

doi: 10.17116/stomat20169528-13

Изучение взаимосвязи состава микробиома пародонта и кишечника в норме и при патологии методами глубокого секвенирования

Н.Б. ПЕТРУХИНА^{1,2}, О.А. ЗОРИНА^{1,2*}, Е.В. ШИХ², А.В. ШИБАЕВА^{3,4}, А.Б. ШЕВЕЛЕВ⁴¹Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава РФ, Москва, Россия;²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия; ³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия;⁴Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия

В работе с применением метода NGS-секвенирования банков суммарной ДНК содержимого пародонтальных карманов с праймерами на область V6 16S рДНК проанализирован качественный и количественный состав видов и родов бактерий в микрофлоре пародонта и кишечника пациентов с пародонтитом разной степени тяжести и лиц со здоровым пародонтом. Важным маркером отсутствия предрасположенности к пародонтиту оказалось повышенное содержание в кишечнике *Akkermansia muciniphila* ($t=133,7$ при $p=10^{-6}$). Данный результат коррелирует с сообщениями о влиянии этой бактерии на риск развития диабета, ожирения, атопического дерматита и постантибиотической диареи, ассоциированной с *Clostridium difficile*. При анализе пародонтопротекторов, населяющих сам пародонт, выявлен ряд таксономических родственников патогенов по Сокранскому: *Aggregatibacter segnis* и *Aggregatibacter aphrophilus* (родственники *A. actinomycetemcomitans*), *Treponema vancouverii* (родственник *Treponema denticola*), *Prevotella baroniae*, *Prevotella salivae* и *Prevotella* spp. (родственники *P. intermedia*), а также *Campylobacter concisus* (родственник *C. jejuni*, возбудителя энтероколитов).

Ключевые слова: пародонт, пародонтит, кишечник, пародонтопатоген, геном, 16S рРНК, 16S рДНК, секвенирование, NGS.

Study of mutual dependence of periodontal and colonic microbiome in health and pathology using NSG-sequencing

N.B. PETRUKHINA, O.A. ZORINA, E.V. SHIKH, A.V. SHIBAEVA, A.B. SHEVELEV

Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia; Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; Emanuel Biochemical Physics Institute, Moscow, Russia; Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russia

By using NGS-sequencing libraries of DNA from periodontal swabs with primers specific to V6 region of 16S rDNA prevalence of bacterial genera and species in periodontal and colonic microbiota of patients with periodontitis of different severity and healthy donors was analyzed. Hyper-colonization of the colon with *Akkermansia muciniphila* was found to be the most important marker of negative predisposition to periodontitis ($t=133,7$ at $p=10^{-6}$). This result is in a good agreement with communications about positive impact of hyper-colonization of the colon with this species on type 2 diabetes, obesity, atopic dermatitis, and antibiotic-induced diarrhea associated with *Clostridium difficile*. Analysis of the periodontal protectors at the periodontium elucidated a number of close taxonomic relatives of the periodontal pathogens by Socransky, e.g. *Aggregatibacter segnis* and *Aggregatibacter aphrophilus* are closely related to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Treponema vancouverii* is a relative of *Treponema denticola*; *Prevotella baroniae*, *Prevotella salivae* and *Prevotella* spp. are relatives of *Prevotella intermedia*; *Campylobacter concisus* is a relative of *Campylobacter jejuni*, causative agent of enterocolitis.

Keywords: periodontium, periodontitis, colon, periodontal pathogen, genom, 16S rRNA, 16S rDNA, Illumina, sequencing, NGS, *Akkermansia muciniphila*.

Большинство исследователей в мире рассматривает микробный фактор как основной в развитии воспалительных заболеваний пародонта [12].

Патология пародонта редко бывает не связанной с другими заболеваниями. Имеются работы, в которых методами медицинской статистики показана взаимосвязь между повышенным риском развития пародонтита и болезнями гастродуоденальной зоны, возбудителями которых является *Helicobacter pylori*. Однако доминирующими

остаются фекально-оральный и орально-оральный механизмы передачи *H. pylori* [1, 13]. Около 10% лиц, инфицированных *H. pylori*, страдают язвенными болезнями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), от 1 до 3% — аденокарциномой желудка и около 0,1% — лимфомой, ассоциированной со слизистой оболочкой ЖКТ [14].

В работах других авторов показано, что накопление в кишечнике облигатного внутриклеточного эндосимбионта *Akkermansia muciniphila* положительно влияет на риск

возникновения у таких пациентов диабета, ожирения, атопического дерматита и постантибиотической диареи, ассоциированных с *Clostridium difficile* [3–7].

Важность изучения факторов риска возникновения пародонтита определяется еще и тем, что в России распространенность этого заболевания у пациентов в возрасте до 25 лет за последние десятилетия существенно выросла. Состав микробиома пародонта у пациентов с агрессивным пародонтитом рассмотрен в нескольких работах, выполненных современными высокоточными методами: с помощью NGS-секвенирования [9–11] и гибридизации на микрочипах (НОММ) [2]. Однако авторы этих работ акцентировали внимание преимущественно на пародонтопатогенах, не придавая достаточного значения потенциальной пародонтопротекторной микрофлоре.

Выявленные в перечисленных работах пародонтопатогены в основном представлены *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и компонентами так называемого красного комплекса по Сокранскому, которые давно известны и могут быть выявлены и без использования NGS-технологий с помощью общедоступных наборов для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. I. Adler, S. Huse и соавт. [2, 8] подчеркивают важную роль в развитии агрессивного пародонтита *Parvimonas micra* и *Filifactor alocis*.

С учетом изложенного, целью настоящей работы явилось изучение методом глубокого секвенирования взаимосвязи состава микробиома пародонта и кишечника у пациентов с пародонтитом разной степени тяжести и у лиц со здоровым пародонтом.

Материал и методы

В исследование включили пациентов, наблюдавшихся в ЦНИИС и ЧЛХ Минздрава РФ.

Были сформированы 2 выборки: здоровые лица (15 человек) и пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) разной степени тяжести (15 человек). Все пациенты, включенные в исследование, не имели системных заболеваний и подписали информированное согласие, в котором были подробно описаны условия участия в исследовании. Степень тяжести пародонтита устанавливали по данным клинического обследования, глубине пародонтальных карманов (ПК) и степени деструкции костной ткани.

Для максимальной объективизации результатов и цифрового выражения уровня гигиены полости рта, степени воспаления тканей пародонта применяли стандартные методики определения индексов Silness—Loe и Muhlemann—Cowell, а степень подвижности зубов устанавливали по Miller в модификации Flezar. В качестве дополнительного метода обследования для уточнения состояния костного субстрата использовали цифровую ортопантомографию.

Образцы материала из ПК отбирали с помощью стерильного бумажного эндодонтического штифта по 4 пробы от каждого пациента: 2 пробы «А» из ПК в области первых моляров (при их отсутствии — в области премоляров) и 2 пробы «Б» из ПК резцов. Материал для исследования брали дважды от каждого пациента.

Для выделения ДНК штифты помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, содержащие по 0,5 мл раствора для гомогенизации образцов из набора Проба-

Рапид («ДНК-Технология», Москва). Суммарную ДНК материала из ПК пациентов выделяли с помощью набора реагентов Проба-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Препарат ДНК, соответствующий 1/10 объема 1 смыва (50 мкл), растворяли в 50 мкл элюирующего раствора (комплектация Проба-ГС).

С применением метода NGS-секвенирования банков суммарной ДНК отделяемого ПК с праймерами на область V6 16S рДНК анализировали представленность видов и родов бактерий в микрофлоре пародонта пациентов с пародонтитом и лиц со здоровым пародонтом.

Обработку данных глубокого секвенирования проводили согласно следующему протоколу:

— распределение и изучение данных по библиотекам на основании последовательностей баркодов проводилось с помощью программы Sabre (<https://github.com/pajoshi/sabre>); предъявлялось требование точного совпадения последовательности баркодов с ожидаемой; в результате удалось идентифицировать 72,3% индивидуальных последовательностей;

— проводился тримминг с использованием программы Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>); набор параметров:

LEADING:25 (триммирование с левого конца по Q25);

TRAILING:25 (триммирование с правого конца по Q25);

SLIDINGWINDOW:4:15 (триммирование с помощью плавающего окна, длина окна — 4, минимальное среднее значение качества в окне — 15);

MINLEN:36 (минимальная длина тримминга);

— с помощью команды ILLUMINACLIP из последовательности удаляли последовательности баркодов и другие технические последовательности;

— анализ метагеномных образцов по 16SPHK проводился с помощью программы Mothur (<http://www.mothur.org/>); использовался протокол http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP в варианте OTU-based analysis; для статистической обработки результатов использовали пакет программ Statistica 8.0;

— для проверки гипотезы о существовании достоверных статистических различий в представленности OTU в микробных консорциумах пародонта и кишечника после анализа выборок на нормальность распределения (по Колмогорову—Смирнову) был использован параметрический критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование образцов 16SpДНК методом метагеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq

NGS-секвенирование образцов суммарной ДНК материала из ПК и кишечного содержимого обеспечило разрешение от 91 234 до 213 786 индивидуальных последовательностей нуклеотидов на образцах. Анализ этих последовательностей позволил идентифицировать в образцах обоих типов по 260—268 родов и 497—500 видов бактерий.

Сопоставление списков нуклеотидов дало возможность установить совпадение 242 (93%) родов из 260, т.е. микробиом пародонта и кишечника во многом сходен. Более того, среди несовпадающих родов преобладают микроорганизмы, заведомо не способные выживать во вну-

тренней среде организма человека. По-видимому, они занесены туда с водой или пищей: например, водоросли *Leucanostoc* и *Spirulina*, симбионты растений (фитопатогены) *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Agrobacterium*, представители аэробной микрофлоры *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Pseudoxanthomonas*, а также митохондрии животных.

Сопоставление встречаемости в микробиоценозах кишечника и пародонта OTU ранга вида выявляет существенно большие различия, чем в случае OTU ранга рода: из 500 видов совпадают только 272. Сходство между анаэробными консорциумами пародонта и прямой кишки проявляется и в том, что доминирующим видом в обоих случаях является *Fusobacterium nucleatum*.

Анализ выборок по Колмогорову—Смирнову показал распределение признаков, близкое к нормальному. Поэтому дальнейшее сравнение родов бактерий в микробиоценозе кишечника у групп пациентов с наличием и отсутствием ХГП было проведено с применением критерия Стьюдента и подтвердило наличие существенных различий между группами (табл. 1).

Достоверность полученных данных была проверена путем сопоставления состава родов в микробиоценозе пародонта у групп пациентов с наличием и отсутствием диагноза ХГП по той же методологической схеме; наличие существенных различий подтвердилось между группами (табл. 2).

Аналогичным способом было проведено сопоставление состава родов бактерий в микробиоценозе пародонта у групп пациентов с наличием и отсутствием диагноза ХГП, что также подтвердило наличие существенных различий между группами (см. табл. 2).

Анализируя данные табл. 1 и 2, необходимо отметить, что на уровне родов бактерий наблюдаются только три группы, повышение концентрации которых связано с патологическим состоянием пародонта: *Brachymonas*, *Longilinea* и *Streptococcus*. Причем для последнего рода различия между контрольной и основной группами статистически недостоверны, хотя средние величины различаются почти в 4 раза. Все 3 рода относятся к микрофлоре кишечника, а не пародонта, что подтверждает тезис о системном характере взаимосвязи между составом микробиоценозов кишечника и пародонта. Существенно большее количество групп: 20 родов микрофлоры кишечника и 6 родов микрофлоры пародонта ассоциированы со здоровым пародонтом. Роды *Akkermansia*, *Thalassospira*, *Oxalobacter*, *Gracilibacter*, *Fibrobacter* и *Howardella* представлены в фекалиях лиц со здоровым пародонтом в 200, 105, 88, 51, 27 и 25 раз в большей концентрации, чем в фекалиях пациентов с воспалительными поражениями пародонта. Они могут рассматриваться как потенциальные энтеропротекторы системного действия. Обращает на себя внимание присутствие среди протекторной микрофлоры пародонта рода *Aggregatibacter*, в который входит опасный пародонтопатоген *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. По-видимому, этот факт объясняется тем, что наиболее опасными конкурентами пародонтопатогенов могут являться их ближайшие таксономические родственники, обладающие сходным типом метаболизма, но не имеющие факторов патогенности.

Наиболее интересен факт обнаружения в кишечнике лиц со здоровым пародонтом повышенной доли бактерий рода *Akkermansia* (содержит единственный вид *Akkermansia muciniphila*). С 2013 г. опубликовано более 20 работ, в ко-

Таблица 1. Идентификация в составе микробиоценоза кишечника родов бактерий, указывающая на различия между пациентами с диагнозом ХГП и контролем (уровень достоверности: $t > 3,0$ при $p \leq 0,05$); $M \pm m$

Род бактерий	Среднее значение (% в микробиоценозе) и среднее квадратичное отклонение		t	p
	ХГП	контроль		
<i>Streptococcus</i>	5,4±0,6	1,2±0,7	0,682	0,54
<i>Porphyromonas</i>	0,16±0,01	0,2±0,002	7,250	0,005
<i>Carnocytophaga</i>	0,024±0,006	0,06±0,002	4,644	0,019
<i>Bacillus</i>	0,0024±0,001	0,02±0,001	10,071	0,002
<i>Leptotrichia</i>	0,04±0,003	0,03±0,004	4,725	0,018
<i>Akkermansia</i>	0,02±0,002	3,1±0,01	130,528	0,000001
<i>Thalassospira</i>	0,02±0,001	2,5±0,4	167,210	0,000000
<i>Bergeyella</i>	0,03±0,002	0,05±0,002	10,392	0,0019
<i>Desulfovibrio</i>	0,004±0,002	0,03±0,005	6,338	0,0079
Кандидатный род tm7	0,001±0,0002	0,01±0,002	3,783	0,032
<i>Sarcina</i>	0,11±0,06	0,6±0,03	7,646	0,0046
<i>Actinobaculum</i>	0,0004±0,00008	0,006±0,0005	7,094	0,0057
<i>Brachymonas</i>	0,002±0,0006	0,00000	3,297	0,046
<i>Longilinea</i>	0,002±0,0005	0,00000	3,606	0,037
<i>Howardella</i>	0,003±0,0003	0,06±0,004	117,496	0,000001
<i>Methanobrevibacter</i>	0,002±0,0003	0,08±0,005	20,815	0,00024
<i>Enterorhabdus</i>	0,0004±0,00008	0,003±0,0001	3,323	0,045
<i>Fibrobacter</i>	0,002±0,0003	0,07±0,008	16,700	0,000467
<i>Oxobacter</i>	0,005±0,0004	0,02±0,004	4,441	0,021
<i>Gracilibacter</i>	0,0007±0,00009	0,04±0,003	39,015	0,000037
<i>Oxalobacter</i>	0,0004±0,00002	0,03±0,002	38,459	0,000039
<i>Sporobacter</i>	0,001±0,0002	0,03±0,001	11,225	0,0015
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0,0007±0,0004	0,01±0,002	5,389	0,012

Таблица 2. Идентификация в составе микробиоценоза пародонта родов бактерий, свидетельствующая о различиях между пациентами с диагнозом ХГП и контролем (уровень достоверности: $t > 3,0$ при $p \leq 0,05$); $M \pm m$

Род бактерий	Среднее значение (% в микробиоценозе) и среднее квадратичное отклонение		<i>t</i>	<i>p</i>
	ХГП	контроль		
<i>Aggregatibacter</i>	1,6±0,8	11,0±1,2	4,64	0,019
<i>Granulicatella</i>	0,6±0,05	2,4±0,3	3,19	0,05
<i>Megasphaera</i>	0,02±0,01	0,4±0,003	32,3	0,00007
<i>Comamonas</i>	0,004±0,001	0,09±0,01	20,3	0,0003
<i>Alysiella</i>	0,0005±0,0006	0,02±0,008	17,2	0,0004

торых повышенный уровень *A. muciniphila* в микробиоценозе кишечника ассоциируется с индивидуальной устойчивостью человека к ожирению, диабету 2-го типа и развитию метаболического синдрома при любом типе питания [4]. В экспериментах на мышах и в ходе клинических исследований авторы установили, что повышение доли этой бактерии эффективно предотвращает развитие ожирения и диабета 2-го типа, в том числе при наличии генетической предрасположенности к диабету (на трансгенных мышах). Повышение содержания этой бактерии увеличивает продукцию эндогенных каннабиноидов, что способствует снижению склонности пациентов к локальным воспалительным реакциям. При этом авторы этой и других публикаций констатируют невозможность культивирования *A. muciniphila* на искусственных средах. Поэтому единственным методом влияния на ее численность остается использование пребиотиков.

Следующей задачей работы было сравнение количества бактерий различных видов в микробиоценозе кишечника у пациентов с наличием и отсутствием ХГП; сравнение также выполнялось с применением критерия Стьюдента (табл. 3).

Аналогичным способом было выполнено сравнение количественного состава бактерий различных видов в микробиоценозе пародонта у групп пациентов с наличием и отсутствием ХГП (табл. 4).

Анализ выявил следующие закономерности:

— у пациентов с диагнозом ХГП наблюдается повышенное содержание в составе поддесневой микрофлоры 3 пародонтопатогенов «красного комплекса» по Сокранскому: *P. gingivalis* ($p=0,0001$), *T. forsythensis* ($p=0,0002$) и *T. denticola* ($p=0,0012$). В среднем различия в степени обсемененности этими бактериями для групп здоровых и больных ХГП составляют: для *P. gingivalis* — 6,7 цикла (104 раза), для *T. forsythensis* — 4,3 цикла (17 раз), для *T. denticola* — 2,3 цикла (4,9 раза). Обсемененность *A. actinomycetemcomitans* и *P. intermedia* не является существенным фактором патогенеза, они в равной мере встречаются в контроле и у пациентов с ХГП соответственно ($p=0,56$ и $0,09$);

— у пациентов с диагнозом ХГП наблюдается повышенное содержание в микробиоме кишечника представителей семейств *Enterobacteriaceae* ($p=0,01$) и *Eubacteriaceae* ($p=0,003$). В среднем различия в степени обсемененности этими бактериями для групп здоровых и больных пародонтитом составляют: для *Enterobacteriaceae* — 2,6 цикла (6 раз), для *Eubacteriaceae* — 3,9 цикла (15 раз).

Анализируя перечень видов из состава микробиоценозов кишечника и пародонта, ассоциированных с тем или иным состоянием пародонта, необходимо отметить, что, как и при анализе родов, в нем резко преобладают ви-

ды-протекторы, тогда как видов-патогенов насчитывается только два: *Leptotrichia* spp. и *Brachymonas* spp. Оба они идентифицированы в качестве фактора риска развития пародонтита в микробиоме кишечника, однако степень ассоциации этого признака с повышенным риском развития пародонтита невысока (соответственно $t=4,0$ и $3,3$). Напротив, число видов-протекторов, повышение доли которых в консорциуме снижает риск развития пародонтита, достаточно велико: 39 видов в микробиоме кишечника и 19 — в микробиоме пародонта.

Наиболее значим из обнаруженных маркеров отсутствия предрасположенности к ХГП оказалось повышение доли в консорциуме *A. muciniphila* ($t=133,7$ при $p=10^{-6}$). Этот результат полностью совпадает с наблюдениями, сделанными при анализе ассоциации по родам, что ожидаемо: в роде *Akkermansia* в настоящее время присутствует только 1 вид. Опубликованные данные о биологии *A. muciniphila* не позволяют судить о механизме ее воздействия на состояние здоровья человека [7], но имеется несколько статистически подтвержденных сообщений о положительном влиянии этой бактерии на риск развития диабета, ожирения, атопического дерматита и постантибиотической диареи, ассоциированной с *C. difficile* [3]. Имеются данные лабораторных исследований, показывающие способность *A. muciniphila* непосредственно влиять на снижение уровня холестерина в крови, провоспалительных цитокинов в крови, метаболизм антиоксидантов, поступающих с пищей. В совокупности эти наблюдения скорее позволяют предполагать наличие системных эффектов *A. muciniphila* на организм в целом, которые обуславливают лучшую или худшую степень защиты пародонта от воспалительных поражений. Опираясь на данные публикации, аналогичный эффект, хотя и менее выраженный, может быть приписан и виду *Ruminococcus bromii* [7], повышение доли которого в консорциуме кишечника, по нашим данным, тесно связано с развитием пародонтита.

Описывая состав прочих видов, повышение доли которых в консорциуме влияет на риск развития пародонтита, необходимо отметить большое число видов, родственных известным пародонтопатогенам.

Системный характер взаимосвязи между составом микробиоценозов кишечника и пародонта подтверждается сходством между анаэробными консорциумами пародонта и ЖКТ.

Нами выявлено, что у пациентов со здоровым пародонтом процентное содержание *P. gingivalis* в консорциуме кишечника среднем в 2 раза выше, чем у пациентов с ХГП. Доля другого пародонтопатогена — *T. denticola* — в консорциуме кишечника контрольной группы в 6 раз выше, чем у пациентов с ХГП. При этом качественно оба вида пародонтопатогенов присутствуют в микробиоме кишеч-

Таблица 3. Идентификация в составе микробиоценоза кишечника видов бактерий, свидетельствующая о различиях между пациентами с ХГП и контроля (уровень достоверности: $t > 3,0$ при $p \leq 0,05$); $M \pm m$

Род бактерий	Среднее значение (% в микробиоценозе) и среднее квадратичное отклонение		<i>t</i>	<i>p</i>
	ХГП	контроль		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,08±0,002	0,1±0,02	3,7	0,03
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,02±0,002	0,01±0,0008	4,0	0,03
<i>Treponema denticola</i>	0,03±0,004	0,05±0,006	3,5	0,04
<i>Ruminococcus bromii</i>	0,05±0,004	1,2±0,01	21,2	0,0002
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0,02±0,007	3,2±0,3	133,7	0,000001
<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	0,005±0,0003	0,03±0,2	6,4	0,008
<i>Thalassospira</i> spp.	0,02±0,004	2,5±0,3	167,2	0
<i>Bergeyella</i> spp.	0,03±0,002	0,05±0,4	10,4	0,002
<i>Prevotella loescheii</i>	0,001±0,0001	0,01±0,001	6,4	0,008
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0,02±0,003	0,07±0,005	3,7	0,03
<i>Bacteroides stercoris</i>	0,08±0,009	1,5±0,2	8,6	0,003
Вид кандидатного рода tm7	0,001±0,0001	0,01±0,0009	3,8	0,03
<i>Sarcina</i> spp.	0,1±0,02	0,6±0,1	7,7	0,005
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,001±0,0001	0,03±0,002	16,6	0,0005
<i>Actinobaculum</i> spp.	0,0004±0,00003	0,006±0,0005	7,0	0,006
<i>Bacteroides ovatus</i>	0,08±0,007	0,4±0,003	4,0	0,03
<i>Eubacterium infirmum</i>	0,002±0,0002	0,01±0,002	3,3	0,04
<i>Brachymonas</i> spp.	0,002±0,0003	0,00000	3,3	0,05
<i>Alistipes massiliensis</i>	0,05±0,006	0,3±0,02	5,2	0,01
<i>Longilinea</i> spp.	0,002±0,0003	0,00000	3,6	0,04
<i>Howardella ureilytica</i>	0,002±0,0004	0,06±0,005	38,8	0,00004
<i>Prevotella baroniae</i>	0,002±0,0003	0	3,3	0,05
<i>Methanobrevibacter</i> spp.	0,002±0,0002	0,08±0,007	20,8	0,0002
<i>Dysgonomonas</i> spp.	0,0004±0,00005	0,003±0,0002	3,3	0,045
<i>Desulfovibrio</i> spp.	0,003±0,0004	0,03±0,004	6,7	0,01
<i>Lactococcus lactis</i>	0,01±0,002	0,05±0,004	4,3	0,02
<i>Ruminococcus callidus</i>	0,008±0,0009	0,08±0,007	4,8	0,02
<i>Enterorhabdus</i> spp.	0,0004±0,00003	0,003±0,0005	3,3	0,045
<i>Fibrobacter</i> spp.	0,002±0,0003	0,07±0,005	16,7	0,0005
<i>Oxobacter</i> spp.	0,005±0,0005	0,02±0,003	4,4	0,02
<i>Gracilibacter</i> spp.	0,0007±0,00009	0,04±0,005	39,0	0,00004
<i>Oxalobacter</i> spp.	0,0004±0,0005	0,03±0,0003	38,5	0,00004
<i>Sporobacter</i> spp.	0,001±0,0002	0,03±0,002	11,2	0,0015
<i>Eubacterium sulci</i>	0,0008±0,0009	0,02±0,001	10,9	0,002
<i>Bacillus vedderi</i>	0,0004±0,00004	0,01±0,0009	15,1	0,001
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i> spp.	0,0007±0,00008	0,01±0,002	5,4	0,01

ника всех пациентов как со здоровым, так и с пораженным пародонтом. Можно предположить, что защитный эффект гиперколонизации кишечника *P. gingivalis* и *T. denticola* опосредован на уровне индукции специфического иммунитета против пародонтопатогенов в форме выработки протективных антител. Не исключено также, что различия в содержании *P. gingivalis* и *T. denticola* в кишечнике двух сравниваемых групп обусловлены неодинаковым поведением других механизмов иммунитета на системном или местном уровне. Факт повсеместной встречаемости *P. gingivalis* и *T. denticola* в кишечнике всех пациентов вне зависимости от пародонтологического диагноза позволяет предполагать, что прямой обмен микрофлорой между слизистыми различных участков желудочно-кишечного тракта хотя и существует, но не является единственным или даже центральным механизмом стабилизации состава микробиоценозов. По-видимому, эту функцию в первую очередь выполняют трофические цепи,

симбиотические и антагонистические взаимодействия между анаэробными консорциумами в составе микробиоценоза, которые принципиально сходны в обоих случаях. Сходство между анаэробными консорциумами пародонта и прямой кишки проявляется и в том, что доминирующим видом в обоих случаях является *Fusobacterium nucleatum*.

При анализе пародонтопатогенных микроорганизмов, выявленных методом NGS-секвенирования, установлены наиболее близкие таксономические родственники большинства патогенов: *A. segnis* и *A. aphrophilus* (родственники *A. actinomycetemcomitans*), *T. venticolii* (родственник *T. denticola*), *P. baroniae*, *Prevotella salivae* и *P. spp.* (родственники *P. intermedia*), а также *C. concisus* (родственник *C. jejuni* — возбудителя энтероколитов).

Таким образом, наблюдаемая тенденция к острой конкуренции между близкими видами, включающими патогенные и протекторные варианты, позволяет предполагать аналогичное явление и внутри видов. Системный

Таблица 4. Идентификация в составе микробиоценоза пародонта видов бактерий, свидетельствующая о различиях между пациентами с диагнозом ХГП и контролем (уровень достоверности: $t > 3,0$ при $p \leq 0,05$); $M \pm m$

Род бактерий	Среднее значение (% в микробиоценозе) и среднее квадратичное отклонение		t	p
	ХГП	контроль		
<i>Aggregatibacter segnis</i>	1,6±0,2	8,3±0,7	3,3	0,044
<i>Prevotella</i> spp.	0,5±0,02	5,5±0,5	8,5	0,0035
<i>Treponema vancouverii</i>	0,04±0,004	0,3±0,004	10,4	0,0019
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	0,04±0,003	2,7±0,4	92,5	0,000003
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0,4±0,02	2,6±0,3	3,6	0,037
<i>Granulicatella paradiacens</i>	0,6±0,03	2,4±0,2	3,2	0,05
<i>Campylobacter concisus</i>	0,2±0,03	1,9±0,3	10,3	0,0019
<i>Megasphaera</i> spp.	0,02±0,001	0,4±0,5	32,3	0,000065
<i>Neisseria subflava</i>	0,04±0,003	0,8±0,07	24,7	0,00014
<i>Comamonas</i> spp.	0,004±0,0005	0,09±0,0008	20,3	0,00026
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,001±0,00008	0,02±0,003	6,3	0,008
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0,001±0,00009	0,01±0,002	7,5	0,005
<i>Prevotella salivae</i>	0,02±0,003	0,3±0,04	10,0	0,0021
<i>Veillonella dispar</i>	0,03±0,002	0,3±0,02	5,7	0,011
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,0005±0,00004	0,004±0,0006	3,5	0,04
<i>Corynebacterium vitæruminis</i>	0,004±0,0005	0,03±0,004	3,9	0,031
<i>Leptotrichia shahii</i>	0,001±0,00008	0,03±0,005	15,3	0,00061
<i>Veillonella parvula</i>	0,005±0,0004	0,03±0,04	3,9	0,029
<i>Alysiella</i> spp.	0,0005±0,00006	0,02±0,003	17,2	0,00042

характер взаимосвязи между составом микробиоценозов кишечника и пародонта подтверждается сходством между анаэробными консорциумами пародонта и ЖКТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственное задание №19.1724.2014/К в сфере научной деятельности).

ЛИТЕРАТУРА

- Зорина О.А., Кулаков А.А., Борискина О.А. Метод ПЦР «в реальном времени» для анализа количественного и качественного соотношения микробиоценоза пародонтального кармана. *Стоматология*. 2011;3:31-33.
- Adler I, Muiño A, Aguas S, Harada L, Díaz M, Lence A, Labbrozzi M, Muiño JM, Elsner B, Avagnina A, Denninghoff V. Helicobacter pylori and oral pathology: Relationship with the gastric infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9922-9935. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9922.
- Belstrom D, Fiehn NE, Nielsen CH, Kirkby N, Twetman S et al. Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41:104-112. doi: 10.1111/jcpe.12190.
- Bradlow HL. Obesity and the gut microbiome: pathophysiological aspects. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2014;17(1):53-61. doi: 10.1515/hmbci-2013-0063.
- Everard A. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):9066-9071. doi: 10.1073/pnas.1219451110.
- Halmos EP, Christophersen CT, Bird AR, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut*. 2015;64(1):93-100. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307264.
- Hansen AK, Hansen CH, Krych L, Nielsen DS. Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(47):17727-17736. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17727.
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS genetics*. 2008;4:1000255. doi: 10.1371/journal.pgen.1000255.
- Junemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS one*. 2012;7:41606. doi: 10.1371/journal.pone.0041606.
- Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of dental research*. 2008;87:1016-1020. doi: 10.1177/154405910808701104.
- Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *Journal of microbiological methods*. 2009;79:266-271. doi: 10.1016/j.mimet.2009.09.012.
- Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(10):727-752. doi: 10.1128/CMR.14.4.727-752.2001.
- Nabwera HM, Logan RP. Epidemiology of Helicobacter pylori: transmission, translocation and extragastric reservoirs. *J Physiol Pharmacol*. 1999;50:711-722.
- Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:713-739. doi: 10.1128/CMR.00011-10.