На правах рукописи

ПОДПОРИН МИХАИЛ СЕРГЕЕВИЧ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭНДОДОНТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПУЛЬПИТОМ С УЧЁТОМ МОНИТОРИНГА МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА

14.01.14 – стоматология (медицинские науки)
03.02.03. – микробиология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России).

Научный руководитель:

Заслуженный врач РФ, д.м.н.,
профессор **Митронин Александр Валентинович**
Заслуженный работник высшей школы РФ,
д.м.н., профессор **Царев Виктор Николаевич**

Официальные оппоненты:

Макеева Ирина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра терапевтической стоматологии, заведующая кафедрой

Червинец Вячеслав Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно - клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико - биологического агентства» России (МЗ РФ)

Защита диссертации состоится « 03 » марта 2021 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.041.07, созданного на базе ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, по адресу 127006, г. Москва, ул. Долгоруковская, д. 4, лекционный зал им. Н.А. Семашко.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (127206, г. Москва, ул. Вучетича, д. 10а) и на сайте http://dissov.msmsu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент **Дашкова Ольга Павловна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Результаты общепринятого эндодонтического лечения пациентов, на данный момент, не могут считаться вполне удовлетворительными, так как частота осложнений по результатам лечения остается высокой и колеблется, согласно литературным обзорам, от 32 до 50% в сроки наблюдения свыше двух лет (Дмитриева Л.А., 2014; Максимовский Ю.М., 2008; Царев В.Н., 2016). Внутренняя морфология зуба чрезвычайно сложна и разнообразна, и даже на сегодняшний день, располагая обширными сведениями о строении системы корневых каналов, эндодонтическое лечение не всегда может быть выполнено качественно, с минимальным количеством ошибок (Plotino G., 2019; Prakash G., 2015).

Бактериальная контаминация системы корневых каналов зуба является ключевым фактором поражения пульпы и периапикальных тканей (Jurič I.B., 2014). Эрадикационно-дезинфицирующие аспекты лечения в составе комплекса эндодонтических мероприятий направлены на уничтожение этих бактерий и минимизацию рисков рецидивов.

Именно для эрадикации микробной флоры инфицированных зубов в эндодонтии начали использовать химико-механическим методики воздействия для полного удаления всей некротизированной ткани пульпы (Franzen R., 2011). В дополнение к механической обработке корневых каналов для поддерживающей эрадикации патогенов широкое применение нашли антибактериальные ополаскивающие растворы и препараты. Гипохлорит натрия (NaOCl) оказался эффективным средством для внутриканального применения (Ширяк Т.Ю., 2016; Beer F., 2012). Однако, ограниченная глубина проникновения химических веществ в разные слои дентина, существенным образом влияла на достижение поставленных целей инактивации микробной флоры (Ширяк Т.Ю., 2016; Makeeva I.M., 2016), поэтому стали применяться различные методики воздействия, а также различные концентрации препаратов при антибактериальной обработке системы каналов.

Кроме того, побочные эффекты, такие как токсичность, неприятный вкус и неприятный запах ирригационных растворов, были обоснованы в различных клинических испытаниях (Yasuda Y., 2010).

Другим важным фактором является то, что корневые каналы имеют овальное сечение, что ограничивает механическую обработку круглыми инструментами. Тем самым, имея возможность дополнять дезинфицирующие ирригационные растворы дополнительными методиками физиотерапевтического воздействия, может стать тем механизмом, который способен оказать ценную помощь для эффективного удаления любых оставшихся тканей и бактерий.

Вышеизложенные факты способствуют поиску и разработке немедикаментозных способов воздействия при лечении заболеваний

полости рта, среди которых важное место занимают физические методы (лазерная и фотодинамическая терапия, ультразвуковое воздействие и др.).

В последние годы фотодинамическая терапия (ФДТ) успешно применяется как метод фотоинактивации микроорганизмов, который получил широкое распространение, в том числе при лечении болезней зубов (Манучарян Л.А., 2017). В терапевтическом поле данная методика возникла как альтернатива классическим ирригационным растворам в аспекте обработки корневого канала (Алиев А.М., 2017; Sauro S., 2019; Shatalov D.O., 2018).

Ключевым недостатком ФДТ является то, что проблемы, которые влияют на обычные ирригационные системы, в частности – ограниченное проникновение в дентинные канальцы, перетяжки и боковые каналы, также влияют на растворы, содержащие фотосенсибилизаторы (Плюхина Т.П., 2017; Робустова Т.Г., 2010).

Кроме того, далеко не каждый фотосенсибилизатор способен должным образом адсорбироваться на бактериальных клетках и накапливаться в тканях (Плюхина Т.П., 2017; Jiang L.M., 2012), тем самым проявляя достоверный положительный клинический результат, что определяет актуальность дальнейших исследований в этом направлении.

В процессе эндодонтического лечения, полностью отказываться от применения антисептических препаратов, на данный момент, не представляется возможным, однако, снижение их используемой концентрации, использование комбинаций антисептиков и совместное применение с альтернативными способами дезинфекции и стерилизации каналов является актуальным направлением, в котором должна двигаться современная эндодонтическая практика.

В связи с вышеизложенным мы исходили в своём исследовании из гипотезы, что оптимизация комбинированной методики в сочетании с использованием традиционных антисептических препаратов и создание четкого алгоритма эндодонтической обработки может существенно повысить эффективность лечения хронического пульпита.

Цель работы

Экспериментальное обоснование и клинико-лабораторная оценка эффективности сочетанного применения ультразвуковой обработки и фотодинамической терапии, в отношении микробной биопленки корневых каналов в экспериментах *in vitro* и в процессе комплексного лечения пациентов с хроническим пульпитом.

Задачи исследования

1. Провести анализ микробной обсемененности корневых каналов у пациентов с воспалительными заболеваниями пульпы зуба;
2. Изучить воздействие фотодинамической терапии с различными фотосенсибилизаторами на комбинированные микробные взвеси анаэробной и микроаэрофильной микрофлоры полости рта в

экспериментах *in vitro*;

3. На основании смоделированной полимикробной биопленки оценить эффективность комбинирования физиотерапевтических методик лечения с использованием сканирующей электронной микроскопии;

4. Оценить эффективность сочетанного применения фотодинамической терапии и ультразвуковой обработки корневых каналов при лечении хронического пульпита в условиях *in vivo*;

5. На основании анализа экспериментальных и клинико-лабораторных методов исследований оценить эффективность предложенной врачебной тактики эндодонтического лечения пульпита с применением фотодинамической терапии в сочетании с ультразвуковой обработкой.

Научная новизна

1. Получены и систематизированы новые сравнительные данные оптимизированного способа фотодинамической терапии в эндодонтической практике в сравнении с традиционными методиками лечения;

2. Проведен сравнительный анализ физиологических характеристик бактериальных популяций под влиянием внешних факторов в условиях автоматизированного культивирования;

3. Установлен алгоритм действия врача-стоматолога при применении фотодинамической терапии при лечении хронического пульпита;

4. Впервые на основании результатов статистического анализа установлено комбинационная взаимосвязь деконтаминирующей эффективности применения фотосенсибилизирующих агентов и различных концентраций антисептических препаратов в отношении доминирующей эндодонтальной микробиоты;

5. Разработана методика комбинированного применения фотодинамической терапии и ультразвуковой активации фотосенсибилизирующего агента, описаны и доказаны клинические аспекты применения данного алгоритма в клинической практике.

Практическая значимость

- предложена и оптимизирована новая методика эндодонтического лечения пациентов с использованием альтернативных способов деконтаминации микробной флоры из корневых каналов при диагнозе хронический пульпит;
- получены и систематизированы новые данные о чувствительности резидентных и пародонтопатогенных бактерий к комплексной фотодинамической обработке;
- изучен процесс сродства фотосенсибилизаторов к бактериальным клеткам и на основании полученных данных

усовершенствованы показания для применения различных фотосенсибилизаторов при лечении.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Исследование проведено с обследованием 287 пациентов, среди которых 157 человек (с диагнозом К04.03) были отобраны и включены в исследуемые группы. Формирование групп проводилось в соответствии с требованиями критерий включения, не включения и исключения. Были использованы современные клинические, клинико-лабораторные и экспериментальные методы, позволяющие получить высокоточные репрезентативные результаты. Анализ полученных данных проведен с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Диссертационное исследование одобрено межвузовским комитетом по этике МГМСУ им. А.И. Евдокимова (протокол 01-18 от 25.01.2018)

Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медицинская весна – 2017». Москва, 2017; 16-й Всероссийский стоматологический форум выставка-ярмарка «Дентал-ревю – 2019». Аспирантская сессия. Москва, 2019; Научно-практическая конференция молодых ученых МГМСУ им. А.И. Евдокимова «Современные технологии в стоматологии». Москва, 2019; XXVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». Министерство здравоохранения РФ, Министерство образования и науки РФ, Российская академия наук, Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования, Национальное общество усовершенствования врачей имени С.П. Боткина. Москва, 2019; Форум университетской науки – 2019 «Научное медицинское прогнозирование: молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния». Секция «Микробные биопленки: проблемы эрадикации в современной клинической практике» Москва, 2019.

Диссертация доложена, обсуждена и одобрена на межкафедральном заседании сотрудников кафедр: кариесологии и эндодонтии, микробиологии, вирусологии, иммунологии; лабораторий Научно-исследовательского медико-стоматологического института (НИМСИ МГМСУ им. А.И. Евдокимова): молекулярно-биологических исследований, проблем стоматологии – 10 июля 2020 года (протокол № 4).

Публикации

По теме диссертационной работы выполнено 13 научных публикаций, в том числе: 5 – в международной базе Scopus, 10 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Получено 3 патента РФ.

Личный вклад автора в исследование

Автором были разработаны основные идеи, дизайн и алгоритм проведенного исследования. Самостоятельно проведен подробный анализ современной специальной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автором проведено обследование и лечение больных с воспалительными заболеваниями пульпы – хроническим пульпитом. Освоены методы взятия и исследования клинического материала для получения микробиологических и иммунологических данных, с последующим анализом и трактовкой. Автором лично проводился забор биопроб, исследуемых в данной работе, и принималось непосредственное участие в подготовке, планировании и в дальнейшем проведении всех экспериментальных исследований. Диссертант лично выполнил структуризацию полученных результатов, провёл полную статистическую обработку материала, участвовал в написании статей по теме диссертации (80 % участия), формулировал текст диссертации, включая рекомендации.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

- Применение ультразвуковой активации фотосенсибилизатора способствует локальной доставки фотокомпонента к труднодоступным участкам системы корневых каналов;
- Стандартные и повышенные концентрации гипохлорита натрия способствуют деструкции стенок дентинных канальцев, формируя условия для возникновения воспалительных рецидивов;
- Применение фотодинамической терапии в комплексе с пониженной концентрацией антисептических препаратов позволяет компенсировать недостатки каждой методики в отдельности и способствует повышению клинической эффективности при лечении.

Объем и структура диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов клинико-лабораторных и экспериментальных методов исследования, глав собственных исследований, обсуждения и заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа состоит из 199 страницы машинописного текста. В тексте представлено 15 таблиц, 62 рисунков. Проанализировано 276 источников литературы, в том числе 148 отечественных и 128 зарубежных автора.

Диссертационная работа выполнена в рамках научно-отраслевой программы: «Вопросы этиологии, патогенеза, профилактики и лечения кариеса зубов и его осложнений» по проблеме 30.02 и входит в план НИР ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (№ государственной регистрации 114112840030).

Обоснование соответствия диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научных специальностей: 14.01.14 – стоматология - пункт 1 – изучение этиологии,

патогенеза, эпидемиологии, методов профилактики, диагностики и лечения поражений твердых тканей зубов (кариес и др.), их осложнений; 03.02.03 – микробиология - пункт 2 – выделение, культивирование, идентификация микроорганизмов; – пункт 6 – сапрофитизм, паразитизм, симбиоз микроорганизмов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Дизайн и методология исследования. На базе кафедры кариесологии и эндодонтии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава Российской Федерации проведено обследование 287 пациентов за период с 2017 по 2020 гг., с диагнозом К04.03 хронический пульпит, без присутствующей сопутствующей патологии. В ходе диспансерного наблюдения, в соответствии с поставленными задачами, критериями включения, не включения и исключения, одобренными Межвузовским комитетом по этике, в исследование было включено 157 человек, в возрасте от 21 до 59 лет.

На основании эпидемиологических, клинико-анамнестических и лабораторных данных были сформированы 2 основные и контрольная группы исследования:

В первую группу (контрольная – 40 человек) – антисептическая обработка корневых каналов проводилась по схеме: 3% раствор гипохлорита натрия; 17% раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); дистиллированная вода. Экспозиция применения гипохлорита натрия – 90 секунд.

Вторая группа (55 человек) – антисептическая обработка корневых каналов проводилась по схеме: 1,5% раствор гипохлорита натрия; 17% раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); фотодинамическая терапия (ФДТ) без ультразвуковой активации фотосенсибилизатора; дистиллированная вода. Экспозиция применения гипохлорита натрия – 300 секунд; экспозиция взаимодействия фотосенсибилизатора при ФДТ – 180 секунд, экспозиция световой активации при длине волны 660 нм – 1 минута.

Третья группа (62 человека) – антисептическая обработка корневых каналов проводилась по схеме: 1,5% раствор гипохлорита натрия; 17% раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); фотодинамическая терапия (ФДТ) с предварительной ультразвуковой активацией фотосенсибилизатора (частотой 2—40 кГц); дистиллированная вода; 1,0% водный раствор хлоргексидина с ультразвуковой активацией (по показаниям). Экспозиция применения гипохлорита натрия – 300 секунд; экспозиция взаимодействия фотосенсибилизатора при ФДТ – 180 секунд, экспозиция световой активации при длине волны 660 нм – 1 минута.

На этапе формирования клинических групп, у пациентов контрольной группы (до процедуры внутриканальной антисептической обработки) проводился фоновый забор содержимого корневых каналов

посредством сорбции исследуемого материала стерильными бумажными штифтами, с последующим помещением в жидкую транспортную систему Ди-Ингли (Himedia, Индия) и пробирки по типу Eppendorff с 0,5 мл стерильным физиологическим раствором. Образцы направлялись для дальнейшего исследования микробного фона с использованием бактериологического и молекулярно-биологического методов исследования. Так же, после процедуры дезинфекции корневых каналов, проводился повторный забор материала с целью оценки эффективности эрадикации патогенов.

Выбор фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии был обоснован предварительным экспериментом для выявления эффективности применяемого фотоагента в отношении определяемого микробного консорциума.

Методика латеральной компоновки холодной гуттаперчи (конусность .04 и .06) являлась основной, при проведении этапа константной обтюрации корневых каналов. Используемый силлер – «AH PLUS» (Dentsply, США).

Восстановление анатомической формы коронковой части зуба проводилось пломбированием с использованием светоотверждаемых композитов или протезированием (по показаниям).

Срок наблюдения за пациентом в динамике – третий и шестой месяц с проведением электроодонтодиагностики.

Для обоснования видового и родового микробного многообразия корневых каналов при хроническом пульпите использовалась методика полимеразно-цепной реакции (ПЦР-диагностика), а также бактериологический метод диагностики, с целью дальнейшего использования микробных культур в экспериментальной части исследования.

При молекулярно-биологическом методе исследования, определение ДНК бактерий облигатно-анаэробной и микроаэрофильной группы, а также постановку полимеразной цепной реакции осуществляли методом ускоренной пробоподготовки с помощью комплекса реактивов «Реалекс» (ООО НПФ «Генлаб», Россия).

Экспериментальные оценка обоснования выбора фотосенсибилизатора в отношении микробных консорциумов проводилась с использованием автоматической термостатирующей роторной системы программируемого культивирования в режиме реального времени – RTS-1 (Biosan, Латвия). Трактовка результатов осуществлялась по изменению показателя оптической плотности (показатель в единицах МакФарланда) при длине волны λ=850 нм.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова. С учетом закономерностей формирования

микробных ассоциаций в полости рта, были сформированы комбинированные бактериальные взвеси (mix-культуры) для дальнейшей оценки эффективности фотодинамического воздействия: **I комбинация** – *S. sanguis, E. faecalis, P. intermedia*; **II комбинация** – *S. constellatus, E. faecalis, A. actinomycetemcomitans*; **III комбинация** – *S. mutans, S. aureus, F. nucleatum*; **IV комбинация** – *C. albicans, C. tropicalis*. Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали конические центрифужные пробирки 50 мл с мембранным фильтром и закругленным дном, в которые добавляли стерильный питательный бульон, микробную взвесь и раствор фотосенсибилизатора (Fotosan, Фотодитазин, Гелеофор).

Световая активация исследуемых образцов осуществлялась в момент изменения фазы развития микробной популяции: переход с адаптивной в экспоненциальную. Время экспозиции – 150 сек.

По окончанию фотодинамического воздействия, пробирка помещалась обратно в биореактор для возобновления процесса культивирования.

Для подтверждения жизнеспособности культуры, а также корреляции оптической плотности с количественной характеристикой культивируемой комбинации, проводились высевы 1 мл взвеси на плотную питательную среду.

В эксперименте с обоснованием комбинированной дезинфекции корневых каналов на модели смешанного микробного консорциума использовали удаленные по ортодонтическим показаниям интактные зубы, которые в дальнейшем были использованы в качестве подложки для формирования модели смешанной биопленки.

После транспортировки в лабораторию, удаленные зубы были эндодонтически пролечены с учетом определения рабочей длины корневых каналов для предотвращения выведения кончика инструмента за апикальное отверстие. Далее, с помощью алмазного диска проводили сепарацию зуба продольно через центр канала в щечно-язычном направлении. Всего было подготовлено 35 зубов: контрольная группа – 11 зубов, исследуемая группа – 24 зуба (И1 – 12 зубов; И2 – 12 зубов).

Каждый из исследуемых образцов помещался в стерильную невентилируемую чашку Петри диаметром 100 мм и фиксировался в горизонтальном положении с помощью липкого воска. Чашка Петри заполнялась на ¼ питательным бульоном для культивирования анаэробов с витамином К и гемином, плотно закрывалась крышкой и помещалась в минианаэростат HiAnaerobic System Mark V (Himedia, Индия) с постоянным составом бескислородной газовой смеси, состоящей из 80% азота, 10% водорода, 10% углекислого газа, который в свою очередь устанавливался в шейкер-инкубатор ES-20 (BioSan, Латвия), обеспечивающий возвратно-поступательные движения в диапазоне 120 движений в минуту, формируя условия текучих сред.

Формирование смешанной биопленки осуществляется в несколько этапов: на начальном этапе производится внесение микроба с высокой адгезивной активностью – *Streptococcus sanguis* с последующим культивированием 24 часа, на следующем этапе, спустя еще 12 часов, проводят внесение представителя промежуточных колонизаторов - *Fusobacterium nucleatum*. На заключительном этапе формирования смешанной микробной биопленки вносят представителя красного комплекса пародонтопатогенов – *Prevotella intermedia*.

После проведенного культивирования, половинки зубов, исследуемых образцов, соединяли между с собой и фиксировали в вертикальном положении, используя заранее подготовленную силиконовую форму-ключ.

Проводилась обработка магистрального канала по следующей схеме:

- контрольная группа (К): медикаментозная обработка с использованием раствора гипохлорита натрия 3% с ультразвуковой активацией ирриганта;
- исследуемая группа была разделена на две подгруппы: И1 (12 единиц) – медикаментозная обработка с использованием методики фотодинамического воздействия с фотосенсибилизатором Фотодитазин; И2 (12 единиц) – медикаментозная обработка с использованием гипохлорита натрия 1,5% в комбинации с фотодинамическим воздействием, с предварительной ультразвуковой активацией антисептика и фотосенсибилизатора Фотодитазин.

Экспозиция применения гипохлорита натрия – 300 секунд; экспозиция взаимодействия фотосенсибилизатора при ФДТ – 180 секунд, экспозиция световой активации при длине волны 660 нм – 1 минута. Ультразвуковая активация проводилась с использованием эндодонтического устройства для промывки и дезинфекции корневых каналов – «Ultrasonic Scaler D7 LED» (DTE, Китай).

После проведенной медикаментозной обработки, образцы фиксировались в формалине и помещались в стерильные контейнеры для дальнейшего проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на базе ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ.

Статистический анализ. Предварительный этап клинико-статистического анализа показателей отражал, что распределение некоторых значений не подчинялось закону нормального распределения (по Гауссу), что не позволило использовать параметрические методики оценки. В связи с этим, в приоритете было использование непараметрических методов анализа: критерий Краскела — Уоллиса; критерий согласия Пирсона. Для статистического анализа экспериментальных методик автоматического культивирования использовался метод построения регрессионной зависимости (парабола второго порядка), с оценкой критерия Фишера и коэффициентом

корреляции Пирсона. Различия оценивалось как статистически значимые при $p<0,05$. При значении $p<0,001$ достоверность считалась высокой. Статистическая обработка проводилась с использованием пакетов прикладных компьютерных программ Statistica 12.0 (TIBCO Software Inc.), Microsoft Office 16.38 (Microsoft Corp.).

Результаты клинических и клинико-лабораторных исследований. В клинической части нашей работы мы сравнивали частоту диагностируемых осложнений при лечении пациентов с хроническим пульпитом. Оценка ближайших результатов эндодонтического лечения проводилась в сроки 2-4 дня после обтюрации корневого канала. Наблюдение в отдаленных сроках за пациентами проводилась в течение трех и шести месяцев, с обязательной оценкой ЭОД пролеченных зубов.

При клиническом обследовании пациентов, наибольший процент наличия неприятных ощущений и постпломбировочных болей (32,5%) отмечалось в контрольной группе (группа 1). Дискомфорт был отмечен в 13 случаях в группе из 40 пациентов.

В отдаленные сроки была проведена оценка в потребности повторного эндодонтического лечения, а также необходимость оперативного хирургического вмешательства. В исследуемых группах, где применялась методика фотодинамической терапии, отмечена картина достоверного снижения частоты случаев необходимости повторного эндодонтического вмешательства. На третий месяц, после проведенного лечения, у пациентов второй группы отмечалось снижение до 13% (8 человек), а у пациентов третий группы до 9% (5 человек). Спустя полгода, в группе 2 (лечение без применения ультразвуковой активации ФС), отмечалось увеличение процента необходимости повторного лечения относительно показателя на третий месяц (повышение на 27% - до 11 человек), а также при параллельном сравнении с контрольной группой. У пациентов третий группы, спустя 6 месяцев после проведенного вмешательства, потребность в повторном лечении корневых каналов требовалось лишь в 3 случаях из 55 человек, что составило 5,45%, и было достоверно ниже, относительно двух других групп. Анализируя показатели хирургического лечения осложнений, в двух группах (1 и 2) отмечается увеличение процентного числа случаев спустя полгода после проведенного лечения, относительно третьему месяцу наблюдений. У пациентов третий группы, где применялась методика с ультразвуковой активацией ирриганта и фотосенсибилизатора, процент хирургических осложнений спустя 6 месяцев был минимальный, вследствие единичных случаев.

Данные, полученные в ходе клинических наблюдений, отражают возможный и при этом высокоэффективный алгоритм по применению альтернативных методик дезинфекции в комбинационной обработке корневых каналов, с учетом возможности применения в каждом конкретном случае и наличие обоснованных показаний **(табл. 1)**.

Таблица 1. Результаты клинических исследований

Группа / Временной промежуток	**Постпломбировочные боли (%)**		
	1 группа	2 группа	3 группа
1 час после лечения	32,5	17,7*	16,4*
3 часа после лечения	25	6,5*	5,5*
Группа / Временной промежуток	**Повторное эндодонтическое лечение (%)**		
	1 группа	2 группа	3 группа
3 месяца	17,5	12,9*	9,1*
6 месяце	12,5	17,7	5,5*
Группа / Временной промежуток	**Хирургическое лечение осложнений (%)**		
	1 группа	2 группа	3 группа
3 месяца	12,5	9,7	5,5*
6 месяце	17,5	16,1	3,6*

**** статистически значимое различия при p<0,05***

Для оценки микробиологического фона корневых каналов, выделение и идентификацию представителей разных видов микробов проводили с использованием техники анаэробного культивирования и полимеразно-цепной реакции. Забор материала для анализа был произведен до обработки корневых каналов антисептическими препаратами. Исследование проводилось у пациентов контрольной группы – 40 человек: мужчины – 17; женщины – 23 **(рис. 1)**.

На долю облигатно-анаэробных и микроаэрофильных микробов, для выделения которых было необходимо создание анаэробиоза, приходилось 85,5% всех изолятов. К ним относились: пептострептококки, пропионибактерии, бактероиды, фузобактерии и другие грамотрицательные анаэробные палочки. Эта группа включала также микроаэрофильные коринебактерии, актиномицеты, α- и β-гемолитические стрептококки. На факультативно-аэробную группу приходилось меньшая часть микробного пейзажа – всего 14,5%. Она включала коагулазо-негативные стафилококки, энтерококки и грибы рода *Candida spp*.

Наличие пародонтопатогенных видов 1 и 2 порядка просматривалось в большей степени только там, где формировались мутуалистические взаимодействия межу начальными и промежуточными колонизаторами, в редких случаях они были обнаружены независимо.

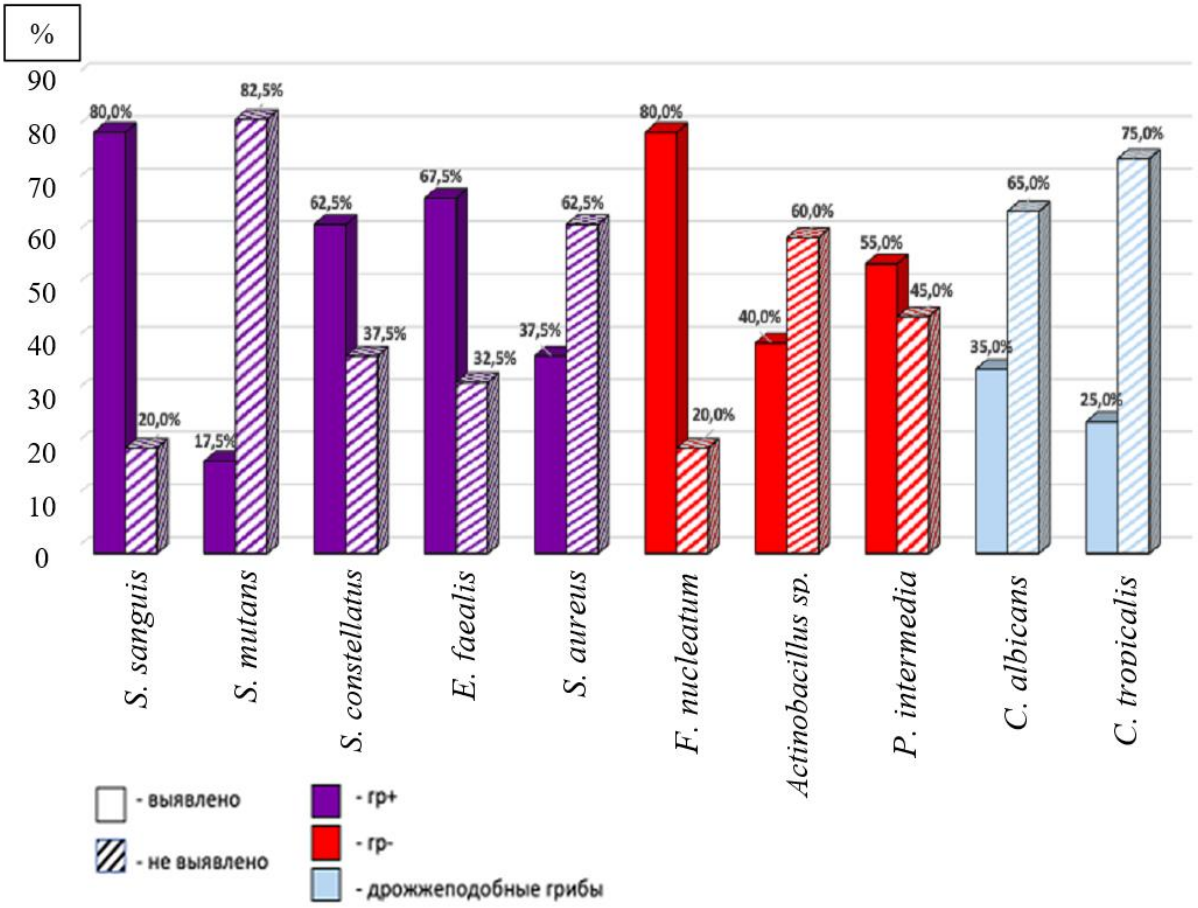

Рисунок 1. Частота выявления приоритетных видов микроорганизмов (контрольная группа=40 человек)

В целом следует подчеркнуть, что важной характеристикой состава эндодонтальной биопленки при хроническом пульпите, несомненно, является не только высокая частота выделения бактериальной и грибковой флоры, но ее количественная характеристика и показатели видовых соотношений **(табл. 2)**. Обращает на себя внимание достаточно большая частота выделения (более чем у половины исследуемых образцов) представителей пародонтопатогенной группы бактерий.

Таблица 2. Ожидаемые частоты (контр. гр. Фактор-отклик: S. sanguis – F. nucleatum – P. intermedia). Преодоление фильтра > 5, Пирсон хи-квадрат 20,2588, df=4, p=,000444

S. sanguis	***F. nucleatum***	***P. intermedia* не выявлено**	***P. intermedia* выявлено**	**итог**
не выявлено	**не выявлено**	0,7	0,8	1,6
не выявлено	**выявлено**	2,8	3,5	6,4
суммарный		3,6	4,4	8,0
выявлено	**не выявлено**	2,8	3,5	6,4
выявлено	**выявлено**	11,5	14,0	25,6
суммарный		14,4	17,6	32,0

Результаты экспериментальных исследований. В процессе проведения методики по программируемому автоматическому культивированию были получены кривые по тенденции роста и развития бактериальных mix-культур приоритетных эндодонтальных патогенов. Независимый анализ (в каждой комбинации) полученных результатов проводили в нескольких параллелях, в основе которых было отражено изменение параметров оптической плотности (интерпретация в единицах МакФарланда (mcf)), и был построен график, отражающая степень развития каждого исследуемого образца **(рис. 2)**. На кривой развития бактериальных клеток выделяют несколько участков (фаз развития), в каждой из которых имеется периодовое дробление. Присущая биохимическая и физиологическая активность в каждой фазе / периоде была индивидуальной, в зависимости от условий, формируемых в пробирке.

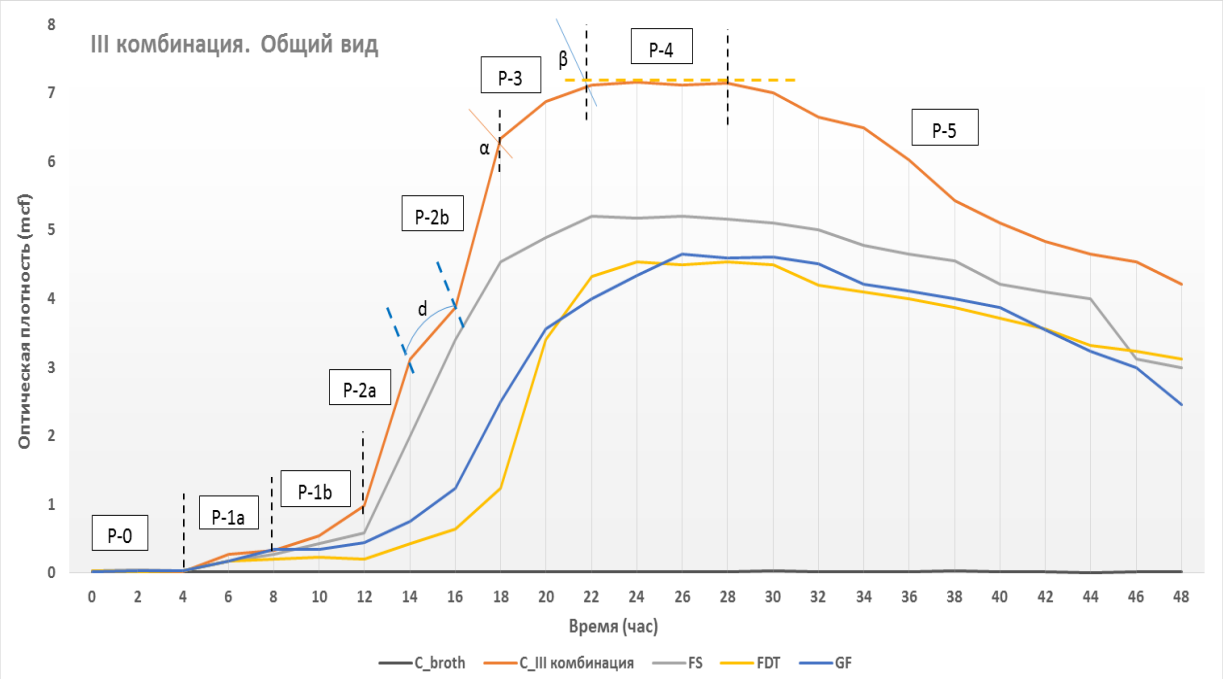

Рисунок 2. Автоматическое культивирование бактериального консорциума *S. mutans; S. aureus; F. nucleatum*. Общий вид.

По результатам проведенного экспериментального исследования с использованием методики автоматического культивирования, наибольшая эффективность при использовании методики фотодинамического воздействия отмечена с применением фотосенсибилизатора «Фотодитазин» **(рис. 3)**.

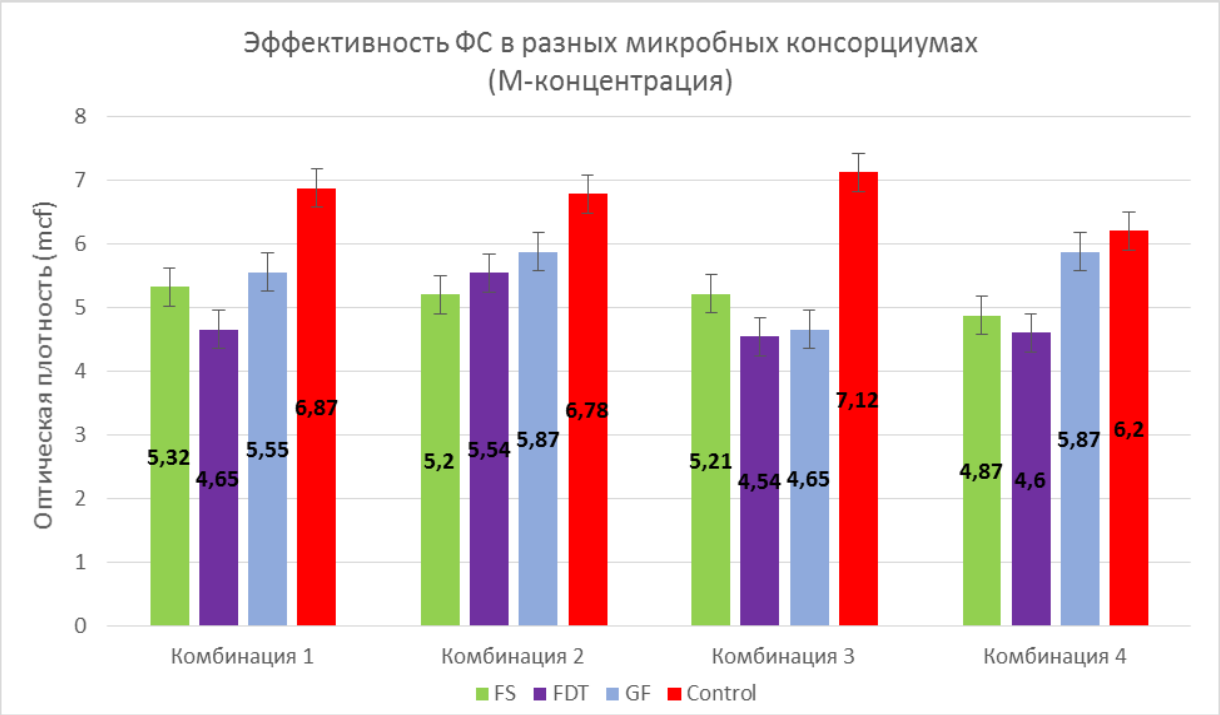

Рисунок 3. Эффективность применения фотосенсибилизаторов (максимальный валовой показатель биомассы)

Статистический анализ заключался в построении зависимости между имеющимися показателями (регрессия). Была введена гипотеза о том, что между фактором X (время) и фактором Y (оптическая плотность) есть парная зависимость по типу параболы второго порядка. К линейной регрессии, с ее методами проверки гипотез и анализом параметров, сводятся многочлены любого порядка. Учитывая тот факт, что после расчета необходимых данных и построение регрессионной зависимости, динамик исходных параметров и расчетных не всегда совпадала, была проведена проверка адекватности полученных результатов, для подтверждения возможности использовать указанную зависимость. Был применен критерий Фишера **(табл. 3)**.

Таблица 3. Сводная таблица статистических показателей регрессии

I комбинация	Y_расчет. средний	Критерий Фишера			коэф. Пирсон	шкала Чеддока (связь)
		F-табл	< / >	F-расчет		
Контроль	4,3	2,04	<	123,08	0,7	сильная / высокая
Fotosan	3,41	2,04	<	91,25	0,6	сильная / заметная
Фотодитазин	2,51	2,04	<	48,47	0,7	сильная / высокая
Гелеофор	3,0	2,04	<	46,14	0,7	сильная / высокая

II комбинация						
Контроль	4,19	2,04	<	71,34	0,5	средняя / умеренная
Fotosan	2,78	2,04	<	43,93	0,5	средняя / умеренная
Фотодитазин	2,99	2,04	<	49,96	0,5	средняя / умеренная
Гелеофор	3,16	2,04	<	42,97	0,4	средняя / умеренная
III комбинация						
Контроль	4,23	2,06	<	58,89	0,6	средняя / заметная
Fotosan	3,18	2,06	<	66,82	0,7	сильная / высокая
Фотодитазин	2,48	2,06	<	38,32	0,8	сильная / высокая
Гелеофор	2,58	2,06	<	52,67	0,7	сильная / высокая
IV комбинация						
Контроль	4,24	2,10	<	83,36	0,7	сильная / высокая
Fotosan	3,20	2,10	<	76,91	0,6	средняя / заметная
Фотодитазин	2,74	2,10	<	50,78	0,5	средняя / заметная
Гелеофор	3,77	2,10	<	68,53	0,5	средняя / заметная

Полибактериальная биопленка была создана путем последовательной инокуляции различных бактерий по поверхности дентина. Затем образцы инкубировали в течение 14 суток, и в течение данного периода проводились периодические проверки жизнеспособности бактериальной композиции, находящейся в бульоне, путем высевов на селективные питательные среды. Все манипуляции выполнялись в условиях ламинарного бокса, с соблюдением анаэробных условий сохранения культур. По результатам проведенной сканирующей электронной микроскопии была продемонстрирована созревшая, и покрывающая большую часть поверхности дентина, поливидовая микробная биопленка **(рис. 4)**.

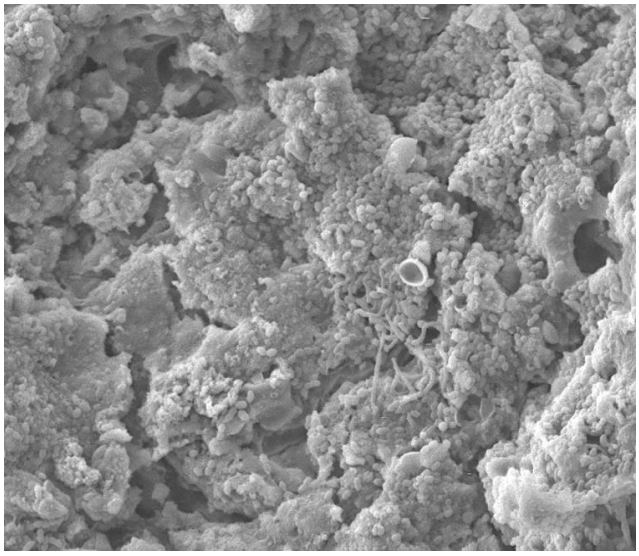

Рисунок 4.
Характер биоплёнки корневого канала до обработки (фон)

Структура биопленки в разных участках корневого канала отмечалась разной степенью толщины, что возможно было визуализировать с использованием большой степени увеличения при СЭМ. Дентинные канальцы были аналогично покрыты данной структурой, с явной картиной проникновения клеток и фрагментов биоплёнки в глубину.

В результате проведенной медикаментозной обработки были отмечены различия между образцами контрольной группы и группы сравнения. Бактериальные клетки, как в образцах контрольной группы, так и в группах сравнения, отличались полиморфизмом. Признаки деления были сохранены.

В целом, с определенной достоверностью можно сказать, что в образцах группы сравнения, количество бактериальных клеток было значительно меньшим, чем в контрольной группе. Однако, в образце И1 (применение фотодинамической терапии без комбинации с антисептическим препаратом), с разной степенью выраженности отмечалось наличие либо участков микробной биопленки, либо отдельных бактериальных клеток, что не позволяло говорить о полноценной микробной эрадикации **(рис. 5)**.

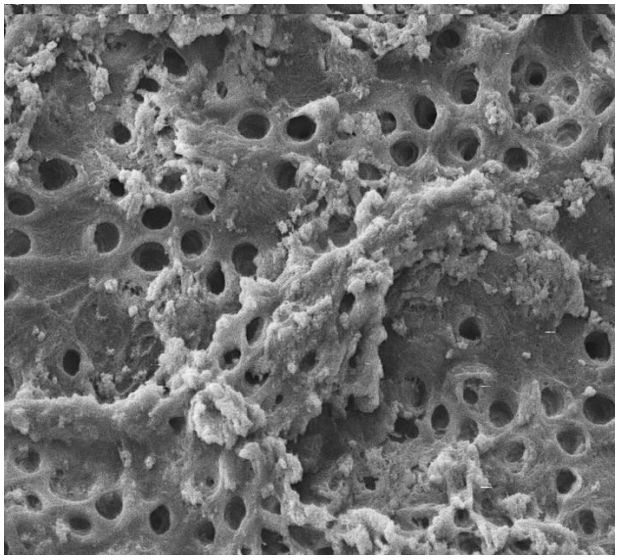

Рисунок 5. Дентинные канальцы. Ув. 8000х. Обработка – ФДТ с ФС Фотодитазин

При этом, в образцах, где использовался гипохлорит натрия в стандартной концентрации, отмечалось изменение ультраструктуры стенок дентинных канальцев с частичной ее деструкцией**.**

Визуализировалось наличие «западающего» конгломерата из фрагментов стенки и микробной флоры в глубину канальца, тем самым создавая условия для повторной самоорганизации и формирования биопленки сначала в проходе дентинного канальца, а затем и на его поверхности снаружи **(рис. 6)**.

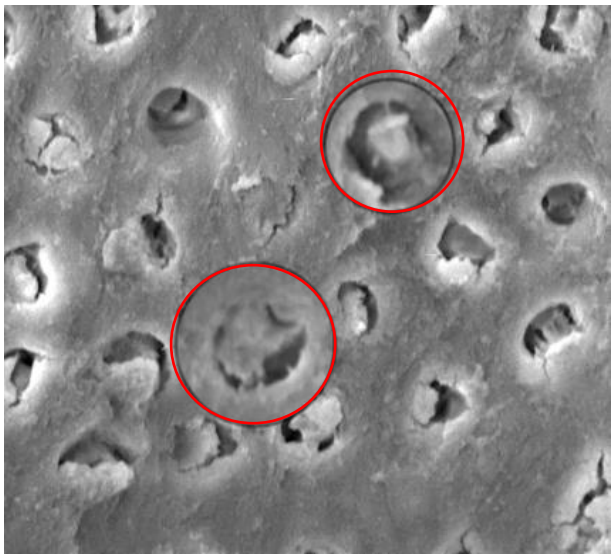

Рисунок 6. Дентинные канальцы. Ув. 12000х. Обработка – Гипохлорит натрия 3%

Из-за их небольшого размера бактерии внутри дентинных канальцев могут быть обнаружены чаще в виде отдельных клеток, но при этом, в 40% случаев встречаются фрагменты биопленки, особенно когда образцы визуализируются при большом увеличении.

При использовании фотодинамического воздействия подобной деструкции не наблюдалось. Микробный пейзаж имел сходный видовой состав, а фрагментов биопленки и отдельных клеток наблюдалось больше только в том варианте обработки, где применение ФДТ было без комбинации с антисептиком. Гипохлорит натрия в пониженной концентрации до 1,5% не оказывал деструктивного воздействия в отношении стенок дентинных канальцев, и в совокупности с фотодинамическим воздействием достигалось повышение синергетического эффекта в отношении микробной эрадикации **(рис. 7)**.

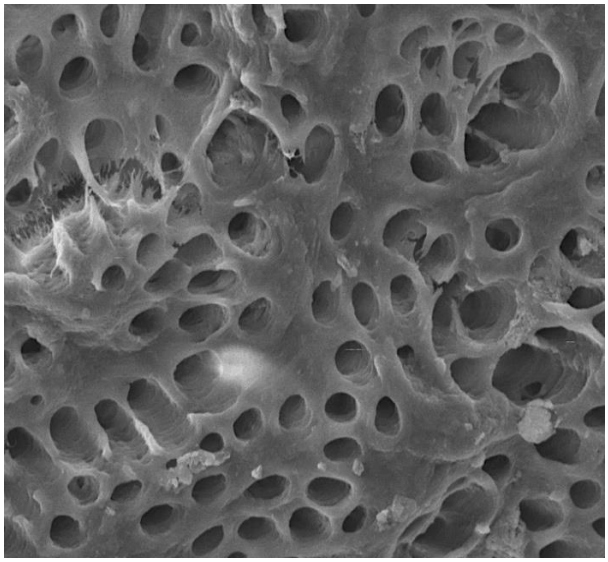

Рисунок 7. Дентинные канальцы. Ув. 8000х. Обработка – гипохлорит натрия 1,5% + ФДТ с ФС Фотодитазин

Стоит отметить, что полной эрадикации патогенов при сонофотодинамической терапии (СФДТ) всё-таки не наблюдалось. В данном случае это, по-видимому, связано с тем, что бактериальные клетки способны избирательно адсорбировать и накапливать молекулы

фотосенсибилизатора. Однако, сохраненная структура стенок дентинных канальцев способствовала более свободному проникновению светопоглощающих растворов в глубину, и в комбинации с антисептиком позволило достичь лучшей степени очистки.

ВЫВОДЫ

1. При инфекционном воспалении пульпы зуба в составе микробной биопленке отмечается абсолютное доминирование представителей облигатно-анаэробных и микроаэрофильных видов бактерий (до 95%);
2. При анализе динамики роста комбинированных популяций бактерий и грибов были установлены различия в наступлении максимума размножения (стимуляции роста) при применении различных классов фотосенсибилизаторов: средняя задержка лог-фазы для фотосенсибилизатора FDT >21,2% относительно FS и GF. М-концентрация FDT<9,1% относительно FS и GF. Коэффициент корреляции Пирсона при расчете регрессионной зависимости: FDT – 0,65; FS – 0,6; GF – 0,57;
3. Комплексный подход во время эндодонтического лечения, с использованием ультразвуковой обработки и фотодинамической терапии, позволяет добиться наилучшего эффекта эрадикации патогена по сравнению с стандартной ручной методикой, что подтверждается оценкой деструктивного действия физических воздействий на смоделированную микробную биоплёнку при сканирующей электронной микроскопии. Снижение частоты возникновения постпломбировочной боли на 78% (группа №3 относительно группы №1). Снижение частоты необходимости повторного эндодонтического вмешательства на 56% (группа №3 относительно группы №1) и на 69% (группа №3 относительно группы №2). Снижение частоты необходимости хирургического вмешательства на 79,5% (группа №3 относительно группы №1) и на 77% (группа №3 относительно группы №2);
4. Применение пониженной концентрации антисептических препаратов способствует сохранению структуры дентинных канальцев, и в комплексной обработке с использованием ФДТ способствует лучшей эрадикации патогенов, без существенного деструктивного воздействия: группа контроль – группа И1 (критерий Краскела — Уоллиса: H (1, N= 23) =9,979661 p =,0016); группа контроль – группа И2 (критерий Краскела — Уоллиса: H (1, N= 23) =11,18242 p =,0008);
5. Применение альтернативной методик эндодонтической дезинфекции корневых каналов с помощью фотосенсибилизирующей системы, необходимо проводить исключительно с точечным подбором фотосенсибилизатора, с учетом микробной картины эндодонтальной биопленки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Комбинированное применение методики фотодинамической терапии и ультразвуковой активации фотосенсибилизирующего агента (с целью достижения деконтаминирующего эффекта), может быть рекомендовано как этап медикаментозной обработки корневого канала при лечении хронического пульпита у пациентов, по следующей схеме (патент на изобретение RU 2707502 C1, 27.11.2019. Заявка № 2019103563 от 08.02.2019):

- раствор гипохлорита натрия с концентрацией 0,5-1,0% в объеме 1-15 мл;
- фотодинамическая терапия с ультразвуковой активацией фотосенсибилизатора (20-40 кГц);
- дистиллированная вода;
- с концентрацией 0,12-1,0% и объемом 1-20 мл с ультразвуковой активацией (20-40 кГц).

2. Использование полимерных материалов в качестве подложки для развития и формирования микробной анаэробной биоплёнки, с последующим изучением процессов первичной микробной адгезии под контролем сканирующей электронной микроскопии (патент на изобретение RU 2619169 C, 12.05.2017. Заявка № 2015149913 от 20.11.2015).

Использование фрагментов твердых тканей зубов (дентин) в качестве подложки для развития и формирования смешанной пародонтопатогенной микробной биоплёнки, с последующим изучением процессов первичной микробной адгезии под контролем сканирующей электронной микроскопии (патент на изобретение RU 2661114 C1, 11.07.2018. Заявка № 2017140664 от 22.11.2017).

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ:

1) Царев В.Н. Экспериментальное обоснование эндодонтического лечения хронических форм пульпита и периодонтита с использованием фотоактивируемой дезинфекции и ультразвуковой обработки / В. Н. Царев, **М.С. Подпорин**, Е.В. Ипполитов, Г.А. Автандилов, Т.В. Царева // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.** [Scopus] — 2016. — № 9. — С. 66-73.

2) Царев В.Н. Микробная биопленка корневых каналов и новые подходы к диагностике и лечению хронических форм пульпита с использованием фотоактивируемой дезинфекции и ультразвуковой

обработки / В. Н. Царев, А.В. Митронин, **М.С. Подпорин** // **Эндодонтия today.** — 2016. — № 3. — С. 19-23.

3) Царев В.Н. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции полости рта и грибы рода Candida в экспериментальных и клинических исследованиях / В. Н. Царев, А. В. Митронин, Е. В. Ипполитов, Т. Т. Малазония, **М. С. Подпорин**, Л. А. Манучарян // **Эндодонтия today.** — 2015. — № 3. — С. 15-20.

4) Царев В.Н. Применение системы самоадаптирующихся файлов (SAF) для борьбы с микробной биопленкой корневых каналов при лечении апикального периодонтита / В. Н. Царев, Л.А. Мамедова, Т.Н. Сиукаева, **М.С. Подпорин** // **Стоматология.** [Scopus] — 2016. — Т. 95, № 6. — С. 26-28.

5) Царев В.Н. Применение сканирующей электронной микроскопии и биореактора для оценки эрадикации микробной биопленки корневых каналов при эндодонтическом лечении / В. Н. Царев, **М.С. Подпорин**, Е.В. Ипполитов // **Клиническая лабораторная диагностика.** [Scopus] — 2017. — Т. 62, № 8. — С. 506-512.

6) Царев В.Н. Сравнительная оценка фотодинамического воздействия на рост популяций дрожжевых грибов Candida / В. Н. Царев, Е.В. Ипполитов, Л.Я. Плахтий, **М.С. Подпорин**, С.Т. Ильясова, Г.Д. Ахмедов // **Клиническая стоматология**. — 2017. — Т. 83, № 3. — С. 20-25.

7) Царев В.Н. Оценка фотодинамического воздействия на рост популяций дрожжевых грибов Candida, выделенных из слизистой оболочки полости рта / В. Н. Царев, Е.В. Ипполитов, Л.Я. Плахтий, **М.С. Подпорин**, С.Т. Ильясова, Г.Д. Ахмедов // **Проблемы медицинской микологии.** — 2017. — Т. 19, № 3. — С. 45-50.

8) Царев В.Н. Контроль первичной адгезии микроорганизмов и формирования биоплёнок на стоматологических материалах, используемых для трансдентальной имплантации при зубосохраняющих операциях / В. Н. Царев, А.Г. Степанов, Е.В. Ипполитов, **М.С. Подпорин**, Т.В. Царева // **Клиническая лабораторная диагностика.** [Scopus] — 2018. — Т. 63, № 9. — С. 568-573.

9) Самусенков В.О. Обоснование применения фотодинамической терапии в экспериментальных исследованиях in vitro со штаммами пародонтопатогенных бактерий и грибов Candida / В.О. Самусенков, В.Н. Царев, Е.В. Ипполитов, **М.С. Подпорин**, С.Т. Ильясова // **Стоматология для всех.** — 2019. — Т. 87, № 2. — С. 34-41.

10) Сидоренко В.О. Микробный пейзаж дентина удаленных третьих моляров / В. О. Сидоренко, А.М. Панин, А.М. Цициашвили, **М.С. Подпорин**

// **Вестник российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.** — 2020. — Т. 24, № 1. — С. 52-60.

11) Крджацян Л.Р. Клинико-лабораторное обоснование антимикробной эффективности фотодинамической терапии с разными фотосенсибилизаторами при лечении воспалительных заболеваний полости рта / Л.Р. Крджацян, А.А. Силогава, **М.С. Подпорин** // Медицинские этюды: Сборник тезисов научной сессии молодых учёных и студентов 2018, Нижний Новгород, 21-22 марта 2018. — Нижний Новгород: Приволжский исследовательский медицинский университет, 2018.

12) Подпорин М.С. Обоснование выбора фотосенсибилизатора и условия антимикробной эффективности фотодинамической терапии при местных инфекционно-воспалительных процессах / **М.С. Подпорин**, Е.В. Ипполитов, А.А. Лабазанов, В.О. Самусенков, В.Н. Царев // Бактериология. — 2017. — Т. 2, № 3. — С. 91-92.

13) Samusenkov V.O. Substantiation of use of photodynamic therapy in experimental research in vitro with strains of periodontopathogenic bacteria and fungi Candida / V. O. Samusenkov, V.N. Tsarev, E.V. Ippolitov, **M.S. Podporin**, A.V. Yumashev, N.N. Vlasova, V.V. Borisov, T.V. Tsareva // **Journal of global pharma technology.** [Scopus] — 2020. — Vol. 12, № 2. — p. 178-186.

14) Способ комплексной обработки системы корневого канала зуба при лечении воспалительных заболеваний пульпы: **пат. 2707502** C1 Российская Федерация / **М. С. Подпорин** [и др.]. — № 2019103563; заявл. 08.02.2019; опубл. 27.11.2019.

15) Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий in vitro: **пат. 2661114** C1 Российская Федерация / Т. Н. Сиукаева [и др.]. — № 2017140664; заявл. 22.11.2017; опубл. 11.07.2018.

16) Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред in vitro: **пат. 2619169** C Российская Федерация / Е.В. Ипполитов [и др.]. — № 2015149913; заявл. 20.11.2015; опубл. 12.05.2017.

Подписано в печать: 02.12.2020
Формат А5
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Тираж 100 Экз.
Заказ №21637
Типография ООО "Цифровичок"
117149, г. Москва, ул. Азовская, д. 13