворотна транскрипція) – метод для виявлення молекул РНК у зразку із заздалегідь відомою ділянкою послідовності, комплементарним праймером, ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів) – реакція ПЛР у поєднанні з рестрикційним аналізом продуктів ампліфікації та інші. ПЛР в режимі реального часу (або кількісна ПЛР-Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR) з видоспецифічними праймерами забезпечує точну кількісну оцінку окремих видів бактерій та їх загальну кількість у зразках зубного нальоту[31, 27]. Цей метод дозволяє визначити, які види бактерій, що утворюють біоплівку ротової порожнини, є домінантний, що дає можливість застосування ефективної протимікробної терапії. ПЛР у реальному часі використовується для якісної та кількісної оцінки парадонтопатогенів зубного нальоту, вмісту пародонтальних кишень [29,30]. Визначення кількості окремих мікроорганізмів дозволяє отримати повне уявлення про екосистему ротової порожнини й виділити переважання конкретних бактерій або їх комплекси [23, 31].

Завдяки вищепереліченим перевагам, у світі метод ПЛР вважається золотим стандартом виявлення етіологічних чинників, що сприяють прогресуванню захворювань пародонту [31, 32, 33].

Ізотермічна петльова ампліфікація (LAMP)

LAMP є найпоширенішим методом для швидкої та чутливої діагностики. Цей спосіб також можна вважати найбільш перспективним для аналізу в умовах, коли час та ресурси обмежені, що ідеально підходить для визначення мікробіоти пародонтальних кишень та визначення

ефективного лікування у стоматологічних клініках. [34, 35, 36]. В LAMP використовуються ДНК-полімерази, що відрізняються ланцюг-витісняючою активністю і 4-6 праймерів, щоб забезпечити більш специфічну реакцію. У результаті утворюються специфічні структури з повторюваних інвертованих послідовностей оригінальної ДНК-мішені, пов'язані разом петлями одноланцюгової ДНК. Метод LAMP ефективно збільшує кількість ДНК у 10^9 - 10^10 разів за 15-60 хвилин, завдяки використанню ДНК-полімераз з ланцюг-витісняючою активністю, що забезпечує високу ефективність ампліфікації. На додаток до цього, метод LAMP може використовуватися для ампліфікації РНК, якщо в реакційну суміш додається зворотна транскриптаза. Метод LAMP на мікрочипі займає від 15 хвилин до години, що менше, ніж зазвичай потрібно ПЛР. Мікросистеми для обох методів чутливі та специфічні, проте LAMP краще завдяки ізотермічному режиму реакцій, який робить його простим і доступним. Крім того, різноманітність візуальних методів детектування продуктів LAMP дозволяє вибирати варіанти, що не вимагають використання спеціального обладнання для детекції позитивних та негативних результатів. Часто ці системи використовуються для попереднього тестування або швидкого моніторингу. Якщо потрібний кількісний аналіз методом LAMP, потрібні стандартні розведення або внутрішні контролі. Однак, складність мультиплексного аналізу є обмеженням методу LAMP, але завдяки іммобілізації праймерів в мікроструктурах чіпа, ампліфікація та детектування різних фрагментів ДНК одночасно в різних камерах може бути здійснена, використовуючи один інтеркалювальний барвник [37, 38, 39]. Зараз існують різні комерційні набори для ідентифікації Escherichia coli та Listeria monocytogenes методом LAMP [40]. Також даний метод застосовується і для ідентифікації ДНК вірусів, таких як вірус простого герпесу людини (HSV), аденовіруси та інші для виявлення паразитів, наприклад, токсоплазми. Цікаво використання даного методу для виявлення генетично модифікованих продуктів шляхом поєднання LAMP з імунохроматографією [40, 12].

До переваг петлевої ізотермічної ампліфікації відноситься здатність ідентифікувати окремі штами бактерій (по ДНК або цілих клітин) високоспецифічним і швидким способом за допомогою візуальної інтерпретації результатів. Все це дозволяє використовувати метод LAMP в умовах стоматологічних клінік, щоб зробити діагностику захворювань тканин пародонту швидкою та ефективною.

Секвенування гена рРНК 16S

Ще одним методом молекулярної діагностики пародонтиту є секвенування консервативного гена рРНК 16S. Між послідовностями даного гена у різних бактерій існують унікальні відмінності, які дозволяють ідентифікувати бактерії, що аналізуються, до роду або навіть до виду [41, 28]. Секвенування на початкових етапах відбувається за допомогою ПЛР із праймерами, підібраними до гена 16S рРНК. Потім продукт ПЛР секвенується та отримані послідовності порівнюються з базами даних відомих видів бактерій [27, 41]. Першою глобальною базою даних, що містить інформацію про мікроорганізми ротової порожнини була «HOMD» (Human Oral Microbiome Database). Там представлені дані майже про 700 видів бактерій, що мешкають у ротовій порожнині людини. Близько 49% мають офіційну назву, 17% без назв і 34% вважаються такими, що не культивуються, філотипами, тобто таксономічні одиниці різного рангу: штами, види. Інструменти HOMD дозволяють порівнювати послідовність аналізованих бактерій з фенотиповою, філогенетичною та клінічною інформацією, доступною у базі даних. Передбачається, що й послідовність гена 16S рРНК збігається щонайменше ніж 97% з відомою послідовністю з бази даних, можна віднести досліджувані бактерії до роду, і якщо збіг на 99%, можна віднести його й до певного виду [28, 40, 48].

Також перевагою секвенування 16S рРНК є підбір вузькоспецифічних праймерів для певних груп або штамів бактерій та можливість їх ампліфікації зі зразків матеріалу. Це дозволяє діагностувати інфекції, викликані бактеріями, що не культивуються [28, 53]. Недоліком методу є низька ефективність у розподілі близьких і сильно рекомбінованих видів, наприклад, види з роду Neisseria і деякі види роду Streptococcus. Незважаючи на це, секвенування гена 16S рРНК дозволило виявити понад 300 видів бактерій, які раніше не ідентифікувалися стандартними методами культивування [40,50,53].

За допомогою секвенування 16S рРНК визначили частоту народження A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis, T. forsythia і T. denticola [40]. Виявили бактерії, що викликають пародонтит в інших частинах тіла людини, де ці бактерії можуть бути виявлені в осередкових інфекціях [41]. Метод секвенування гена, що кодує 16S рРНК, може бути корисним і в діагностиці ендопародонтальних інфекцій, оскільки визначає бактеріальний склад в осередку ураження і дозволяє визначити джерело інфекції [42]. Завдяки секвенуванню можливе вивчення складу всього мікробіому ротової порожнини з визначенням зміни під впливами різних факторів. Наприклад, порівняти та вивчити мікробіом піддесневого зубного нальоту курців та некурців, пов'язаний із запаленням навколо зубних імплантатів [43,55].

Секвенування нового покоління (NGS) (англ. next generation sequencing)

В останні роки відбувся значний розвиток технологій секвенування ДНК. NGS - це група методів визна-

чення нуклеотидної послідовності ДНК та РНК для отримання формального опису її первинної структури. Цей метод дозволяє почитати одночасно декілька ділянок геному, що є головною відмінністю від більш ранніх методів секвенування. Технології NGS (масове паралельне або глибоке секвенування) дозволяють весь людський геном секвенувати протягом дня. Секвенування наступного покоління знайшло застосування у виявленні та розумінні біорізноманіття геномів вірусів, у тому числі грипу, ВІЛ та вірусного гепатиту В [44]. Даний метод використовувався при оцінці змін у складі мікробіом під'ясенневої області у хворих з пародонтитом після лікування, а також порівнювався з мікробіомом пародонтальних кишень у курців та некурців [45]. NGS - секвенування використовується в молекулярній діагностиці для вивчення різноманітності біоплівок, які виявляються в ротовій порожнині людини [46,47,54].

ДНК- мікрочип (англ. DNA microarray) технологія

В основі роботи ДНК- мікрочипів лежить явище гібридизації. Мікрочипи з використанням методу гібридизації застосовуються для ідентифікації мікроорганізмів та визначення експресії генів. Вони складаються з одноланцюгових зондів, пов'язаних ковалентно зі скляними або нейлоновими поверхнями мікросхеми. Для виявлення специфічних фрагментів нуклеїнових кислот використовуються зонди у вигляді одноланцюгових фрагментів ДНК з відомою послідовністю продукту ПЛР або олігонуклеотиди. Зонди призначені для гібридизації зі специфічними послідовностями РНК або ДНК зі зразка біологічного матеріалу, що тестується. Послідовність зондів найчастіше вибираються з баз даних GeneBank чи UniGene [28, 49].

Всі доступні комерційні набори мікрочипів мають один механізм дії. Після нанесення зразка на поверхню чипа потрібний одноланцюговий фрагмент нуклеїнової кислоти гібридизується з комплементарним зондом. Утворюються дволанцюгові фрагменти, які реєструються флуоресцентним, хемілюмінесцентним або мас-спектрометричним методами. Інтенсивність сигналу, отриманого від аналізованого зразка, дозволяє визначити кількість пов'язаної нуклеїнової кислоти, і, таким чином, оцінити кількість мікроорганізмів або рівень експресії генів у матеріалі, що тестується [49,50,53]. В такий спосіб можна визначити агенти, пов'язані з вірулентністю мікроорганізмів, наприклад, гени стійкості до антибіотиків. Мікрочипи ДНК мають необмежені можливості виявлення різних послідовностей ДНК. Вони можуть містити від сотень до тисяч зондів на поверхні, а мікрочипи з високою щільністю містять від тисяч до мільйонів молекулярних зондів [49, 51]. Комерційні ДНК- чіпи ідентифікують мікроорганізми біоплівок при пародонтиті. Мікрочип для клінічної пародонтальної діагностики ParoCheck® дозволяє виявляти 10 видів асоційованих бактерій із пародонтитом [52,55].

Висновки

Методи молекулярної діагностики все частіше використовують для ідентифікації пародонтопатогенів, бо мають значні переваги над мікробіологічними дослідженнями. Застосування сучасних методів молекулярної діагностики, дозволить успішно досліджувати мікробіом порожнини рота, швидко виявляти пародонтопатогени, присутні в діагностичному біоматеріалі навіть у невеликих кількостях, а також ідентифікувати клінічно значущі види мікроорганізмів, що не культивуються або важко культивуються та виявляють стійкість до антибіотиків у них. Також молекулярна діагностика може забезпечити ефективний скринінг захворювань тканин пародонту. Враховуючи вище згадане, оптимальним буде комбінація різних методів діагностики пародонтопатогенів для кожного конкретного випадку, що дозволить підбирати найбільш ефективні способи лікування. Однак одного моніторингу мікробіому порожнини рота недостатньо для ефективного прогнозування перебігу та планування реабілітації пацієнтів з захворюванням тканин пародонту. Необхідність пошуку комбінації молекулярно-генетичних методів діагностики захворювань тканин пародонту є очевидним.

ПОСИЛАННЯ

1. Hajishengallis G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol. 35, 3–11 10.1016/j.it.2013.09.001 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Kistler J. O., Booth V., Bradshaw D. J., Wade W. G. (2013). Bacterial community development in experimental gingivitis. PLoS ONE 8:e71227 10.1371/journal.pone.0071227 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Shi B., Chang M., Martin J., Mitreva M., Lux R., Klokkevold P., Sodergren E., Weinstock G.M., Haake S.K., Li H. Dynamic changes in the subgingival microbiome and their potential for diagnosis and prognosis of periodontitis. mBio. 2015; 6(1):e01926-14. DOI: 10.1128/mBio.01926-14.
4. Abusleme L., Dupuy A. K., Dutzan N., Silva N., Burleson J. A., Strausbaugh L. D., et al. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME J. 7, 1016–1025
5. Lamont R.J., Koo H., Hajishengallis G. The Oral Microbiota: Dynamic Communities and Host Interactions. Nat. Rev. Microbiol. 2018; 16:745–59.

6. Laine M. L., Moustakis V., Koumakis L., Potamias G., Loos B. G. (2013). Modeling susceptibility to periodontitis. J. Dent. Res. 92, 45–50 10.1177/0022034512465435 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Chapple I.L.C., Genco R. Diabetes and Periodontal Diseases: Consensus Report of the Joint EFP/AAPWorkshop on Periodontitis and Systemic Diseases. J. Periodontol. 2013; 84: 106–12.
8. Kumar P. S., Matthews C. R., Joshi V., De Jager M., Aspiras M. (2011). Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. Infect. Immun. 79, 4730–4738 10.1128/IAI.05371-11 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Mason M. R., Nagaraja H. N., Camerlengo T., Joshi V., Kumar P. S. (2013). Deep sequencing identifies ethnicity-specific bacterial signatures in the oral microbiome. PLoS ONE 8:e77287 10.1371/journal.pone.0077287 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Zhang Y., He J., He B., Huang R., Li M. Effect of Tobacco on Periodontal Disease and Oral Cancer. Tob.Induc.Dis. 2019; 17. DOI: 10.18332/tid/1061878.
11. Fan J., Caton J.G. Occlusal Trauma and Excessive Occlusal Forces: Narrative Review, Case Definitions, and Diagnostic Considerations: Occlusal Trauma and Excessive Occlusal Forces. J. Periodontol. 2018; 89: 214–22.
12. Lenkowski M., Nijakowski K., Kaczmarek M., Surdacka A. TheLoop-Mediated Isothermal Amplification Technique in Periodontal Diagnostics: A Systematic Review. J. Clin. Med. 2021; 10: 1189. DOI: 10.3390/jcm10061189.
13. Wolf D.L., Lamster I.B. Contemporary Concepts in the Diagnosis of Periodontal Disease. Dental Clinics. 2011; 55: 47–61.
14. Chen C., Hemme C., Beleno J., Shi Z.J., Ning D., Qin Y., Tu Q., Jorgensen M., He Z., Wu L. et al. Oral Microbiota of Periodontal Health and Disease and Their Changes after Nonsurgical Periodontal Therapy. ISME J. 2018; 12: 1210–24.
15. Deo P.N., Deshmukh R. Oral Microbiome: Unveiling the Fundamentals. J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP. 2019; 23: 122–8.
16. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. J. Clin. Periodontol. 1998; 25: 134–44.
17. Aruni, A.W., Dou, Y., Mishra, A., Fletcher H.M. The Biofilm Community: Rebels with a Cause. Curr. Oral Health Rep. 2015; 2: 48–56.
18. Kolenbrander P. E., Palmer R. J., Jr., Periasamy S., Jakubovics N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Nat. Rev. Microbiol. 8, 471–480 10.1038/nrmicro2381 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
19. Nørskov-Lauritsen N., Claesson R., Birkeholm J.A., Åberg C.H., Haubek D. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans: Clinical Significance of a Pathobiont Subjected to Ample Changes in Classification and Nomenclature. Pathogens. 2019; 8: 243.
20. Dahlen G., Basic A., Bylund J. Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevice and in the Pathogenesis of Periodontal Disease. J. Clin. Med. 2019; 8: 1339.
21. Kumar P. S., Matthews C. R., Joshi V., De Jager M., Aspiras M. (2011). Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. Infect. Immun. 79, 4730–4738 10.1128/IAI.05371-11 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Matthews C. R., Joshi V., De Jager M., Aspiras M., Kumar P. S. (2013). Host-bacterial interactions during induction and resolution of experimental gingivitis in current smokers. J. Periodontol. 84, 32–40 10.1902/jop.2012.110662 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
23. Siqueira J. F., Jr., Rôças I. N. (2013). As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. J. Oral Microbiol. 5:21077
24. Slots J., Slots H. Periodontal Herpesvirus Morbidity and Treatment. Periodontol. 2000. 2019; 79: 210–20.
25. Sztukowska M.N., Dutton L.C., Delaney C., Ramsdale M., Ramage G., Jenkinson H.F., Nobbs A.H., Lamont R.J. Community Development between. Porphyromonas Gingivalis and Candida Albicans Mediated by InlJ and Als3. MBio. 2018; 9:e00202-18.
26. Lourenço A.G., Ribeiro A.E.R.A., Nakao C., Motta A.C.F., Antonio L.G.L., Machado A.A., Komesu M.C. Oral Candida Spp Carriage and Periodontal Diseases in HIV-Infected Patients in Ribeirão Preto, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2017; 59:e29. DOI: 10.1590/S1678-9946201759029.
27. Tomita S., Komiya-Ito A., Imamura K., Kita D., Ota K., Takayama S., Makino-Oi A., Kinumatsu T., Ota M., Saito A.: Prevalence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. Microb.Pathog. 2013; 61-62: 11-5.
28. Korona-Głowniak I., Siwiec R., Berger M., Malm A., Szymańska J. Molecular diagnostics of periodontitis. PostepyHig Med Dosw (Online). 2017; 71(0):47-56. DOI: 10.5604/17322693.1229820. PMID: 28181911.
29. Hiranmayi K.V., Sirisha K., Ramoji R.M., Sudhakar P. Novel Pathogens in Periodontal Microbiology. J. Pharm. Bioallied Sci. 2017; 9:155–63.
30. Danišová O., Halánová M., Valen˘cáková A., Luptáková L. Sensitivity, Specificity and Comparison of Three Commercially Available Immunological Tests in the Diagnosis of Cryptosporidium Species in Animals. Braz. J. Microbiol. 2018; 49: 177–83.
31. Kumawat R., Ganvir S., Hazarey V., Qureshi A., Purohit H. Detection of Porphyromonas Gingivalis and TreponemaDenticola in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: A Comparative Polymerase Chain Reaction Study. Contemp. Clin. Dent. 2016; 7: 481.
32. Sanz M., van Winkelhoff A. J., (Working Group 1 of Seventh European Workshop on Periodontology). (2011). Periodontal infections: understanding the complexity–consensus of the seventh European workshop on periodontology. J. Clin. Periodontol. 38, 3–6 10.1111/j.1600-051X.2010.01681.x [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
33. Sidstedt M., Rådström P., Hedman J. PCR Inhibition in QPCR, DPCR and MPS—Mechanisms and Solutions. Anal.Bioanal. Chem. 2020; 412:

2009–23.

34. Gatto M.R., Montevecchi M., Paolucci M., Landini M.P., Checchi, L.: Prevalence of six periodontal pathogens in subgingival samples of Italian patients with chronic periodontitis. New Microbiol. 2014; 37: 517-24.
35. Abusleme L., Dupuy A. K., Dutzan N., Silva N., Burleson J. A., Strausbaugh L. D., et al. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME J. 7, 1016–1025 10.1038/ismej.2012.174 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Choi H., Kim E., Kang J., Kim H.-J., Lee J.-Y., Choi J., Joo J.-Y. Real-Time PCR Quantification of 9 Periodontal Pathogens in Saliva Samples from Periodontally Healthy Korean Young Adults. J. Periodontal Implant Sci. 2018; 48: 261.
37. Arenas R.V.A., de Avila E.D., Nakano V., Avila-Campos M.J. Qualitative, Quantitative and Genotypic Evaluation of AggregatibacterActinomycet emcomitans and Fusobacterium Nucleatum Isolated from Individuals with Different Periodontal Clinical Conditions. Anaerobe. 2018; 52: 50–8.
38. Krom B. P., Kidwai S., Ten Cate J. M. (2014). Candida and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. J. Dent. Res. 93, 445–451 10.1177/0022034514521814 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
39. Lim H.S.Y., Zheng Q., Miks-Krajnik M., Turner M., Yu, H.-G. Evaluation of Commercial Kit Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Low Levels of Uninjured and Injured Salmonella on Duck Meat, Bean Sprouts, and Fishballs in Singapore. J. Food Prot. 2015; 78: 1203–7.
40. Ramich T., Schacher B., Scharf S., Röllke L., Arndt R., Eickholz P., Nickles K. Subgingival plaque sampling after combined mechanical and antibiotic nonsurgical periodontal therapy. Clin. Oral Investig. 2015; 19: 27-34.
41. Ding F., Lyu Y., Han X., Zhang H., Liu D., Hei W., Liu Y. Detection of periodontal pathogens in the patients with aortic aneurysm. Chin. Med. J. 2014; 127: 4114-8.
42. Fujii R., Muramatsu T., Yamaguchi Y., Asai T., Aida N., Suehara M., Morinaga K., Furusawa M. An endodontic-periodontal lesion with primary periodontal disease: a case report on its bacterial profile. Bull. Tokyo Dent. Coll. 2014; 55: 33-7.
43. Moon J.H., Lee J.H., Lee J.Y. Subgingivalmicrobiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. Mol. Oral Microbiol. 2015; 30: 227-41.
44. Radford A.D., Chapman D., Dixon L., Chantrey J., Darby A.C., Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. J. Gen. Virol. 2012: 93; 1853-68.
45. Schwarzberg K., Le R., Bharti B., Lindsay S., Casaburi G., Salvatore F., Saber M.H., Alonaizan F., Slots J., Gottlieb R.A., Caporaso J.G., Kelley S.T. The personal human oral microbiome obscures the effects of treatment on periodontal disease. PLoS One. 2014; 9: e86708.
46. Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. Mol. Ecol, 2012; 21: 1794-1805.
47. Abusleme L., Dupuy A. K., Dutzan N., Silva N., Burleson J. A., Strausbaugh L. D., et al. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME J. 7, 1016–1025 10.1038/ismej.2012.174 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
48. Griffen A. L., Beall C. J., Campbell J. H., Firestone N. D., Kumar P. S., Yang Z. K., et al. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. ISME J. 1176–1185 10.1038/ismej.2011.191 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
49. Pozhitkov A.E., Beikler T., Flemmig T., Noble P.A. High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. Periodontol. 2000. 2011; 55: 70-86.
50.Zarco M. F., Vess T. J., Ginsburg G. S. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. Oral Dis. 18, 109–120 10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
51. Hajishengallis G., Lamont R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol. Oral Microbiol. 27, 409–419 10.1111/j.2041- 1014.2012.00663.x [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
52. Topcuoglu N., Kulekci G. 16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis. Anaerobe. 2015; 35: 35-40.
53. Caselli, E., Fabbri, C., D'Accolti, M., Soffritti, I., Bassi, C., Mazzacane, S., Franchi, M. Defining the oral microbiome by wholegenome sequencing and resistome analysis: The complexity of the healthy picture. BMC Microbiol. 2020, 20, 120. [CrossRef]
54. Oh, C., Lee, K., Cheong, Y., Lee, S.W., Park, S.Y., Song, C.S., Choi, I.S., Lee, J.B. Comparison of the Oral Microbiomes of Canines and Their Owners Using Next-Generation Sequencing. PLoS ONE 2015, 10, e0131468. [CrossRef] [PubMed]
55. Willis, J.R., Gabaldón, T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. Microorganisms 2020, 8, 308. [CrossRef] [PubMed]

Modern methods of diagnosing periodontal tissue diseases in the concept of a systemic approach to treatment. (Literature review. Part 1)

Symonenko R.

Resume. In Diseases of periodontal tissues remain one of the most urgent problems studied in dentistry. However, until now, the clinical diagnosis of periodontopathies has its limitations and often does not allow clinicians to determine the cause, mechanisms of disease development, and make forecasts of the course of the disease. The modern concept of a systemic approach to the treatment of dystrophic-inflammatory periodontal diseases requires informative and quick diagnostic methods that are understandable for doctors of all dental specialties. Therefore, the search for effective approaches and new methods of diagnosing periodontal tissue diseases is a very urgent issue. Disturbance of the balance in the microbiome of the oral cavity is considered a leading factor affecting the occurrence and progression of this disease. Therefore, identifying the composition of biofilms in the oral cavity and understanding the complex relationships involving microorganisms, environmental factors, and the state of human health will allow for improved diagnosis, targeted therapy of patients with periodontitis, and prediction of the course of the disease. The review describes the advantages and disadvantages of the following methods: cultivation of periodontopathogens, polymerase chain reaction (PCR), isothermal loop amplification (LAMP), sequencing of the 16S pRNA gene, next-generation sequencing (NGS), DNA microarray technology using the hybridization method in the study of periodontopathogens.Modern methods of molecular diagnostics are increasingly used to identify periodontopathogens, which will make it possible to successfully study the microbiome of the oral cavity, quickly identify periodontopathogens present in diagnostic biomaterial even in small quantities, as well as identify clinically significant types of microorganisms that are not cultivated or are difficult to cultivate in bacteriological laboratories and detect resistance to antibiotics in them. A combination of different methods of periodontopathogen diagnostics for each specific case will be optimal, which will allow selecting the most effective methods of treatment. However, monitoring the oral microbiome alone is not enough to effectively predict the course and plan the rehabilitation of patients with periodontal tissue disease. The need to find a combination of molecular and genetic methods for the diagnosis of periodontal tissue diseases is obvious.

Key words: orthodontics, students, active skills, self-study education, digital book, graphically visualized tests.

Симоненко Рената Володимирівна *- канд. мед. наук,доцент кафедри ортопедичної стоматології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна*

Стаття: надійшла до редакції 07.11.2023 р. – прийнята до друку 08.12.2023 р.