

АБДРАХМАНОВ АЙРАТ КАМИЛЕВИЧ

**Клинические особенности и структура микробиоты
тканей пародонта у лиц молодого возраста**

14.01.14 – СТОМАТОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискателя ученой степени
кандидата медицинских наук

ПЕРМЬ – 2019

Работа выполнена на кафедре стоматологии детского возраста в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Мамаева Елена Владимировна - доктор медицинских наук, профессор кафедры стоматологии детского возраста ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России

Официальные оппоненты:

Николаев Александр Иванович - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапевтической стоматологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Мандра Юлия Владимировна – доктор медицинских наук, профессор кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Уфа).

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.067.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет» имени академика Е.А. Вагнера Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г.Пермь, ул.Петропавловская д.26.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет» имени академика Е.А. Вагнера Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г.Пермь, ул.Петропавловская д.26 и на сайтах: rector@psma.ru, vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Мудрова Ольга Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Полость рта человека населена многочисленными микроорганизмами, формирующими одно из наиболее разнообразных микробных сообществ организма человека и представленными более чем 700-тью видами бактерий, часто не культивируемых на простых питательных средах (Зорина О.А., 2011; Belibasakis G.N., 2019; Kreth, J., 2009; Krishnan, K., 2017; Papaioannou W., 2009; Paster V.J., 2006; Redanz S., 2011). Особенности видового состава микрофлоры полости рта определяют многочисленные эндо- и экзогенные, местные и системные факторы: уровень гигиенических знаний и навыков, воздействие окружающей среды и климата, особенности питания, наследственная предрасположенность, различная соматическая патология (заболевания эндокринной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, опорно-двигательной систем), а также вредные привычки и уровень психоэмоционального напряжения (Катола В.М., 2018; Кузнецова Н.С., 2017; Лобода Е.С., 2010; Орехова Л.Ю., 2009; Цепов, Л.М., 2007). Действия этих факторов на ткани пародонта проявляются неодинаково и зависят от состояния регуляторных механизмов защиты полости рта и вегетативно-иммунологического состояния организма (Ермольев С.Н., 1994). Большинство авторов рассматривают полость рта как экологическую систему, в которой различные биологические факторы, совместно взаимодействуя, вызывают неодинаковые патологические процессы (Модина Т.Н., 2006; Kukletova M, 2012; Masamatti S.S., 2012).

Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) по-прежнему составляют актуальную, не до конца решенную проблему современной стоматологии в связи с сохраняющимся высоким уровнем распространенности гингивита и пародонтита у населения различных популяций, частой манифестацией первых клинических проявлений у лиц молодого трудоспособного возраста, развитием хронического прогрессирующего течения у лиц с сочетанной системной патологией, частотой развития осложнений на фоне нерационального, нередко преимущественно симптоматического, не учитывающего необходимость элиминации всей многообразной пародонтопатогенной флоры, пародонтологического лечения (Аболмасов Н.Н, 2003; Ашуров К.И., 2012; Водолацкий М.П., 2012; Ефимова О.В., 2008; Хайбуллина Р.Р., 2016). В течение последних десятилетий выросли показатели распространённости воспалительных заболеваний пародонта, и существенно поменялась, в сторону повышения более тяжёлых форм, их дифференциальная структура (Ашуров, К.И., 2012; Байбакова О.В., 2009). По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 80% 15-18-летних жителей планеты страдают гингивитом или начальной стадией генерализованного пародонтита. У жителей Российской Федерации частота воспалительных заболеваний пародонта достигает 62-94% (Лукичев М.М., 2018), причем у лиц в возрасте 18-24 лет, проживающих в различных регионах России, распространённость ВЗП составляет от 83,6% до 96,6% (Орехова Л.Ю., 2012). Также в последнее время произошло резкое увеличение числа лиц молодого возраста с тяжелыми деструктивными и атрофическими изменениями пародонта (Безрукова И.В., 2002).

Особая медико-социальная группа молодежи – студенты очной формы обучения, при существующей организации учебного процесса испытывают постоянное переутомление, находятся в психоэмоциональном напряжении, не имеют возможности полноценного рационального питания, большинство студентов не обладает информацией о способах поддержания и укрепления здоровья, а также не расценивают наличие имеющихся у них симптомы патологии пародонта, как проявление заболевания. Правильные представления об этиологии ВЗП имеют только 9,4 из 100 студентов; комплекс мероприятий по уходу за полостью рта правильно выполняют лишь 2,1% студентов) (Ширшова, Н.Е., 2007). Ведущим фактором риска возникновения ВЗП у

студентов считается неудовлетворительный уровень гигиены полости рта (Ширшова Н.Е., 2006).

Неблагоприятное местное влияние на возникновение ВЗП в молодом возрасте могут оказывать травма десневого края некачественными пломбами, коронками, наличие зубного камня, особенности строения мягких тканей преддверия, частичная адентия, травматическая окклюзия. Среди общих факторов значимы курение, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы (критерий Лямбда-Уилкса $< 0,001$) (Ширшова, Н.Е., 2007).

На сегодняшний день актуальна разработка стандартов диагностики заболеваний пародонта (в том числе, с учетом особенностей у лиц молодого возраста), которые могут использоваться в повседневной практике врача-стоматолога (Кулыгина, В.Н., 2013; Юдина, Н.А., 2011). Выбор диагностических алгоритмов определяется, в том числе, преимуществами и недостатками каждого метода. Ограничения цитологического метода связывают с возможностью наличия микрофлоры, без возможности определения вида возбудителя и чувствительности к противомикробным средствам. Более информативный, достаточно затратный метод жидкостной цитологии также не дает возможности определения чувствительности к противомикробным средствам. Бактериологическая диагностика позволяет установить видовой состав и чувствительность к антибактериальным препаратам, но, будучи еще более дорогим, имеет чувствительность к забору и транспортировке материала. Метод ПЦР позволяет с высокой точностью определить видовой состав микрофлоры, не требователен к забору и транспортировке материала, дает возможность определения чувствительности к антибактериальным препаратам, однако имеет высокую стоимость и возможны ложные результаты (Медведева Л.С., 2018). Таким образом, комплексная микробиологическая диагностика ВЗП, не всегда представляет развернутую оценку микробиологического представительства во всех биотопах полости рта. Микробиота полости рта человека остается недостаточно изученной, что в значительной степени связано с существованием смешанных микробных биопленок и наличием в их составе неизвестных науке бактерий, обозначаемых как «некультивируемые» и «пока не культивируемые» (Цепов Л.М., 2018; Цепов Л.М., 2010). Это объясняется выраженной взаимозависимостью микробов, при которой внутри смешанных биопленок происходит обмен жизненно важными факторами, которые тот или иной микроорганизм не в состоянии продуцировать сам и которые отсутствуют в использованных питательных средах. Очевидно, что такие бактерии, относятся к «пока не культивируемым», поскольку имеющиеся методы не позволяют воспроизвести все условия в лаборатории, требующиеся данным микроорганизмам для роста в виде чистых культур (Вечерковская М.Ф., 2015; Тец В.В., 2012; Fava F., 2011).

Метагеномика – один из самых развивающихся разделов геномики, посвященный изучению генетического материала (метагенома) сообществ микроорганизмов в совокупности [269]. Важной особенностью метагеномных исследований можно считать отсутствие необходимости в изоляции и культивировании микроорганизмов (Курильщиков А.М., 2012; Nakamura S., 2008). Наиболее изучены метагеномы желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей, вовлеченные в ключевые процессы организма (Курильщиков А.М., 2012). Патогенез большинства заболеваний и, соответственно, особенности их патогенетического лечения связаны с изменением ферментативной и биохимической активности микрофлоры, что предопределяет возрастающий научный интерес к метагеномным исследованиям в медицине и стоматологии (Uronis J.M., 2009; Wu S., 2009).

В специальной литературе большее внимание уделено анализу местных факторов пародонтопатогенного риска, роли микробной колонизации и образования бактериальной биопленки на поверхности тканей зуба и десны (Балашов, А.Н., 1992; Дмитриева, Л. А., 2007; Дмитриева, Л. А., 2002; Зеленова, Е.Г., 2003; Иванов В.С., 2001; Луцкая И.К., 2010; Davies R.M., 2000; Marchant S., 2001). Воспалительная реакция играет

ключевую роль в повреждении ткани пародонта (Абдулмеджидова Д.М., 2017) Возрастные аспекты образования микробных биопленок у лиц молодого возраста изучены недостаточно. Вместе с тем, рост распространенности ВЗП у всего населения и все более молодой возраст пациентов пародонтологического профиля свидетельствуют о том, что применяемые методы диагностики несовершенны, а существующие методы лечения недостаточно эффективны (Слободина Е.В., 2008).

Одним из перспективных направлений в стоматологии, способствующих снижению распространенности и интенсивности заболеваний пародонта, является разработка и внедрение методов ранней пародонтологической диагностики и лечения (Кулыгина В.Н., 2013).

Исследования, отражающие профиль представленности и обосновывающие роль различных (хорошо изученных и малоисследованных) маркеров микробного происхождения в поддержании микробного гомеостаза полости рта, а также в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта, весьма многочисленны, но часто не систематизированы, весьма разночтивны, требуют конкретизации применительно к конкретным возрастным группам пациентов, особенно лицам молодого возраста (Зеленова, Е.Г., 2004; Зорина О.А., 2011; Hamlet S., 2004; Moore W.E., 1982; Siddharth M., 2013). Вышесказанное послужило основанием для проведения настоящего научного исследования.

Степень разработанности темы исследования

В многочисленных фундаментальных и прикладных работах доказано, что пародонтопатогены выполняют основную патогенетическую роль в развитии ВЗП у лиц различного возраста, причем микробным маркерам отводится иницирующая роль в развитии патологии (Садовский В. В., 2008; Цепов Л.М., 2009; Шибаета, А.В., 2017; Ximenez-Fyvie L.A., 2000). Ximenez-Fyvie L.A. и соавт. в 2000 году впервые с помощью методов молекулярной таксономии определили основную роль пародонтопатогенов в развитии пародонтита. В последние годы появился ряд исследований по характеристике состава микробиома пародонта с применением методов метагеномного секвенирования (Шибаета А.В., 2017; Jünemann S., 2012), однако уровень репрезентативности клинико-микробиологических наблюдений невысок, актуальная проблематика не раскрыта в возрастном аспекте, не учитывает специфику лиц молодого возраста.

Таким образом, роль маркеров микробного происхождения в развитии воспалительных заболеваний пародонта до сих пор остается не достаточно изученной и сохраняет актуальность как значимая научно-практическая медицинская и стоматологическая проблема.

Цель исследования – совершенствование методических подходов к диагностике воспалительных заболеваний пародонта на основе протеомного и метагеномного анализа микробиоты пародонтальных пространств и выявления нанообъектов в ротовой жидкости пациентов молодого возраста.

Задачи исследования:

1. Изучить распространенность и клиническую структуру воспалительных заболеваний пародонта у лиц 18-19 лет, проживающих на территории Республики Татарстан.
2. На основе протеомного анализа определить родовую и видовую структуру микроорганизмов пародонтальных пространств при интактном пародонте, хроническом катаральном гингивите и хроническом пародонтите легкой степени тяжести у пациентов в возрасте 18 – 19 лет.

3. Выполнить сравнение геномного состава микробиоты пародонтальных пространств интактного пародонта, катарального гингивита и пародонтита легкой степени тяжести у лиц молодого возраста.
4. На основе данных электронной микроскопии определить наличие и представить качественные характеристики нанообъектов в ротовой жидкости лиц с интактным пародонтом и пациентов с гингивитом при наличии твердых зубных отложений.

Научная новизна исследования.

Впервые изучены особенности протеомного профиля микробиома пародонтальных пространств на ранних стадиях воспалительных заболеваний пародонта у лиц 18-19 лет – жителей Республики Татарстан, связанные со статистически значимым увеличением доли семейств *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2.127), *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB (2.208), *Corynebacterium variabile* DSM 20132 TDSM (1.71), *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM (2.053). *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB и *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM *Corynebacterium variabile* DSM 20132 TDSM, а также выявлением неопределенных филотипов на уровне родов TM7-3, *Mogibacteriaceae*.

Установлен новый научный факт частого образования ассоциаций филотипов *Fusobacterium*, *Veillonella* в биотопе десны при гингивите, отражающий инициальный этап воспаления пародонта у лиц молодого возраста.

На основе комплексного подхода с использованием протеомного и метагеномного анализа впервые установлены клиничко-микробиологические параллели, характеризующие состояние здоровья пародонта и его отклонения на ранних стадиях воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Результаты исследования позволяют расширить современные представления о развитии воспалительных заболеваний пародонта у молодых людей в возрасте 18 – 19 лет, с углубленной оценкой роли маркеров микробного происхождения. Предложенный комплекс, включающий клинические методы, определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и метагеномный анализ позволил дать оценку характеру изменений архитектуры микробного сообщества пародонтальных пространств у пациентов молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта, обосновать изменения в тактике ведения пациентов и внести соответствующие коррективы в тактику ведения пациентов.

Проведен сравнительный анализ геномного состава микробиот зубодесневой борозды и пародонтального кармана у условно здоровых пациентов в возрасте 18-19 лет, идентифицировано 183 филотипа на уровне родов, относящиеся к 17 филам, найдены уникальные микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах. Установленный уровень геномного состава микробиот может быть использован в качестве исходных материалов для решения различных клинических и микробиологических задач, в том числе, для прогнозирования течения заболевания и обоснования тактики лечения пациентов.

Для студентов стоматологического факультета подготовлено и издано учебное пособие: «Комплексный подход в диагностике и лечении хронического пародонтита у подростков» [протокол №4 от 10. 12. 2015 г. заседания ЦКМС ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России], составленное в соответствии программой дисциплины «Детская стоматология», модуль «Детская стоматология», раздел «Болезни пародонта у детей и подростков», который изучается на девятом семестре и относится к циклу профессиональных дисциплин образовательного стандарта высшего профессионального медицинского образования 31.05.03 «Стоматология».

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Диссертация выполнена в дизайне проспективного исследования с использованием клинических, инструментальных, лабораторных и статистических методов.

В начале работы осуществлено эпидемиологическое исследование с целью выявления факторов риска, которым подвержены молодые люди 18-19 лет. Затем было проведено комплексное стоматологическое обследование пациентов (с акцентом на оценку пародонтологического статуса). Далее было выполнено определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов методом прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии. Определен состав метагенома зубодесневого соединения и пародонтального кармана по результатам ДНК секвенирования. В результате электронной микроскопии (методом негативного контрастирования) были найдены нанообъекты размером 20-200нм.

В конце работы проведен статистический анализ полученных данных и сформированы практические рекомендации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Пародонтологический статус пациентов молодого возраста – жителей г. Казань (18-19 лет) характеризуют: высокая (53,25%) распространенность воспалительных заболеваний пародонта, преимущественно на ранних стадиях, катарального гингивита и хронического пародонтита легкой степени тяжести (23,3%) при неудовлетворительном уровне гигиены полости рта (ГИ = 1,2), что отражает недостаточное качество стандартных методов диагностики и лечения заболеваний пародонта и предопределяет необходимость совершенствования существующих лечебно-диагностических подходов.

2. Практическое применение протеомных и метагеномных исследований микробиоты пародонтальных пространств в комплексе с наноуровневым анализом ротовой жидкости позволяет повысить уровень диагностики ранних стадий воспалительных заболеваний пародонта, обосновывает патогенетическую направленность лечения и профилактики гингивита у пациентов молодого возраста.

Степень достоверности и апробация диссертации

Работа выполнена по плану НИР ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России (ректор – д.м.н., профессор А.С. Созинов) на кафедре стоматологии детского возраста (зав. кафедрой – к.м.н., доцент Р.М. Сафина). Результаты исследования используются в практической работе врачей-стоматологов стоматологической клиники ООО «Камил-Дент» г. Казани, стоматологической поликлиники ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России г. Казань, ГАУЗ «РСП МЗ РТ» г. Казань. Полученные данные, отображающие особенности распространенности и структуры воспалительных заболеваний пародонта у молодых лиц, практическое применение протеомных и метагеномных исследований микробиоты пародонтальных пространств в комплексе с наноуровневым анализом ротовой жидкости, включены в лекционную программу и используются при проведении практических занятий на кафедре стоматологии детского возраста и терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

Материалы диссертации были доложены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Стоматология XXI века», посвященная Ф.С. Хамитову, Чебоксары. – 2015г. (20 марта); на IV-ой Всероссийской научно-практической

конференции «Профессорские чтения им. Г.Д. Овруцкого. «Актуальные вопросы стоматологии», г.Казань. – 2016г. (март); на VIII-ой Российской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье человека в XXI веке», г.Казань. – 2016г. (31 марта); на международной конференции XV international research and practice conference «European Science and Technology», Munich, Germany. – 2016 (14 – 15 December); на 90-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, г.Казань. – 2016г. (13 апреля); IX Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке, г.Казань. – 2017г. (30 марта); на 90-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Казань – 2017г. (13 апреля); на Евразийском конгрессе «Стоматологическое здоровье детей в XXI веке», г.Казань. – 2017г. (20 апреля); на 1 Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии детского возраста», г. Казань. – 2018г. (9 февраля).

Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на заседании кафедры стоматологии детского возраста ФГБОУ ВО Казанский ГМУ (выписка из протокола №6) Минздрава России 7 декабря 2017 г., заседании предметно – проблемной комиссии по научным проблемам стоматологии кафедр стоматологии детского возраста, челюстно – лицевой хирургии, терапевтической и ортопедической стоматологий ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России 14 апреля 2018 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 15 печатных работ, в том числе 4 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ

Личный вклад автора в выполнение исследования

Автором осуществлены анализ литературных источников, ретро- и проспективный анализ лечения пациентов. Проведены сбор данных, систематизация и статистическая обработка показателей, полученных в результате исследования. Автором лично проводился забор и транспортировка биоматериала в микробиологическую лабораторию. Диссертант обобщил полученные результаты исследования, подготовил материалы для публикации и выполнил написание и оформление диссертации и автореферата. Личный вклад автора составляет 90%.

Объём и структура диссертации

Диссертация представлена рукописью на русском языке объемом 183 машинописных страниц, построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы; главы с описанием материалов и методов исследования; главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 422 наименований работ, в т.ч. 195 отечественных и 227 иностранных источников. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 10 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Основой для формирования групп на всех этапах исследования явилась оценка пародонтологического статуса с выделением следующих клинических состояний:

интактный пародонт, хронический генерализованный катаральный гингивит и хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести.

Таблица 1 – Критерии включения и исключения пациентов в группы наблюдения

№	Критерии включения пациентов в группу наблюдения:	Критерии исключения из группы наблюдения:
1	Согласие на участие в исследовании	Отказ от участия в исследовании на любом этапе
2	Возраст 18-19 лет.	Возраст младше 18 лет и старше 20 лет
3	Находились на учете у пародонтолога.	Не посещали пародонтолога
4	Не имели вредных привычек (алкогольную, табачную и наркозависимость) исходя из данных анкетирования пациентов.	Наличие вредных привычек – алкоголь, табакокурение, наркомания.
5	На период исследования не были беременны и не использовали методы гормональной контрацепции.	Беременность и использование методов гормональной контрацепции.
6	Не принимали антибиотики и антисептики в течении 3 месяцев до проведения 2 и 3 этапа исследования.	Использовали антибиотики и антисептиков в течении 3 месяцев до проведения 2 и 3 этапа исследования.
7	Ткани пародонта соответствовали клиническим и рентгенологическим признакам интактного пародонта.	Ткани пародонта не соответствовали клиническим и рентгенологическим признакам интактного пародонта.
8	Наличие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный катаральный гингивит (К 05.1, в соответствии с классификацией МКБ -10)	Отсутствие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный катаральный гингивит (К 05.1, в соответствии с классификацией МКБ -10)
9	Наличие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (К 05.3, в соответствии с классификацией МКБ -10)	Отсутствие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (К 05.3, в соответствии с классификацией МКБ -10)
10	Присутствие письменного информированного согласия на участие в проведении исследований (Приложение 3).	Отсутствие письменного информированного согласия на участие в проведении исследований (Приложение 3).

Решение поставленных в работе задач потребовало выполнения трех этапов исследования. На подготовительном этапе проанализированы данные комплексного стоматологического обследования с расчетом пародонтальных индексов у 90 пациентов в возрасте 18-19 лет – жителей Республики Татарстан. Проведено одноцентровое рандомизированное проспективное клинико-микробиологическое контролируемое открытое исследование.

Методом рандомизации было сформировано 3-и группы наблюдения на подготовительном этапе:

- Контрольная группа: с интактным пародонтом (34 человек -18 мужчин и 16 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
- Группа наблюдения 1: с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (30 человек - 16 мужчин и 14 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
- Группа наблюдения 2: с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (36 человек-16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

На первом этапе, в целях определения видовой принадлежности выделенных микроорганизмов, обследовано 90 пациентов (50 мужчин и 40 женщин в возрасте от 18 до 19 лет), рандомизированных по 3-м группам:

1. Контрольная группа: с интактным пародонтом (34 человека - 18 мужчин и 16 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
2. Группа наблюдения 1: с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (30 человек - 16 мужчин и 14 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

3. Группа наблюдения 2: с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (36 человек-16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

На втором этапе было проведено выделение ДНК гена 16s рнк секвенирование и анализ данных 36 пациентов (16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 19 лет), сформировавших 3-и группы:

1. Контрольная группа: с интактным пародонтом (11 человек - 5 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
2. Группа наблюдения 1: с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (12 человек - 7 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
3. Группа наблюдения 2: с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (13 человек - 4 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

Третий этап включал оценку возможностей применения метода просвечивающей электронно-микроскопии (негативное контрастирование) и оценку результатов анализа 17 пациентов (7 мужчин и 10 женщин в возрасте от 18 до 19 лет) Для этого методом рандомизации были сформированы две выборки:

1. Контрольная группа: – лица с интактным зубным рядом, интактным пародонтом и отсутствием склонности к минералообразованию (5 человек - 2 мужчин и 3 женщины в возрасте от 18 до 19 лет)

2. Группа наблюдения: – пациенты с воспалительными заболеваниями, имеющих повышенную склонность к образованию зубных отложений (над- и поддесневых зубных камней) (12 человек - 3 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

В процессе обследования проводили изучение частоты и клинко-рентгенологического состояния тканей пародонта молодых людей в возрасте 18 – 19 лет, полученные в результате стоматологического осмотра 533 обучающихся 1 – 2 курсов различных ВУЗов г. Казани. Из указанной выборки была проведена рандомизация пациентов по необходимым критериям. Комплексную диагностику тканей пародонта у пациентов проводили с учетом гигиенических и пародонтальных индексов ОНІ – S, СРІТN, РМА, РВІ.

Диагностические мероприятия включали в себя анализ микроорганизмов, выделенных из зубодесневой борозды у условно здоровых молодых людей с интактным пародонтом (контроль) и пациентов с хроническим катаральным гингивитом; и из пародонтального кармана – у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести.

Все заборы проводили после проведения тщательной профессиональной гигиены рта. Удаляя наддесневые отложения стерильными кюретками, осушали с помощью стерильного ватного шарика. С помощью стерильных пинцетов вводили стерильную ватную турунду в исследуемый участок, не касаясь слизистой оболочки рта, поверхности эмали или коронки зуба на 10 – 20 секунд. Далее исследуемый материал помещался в стерильный пластиковый контейнер и хранился в морозильной камере при температуре – 25⁰С.

В данной работе мы провели анализ аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. С целью подсчета числа культивируемых микроорганизмов посев проводился на основные (мясо-пептонный агар) и специальные среды (Чапека, Гаузе, Сабуро и Эндо). Выделенные аэробные бактерии были идентифицированы с использованием прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии

Bruker Daltonik MALDI Biotyper (Германия). В таблице 2 представлены значения логарифмических показателей при определении видовой принадлежности микроорганизмов.

Таблица 2 – Значение логарифмических показателей при определении видовой принадлежности микроорганизмов в масс-спектрометре

Значение биомассы (г/л)	Описание
1.300... 3.000	Высокая вероятность идентификации вида
2.000 ... 2.299	Гарантированная идентификация рода, возможная идентификация вида
1.700 ... 1.999	Возможная идентификация рода
0.000 ... 1.699	Отсутствие надежной идентификации

Для выделения ДНК и сравнительного анализа микробных сообществ образцы были помещены в 2 мл микроцентрифужные пробирки и заморожены при -20°C . Секвенирование осуществляли с использованием секвенатора ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, USA). Полученные последовательности были проанализированы с помощью QIIME, Version 1.9.1. Тест Kruskal –Wallis использовался для определения относительного обилия филогенов между группами. Была использована версия R 3.4.1, значение было установлено на $P < 0,05$.

Во время проведения третьего этапа исследования у пациентов обеих групп исследования были получены образцы проб ротовой жидкости. Отбор проб ротовой жидкости осуществлялся в вечернее время суток (пациенты чистили зубы в утреннее время, с применением профилактических зубных паст и ополаскивателей), до профессиональной гигиены рта и удаления над- и поддесневых отложений.

Просвечивающая электронная микроскопия (метод негативного контрастирования) проводилась с использованием электронного микроскопа JEM 100C («Jeol» Japan). Съемку проводили на фототехническую пленку AGFA ORTHOCHROMATIC. Для получения микрофотографий негативы сканировали на сканере EPSON PERFECTION 4990 PHOTO с разрешением 600 dpi. Микрофотографии обрабатывали с помощью программы Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

Статистический анализ проводился с использованием стандартных методов математической статистики в программе Microsoft Excel 2007. Критерий вероятности $p < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы групп данных.

Определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов было проведено в условиях междисциплинарного центра протеомных исследований ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии (заведующий кафедрой д.м.н., профессор Ильинская О.И.). Выделение ДНК гена 16S рНК секвенирование было проведено в условиях в условиях ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ (руководитель протеоеномного направления, директор Междисциплинарного центра протеомных исследований Чернов В.М.). Электронно-микроскопические изображения были получены в НИЛ ультраструктурной организации тканей кафедры зоологии и общей биологии КФУ под методическим руководством канд. биол. наук доцента Л.В. Малютиной.

Исследование проводилось в соответствии с утвержденной инструкцией по экспериментам с участием человека в качестве субъекта. В соответствии с требованиями Локального Этического Комитета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ МЗ РФ (выписка из протокола №9 от 25 июня 2019 г.). Письменное информированное согласие было получено от всех исследованных пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Клиническая характеристика воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста

В ходе проведенного исследования была изучена частота и характер патологических изменений тканей пародонта у молодых людей в возрасте 18 – 19 лет. Полученные в ходе стоматологического осмотра 533 обучающихся 1-го – 2-го курсов различных ВУЗов г. Казани результаты обработаны методом вариационной статистики (таблица 3).

Таблица 3 – Частота выявления различных патологических изменений в тканях пародонта у молодых людей в возрасте 18 – 19 лет

Возраст	Юноши		Девушки			Оба пола
	Кол-во обследованных	Распространенность (%)	Кол-во обследованных	Распространенность (%)	Кол-во обследованных	Распространенность (%)
18	97	56,0±2,6	174	55,2±2,8	271	55,6±1,9
19	116	51,2±2,8	146	50,6±2,6	262	50,9±2,8
Всего	213	53,6±1,9	320	52,9±2,6	533	53,25±1,9

Анализ результатов показал, что 47,0 % обследованных составили молодые люди с интактным пародонтом. В 53,0% случаев у обследованных пациентов были выявлены различные симптомы воспалительных заболеваний пародонта.

Показательно, что частота выявления различных заболеваний пародонта у лиц 19-летнего возраста была несколько выше (на 4,7 %), чем у молодых пациентов в возрасте 18 лет, что в числе многих причин, можно объяснить снижением влияния симпатической иннервации на сформированные ткани пародонта. Последнее подтверждает правильность выбора возрастных ограничений при определении критерий настоящего исследования.

Анализ полученных данных показал, что у юношей заболевания пародонта встречались в 56,0 % случаев, достоверно чаще ($p < 0,05$), чем у девушек (44%). Максимальные гендерные различия в частоте поражения пародонта выявлены (в пользу юношей) в 18-летнем возрасте.

Детальное изучение пародонтологического статуса обследованных лиц показало, что гингивит (K05.1 по МКБ–10) был диагностирован в 68,1% случаев, пародонтит (K05.3 по МКБ–10) – в 23,3% случаев, другие формы патологии пародонта – в 8,6% случаев.

В структуре заболеваемости пародонта, в частности гингивита, было выявлено, что катаральный гингивит встречался в 68,80% случаев, гипертрофический гингивит в 30,50%, а язвенный в 0,70% случаев. Острая форма гингивита встречалась в 30,70% случаев, а хроническая форма в 69,30% случаев. В 75,50% случаев встречался генерализованный гингивит, а в 24,50% - локализованный гингивит. Преимущественно у обследованных лиц диагностировали хронический генерализованный гингивит.

При анализе клинической структуры пародонтита было выявлено, что пародонтит легкой степени тяжести встречался в 62,30 % случаев, средняя степень тяжести пародонтита была выявлена в 36,70% случаев, и только в 1,00% случаев диагностировали пародонтит тяжелой степени. В 71,90% случаев выявлялась хроническая форма пародонтита, у 28,10% обследованных пародонтит протекал в острой форме. В 76,60% случаев выявляли генерализованный пародонтит, а в 23,4% - его локализованную форму. По характеру течения у обследованных преобладал хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести.

Нами были проанализированы основные показатели стоматологического статуса у 90 пациентов контрольной группы и 2 групп наблюдения.

Показатели индекса ОНI-S в группе наблюдения №1 пациентов с хроническим генерализованным катаральным гингивитом составили – $1,82 \pm 0,17$, а группе наблюдения №2 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести – $2,51 \pm 0,18$, что свидетельствовало о неудовлетворительном уровне гигиены полости рта у пациентов двух групп наблюдения. Средняя величина папиллярно – маргинально – альвеолярного индекса РМА в группе наблюдения №1 у пациентов с хроническим катаральным гингивитом составила $29,30 \pm 5,3$, а в группе наблюдения №2 у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом составила $49,3 \pm 6,9$. Оценка степени кровоточивости десны по показателю индекса кровоточивости десневых сосочков РВI составила: в группе наблюдения №1 – $1,46 \pm 0,16$, а в группе наблюдения №2 – $2,26 \pm 0,18$, что вызывало микрогеморрагий при зондировании десневой борозды. Индекс нуждаемости в лечении болезней пародонта СРITN у пациентов группы наблюдения №1 составлял $1,75 \pm 0,19$, а группе наблюдения №2 – $3,5 \pm 0,19$, что указывало на необходимость проведения профессиональной гигиены полости рта, коррекции индивидуальной гигиены полости рта и потребность в терапевтическом и хирургическом пародонтологическом лечении.

Таким образом, клинические показатели пародонтологического статуса у пациентов группы наблюдения №1 и группы наблюдения №2 достоверно отличались от показателей нормы и возрастали индексные величины изучаемых показателей у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

В хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта нуждалось 19,0% пациентов обеих групп наблюдения. Проведение ортодонтической коррекции было показано 29,0% пациентам из 2-ой групп наблюдения.

Результаты оценки видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных у лиц молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта

Результаты клинических исследований показали, что проведение комплексного лечения как хронического катарального гингивита, так и локализованного пародонтита легкой степени тяжести согласно утвержденным протоколам лечения, не достаточно эффективно, что побудило нас к проведению микробиологического исследования. Их основной целью был поиск основных маркеров ВЗП с применением современных методов микробиологической диагностики. По результатам микробиологического анализа формулировали практические рекомендации, назначали лекарственные средства, обладающие направленной чувствительностью и, следовательно, более эффективные для лечения пациентов молодого возраста с ВЗП.

Второй этап исследования был проведен с определением видовой принадлежности выделенных микроорганизмов методом прямого белкового профилирования MALDI-TOF

масс-спектрометрии. В таблице 4 представлена видовая принадлежность выделенных микроорганизмов.

Таблица 4 – Показатели достоверности видовой принадлежности микроорганизмов (биомасса, г/л), пародонтальных пространств у пациентов в группах наблюдения.

№	Микроорганизмы	Показатель достоверности вида
1	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> DSM 10T DSM	2.111
2	<i>Candida albicans</i> CBS 1905 NT CBS	2.06
3	<i>Candida albicans</i> CBS 1905 NT CBS	2.192
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	2.208
5	<i>Candida albicans</i> VA_17248_07 04 UKE	2.098
6	<i>Candida albicans</i> VA_17248_07 04 UKE	2.037
7	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 THL	1.988
8	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 20132T DSM	1.71
9	<i>Candida albicans</i> DSM 6659 DSM	1.779
10	<i>Candida albicans</i> CBS 1905 NT CBS	2.127
11	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 13835 DSM	2.053

*№ 1-2 – контрольная группа с интактным пародонтом;

*№ 3-11 – группа наблюдения с воспалительными заболеваниями пародонта

Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 10TDSM (№1) и *Candida albicans* CBS 1905 NTCBS (№2) с высокими показателями достоверности вида – 2.111 и 2.06, соответственно, были идентифицированы в пародонтальных пространствах как лиц с интактным пародонтом (контрольная группа), так и в пародонтальных пространствах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (опытная группа), что позволило отнести эти микроорганизмы к представителям основной фракции микробного сообщества (Таблица 4).

Результаты изучения видовой принадлежности микроорганизмов пародонтальных пространств у лиц с гингивитом и пародонтитом легкой степени в сравнительном аспекте не позволили однозначно выделить микроорганизмы-маркеры конкретной стадии воспаления пародонта хронического пародонтита легкой степени тяжести или катарального гингивита.

В исследуемых пародонтальных пространствах у пациентов групп наблюдения №1 и №2 - лиц с воспалительными заболеваниями пародонта также выделялась *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2,192); VA_17248_07 04 UKE (2,098); VA_17248_07 04 UKE (2,037); ATCC 10231 THL (1,988); DSM 6659 DSM (1,779); CBS 1905 NT CBS (2,127). Причем представительство *Candida albicans* в пародонтальных пространствах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта количественно превышало *Candida albicans* в зубо - десневой борозде лиц с интактным пародонтом (контрольная группа).

Вариабельность видового состава и количественных характеристик бактериальной и грибковой флоры различных биотопов полости рта, включая основные пародонтальные биотопы в норме и при развитии заболеваний пародонта весьма велика и определяется комплексом разнообразных экзо- и эндогенных факторов. Так, по мнению многих исследователей, концентрация факультативно–анаэробных бактерий и грибов рода *Candida* в микробиоме полости рта увеличивается в сравнении с аналогичными показателями у лиц с интактным пародонтом, причем эти различия особенно выражены у лиц, проживающих в экологически неблагоприятных зонах, когда те или иные виды антропогенной нагрузки создают дополнительный риск развития заболеваний полости рта (пародонта), в том числе посредством неблагоприятного влияния на состав и свойства (метаболическая активность, адгезивные свойства, склонность к колонизации и т.д.) микрофлоры полости рта, в целом, и пародонтальных пространств, в частности.

В пародонтальных пространствах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта также был выделен ряд микроорганизмов: *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB (2,208), *Corynebacterium variabile* DSM 20132T DSM (1,71), *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM (2,053).

Анализ логарифмических показателей (значение биомассы, г/л) позволил гарантированно охарактеризовать *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB и *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM по показателям определения рода и вероятности видовой идентификации (соответственно, 2.208 и 2.053). Принимали во внимание, что концентрация *Staphylococcus epidermidis* в ряде биотопов организма нарастает при воспалении слизистых оболочек различной локализации, длительных хронических инфекциях, стрессе, переохлаждении, иммунодефицитных состояниях, что говорит о присоединении вторичной инфекции. Известны штаммы *Bacillus pumilus*, изолированные из клинического материала пациентов, перенесших пищевую токсикоинфекцию/сепсис.

Согласно полученным логарифмическим показателям (значение биомассы, г/л), *Corynebacterium variabile* DSM 20132T DSM соответствовали параметру возможной (вероятной) видовой идентификации рода (1.71). Принимали во внимание данные, что непатогенные *Corynebacterium* способны вызывать отдельные кожные заболевания и отдельные формы системной патологии, в первую очередь, у пациентов с иммуносупрессией.

Использование прямого белкового профилирования MALDI–TOF масс-спектрометрии Bruker Daltonik MALDI Biotyper позволило нам провести идентификацию бактерий *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium variabile*, *Bacillus pumilus* и дрожжеподобных грибов рода *Candida albicans* и определить их видовую принадлежность, что научно-обосновывает использование в протоколах лечения воспалительных заболеваний пародонта антимикотических препаратов, чувствительных к определенным дрожжеподобным грибам *Candida albicans*. Направленное действие антимикотиков и их использование в комплексе с другими антимикробными средствами позволит создать наилучшие условия для более качественного лечения воспалительных заболеваний пародонта и повысит его эффективность. Считали, что на основании полученных нами данных сформулировать принципиальный вывод о качественных различиях в составе бактериальных сообществ пародонтальных пространств у пациентов с интактным пародонтом, хроническим катаральным гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести не обоснованно, тогда как использование метагеномного анализа для аналогичного сопоставления, окажется способным внести более существенный вклад в понимание роли определенных микроорганизмов в генезе ранних стадий воспалительных заболеваний пародонта (гингивита и пародонтита легкой степени тяжести) у лиц молодого возраста, представляющих особую медико-социальную группу студенческой молодежи, проживающей на территории Республики Татарстан.

Полагали, что с использованием самых современных методов – метагеномного анализа, позволяющего идентифицировать практически все известные, а также новые некультивируемые формы микроорганизмов, чей геном еще не внесен в базы данных, сможет предоставить панорамный взгляд на архитектуру микробного сообщества, ассоциированного с интактным пародонтом, и особенности ее реструктуризации на ранних стадиях развития воспаления в пародонтальных тканях.

Результаты метагеномного анализа у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта

В данной работе описаны универсальный алгоритм метагеномных исследований и результаты первого клинко–микробиологического исследования микробиома рта при воспалительных заболеваниях пародонта у пациентов 18–19.

На рисунке 1 представлены альфа–разнообразие образцов – разнообразие внутри сообществ, так называемое видовое обилие. Применение индексов альфа–разнообразия дало возможность косвенно определить их статус.

По результатам исследования, альфа разнообразие образцов интактного пародонта оказалось значительно ниже, чем разнообразие образцов при хроническом катаральном гингивите. Альфа–разнообразие образцов при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести варьировало в более широких пределах.

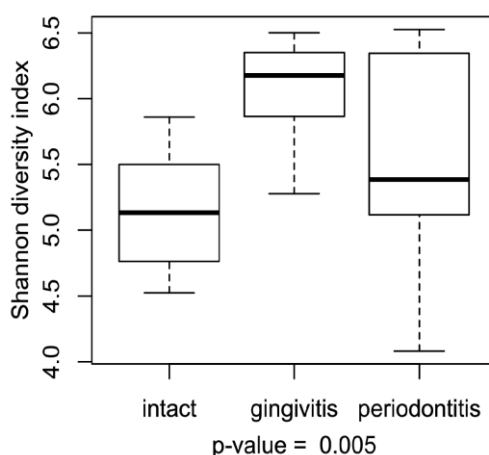


Рисунок 1 – Альфа–разнообразие микробных сообществ при интактном пародонте и воспалительных заболеваниях пародонта у молодых лиц в возрасте 18-19 лет

Было идентифицировано 183 филотипа на уровне родов, относящиеся к 17 филам (Фил (*phylum*) - это синоним типа в таксономии (таксон между царством и классом).

Для выявления различий в относительной численности филотипов на уровне родов и семейств между образцами применяли критерий Kruskal–Wallis, предназначенный для определения равенства медиан нескольких выборок (данный критерий является многомерным обобщением критерия Уилкоксона – Манна – Уитни).

Нами были найдены достоверно отличающиеся филотипы, чья медианная относительная численность превышала 0,5% хотя бы в одной группе. При этом определяли, что относительная численность 21 филотипа на уровне родов и семейств достоверно различалась между группами.

В большинстве образцов преобладали представители рода *Streptococcus*. В образцах микрофлоры молодых пациентов с интактным пародонтом доля стрептококков была достоверно больше (31.73 (6.11 to 50.30), в сравнении с двумя другими группами, причем это различие было статистически значимо (17.51 (4.01 to 34.43) и 18.37 (1.66 to 50.40) соответственно).

Вторым из преобладающих представителей микрофлоры у лиц с интактным пародонтитом явился род *Neisseria* (8.50 (0.03 to 18.18)), в сравнении с двумя другими группами, причем это различие также было статистически значимо (0.65 (0.015 to 10.08) и 1.84 (0.00 to 24.46) соответственно).

Кроме того, интактный пародонт был ассоциирован с членами семейства *Micrococcaceae* и рода *Rothia* – 5.35 (0.13 to 13.30). Показательно, что количество классических бактерий, традиционно выделяемых при кариесе, - род *Rothia* (*Stomatococcus mucilaginosus* и *Micrococcus mucilaginosus*), в контроле было в 2 раза более высоким.

Интересно, что если род *Actinomyces* преобладал у лиц с интактным пародонтом 2.46 (0.27 to 16.13), то при ВЗП (гингивит, пародонтит) эти присутствовали примерно в одинаковых соотношениях 1.50 (0.39 to 3.91) против 1.49 (0.32 to 6.11).

При патологии пародонта отмечали количество неидентифицированных бактерий. Микроорганизмы рода *Rothia* при ВЗП были замещены антагонистическими патогенными бактериями.

В числе преобладающей микрофлоры оказался род *Fusobacterium*. У лиц с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (10.19 (3.36 to 21.73)) преобладал род *Fusobacterium*. В сравнении с данными лиц с интактным пародонтом (5.16 (0.39 to 14.97)) и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (5.04 (1.19 to 30.09)), различия были статистически значимы.

Выявляли преобладание семейств *Veillonella* у лиц с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (4.66 (0.47 to 11.89)), в сравнении с двумя другими группами – с интактным пародонтом (3.65 (0.36 to 10.19)) и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (3.65 (0.36 to 10.19)).

Аналогичная закономерность выявлена в отношении родов *Selenomonas*, *Corynebacterium* и *Campylobacter*, присутствующих в достоверно больших количествах в образцах пациентов, страдающих хроническим генерализованным катаральным гингивитом, чем с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести, что может указывать на смену преобладающих видов при прогрессировании воспаления в пародонтальном комплексе (4.45 (0.10 to 12.78); 2.42 (0.29 to 6.00); 1.04 (0.53 to 2.96), соответственно).

Кроме того, были идентифицированы микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах – некультивируемые представители семейств *Rs-045*, *Dethiosulfovibrionaceae*, которые также преобладали у лиц с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (0.44 (0.00 to 3.31) и 0.58 (0.00 to 4.04), соответственно) в сравнении с двумя данными у лиц с интактным пародонтом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (различия статистически значимы).

Таким образом, результаты метагеномного анализа подтвердили результаты предшествующих микробиологических исследований (гл. 3.3), подтверждающих отсутствие какого – либо одного (специфического) или нескольких микробиологических агентов – маркеров микробного происхождения, способных инициировать прогрессирование гингивита с развитием хронического пародонтита легкой степени тяжести.

Установлено, что по отношению к показателям интактного пародонта у пациентов двух других групп наблюдали статистически значимое увеличение доли семейств *Porphyromonadaceae*, *Peptostreptococcaceae* и доли родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.

Кроме того, по отношению к интактному пародонту в двух других группах были найдены микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах – некультивируемые представители неопределенных филотипов на уровне рода *Mogibacteriaceae*, *TM7 3*.

Таким образом, нами был проведен сравнительный анализ бактериальных сообществ пародонта при хроническом генерализованном катаральном гингивите, хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести и у здоровых индивидуумов.

В выборке метагеномных образцов были найдены уникальные микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах. Разнообразие бактерий при изучаемых патологических состояниях оказалось достоверно выше, чем при интактном пародонте. Показано, что относительная численность 21 филотипа (чья

медианная численность превышает 0,5% как минимум в одной группе) на уровне родов и семейств достоверно различалась между группами. При этом такая характеристика, как число генов в метагеноме, можно в перспективе рассматривать в качестве диагностического инструмента для детекции ВЗП, тогда как выявление образцов с аномально высоким содержанием ДНК может рассматриваться как косвенный признак наличия воспаления/повышенной десквамации эпителия десны. Помимо оценки качества экспериментальных процедур, результат этой фильтрации может служить первичным маркером потенциальной патологии.

Результаты определения кальцинированных наночастиц в ротовой жидкости пациентов молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта

Третий этап исследования заключался в оценке возможностей просвечивающей электронной микроскопии (метод негативного контрастирования). Для этого методом рандомизации были сформированы две выборки:

1. Группа наблюдения - пациенты с ВЗП и повышенной склонностью к образованию зубных отложений (над- и поддесневого зубного камня) (12 пациентов – 4 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

2. Контрольная группа - лица с интактным зубным рядом, интактным пародонтом (зубные отложения практически отсутствуют) (5 пациентов – 2 мужчин и 3 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

По результатам электронной микроскопии, в смешанной слюне пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта при повышенной склонности к образованию зубных отложений были выявлены нанообъекты округлой формы размером от 20 до 200 нм (рис.1, 2, 23).

Выявленные формы были представлены не только одиночными (Рисунок 21), но и делящимися нанообъектами (Рисунок 2), многие из которых образовывали конгломераты (Рисунок 3), что с большой долей вероятности позволяет их отнести к нанобактериям. Конгломераты, как и единичные нанообъекты, имели светлую оболочку из биополимеров, предположительно белков или полисахаридов. Также были зафиксированы и мелкие частицы неправильной формы, по-видимому, представляющие собой продукты разрушения.

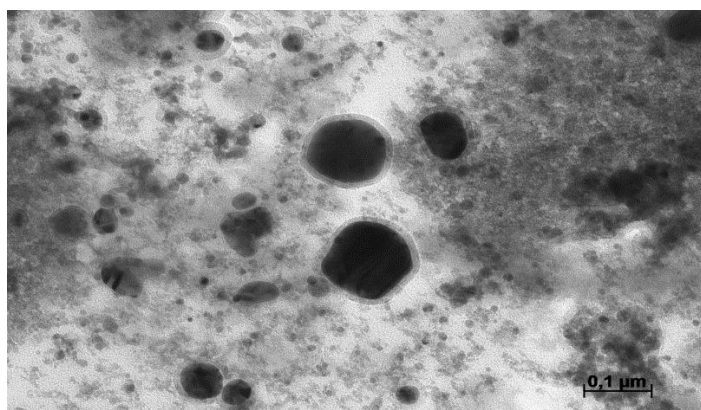


Рисунок 2– Электроннограмма– единичные нанообъекты округлой формы, со светлой оболочкой в ротовой жидкости

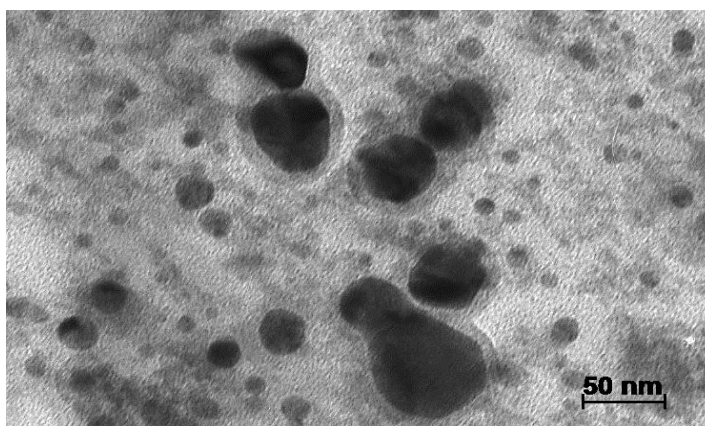


Рисунок 3– Электроннограмма – делящиеся нанообъекты, имеющие единую оболочку, в ротовой жидкости

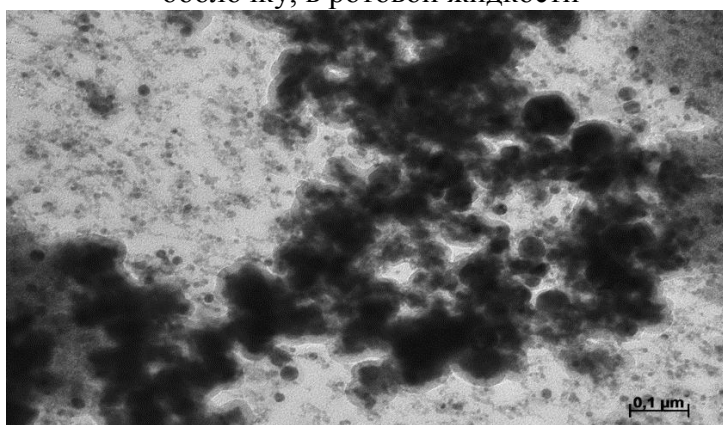


Рисунок 4 – Электроннограмма – группы нанообъектов, образующие конгломераты, в ротовой жидкости

В ротовой жидкости пациентов с интактным зубным рядом, здоровым пародонтом при отсутствии склонности к образованию минерализованных зубных отложений конгломераты, не имеющие выраженной светлой оболочки, выявлялись в единичных случаях, тогда как наличия отдельных нанообъектов со светлой оболочкой не наблюдали (Рисунок 4).

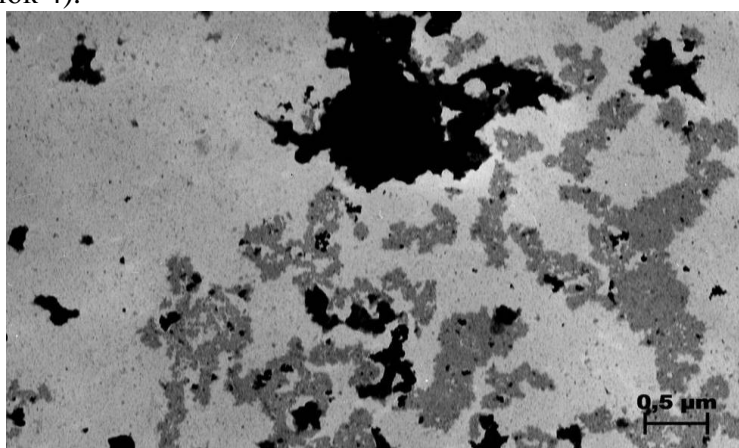


Рисунок 5 – Электроннограмма – редко встречающиеся конгломераты, не имеющие выраженной светлой оболочки

При интерпретации результатов исходили из того, что существует две теории природы нанообъектов. Одна из них – нанообъекты рассматриваются как неживые объекты и являются связующим звеном в образовании минералов, вторая – нанообъекты – это живые объекты, имеющие свою ДНК. По результатам нашего исследования

обнаружено, что нанообъекты способны к делению и образованию конгломератов. По данным доступной литературы, нанообъекты рассматриваются как этиологические факторы той или иной патологии, как кофакторы ее развития или просто сопутствующие образования. Процессы минералообразования в полости рта возможно аналогичны эктопической кальцификации и также могут быть связаны с нанообъектами. На сегодняшний день данные о природе и характеристика нанообъектов в слюне и в зубном налете в доступной нам литературе отсутствуют.

ВЫВОДЫ

1. Пациентов молодого возраста (18 – 19 лет) отличает высокая распространенность воспалительных заболеваний пародонта (53,25%) при неудовлетворительном/низком уровне гигиены полости рта; в структуре воспалительных заболеваний пародонта доминируют: хронический катаральный гингивит (68,1%) и хронический генерализованный пародонтит (23,3%) преимущественно (62,30% ; $p < 0,05$) легкой степени тяжести.

2. Методом протеомного анализа установлено, что у пациентов молодого возраста, вне зависимости от состояния тканей пародонта (интактный пародонт, ранние стадии воспаления – гингивит, пародонтит легкой степени), в микробиоме пародонтальных пространств выделены *Bacillus subtilis ssp subtilis* DSM 10T DSM (2.111) и *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2.06), что позволяет охарактеризовать их как представителей аутохтонной микрофлоры полости рта.

3. Ранние стадии воспаления пародонта у лиц в возрасте 18 - 19 лет с высокой степенью надежности ассоциированы с присутствием в десневой борозде и пародонтальном кармане: *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB (2.208), *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2,127), *Candida albicans* VA 17248 07 04 UKE (2.098), *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM (2.053), *Corynebacterium variabile* DSM 20132T DSM (1.71).

4. По данным метагеномного анализа, в микробиоте пародонтальных пространств у пациентов молодого возраста идентифицировано 183 филотипа на уровне родов, относящиеся к 17 филам. В сравнительном аспекте в образцах лиц с интактным пародонтом преобладали филотипы *Streptococcus* - 31.73 (6.11 - 50.30), *Neisseria* - 8.50 (0.03 - 18.18), *Rothia* - 5.35 (0.13 - 13.30), *Actinomyces* - 2.46 (0.27 - 16.13). При развитии катарального гингивита наблюдается тенденция к формированию ассоциации филотипов *Fusobacterium* - 10.19 (3.36 - 21.73), *Veillonella* - 4.66 (0.47 - 11.89).

5. Микробиота пародонтальных карманов при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести характеризуется наиболее широким диапазоном видового многообразия (индекс альфа-разнообразия 5.2 – 6.3), включая два неопределенных филотипа на уровне рода *Mogibacteriaceae*, TM7 3. С диагнозом хронический генерализованный пародонтит ассоциировано статистически значимое увеличение доли семейств *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Tissierellaceae*, *Veillonellaceae*, родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.

6. Обнаруженные в ротовой жидкости пациентов группы наблюдения нанообъекты диаметром от 20 до 200 нм, окруженные оболочкой с видимой кристаллизацией, а также наличие кальцинированных нанообъектов, визуализируемых как одиночные, делящиеся и агрегированные формы, позволяет предположить их участие в процессе супра- и субгингивального денталитиаза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При составлении индивидуальных программ стоматологического обследования лиц молодого (18 – 19 лет) возраста с признаками воспалительных заболеваний пародонта рекомендовано проводить оценку критериев объективного обследования, пародонтологического статуса и видовой принадлежности выделенных микроорганизмов.

2. В протокол ведения пациентов с хроническим генерализованным катаральным гингивитом врачам - пародонтологам рекомендовано введение антимикотических средств, способных воздействовать на *Candida albicans* и антибактериальных средств широкого спектра действия, способных воздействовать на *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Tissierellaceae*, *Veillonellaceae*, родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.
3. В протокол лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести врачам – пародонтологам рекомендовано включение антимикотических препаратов, способных воздействовать на *Candida albicans* и антибактериальных препаратов широкого спектра действия, способных воздействовать на *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium variabile*, *Bacillus pumilus*, *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Tissierellaceae*, *Veillonellaceae*, родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Абдрахманов А.К., Ювенильный пародонтит – видовая принадлежность выделенных микроорганизмов /Абдрахманов А.К., Мамаева Е.В., Яковлева Г.Ю., Ильинская О.Н. // Стоматология детского возраста и профилактика. – 2016. - № 3. – С. 4-9.
2. Абдрахманов А.К., Кальцинированные нанообъекты в слюне пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта /Абдрахманов А.К., Модина Т.Н., Мамаева Е.В., Малютин Л.В. Ильинская О.Н. // Пародонтология. – 2017. – №1. – С. 63-67.
3. Абдрахманов А.К., Идентификация грибов рода *Candida* при воспалительных заболеваниях пародонта / Модина Т.Н., Абдрахманов А.К., Мамаева Е.В., Гильфанов Б.Р., Ильинская О.Н. // Клиническая стоматология. - 2019. - №1(89). - С.20-23.
4. Абдрахманов А.К., Кальцинированные нанообъекты в слюне пациентов с интактным пародонтом и при его патологии /Модина Т.Н., Абдрахманов А.К., Мамаева Е.В., Сальникова М. М., Ильинская О.Н. //Клиническая стоматология. – 2017. – №1.– С.16-21.
5. Абдрахманов А.К., Metagenome of dentogingival sulcus`s communities by the young people with intact periodontum / Салеев Р.А., Салеева Г.Т., Абдрахманов А.К., Модина Т.Н., Циннекер Д.А., Ильинская.О.Н, Яковлева Г.Ю., Мамаева Е.В.
6. Абдрахманов А.К. Нанобактерии и уровень гигиены полости рта у подростков с различным пародонтологическим статусом /Абдрахманов А.К., Мамаева Е.В. //Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Стоматология XXI века», посвящённая памяти основателя стоматологического факультета ФГБОУВПО «ЧГУ им. И.Н.Ульянова» д.м.н., профессора Хамитова Фидагия Сабировича, Чебоксары. – 2015 (20 марта). – С. 6-7.
7. Абдрахманов А.К. Обоснование включения противогрибковой терапии в комплексное лечение хронического генерализованного пародонтита подростков /Абдрахманов А.К. //IV всероссийская научно-практической конференции «Профессорские чтения им. Г.Д. Овруцкого. «Актуальные вопросы стоматологии», Казань. – 2016 (март). – С. 12-17.
8. Абдрахманов А.К. Бактериальная обсемененность при хронических пародонтитах у подростков /Абдрахманов А.К. Мамаева Е.В. Яковлева Г.Ю., Ильинская О.Н. //VIII-ая Российская научно-практическая конференция с международным участием «Здоровье человека в XXI веке», Казань. – 2016 (31 марта). – С. 23-27
9. Абдрахманов А.К., Антибактериальная терапия хронического генерализованного пародонтита подростков /Абдрахманов А.К. //90-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых, Казань. – 2016 (13 апреля). – С. 346
10. Abdrakhmanov A.K. CONTAMINATION BY FUNGI OF THE GENUS CANDIDA IN CASE OF INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES IN THE 18-19-YEAR OLD TEENAGERS /Abdrakhmanov A.K., Yakovleva G.Yu. //XV international research and practice

conference «European Science and Technology», Munich, Germany. – 2016 (14 – 15 December). – P. 179-186.

11. Абдрахманов А.К. Возможности просвечивающей электронной микроскопии при оценке нанообъектов в слюне пациентов /Абдрахманов А.К., Мамаева Е.В., Милютин Л.В. // «Современная стоматология». Сборник научных трудов, посвященный 125-летию основателя кафедры ортопедической стоматологии КГМУ профессора Исаака Михайловича Оксмана. – Казань, 2017. – С. 19-24.

12. Абдрахманов А.К. Метагеномика – современный метод определения маркеров микробного происхождения (литературный обзор) /Мамаева Е.В., Яковлева Г.Ю., Абдрахманов А.К. //IX Российская научно-практическая конференция «Здоровье человека в XXI веке, Казань. – 2017 (30 марта). – С.56-63.

13. Абдрахманов А.К. Метагеномный анализ микрофлоры рта при патологии пародонта /Абдрахманов А.К. //91-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых, Казань. – 2017 (13 апреля). – С. 390.

14. Абдрахманов А.К. Распространенность воспалительных заболеваний пародонта у молодых людей в возрасте 18-19 лет /Гизатуллина О.С., Филиппова И.М., Ахметова Г.М., Абдрахманов А.К. //Евразийский конгресс «Стоматологическое здоровье детей в XXI веке», Казань. – 2017 (20-21 апреля). – С.60-65.

15. Абдрахманов А.К. Анализ микрофлоры зубодесневого соединения у молодых людей с интактным пародонтом /Абдрахманов А.К., Мамаева Е.В., Ахметова Г.М. //I Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы стоматологии детского возраста». – Казань, 2018. – С. 3-10.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота;

K05.1 – диагноз хронический генерализованный катаральный гингивит (в соответствии с классификацией МКБ–10);

K05.3 – диагноз хронический генерализованный пародонтит (в соответствии с классификацией МКБ–10);

МКБ-10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра;

НАСА – Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства;

ОТЕ – операционные таксономические единицы;

п. н. – нуклеотидные последовательности;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

pH – показатель кислотно–щелочного равновесия;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

16S рРНК – одна из трёх основных типов РНК, входит в состав рибосомы в комплексе с белком и участвует в процессе трансляции;

'5-ССТАСGGGNGGCWGCAG-3'– баркодированный праймер Bakt_341F;

'5-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'– баркодированный праймер Bakt_341F;

АТСС – Среды для идентификации из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection);

СВС – Среды для идентификации из Центрального бюро культур грибов – секция формирования коллекции карантинных грибов и их родственных видов Института биоразнообразия грибов;

СНВ – Среды для идентификации *Bacillus* spp. и родственных микроорганизмов, а также *Enterobacteriaceae* spp. и *Vibrionaceae* spp. на стрипе API 50 СН. Идентификаторы на стрипах API;

CPITN – пародонтальный индекс ВОЗ, определяет потребность в лечении заболеваний пародонта;

DSM – Среды для идентификации «Бактериальные культуры из национальной коллекции микроорганизмов»;

DSMZ – Среды для идентификации «Бактериальные культуры из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур»;

FeSO₄ – сульфат железа;

GI – индекс определяющий степень воспаления десны;

KCl – хлорид калия;

KH₂PO₄ – дигидроортофосфат калия;

MGN 3 – арабиноксилан из рисовых отрубей;

MgSO₄ – сульфат магния;

NaCl – хлорид натрия;

NaNO₃ – нитрат натрия;

OHI – S – индекс Грина–Вермильона;

PBI – индекс кровоточивости сосочков;

PMA – палилла–маргинально–альвеолярный индекс;

RDP – классификатор таксономический классификации последовательностей;

UKE – Среды для идентификации из Университетский Медицинский Центр им. Эппендорфа (Гамбург, Германия).