

УДК 616.314.17–008.1–085.27

DOI <https://doi.org/10.35220/2523-420X/2023.1.4>**О.В. Дєньга,**

доктор медичних наук, професор, завідувач  
відділу епідеміології та профілактики основних  
стоматологічних захворювань, стоматології дитячого  
віку та ортодонції, Державна установа «Інститут  
стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН  
України», вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, Україна,  
індекс 65026

**В.Б. Пиндус,**

кандидат медичних наук, доцент, декан  
фармацевтичного факультету, Вищий приватний  
навчальний заклад «Львівський медичний університет»,  
вул. Патона, 22-А, м. Львів, Україна, індекс 79040

### ВПЛИВ ВКРАЙ ВИСОКИХ ЧАСТОТ НА ПАРОДОНТОПАТОГЕНИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ ПАРОДОНТИТ

Пародонтит – це запальне захворювання, ініційоване специфічними видами бактерій, які колонізують область між поверхнею зуба та краєм ясен. Це захворювання викликає руйнування опорних тканин зуба, включаючи сполучну тканину та альвеолярну кістку, і може призвести до втрати зуба. **Мета дослідження.** Дослідження присвячене вивченню впливу вкрай високих частот на кількість пародонтопатогенів в зразках пародонтальних кишень пацієнтів з хронічним генералізованим пародонтитом за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. **Матеріали та методи.** У дослідженні взяли участь 10 хворих на хронічний генералізований пародонтит початкової, 1 та 2 стадії (середній вік – 47 років). В якості патогенетичної терапії використовували вплив вкрай високих частот. Випромінювач вкрай високих частот прикладався безпосередньо на слизову оболонку ясен у проекції верхівок коренів зубів. Тривалість процедури становила 3-4 хвилини для кожного поля впливу. Наявність та кількість пародонтопатогенів *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* та *Fusobacterium nucleatum* визначали методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Серед пародонтопатогенів, що вивчалися, найбільшою кількістю присутністю відрізнявся *A. actinomycetemcomitans*: > 90 % всіх бактерій зразка у 60 % зразків вмісту пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит. Застосування ВВЧ достовірно знизило кількість *P. endodontalis* в зразках, що дозволяє рекомендувати ВВЧ в якості одного з методів комплексного лікування хронічного генералізованого пародонтиту.

**Ключові слова:** хронічний генералізований пародонтит, пародонтопатогени, полімеразна ланцюгова реакція, вкрай високі частоти, тканини пародонту.

**O.V. Denha,**

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head  
of the Department of Epidemiology and Prevention  
of Major Dental Diseases, Pediatric Dentistry  
and Orthodontics, State Institution “Institute of Dentistry  
and Maxillofacial Surgery of the National Academy  
of Medical Sciences of Ukraine”, 11 Richelevskaya street,  
Odessa, Ukraine, postal code 65026

**V.B. Pyndus,**

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Dean  
of the Faculty of Pharmacy, Higher Private Educational  
Institution “Lviv Medical University”, 22-a Patona street,  
Lviv, Ukraine, postal code 79040

### EFFECT OF EXTREMELY HIGH FREQUENCY ON PERIODONTAL PATHOGENS IN SUBJECTS WITH GENERALIZED CHRONIC PERIODONTITIS

Periodontitis is an inflammatory disease caused by certain types of bacteria that colonize the area between the tooth surface and the edge of the gum. This condition causes destruction of the supporting tissues of the tooth, including connective tissue and alveolar bone, and can lead to tooth loss. **Purpose of the study.** The study is devoted to the research of the effect of extremely high frequencies on the number of periodontal pathogens in periodontal pocket samples of patients with chronic generalized periodontitis using the real-time polymerase chain reaction method. **Materials and methods.** The study involved 10 patients with chronic generalized periodontitis of the initial, 1st and 2nd stages (average age – 47 years). Exposure to extremely high frequencies was used as a pathogenetic therapy. The extremely high frequency emitter was applied directly to the gingival mucosa in the projection of the apices of the teeth roots. The duration of the procedure was 3-4 minutes for each exposure field. The presence and number of periodontal pathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* were determined by real-time polymerase chain reaction. Among the periodontopathogens studied, the greatest quantitative presence was distinguished by *A. actinomycetemcomitans*: > 90% of all sample bacteria in 60% of samples of periodontal pocket contents in patients with generalized periodontitis. The use of HFE significantly reduced the number of *P. endodontalis* in samples, which allows us to recommend HFE as one of the methods of complex treatment of chronic generalized periodontitis.

**Key words:** generalized chronic periodontitis, periodontal pathogens, polymerase chain reaction, extremely high frequencies, periodontal tissues.

Пародонтит – це запальне захворювання, ініційоване специфічними видами бактерій, які колонізують область між поверхнею зуба та краєм ясен.

Це захворювання викликає руйнування опорних тканин зуба, включаючи сполучну тканину та альвеолярну кістку, і може призвести до втрати зуба. Серед мікрофлори ротової порожнини, що нараховує за різними даними від 500 до 3500 мікроорганізмів, до основних збудників пародонтозу відносять грампозитивні та грамнегативні, факультативні та строго анаеробні бактерії [1]. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* та *Tannerella forsythia*, що входять до так званого «червоного комплексу», асоційованого з важкими формами захворювання, тісно пов'язані з хронічною формою пародонтиту та, як вважають, відіграють важливу роль у його патогенезі [2]. З хронічним пародонтитом пов'язують також інші види бактерій, включаючи *Porphyromonas endodontalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* та *Fusobacterium nucleatum* [3-6]. Хоча окремі бактеріальні види та групи бактерій були ідентифіковані як етіологічні чинники пародонтиту, взаємодія між бактеріями та організмом господаря також відіграє ключову роль в етіопатогенезі захворювання, при цьому у пацієнтів зі зниженим імунітетом представники нормальної мікрофлори можуть стати збудниками захворювання [7].

Використання молекулярно-генетичних методів ідентифікації патогенів, що є більш чутливими, ніж бактеріальні культуральні аналізи, призводить до кращого розуміння ролі конкретних видів мікроорганізмів у патогенезі пародонтиту та інших захворювань ротової порожнини. Наприклад, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) дозволяє відрізнити чорнопігментовані бактерії *P. gingivalis* та *P. endodontalis*, що неможливо при використанні стандартних бактеріальних посівів [8].

**Метою** даного дослідження було вивчення впливу вкрай високих частот на мікрофлору пародонтальних кишень пацієнтів з хронічним генералізованим пародонтитом за допомогою кількісної ПЛР.

**Матеріал та методи дослідження.** У дослідженні взяли участь 10 хворих на хронічний генералізований пародонтит початкової, 1 та 2 стадії (середній вік – 47 років).

В якості патогенетичної терапії використовували вплив вкрай високих частот (ВВЧ) за допомогою апарату «Емітер-ОНС» (НВО «Созидатель», Дніпро, Україна). Інтенсивність випромінювання була 0,5 мВт/см<sup>2</sup>, низькочастотна модуляція високочастотного сигналу проводилася з частотою 10 Гц, глибина модуляцій становила

50 %. Випромінювач ВВЧ прикладався безпосередньо на слизову оболонку ясен у проекції верхівок коренів зубів. Тривалість процедури становила 3-4 хвилини для кожного поля впливу.

Зразки мікробіологічного матеріалу збирали натщесерце, до ранкової гігієни ротової порожнини за допомогою стерильних паперових ендодонтичних штифтів (розмір № 25), які вводили пінцетом у найбільш глибокі ділянки пародонтальної кишені на 15 секунд до проведення ВВЧ і через 7 діб після ВВЧ. Зібраний матеріал негайно поміщався в стерильні герметичні пробірки Eppendorf (1,5 мл) з 1 мл фізіологічного розчину для транспортування в лабораторію в термоконтейнері з хладагентом.

Бактеріальну ДНК виділяли з використанням набору «ДНК-ЭКСПРЕСС» (НПФ «Литех»), згідно з інструкцією виробника. Наявність та кількість пародонтопатогенів *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* та *Fusobacterium nucleatum* визначали методом ПЛР у реальному часі за допомогою набору «Дентоскрин для кількісного аналізу формату Флуоропол-РВ», комплектація OneStep Strip (НПФ «Литех») за методикою виробника на ампліфікаторі CFX96 Touch “REAL TIME” (Bio-Rad, США), з використанням низького (> 50 бактерій у зразку) та високого (> 1000 бактерій у зразку) порогу чутливості.

Статистичну обробку отриманих результатів, що включала логарифмічне (log) перетворення даних кількості бактерій, порівняння кількості бактерій до та після ВВЧ за допомогою t-тесту для рівних дисперсій та тесту Уелча для нерівних дисперсій, t-тесту для парних вибірок, точного тесту Фішера проводили з використанням пакету статистичних програм MedCalc (MedCalc Software Ltd). Значення  $p < 0,05$  вважали статистично значущими.

**Результати та їх обговорення.** За даними ПЛР-аналізу у реальному часі зразків вмісту пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит всі 7 пародонтопатогенних мікроорганізмів, що вивчалися, були присутні в дослідженій популяції. При використанні порогу низької чутливості (більше 50 копій ДНК кожного патогену у зразку) більшість патогенів, за виключенням *A. actinomycetemcomitans* та *P. gingivalis*, що знайдені у 90 % зразків, була виявлена у 100 % зразків до використання ВВЧ терапії (таблиця 1).

Таблиця 1

**Поширеність пародонтопатогенів серед хворих на хронічний генералізований пародонтит до та після ВВЧ-терапії**

Патоген	Кількість хворих (%)			
	До ВВЧ		Після ВВЧ	
	НПЧ	ВПЧ	НПЧ	ВПЧ
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	9 (90)	9 (90)	8 (80)	8 (80)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9 (90)	9 (90)	9 (90)	8 (80)
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	10 (100)	10 (100)	9 (90)	4 (40)*
<i>Treponema denticola</i>	10 (100)	10 (100)	9 (90)	7 (70)
<i>Tannerella forsythia</i>	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
<i>Prevotella intermedia</i>	10 (100)	8 (80)	8 (80)	8 (80)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

Примітка: ВВЧ – вкрай високі частоти, ВПЧ – високий поріг чутливості (> 1000 бактерій), НПЧ – низький поріг чутливості (> 50 бактерій). Розбіжності між відповідними групами достовірні при \* $p < 0,05$  (точний тест Фішера)

Впровадження порогу високої чутливості (більше 1000 копій бактеріальної ДНК у зразку) істотно не вплинуло на кількісну наявність патогенів в популяції, лише кількість зразків з виявленою *P. intermedia* зменшилась зі 100 % до 80 % (таблиця 1). Проте відсотковий розподіл патогенів у зразках був дуже нерівномірним. У 6 з 10 випадків (60 %) домінуючою за кількістю була бактерія *A. actinomycetemcomitans* – більше 90 – 99,9 % кількості всіх бактерій зразка (рисунок 1).

Ця бактерія була відсутня в зразках лише одного пацієнта. За літературними даними, грамнегативна, нерухома, факультативно-анаеробна бактерія *A. actinomycetemcomitans* тісно пов'язана з агре-

сивним пародонтитом у молодих людей і підлітків [9-11] та є одним із найбільш поширених мікроорганізмів у пацієнтів з пародонтитом [12]. Важливо, що *A. actinomycetemcomitans* також асоціюється з серйозними неоральними інфекціями, такими як ендокардит і абсцеси мозку [13, 14]. За відсутності кількісного домінування *A. actinomycetemcomitans* (40 % зразків), у одного пацієнта кількісно переважала бактерія *P. gingivalis*; в зразках інших пацієнтів розподіл патогенів був у частковому співвідношенні більш менш рівномірним (рис. 1).

Через тиждень після застосування ВВЧ виявлено достовірне зниження кількості зразків, що містили *P. endodontalis*, зі 100 % до 40 % за вико-

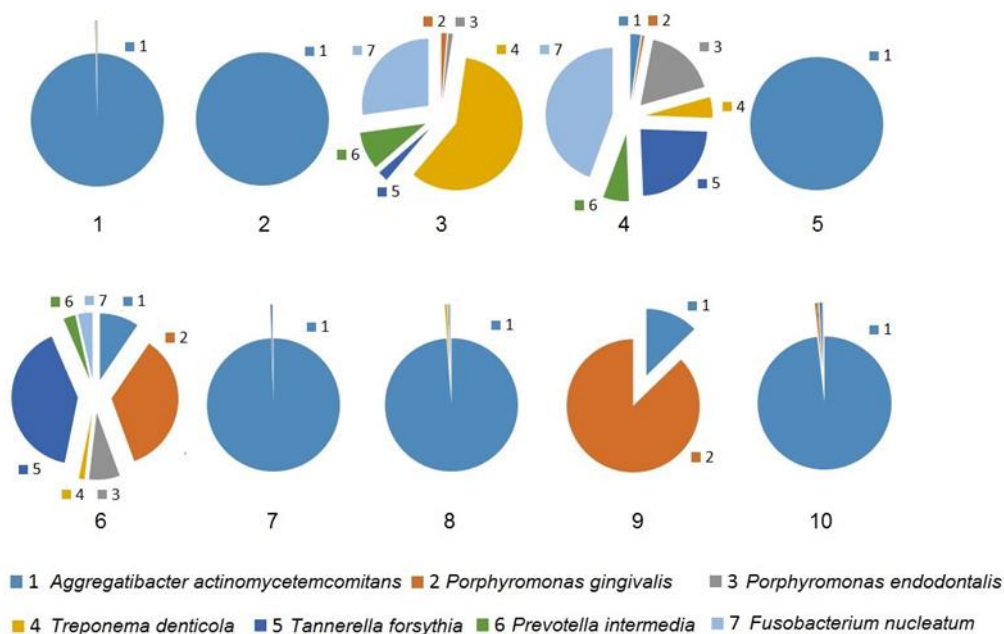


Рис. 1. Кількісний розподіл пародонтопатогенів в зразках пародонтальних карманів 10 хворих на хронічний генералізований пародонтит

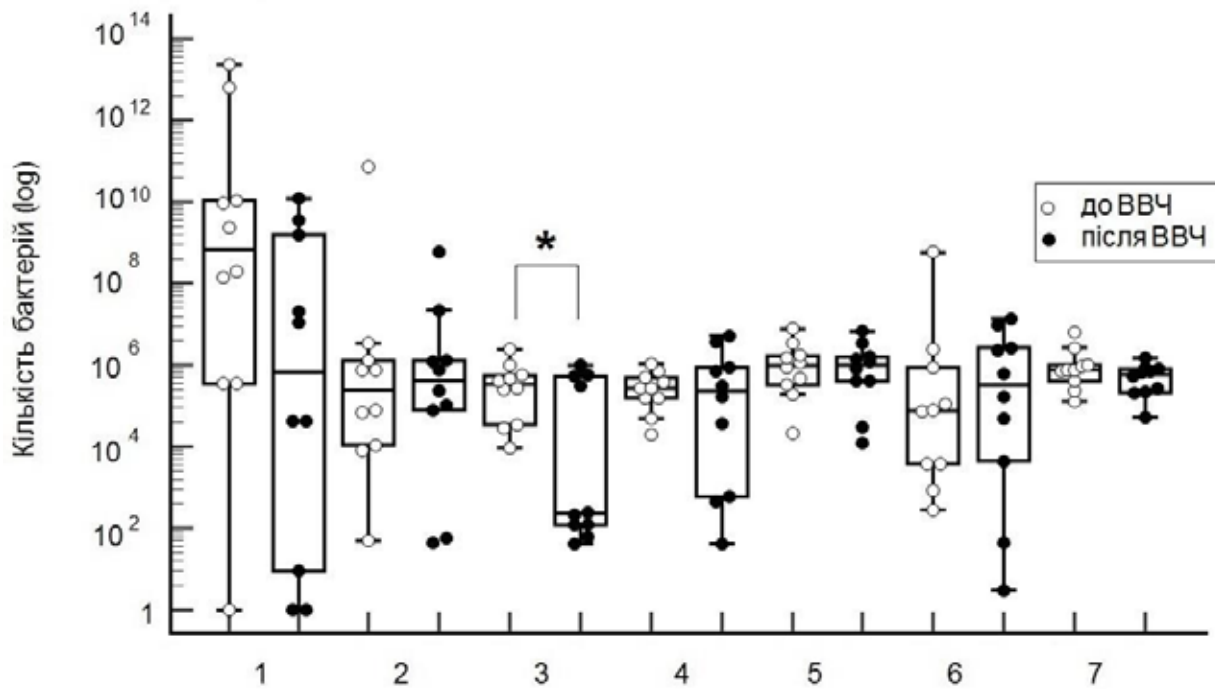


Рис. 2. Порівняння кількості пародонтопатогенів в зразках пародонтальних карманів 10 хворих на хронічний генералізований пародонти до та після застосування ВВЧ-терапії. 1 – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 2 – *Porphyromonas gingivalis*, 3 – *Porphyromonas endodontalis*, 4 – *Treponema denticola*, 5 – *Tannerella forsythia*, 6 – *Prevotella intermedia*, 7 – *Fusobacterium nucleatum*

ристанням порогу високої чутливості ( $> 1000$  бактерій; точний тест Фішера,  $P = 0,0108$ , табл.), а також загальної кількості *P. endodontalis* в середньому (t-тест,  $P = 0,0178$ ; рис. 2) та при попарному порівнянні зразків до та після ВВЧ (t-тест для парних вибірок,  $P = 0,012$ ). *P. endodontalis*, грамнегативна бактерія з чорною пігментацією, високо поширена у хворих ділянках пародонту подібно іншим пов'язаним із пародонтитом патогенам, таким, як *P. gingivalis* і *T. forsythia* [15]. Кількість найбільш поширеного в нашому дослідженні патогену *A. actinomycetemcomitans* також зменшилась, проте це зменшення не досягло статистично значимого рівня (рисунок 2).

Отримані нами дані свідчать про те, що ВВЧ терапія може зменшувати кількість принаймні деяких збудників генералізованого пародонтиту, що дозволяє рекомендувати впровадження методу в систему заходів комплексного лікування даного захворювання. Оскільки одиночна процедура ВВЧ не призвела до статистично достовірного зменшення інших проаналізованих нами збудників генералізованого пародонтиту, ВВЧ-терапія пародонтиту потребує подальшого процедурного удосконалення, принаймні збільшення кількості сеансів в купі з вивченням впливу ВВЧ на перерозподіл мікрофлори ротової порожнини та на відновлення нормальної мікрофлори.

**Висновки.** Серед пародонтопатогенів, що вивчалися, найбільшою кількісною присутністю відрізнявся *A. actinomycetemcomitans*:  $> 90$  % всіх бактерій зразка у 60 % зразків вмісту пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит.

1. Застосування ВВЧ достовірно знизило кількість *P. endodontalis* в зразках, що дозволяє рекомендувати ВВЧ в якості одного з методів комплексного лікування хронічного генералізованого пародонтиту.

#### Література:

- Jarvensivu, A., Hietanen, J., Rautema, R., Sorsa, T., & Richardson, M. (2004). Candida yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis*, 10, 106–112 doi: 10.1046/j.1354-523x.2003.00978.x.
- Mineoka, T., Awano, S., Rikimaru, T., Kurata, H., Yoshida, A., Ansai, T., & et al. (2008). Site specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol.*, 79, 670–676 doi: 10.1902/jop.2008.070398.
- Lombardo Bedran T.B., Marcantonio, R.A., Spin, Neto R., Alves Mayer, M.P., Grenier, D., Spolidorio, L.C., & Spolidorio, D.P. (2012). *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological

- cross-sectional study. *J Oral Microbiol* doi: 10.3402/jom.v4i0.10123.
4. Fine, D.H., Schreiner, H., & Velusamy, S.K. (2020). *Aggregatibacter*, A Low Abundance Pathobiont That Influences Biogeography, Microbial Dysbiosis, and Host Defense Capabilities in Periodontitis: The History of A Bug, And Localization of Disease. *Pathogens*, 2, 9(3), 179 /doi.org/10.3390/pathogens9030179.
5. Zolotuhina, O.L., Romanova, Ju.G., & Shnajder, S.A. (2020). Charakterystyka zmin mikroflory parodontal'nyh kysheň pislja kompleksnogo likuvannja tjutjunozaleznyh pacientiv z hronichnym generalizovanyim parodontytom na tli hronichnogo giperacydnogo gastrytu [Characteristics of changes in the microflora of periodontal pockets after complex treatment of tobacco-dependent patients with chronic generalized periodontitis on the background of chronic hyperacid gastritis]. *Visnyk stomatologii – Bulletin of Dentistry*, 3(112), 37, 30-35 doi 10.35220/2078-8916-2020-37-3-30-35.
6. Shiba, T., Komatsu, K., Sudo, T., Sawafuji, R., Saso, A., Ueda, S., Watanabe, T., & et al. (2021). Comparison of Periodontal Bacteria of Edo and Modern Periods Using Novel Diagnostic Approach for Periodontitis With Micro-CT. *Front Cell Infect Microbiol.*, 20, 11, 723821 doi: 10.3389/fcimb.2021.723821.
7. Kumar, P.S., Griffen, A.L., Barton, J.A., Paster, B.J., Moeschberger, M.L., & Leys, E.J. (2003). New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.*, 82, 338–44 doi: 10.1177/154405910308200503.
8. Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., & Slots, J. (1996). Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.*, 1, 266–73 doi: 10.1111/j.1399-302x.1996.tb00180.x.
9. Henderson, B., Ward, J.M., & Ready, D. (2010). *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen? *Periodontol.* 2000, 54, 78–105 doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x.
10. Fine, D.H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M., & Gunsolley, J. (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*, 45, 3859–3869 doi: 10.1128/JCM.00653-07.
11. Haubek, D., Ennibi, O-K., Poulsen, K., Væth, M., Poulsen, S., & Kilian, M. (2008). Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, 371, 237–242 v doi: 10.1016/S0140-6736(08)60135-X.
12. Sánchez-Villamil, J.P., Pino-Vélez, C., Trejos-Suárez, J., Cardona, N., España, A.L., & Alfonso, P.A. (2020). Salivary markers of oxidative stress and periodontal pathogens in patients with periodontitis from Santander, Colombia. *Biomedica*, 40, 113–124 doi: 10.7705/biomedica.5149.
13. Rahamat-Langendoen, J.C., van Vonderer, M.G.A., Engström, L.J., Manson, W.L., van Winkelhoff, A.J., & Mooi-Kokenberg, E.A.N.M. (2011). Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. *J Clin Periodontol*, 38, 702–706 doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01737.x.
14. Zambon, J.J. (1985). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 12, 1–20 doi: 10.1111/j.1600-051x.1985.tb01348.x.
15. Lombardo Bedran, T.B., Marcantonio, R.A., Spin, Neto R., Alves, Mayer M.P., Grenier, D., Spolidorio, L.C., & Spolidorio, D.P. (2012). *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *J Oral Microbiol.*, 4 doi: 10.3402/jom.v4i0.10123. Epub 2012 Jan 5.