

Характеристика микробиоценозов поддесневой биопленки и содержимого кишечника при хроническом генерализованном пародонтите у пациентов с метаболическим синдромом

К.м.н. Н.Б. ПЕТРУХИНА^{1,2*}, д.м.н. О.А. ЗОРИНА^{1,2}, Е.В. ШИХ¹, Е.В. КАРТЫШЕВА¹

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия; ²Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва, Россия

В результате исследования составов микробных консорциумов рта и кишечника с применением глубокого секвенирования библиотек 16S рДНК показано, что качественный состав микробиома кишечника пациентов с хроническим пародонтитом на фоне метаболического синдрома достоверно отличается от микробиома пациентов со здоровым пародонтом. Анализ состава поддесневой микрофлоры методом полимеразной цепной реакции в реальном времени у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) показал более высокое содержание в поддесневой биопленке *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*. При исследовании микрофлоры кишечника у пациентов с ХГП в сочетании с метаболическим синдромом статистически значимо повышается содержание представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Eubacteriaceae*.

Ключевые слова: пародонтит, метаболический синдром, дисбиоз, полимеразная цепная реакция, NGS-секвенирование.

Microbiocenosis of subgingival biofilm and intestinal content in chronic periodontal disease in patients with metabolic syndrome

N.B. PETRUKHINA^{1,2*}, O.A. ZORINA^{1,2}, E.V. SHIKH¹, E.V. KARTYSHEVA¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; ²Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

The aim of the study was to assess correlations of subgingival biofilm and intestinal microbiota in patients with chronic periodontal disease (CPD) and metabolic syndrome (MS). The study included 80 patients divided in 2 groups: 40 healthy individuals with no signs of periodontal disease and 40 patients with CPD and MS. Oral and intestinal microbial consortia compositions were revealed using deep sequencing libraries of 16S rDNA. The study showed that the qualitative composition of the intestinal microbiome in patients with CPD differ significantly from the microbiome of controls. Real-time PCR of subgingival microflora in CPD patients revealed high content of *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola*, while in intestinal microbiome dominated representatives of *Enterobacteriaceae* and *Eubacteriaceae* families with signs of intestinal dysbiosis mostly associated with the decrease of protective species.

Keywords: periodontal disease, metabolic syndrome, dysbiosis, PCR, NGS sequencing.

Метаболический синдром (МС) представляет собой симптомокомплекс, включающий абдоминальное ожирение, нарушение толерантности к глюкозе или сахарный диабет 2-го типа, а также характерную для этой патологии атерогенную дислипидемию (ВНОК, 2009). По данным Международной федерации диабета, распространенность МС в популяции около 25%, а среди лиц старше 50 лет она достигает 40–50% (IDF, 2011). Из-за развития тяжелых осложнений МС не только приводит к потере здоровья, снижению качества и продолжительности жизни, но и требует значительных финансовых затрат на лечение и реабилитацию как со стороны государства, так и самого пациента [1, 2, 5]. В свою очередь длительные протекающие воспалительные заболевания пародонта также могут оказывать негативные воздействия на организм в целом [12, 13].

В ряде клинических исследований показано, что у пациентов с МС отмечается более тяжелое течение воспалительных заболеваний пародонта. Полагают, что эти заболевания по принципу суперпозиции оказывают взаимное влияние друг на друга, но точный механизм этой взаимосвязи до конца не выяснен [7, 11].

Установлено, что общими патогенетическими звеньями МС и ХГП являются системное воспаление и оксидативный стресс, которые усугубляются вследствие дисбиоза пищеварительного тракта и сопутствующих заболеваний — гастрита, энтероколита, стеатогепатита, сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), способствующих увеличению содержания провоспалительных медиаторов и продуктов свободнорадикального окисления в плазме крови [3, 6].

Вместе с тем еще недостаточно данных, позволяющих провести более детальное изучение механизмов развития дисбиотических процессов при ХГП и МС. Роль дисбиоза пищеварительного тракта в развитии системной патологии и взаимовлияния бактерий из биоценозов разных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) редко учитываются в клинической практике, что может являться причиной низкой эффективности профилактических и лечебных мероприятий.

Цель исследования — повысить эффективность диагностики и лечения ХГП у пациентов с МС, изучив взаимосвязь микробиоценозов поддесневой биопленки и содержимого кишечника.

Материал и методы

Для изучения составов микробных консорциумов рта и кишечника были обследованы 80 человек: 1-я группа — практические здоровые лица с интактным пародонтом ($n=40$), 2-я группа — пациенты с ХГП на фоне МС ($n=40$).

Клиническое обследование пациентов включало сбор жалоб и анамнеза, осмотр, определение индекса гигиены ОНИ-S (J. Green, J. Vermillion, 1964), индекса кровоточивости Мюллемана (H. Mühlemann, 1971) в модификации Коуэлла (I. Cowell, 1975). Основаниями для постановки диагноза ХГП была совокупность клинических показателей, а также деструкция костной ткани, которую определяли с помощью ортопантомографии.

Отбор образцов поддесневой микрофлоры осуществлялся путем введения эндодонтического штифта в пародонтальный карман (ПК) в случае пародонтита или в десневую бороздку в случае здорового пародонта на глубину 2—5 мм. У каждого пациента брали по 4 образца: 2 с верхней челюсти и 2 с нижней (эти образцы от каждого пациента маркировали как А и В), поскольку развитие пародонтита может быть неравномерным, забор биологического материала из разных точек может дать более полную картину и позволит усреднить результаты в случае их неравномерности. Часто заболевание в первую очередь поражает коренные зубы, поэтому пробы брали из десневой бороздки или ПК в области первых моляров (при их отсутствии в области премоляров).

Для исследования микрофлоры кишечника пациенты сдавали образец кала в стерильном контейнере. Все образцы биоматериала получали индивидуальную маркировку.

Для исследования микрофлоры применяли современные методы молекулярно-генетического исследования:

— полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени с применением наборов реактивов Дентофлор и Энтерофлор «ДНК-технология», Москва;

— NGS-секвенирование суммарной ДНК с праймерами на область V6 16S рДНК с помощью NGS-секвенатора Illumina MiSeq. Для идентификации микроорганизмов использовали процедуру автоматического поиска Blast по базе данных NCBI GenBank (рис. 1).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования общего количества микрофлоры (бактериальная масса) содержимого ПК и кишечника (кал) у пациентов с МС (группа исследования) и лиц без метаболических нарушений (группа сравнения) выявили существование межгрупповых различий. Общая

бактериальная масса поддесневой микрофлоры у пациентов группы исследования (индекс массы тела (ИМТ) ≥ 25 кг/м²) составила $10^{8,4}$ КОЕ, микрофлоры кишечника — $10^{17,4}$ КОЕ, что статистически достоверно ($p < 0,01$) отличалось от таковых в контроле (ИМТ < 25 кг/м²), где в содержимом ПК бактериальная масса была равна $10^{4,5}$ КОЕ, в кишечнике — $10^{14,9}$ КОЕ.

Высокий коэффициент корреляции ($r_{\text{КОЕК-КОЕР}}$) между показателями общей бактериальной массы кишечника и полости рта (ПР; $r_{\text{КОЕК-КОЕР}} = 0,82$; $p < 0,001$) свидетельствовал о наличии тесной взаимосвязи состояния микробиоты ПР с микробиотой нижних отделов пищеварительного тракта (кишечник); табл. 1.

Результаты молекулярной характеристики состава микробных консорциумов пародонта с применением набора Дентофлор («ДНК-технология» Москва) представлены в табл. 2.

Результаты молекулярной характеристики состава микробных консорциумов кишечного содержимого, полученные методом ПЦР в реальном времени с применением наборов Энтерофлор «ДНК-технология», Москва, представлены в табл. 3.

В ходе исследования составов поддесневой и кишечной микрофлоры методом ПЦР в реальном времени в группе лиц с ХГП обнаружены закономерности в представленности молекулярных маркеров, существенно отличающиеся от закономерностей в группе лиц с интактным пародонтом.

В составе поддесневой микрофлоры у пациентов с ХГП наблюдается более высокое содержание 3 пародонтопатогенов: *P. gingivalis* ($p=0,0001$), *T. forsythia* ($p=0,0002$) и *T. denticola* ($p=0,0012$). В среднем различия в степени обсемененности этими бактериями в группах здоровых и больных ХГП на фоне МС составляют: для *P. gingivalis* — 6,7 цикла (104 раза), для *T. forsythia* — 4,3 цикла (17 раз), для *T. denticola* — 2,3 цикла (4,9 раза). Обсемененность *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* и *C. albicans* не является существенным фактором патогенеза ХГП, в равной мере встречаясь в обеих выборках (соответственно $p=0,56$; 0,09 и 0,78) — рис. 2.

В содержимом кишечника (кал) у пациентов с ХГП на фоне МС наблюдается более высокое содержание 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), а для *Eubacteriaceae* 3,9 цикла (15 раз) — рис. 3.

Подробный анализ представленности видов и родов бактерий в поддесневой микрофлоре пациентов с ХГП и лиц со здоровым пародонтом был проведен с применением метода NGS-секвенирования на платформе Illumina.

Таблица 1. Результаты исследования общего количества микрофлоры (бактериальная масса) содержимого ПК и кишечника (кал) у пациентов с МС (группа исследования) и лиц без метаболических нарушений (группа сравнения)

Показатель	Группа исследования (n=40)	Группа сравнения (n=40)
ПР (бактериальная масса)	$10^{8,4*}$	$10^{4,5}$
Толстый отдел кишечника	$10^{17,4*}$	$10^{14,9}$

Примечание. * — $p < 0,01$ по отношению к группе сравнения.

Таблица 2. Результаты молекулярной характеристики состава микробных консорциумов пародонта с применением набора Дентофлор

Выборка	Частота выявления, %	Медиана	Min	Max	Q25	Q75
16s:						
1-я группа (n=40)	100	23,8	21,0	26,6	22,4	25,2
2-я группа (n=40)	100	20,9	17,8	24,0	19,35	22,45
<i>Aggregatibacter actinomycetem-comitans:</i>						
1-я группа (n=40)	32,5	35,4	34,9	35,9	35,15	35,65
2-я группа (n=40)	32,5	35,5	34,6	36,4	35,05	35,95
<i>Porphyromonos gingivalis:</i>						
1-я группа (n=40)	57,5	31,4	24,1	38,7	27,75	35,05
2-я группа (n=40)	80,0	24,7	19,2	30,2	21,95	27,45
<i>Prevotella intermedia:</i>						
1-я группа (n=40)	25,0	31,1	30,2	32	30,65	31,55
2-я группа (n=40)	30,0	31,3	29,1	33,5	30,2	32,4
<i>Tannerella forsythia:</i>						
1-я группа (n=40)	50,0	33,9	30,7	37,1	32,3	35,5
2-я группа (n=40)	30,0	29,6	29	30,2	29,3	29,9
<i>Treponema denticola:</i>						
1-я группа (n=40)	25,0	30,7	22,6	38,8	26,65	34,75
2-я группа (n=40)	90,0	28,4	21,5	35,3	24,95	31,85
<i>Candida albicans:</i>						
1-я группа (n=40)	7,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
2-я группа (n=40)	10,0	38,3	37,4	39,2	37,85	38,75
Геномная ДНК человека:						
1-я группа (n=40)	100	31,9	29,7	34,1	30,8	33,0
2-я группа (n=40)	100	31,2	30,2	32,2	30,7	31,7

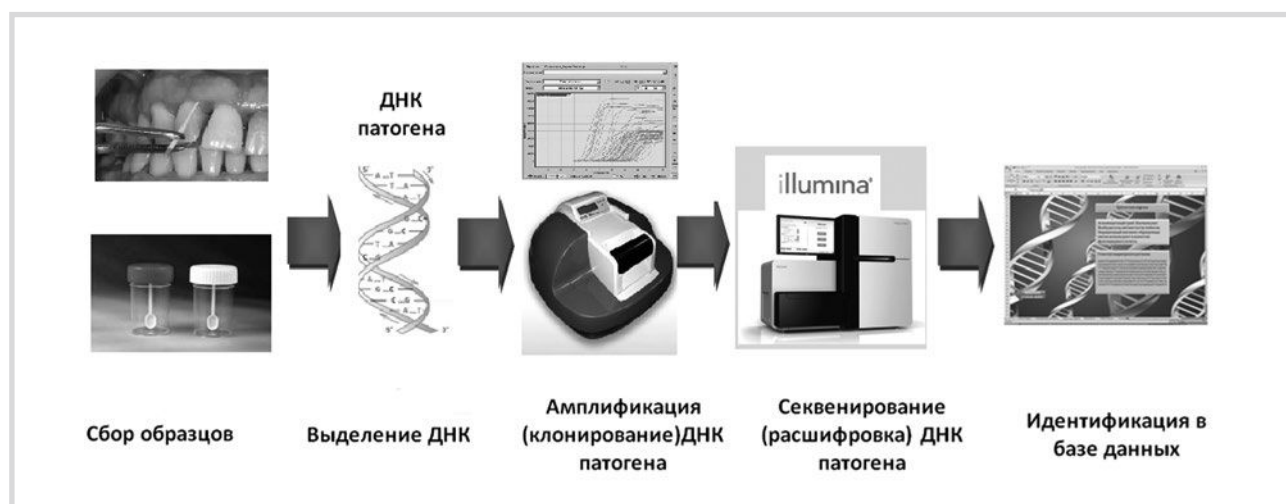


Рис. 1. Схема исследования микробного состава поддесневой микрофлоры и кишечного содержимого.

Сопоставление составов микробиомов пародонта и кишечника позволило установить совпадение 242 (93%) родов из 260, в то время как из 500 видов микроорганизмов совпали только 272. Сходство между анаэробными консорциумами пародонта и кишечника проявляется и в том, что доминирующим видом в обоих случаях является *Fusobacterium nucleatum*.

Это наблюдение показывает, что прямой обмен микрофлорой между слизистыми разных участков ЖКТ хотя и существует, но не является единственным или даже центральным механизмом стабилизации состава различных микробиоценозов. По-видимому, эту функцию выполня-

ют 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*.

Достоверность полученных данных была проверена путем сопоставления родов в составах микробиоценозов пародонта у лиц с интактным пародонтом (1-я группа) и у пациентов с ХГП на фоне МС (2-я группа) с применением параметрического критерия Стьюдента, что подтвердило

Таблица 3. Результаты молекулярной характеристики состава микробных консорциумов кишечного содержимого с применением набора Энтерофлор

Выборка	Частота выявления, %	Количественное содержание — Ct				
		медиана	min	max	Q25	Q75
16s:						
1-я группа (n=40)	100	15,5	14,4	16,6	14,95	16,05
2-я группа (n=40)	100	16,1	14,3	17,9	15,2	17,0
<i>Enterobacterium</i> spp.:						
1-я группа (n=40)	100	24,6	19,4	29,8	22,0	27,2
2-я группа (n=40)	100	22,0	20,5	23,5	21,25	22,75
<i>Eubacterium</i> spp.:						
1-я группа (n=40)	100	23,3	17,0	29,6	20,15	26,45
2-я группа (n=40)	100	19,4	17,6	21,2	18,5	20,3
<i>Peptostreptococcus/Parvimonas</i> :						
1-я группа (n=40)	100	22,0	21,2	22,8	21,6	22,0
2-я группа (n=40)	100	22,5	19,6	25,4	21,05	23,95
<i>Veilonellaceae</i> :						
1-я группа (n=40)	100	21,2	20,1	22,3	20,65	21,75
2-я группа (n=40)	100	22,5	20,1	24,9	21,3	23,7
<i>Neisseria</i> spp.:						
1-я группа (n=40)	25,0	40,1	39,9	40,3	40,0	40,2
2-я группа (n=40)	40,0	38,4	37,0	39,8	37,7	39,1
<i>Faecalibacterium prau</i> :						
1-я группа (n=40)	100	18,6	17,3	19,9	17,95	19,25
2-я группа (n=40)	100	20,0	19,0	21,0	19,5	20,5
<i>Ruminococcus</i> :						
1-я группа (n=40)	100	17,0	15,6	18,4	16,3	17,7
2-я группа (n=40)	100	17,3	16,1	18,5	16,7	17,9
Геномная ДНК человека:						
1-я группа (n=40)	100	31,9	29,7	34,1	30,8	33,0
2-я группа (n=40)	100	31,2	30,2	32,2	30,7	31,7

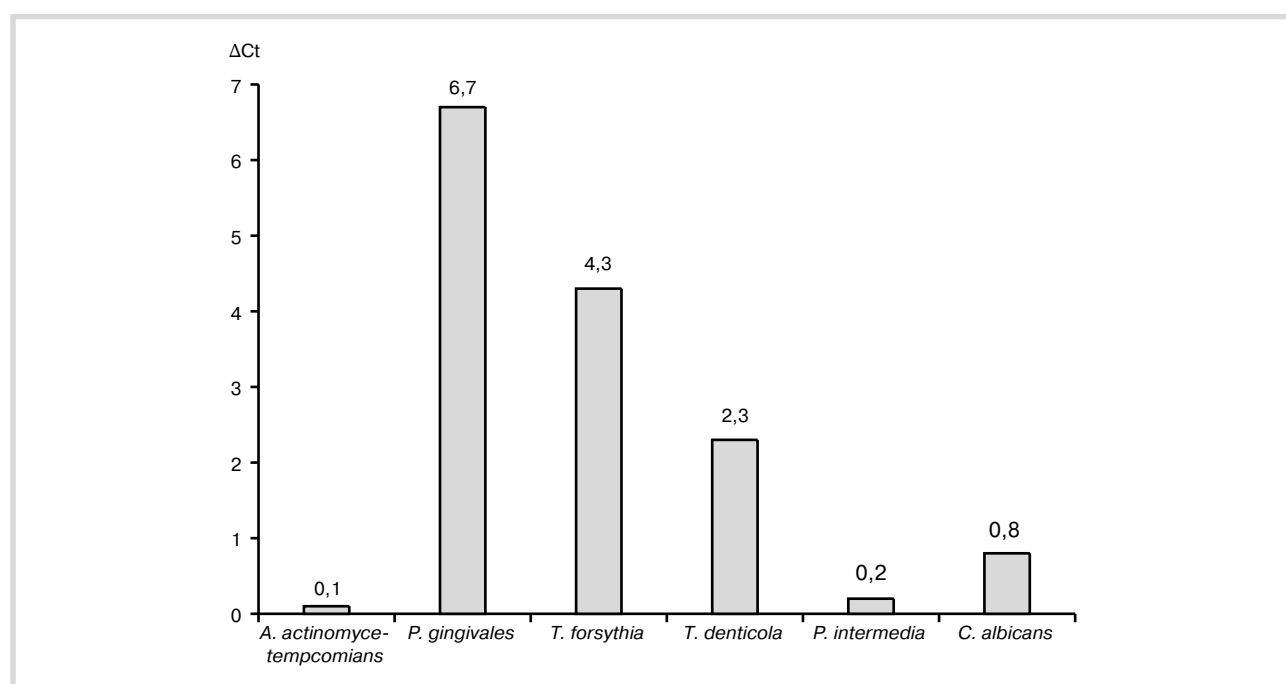


Рис. 2. Различия в количественном содержании бактерий в поддесневой биопленке у лиц с интактным пародонтом и больных ХГП на фоне МС.

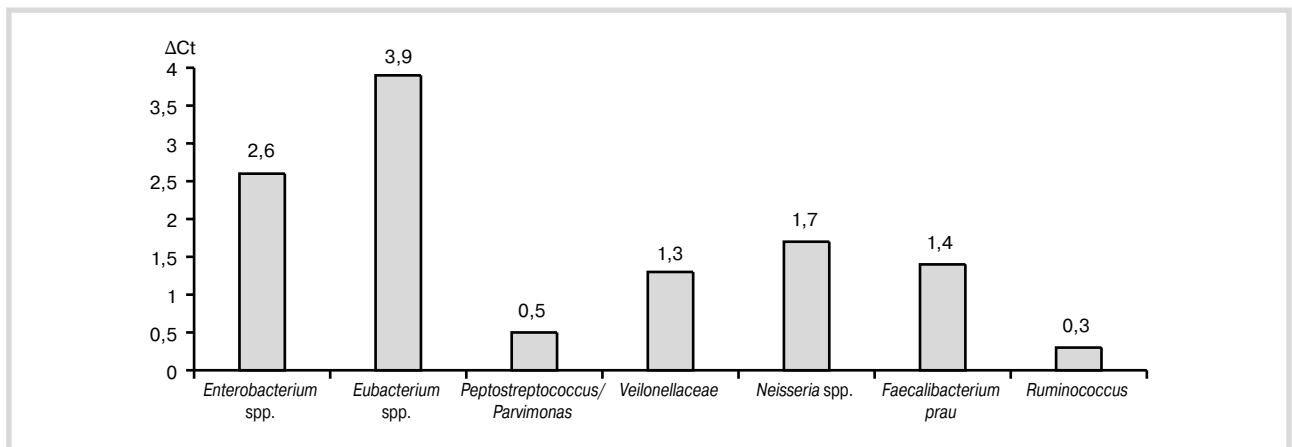


Рис. 3. Различия в количественном содержании бактерий кишечника у лиц с интактным пародонтом и больных ХГП на фоне МС (ΔCt).

Таблица 4. Сопоставление родов в составах микробиоценозов пародонта у лиц с интактным пародонтом и пациентов с ХГП на фоне МС

Род бактерий	Среднее значение, % в микробиоценозе		t	p
	1-я группа — лица с интактным пародонтом (n=20)	2-я группа — пациенты с ХГП (n=20)		
<i>Aggregatibacter</i>	11,0	1,61	-4,64	0,019
<i>Granulicatella</i>	2,37	0,6	-3,19	0,05
<i>Megasphaera</i>	0,4	0,016	-32,3	0,00007
<i>Comamonas</i>	0,094	0,004	-20,3	0,0003
<i>Alysiella</i>	0,019	0,00047	-17,2	0,0004

наличие существенных различий между этими группами (табл. 4).

Подобное сравнение родов с применением параметрического критерия Стьюдента было проведено при анализе состава микробиоценозов кишечника; сравнение также подтвердило наличие существенных различий между группами лиц с интактным пародонтом и пациентов с ХГП в сочетании с МС (табл. 5).

Анализируя данные табл. 4 и 5, необходимо отметить, что на уровне родов бактерий наблюдается повышение доли *Brachymonas*, *Longilinea*, *Leptotrichia* и *Streptococcus*, причем для последнего рода различия между группами контроля и случая статистически недостоверны, хотя средние величины различаются почти в 4 раза. Удивительно, что все 4 рода относятся к микрофлоре кишечника, а не пародонта, что подтверждает тезис о системном характере взаимосвязи между составом микробиоценозов кишечника и пародонта.

Существенно большее число групп — 20 родов микрофлоры кишечника и 6 родов микрофлоры пародонта были ассоциированы со здоровым пародонтом. Как оказалось, 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 и МС. Бактерии этих родов могут рассматриваться как кандидатные энтеропротекторы системного действия.

Наиболее интересным является обнаружение в кишечнике лиц со здоровым пародонтом повышенной доли бактерий рода *Akkermansia* (содержит единственный вид *Akkermansia muciniphila*). С 2013 г. опубликовано более 20

статей, в которых повышенный уровень *A. muciniphila* в микробиоценозе кишечника ассоциируется с индивидуальной устойчивостью человека к ожирению, диабету 2-го типа и развитию МС при любом типе питания [8]. 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.

Следующей задачей было сравнение состава и численности бактерий разных видов в поддесневом микробиоценозе у пациентов с интактным пародонтом и ХГП; сравнение также выполнялось с применением параметрического критерия Стьюдента (табл. 6).

Аналогичным способом выполнено сравнение численности бактерий разных видов в микробиоценозах кишечника двух групп: лиц с интактным пародонтом и пациентов с диагнозом «пародонтит» (табл. 7).

Анализируя список видов из микробиоценозов пародонта и кишечника, ассоциированных с тем или иным состоянием пародонта, необходимо отметить, что, как и при анализе родов, в нем резко преобладают виды-протекторы, тогда как видов-патогенов насчитывается только 2: *Leptotrichia* spp. и *Brachymonas* spp. Оба они идентифицированы в микробиоме кишечника, но ассоциированы с риском развития пародонтита, хотя степень достоверности этой ассоциации невысока (соответственно $t=4,0$ и $3,3$). Напротив, число видов-протекторов, гиперколонизация которыми ассоциируется с интактным пародонтом, достаточно велико: 39 видов в микробиоме кишечника и 19 в микробиоме пародонта.

Таблица 5. Сопоставление родов бактерий в составах микробиоценозов кишечника у лиц с интактным пародонтом и пациентов с ХГП на фоне МС

Род бактерий	Среднее значение, % в микробиоценозе		$t > 3,0$	$p < 0,05$
	1-я группа — лица с интактным пародонтом (n=20)	2-я группа — пациенты с ХГП (n=20)		
<i>Streptococcus</i>	1,16	5,38	0,682	0,54
<i>Porphyromonas</i>	0,24	0,16	-7,250	0,005
<i>Capnocytophaga</i>	0,057	0,024	-4,644	0,019
<i>Bacillus</i>	0,016	0,0024	-10,071	0,002
<i>Leptotrichia</i>	0,025	0,04	4,725	0,018
<i>Akkermansia</i>	3,14	0,02	-130,528	0,000001
<i>Thalassospira</i>	2,54	0,02	-167,210	0,000000
<i>Bergeyella</i>	0,048	0,03	-10,392	0,0019
<i>Desulfovibrio</i>	0,029	0,004	-6,338	0,0079
Кандидатный род tm7	0,0095	0,001	-3,783	0,032
<i>Sarcina</i>	0,63	0,11	-7,646	0,0046
<i>Actinobaculum</i>	0,0064	0,00038	-7,094	0,0057
<i>Brachymonas</i>	0,00000	0,00222	3,297	0,046
<i>Longilinea</i>	0,00000	0,00185	3,606	0,037
<i>Howardella</i>	0,063	0,00259	-117,496	0,000001
<i>Methanobrevibacter</i>	0,083	0,00233	-20,815	0,00024
<i>Enterorhabdus</i>	0,0032	0,00038	-3,323	0,045
<i>Fibrobacter</i>	0,067	0,00243	-16,700	0,000467
<i>Oxobacter</i>	0,022	0,00471	-4,441	0,021
<i>Gracilibacter</i>	0,038	0,00074	-39,015	0,000037
<i>Oxalobacter</i>	0,032	0,00036	-38,459	0,000039
<i>Sporobacter</i>	0,02856	0,00109	-11,225	0,0015
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i>	0,00952	0,00073	-5,389	0,012

Таблица 6. Сопоставление видов бактерий в составах микробиоценозов пародонта и кишечника у лиц с интактным пародонтом и пациентов с ХГП на фоне МС

Род бактерий	Среднее значение, % в микробиоценозе		t	p
	1-я группа — лица с интактным пародонтом (n=20)	2-я группа — пациенты с ХГП (n=20)		
<i>Aggregatibacter segnis</i>	8,25	1,56	-3,3	0,044147
<i>Prevotella</i> spp.	5,45	0,48	-8,5	0,003478
<i>Treponema vancouverii</i>	0,27	0,037	-10,4	0,001914
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	2,65	0,036	-92,5	0,000003
<i>Leptotrichia buccalis</i>	2,57	0,44	-3,6	0,036795
<i>Granulicatella paradiacens</i>	2,37	0,6	-3,2	0,049772
<i>Campylobacter concisus</i>	1,88	0,2	-10,3	0,001933
<i>Megasphaera</i> spp.	0,4	0,016	-32,3	0,000065
<i>Neisseria subflava</i>	0,77	0,038	-24,7	0,000145
<i>Comamonas</i> spp.	0,09	0,00431	-20,3	0,000260
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,017	0,00110	-6,3	0,008087
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0,01	0,00098	-7,5	0,004956
<i>Prevotella salivae</i>	0,3	0,02347	-10,0	0,002118
<i>Veillonella dispar</i>	0,28	0,03363	-5,7	0,010605
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,0042	0,00047	-3,5	0,039975
<i>Corynebacterium vitae</i>	0,027	0,00394	-3,9	0,030928
<i>Leptotrichia shahii</i>	0,033	0,00095	-15,3	0,000610
<i>Veillonella parvula</i>	0,027	0,00486	-3,9	0,029273
<i>Alsiella</i> spp.	0,01871	0,00047	-17,2	0,000425

Наиболее значимым из обнаруженных микробных маркеров, указывающих на низкий уровень предрасположенности к пародонтиту, оказалась гиперколонизация *A. muciniphila* ($t=133,7$ при $p=10^{-6}$). Этот результат полно-

стью совпадает с наблюдениями, сделанными при анализе ассоциации по родам, что ожидаемо: в роде *Akkermansia* в настоящее время присутствует только 1 вид. Имеются данные лабораторных исследований, показывающих спо-

Таблица 7. Сопоставление видов бактерий в составах микробиоценозов пародонта и кишечника у лиц с интактным пародонтом и пациентов с ХГП на фоне МС

Род бактерий	Среднее значение, % в микробиоценозе		t	p
	1-я группа — лица с интактным пародонтом (n=20)	2-я группа — пациенты с ХГП (n=20)		
<i>P. gingivalis</i>	0,13	0,077	-3,7	0,034358
<i>Leptotrichia</i> spp.	0,013	0,024	4,0	0,028561
<i>T. denticola</i>	0,05	0,033	-3,5	0,040314
<i>Ruminococcus bromii</i>	1,19	0,052	-21,2	0,000229
<i>A. muciniphila</i>	3,15	0,016	-133,7	0,000001
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,03	0,005	-6,4	0,007760
<i>Thalassospira</i> spp.	2,54	0,024	-167,2	0,000000
<i>Bergeyella</i> spp.	0,048	0,028	-10,4	0,001902
<i>Prevotella loeschii</i>	0,01	0,00098	-6,4	0,007792
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0,07	0,019	-3,7	0,033173
<i>Bacteroides stercoris</i>	1,46	0,077	-8,6	0,003346
Вид кандидатного рода tm7	0,0095	0,001	-3,8	0,032369
<i>Sarcina</i> spp.	0,64	0,11	-7,7	0,004646
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,029	0,0012	-16,6	0,000474
<i>Actinobaculum</i> spp.	0,0064	0,00038	-7,0	0,005762
<i>Bacteroides ovatus</i>	0,4	0,0787	-4,0	0,026584
<i>Eubacterium infirmum</i>	0,0095	0,0018	-3,3	0,044109
<i>Brachymonas</i> spp.	0,00000	0,0022	3,3	0,045824
<i>Alistipes massiliensis</i>	0,29	0,05	-5,2	0,014112
<i>Longilinea</i> spp.	0,00000	0,0019	3,6	0,036604
<i>Howardella ureilytica</i>	0,063	0,002	-38,8	0,000038
<i>Prevotella baroniae</i>	0,00000	0,002	3,3	0,045824
<i>Methanobrevibacter</i> spp.	0,083	0,002	-20,8	0,000243
<i>Dysgonomonas</i> spp.	0,003	0,00038	-3,3	0,044942
<i>Desulfovibrio</i> spp.	0,029	0,003	-6,7	0,006854
<i>Lactococcus lactis</i>	0,048	0,01	-4,3	0,023789
<i>Ruminococcus callidus</i>	0,079	0,008	-4,8	0,017118
<i>Enterorhabdus</i> spp.	0,003	0,00038	-3,3	0,044942
<i>Fibrobacter</i> spp.	0,067	0,0024	-16,7	0,000467
<i>Oxobacter</i> spp.	0,022	0,0047	-4,4	0,021231
<i>Gracilibacter</i> spp.	0,038	0,00074	-39,0	0,000037
<i>Oxalobacter</i> spp.	0,03	0,00036	-38,5	0,000039
<i>Sporobacter</i> spp.	0,029	0,001	-11,2	0,001516
<i>Eubacterium sulci</i>	0,019	0,00075	-10,9	0,001669
<i>Bacillus vedderi</i>	0,013	0,00036	-15,1	0,000629
<i>Hydrogenoanaerobacterium</i> spp.	0,01	0,00073	-5,4	0,012520

способность *A. muciniphila* непосредственно влиять на снижение холестерина в крови, провоспалительных цитокинов в циркуляции, метаболизм антиоксидантов, поступающих с пищей. В совокупности эти наблюдения позволяют предполагать наличие системных эффектов *A. muciniphila* на организм в целом, которые обуславливают лучшую или худшую степень защиты пародонта от воспалительных поражений [9].

Описывая состав прочих видов, гиперколонизация которыми ассоциирована с низким риском развития пародонтита, необходимо отметить большое число видов, родственных известным пародонтопатогенам.

Во-первых, удивительным является наблюдение, что гиперколонизация кишечника *P. gingivalis* (в среднем в 2 раза) и *T. denticola* (в среднем в 6 раз) не связана с риском развития пародонтита. При этом доля этих бактерий в микробиомах кишечника и пародонта в норме и при па-

тологии сопоставима. Из этого можно заключить, что миграция пародонтопатогенов со слизистой одного биотопа в другой не играет роли в развитии пародонтита. Не исключено, что защитный эффект эктопической инфекции проявляется на уровне индукции специфического иммунитета против пародонтопатогенов. Вырабатываемые при этом антитела, включая секреторные антитела класса IgA, могут служить фактором защиты тканей пародонта.

Во-вторых, при анализе потенциальных пародонтопротекторов, населяющих сам пародонт, выявлены близкие таксономические родственники большинства патогенов, описанных S. Socransky и соавт. [14]: *A. segnis* и *A. aphrophilus* (родственники *A. actinomycetemcomitans*), *T. vancouveriensis* (родственник *T. denticola*), *P. baroniae*, *P. salivae* и *Prevotella* spp. (родственники *P. intermedia*), а также *C. concisus* (родственник *C. jejuni* — возбудителя энтероколитов).

В-третьих, отдельную группу протекторов составляют виды бактерий, не способные утилизировать сахара и специализирующиеся на декарбоксилировании многоосновных кислот, образующихся при брожении. К этой категории относятся *G. paradiacens*, *N. subflava*, *Comamonas* spp., *S. agalactiae*, *Bergeyella* spp., *V. dispar* и *V. parvula*.

В-четвертых, довольно многочисленной группой потенциальных протекторов являются микроорганизмы, по своим физиологическим особенностям не способные выживать в условиях поддесневой биопленки, но заносимые туда с пищей. Наиболее ярким представителем этой группы оказалась сине-зеленая водоросль *Thalassospira* spp. Сюда же можно отнести *Bacillus vedderi*. Важной особенностью этих видов для клинической практики являются их заведомая биологическая безопасность и удобство для применения в качестве пробиотиков при терапии и профилактике пародонтита. Напротив, виды бактерий, традиционно используемые в качестве пробиотиков, — *B. adolescentis* и *L. lactis*, вряд ли можно считать перспективными с точки зрения защиты тканей пародонта ввиду их малочисленности и слабого влияния на развитие пародонтита в естественных условиях.

В-пятых, проведенное исследование показало важность анализа штаммовой гетерогенности известных видов бактерий на предмет ее влияния на состояние организма-хозяина. Наблюдаемая тенденция к острой конкуренции между близкими видами, включающими патогенные и протекторные варианты, позволяет предполагать аналогичное явление и внутри видов. Наиболее важным, с нашей точки зрения, объектом для практического решения этой задачи является род *Capnocytophaga*, который неоднократно связывался с повышенным риском развития пародонтита, но так и не был внесен в список доказанных пародонтопатогенов. Обнаруженная нами ассоциация вида *C. leadbetteri* в составе микробиоценоза кишечника с низким риском развития пародонтита свидетельствует о целесообразности более пристального анализа систематических отношений внутри рода *Capnocytophaga*, который может содержать одновременно и пародонтопротекторы, и опасные для тканей пародонта патогены.

Роль дисбиоза пищеварительного тракта в развитии системной патологии, в том числе и МС, и взаимовлияние бактерий из биоценозов разных отделов ЖКТ редко учитываются в клинической практике, что может являться причиной низкой эффективности профилактических и лечебных мероприятий, возникновения рецидивов и прогрессирования различных заболеваний.

Подробное исследование микрофлоры поддесневой биопленки и кишечника до настоящего времени сдерживалось, поскольку из-за сложного состава микробных консорциумов и присутствия до 80—90% облигатных анаэробов идентифицировать большинство микроорганизмов в лабораторных условиях не удавалось [9]. Таким образом, с разработкой метода NGS-секвенирования и расширением сферы его доступности для практического применения появилась возможность более детально исследовать состав микрофлоры различных биотопов организма, идентифицировать ранее не изученные микроорганизмы в составе микробных сообществ ПР и кишечника.

В нашей работе особое внимание было уделено сопоставлению данных, получаемых на одних и тех же биологических образцах методами NGS-секвенирования и ПЦР в реальном времени, поскольку основным предна-

значением данных, полученных при использовании NGS-секвенирования на ограниченных выборках, являлось развитие методов рутинной клинической диагностики на основе ПЦР в реальном времени.

При анализе состава поддесневой микрофлоры методом ПЦР в реальном времени у пациентов с ХГП выявлено более высокое содержание в поддесневой биопленке *P. gingivalis*, *T. forsythia* и *T. denticola*. В среднем различия в степени обсемененности этими бактериями для групп здоровых и больных пародонтитом составляют: для *P. gingivalis* 6,7 цикла (104 раза), для *T. forsythia* 4,3 цикла (17 раз), для *T. denticola* 2,3 цикла (4,9 раза). При исследовании микрофлоры кишечника у пациентов с ХГП выявлено повышенное содержание представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Eubacteriaceae*. Различия в степени обсемененности этими бактериями для групп здоровых и больных пародонтитом составляют: для *Enterobacteriaceae* 2,6 цикла (6 раз), а для *Eubacteriaceae* 3,9 цикла (15 раз).

NGS-секвенирование образцов суммарной ДНК поддесневой биопленки и кишечного содержимого позволило добиться разрешения от 91 234 до 213 786 индивидуальных последовательностей на образце. Анализ последовательностей позволил идентифицировать в образцах обоих типов по 260—268 родов и 497—500 видов бактерий.

Сопоставление этих списков позволило установить совпадение 242 (93%) родов из 260, т.е. микробиом пародонта и кишечника во многом сходны между собой.

Сопоставление представленности в микробиоценозах кишечника и пародонта OTU-ранга вида показывает существенно больше 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*.

Более того, среди несовпадающих родов преобладают организмы, заведомо не способные выживать во внутренней среде организма человека. По-видимому, они занесены туда с водой или пищей: например, водоросли *Leuconostoc* и *Spirulina*, симбионты растений (фитопатогены) *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Agrobacterium*, представители аэробной микрофлоры *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Pseudoxanthomonas*, а также митохондрии животных.

В результате нашего исследования выявлены 6 родов потенциальных пародонтопротекторов и 8 родов потенциальных пародонтопатогенов, имеющих отношение к риску возникновения хронического пародонтита.

У лиц со здоровым пародонтом было впервые выявлено статистически достоверное преобладание в составе консорциума рода *Veillonella*, который, таким образом, должен рассматриваться в качестве маркера здоровья пародонта. Роды *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella* и *Corynebacterium* могут рассматриваться в качестве кандидатных пародонтопротекторов.

У больных пародонтитом выявлено статистически достоверное повышение представленности родов *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas*, *Mycoplasma*, из которых только 3 (*Porphyromonas*, *Treponema* и *Tannerella*) традиционно рассматриваются как пародонтопатогены.

В результате исследования составов микробных консорциумов ПР и кишечника с применением глубокого

секвенирования библиотек 16S рДНК показано, что качественный состав микробиома кишечника пациентов с ХГП достоверно отличается от микробиома пациентов со здоровым пародонтом. Для пациентов с пародонтитом характерно уменьшение в среднем в 16 раз содержания в кишечнике бактерии—протектора *A. muciniphila*. Наблюдае-

мый у пациентов с пародонтитом дисбиоз кишечника в большей мере проявляется сокращением представленности в консорциуме протекторной микрофлоры (36 видов), чем увеличением доли патогенов (2 вида).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Акимова Е.В., Каюмов Р.Х., Гакова Е.И. и др. Популяционные характеристики метаболического синдрома в открытой мужской популяции. *Кардиология*. 2014;6:58-61. [Akimova EV, Kayumov AD, Gakova EI, et al. Population characteristics of the metabolic syndrome in the open male population. *Cardiology*. 2014;6:58-61. (In Russ.)].
2. Бокарев И.Н. Метаболический синдром. *Клиническая медицина*. 2014;8:71-76. [Bokarev IN. Metabolic syndrome. *Clinical Medicine*. 2014;8:71-76. (In Russ.)].
3. Ведешина Э.Г., Бабичев С.А. Коррекция микробиоценоза полости рта у больных пародонтитом. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2012;1:18-22. [Vedeshina EG, Babichev SA. Correction microbiocenosis oral cavity in patients with periodontitis. *Kuban Research Medical Gazette*. 2012;1:18-22. (In Russ.)].
4. ВНОК. Рекомендации по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр. М. 2009. [GFCF. Recommendations for the diagnosis and treatment of metabolic syndrome. The second revision. M. 2009. (In Russ.)].
5. Маколкин В.И. *Метаболический синдром*. М.: Медицинское информационное агентство; 2010. [Makolkin VI. *Metabolic syndrome*. M.: Medical News Agency; 2010. (In Russ.)].
6. Папапану П.Н. Связь пародонтита и атеросклероза сосудов: актуальные данные и значимость для специалистов и общества. *Лечащий врач*. 2013;7:44-48. [Papapanou PN. Contact periodontitis and atherosclerosis: the actual data and the importance for professionals and the public. *Therapist*. 2013;7:44-48. (In Russ.)].
7. Шилов А.М., Зорина О.А., Петрухина Н.Б. Дисбиоз кишечника, пародонтит и метаболически ассоциированные сердечно-сосудистые заболевания. *Фарматека*. 2013;14:85-91. [Shilov AM, Zorina OA, Petrukhina NB. Disbiocenoz intestine, periodontitis and associated metabolic cardiovascular disease. *Farmateka*. 2013;14:85-91. (In Russ.)].
8. Everard A. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):9066-9071.
9. Hansen AK, Hansen CH, Krych L, Nielsen DS. Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease. *World Journal Gastroenterol*. 2014;20(47):17727-17736.
10. International Diabetes Federation. Global IDF/ISPAD guideline for diabetes in childhood and adolescence. Brussels: IDF; 2011;130.
11. Kaye EK, Chen N, Cabral HJ, et al. Metabolic Syndrome and Periodontal Disease Progression in Men. *Journal Dental Research*. 2016. pii: 0022034516641053
12. Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*. 2006;94:10-21.
13. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter — relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008;122:417-433.
14. Socranky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134-144.