

На правах рукописи

Тунева Наталья Александровна

**ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ В РАЗВИТИИ ПЕРИИМПЛАНТИТОВ**

1.5.11 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Киров – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Богачева Наталья Викторовна

Официальные оппоненты:

Сидоренко Сергей Владимирович – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, заведующий

Краева Людмила Александровна – доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория медицинской бактериологии, заведующая

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На современном этапе развития стоматологии для восстановления частично или полностью утраченных зубов все чаще используются в качестве опоры ортопедических конструкций дентальные имплантаты. С увеличением количества устанавливаемых дентальных имплантатов возрастает и количество осложнений. По данным мультифакторного анализа патологические процессы в области установленных имплантатов на ранних или поздних этапах имплантации выявляют у 5,1–57,0 % обследованных (Головина Е.С. и др., 2010; Rodrigo D., et al. 2012). Изменения, возникающие в периимплантной зоне, характеризуются воспалительными проявлениями в мягких тканях, окружающих имплантат (мукозит), и потерей опорной костной ткани в более позднем периоде (периимплантит) (Костина И.Н. и др., 2020).

Механизмы развития осложнений при дентальной имплантации связаны с многими факторами. Среди них пародонтит, который на сегодняшний день является основной причиной потери зубов и необходимости установки имплантатов; курение; ятрогенные причины, выраженные в нарушении правил асептики и антисептики; невыявленных очагах хронической инфекции в челюстно-лицевой области; несоответствие размера имплантата размерам имплантационного ложа; чрезмерная сила вкручивания имплантата при его установке или перегрев кости при препарировании и, как следствие, некроз костных тканей; ошибки на этапах протезирования; наличие остеопенического синдрома и остеопороза у лиц старшей возрастной группы; эндокринные и аутоиммунные заболевания и т. д. (Renvert S. et al., 2012; Горбунова И.Л. и др., 2017; Махмудов Т. Г. и др., 2019; Петруняк В.И. и др., 2021).

Инфицирование микроорганизмами периимплантной области – один из наиболее важных факторов риска периимплантита. И, если микробные консорциумы у пациентов с пародонтитами в настоящее время хорошо известны, то состав микробиоты периимплантных зон при изолированном и сочетанном с пародонтитом течении требует дальнейшего изучения (Гударьян А.А., 2014; Preethanath R.S. et al., 2017; Петруняк В.И. и др., 2021).

Все вышеизложенное определяет актуальность научного исследования, направленного на изучение микробиоты периимплантных зон с учетом особенностей течения процесса, и целесообразность обоснования значимых микроорганизмов, которые в дальнейшем могут быть использованы для разработки иммунобиологического препарата направленного действия для профилактики и комплексного лечения периимплантита.

Степень разработанности темы исследования

За последние годы проблема периимплантита достаточно остро обозначена в стоматологической практике. Достаточно хорошо изучены микробные ассоциации при пародонтите, являю-

щимся пусковым механизмом потери зубов (Зорина О.А. и др., 2011; Правосудова Н.А., 2013; Тамарова Э.Р. и др., 2020). Установлено изменение микрофлоры полости рта при использовании зубных протезов, в том числе с опорой на имплантаты (Каламкарров А. Э. и др. 2014; Яковлев А.Т. и др., 2015). Доказана роль зубного налета и зубной бляшки, которые образуются из-за погрешностей гигиены и влияют на качественный и количественный состав микрофлоры полости рта (Орехова Л.Ю., 2004; Николаев А.И. и др., 2019).

Однако, несмотря на наличие отдельных научных исследований по изучению состава микробиоты периимплантных зон в период воспаления, особенность микробиоценоза при периимплантите при независимом или сочетанном с пародонтитом течении не достаточно изучена (Быкова Н.И. и др., 2017; Царев В.Н. и др., 2017; Lafaurie G.I. et al., 2017; Ziebolz D. et al., 2017). Немногочисленные работы (Орлова Е.С. и др., 2020; Шевела Т.Л., 2020), посвященные теме хеликобактериоза в ассоциации с периимплантитом, свидетельствуют о влиянии носительства *Helicobacter pylori*, обнаруженного в биологическом материале периимплантной области, на рецидивирующее течение хеликобактериоза и возможность реинфицирования после эрадикационной терапии (Захарова Н.В. и др., 2016; Ивашкин В.Т. и др., 2017).

Отечественный и зарубежный опыт применения антибактериальных препаратов, доказывающий рост антибиотикорезистентности у микроорганизмов, являющихся источником воспалительных заболеваний пародонта и периимплантных зон, определяет целесообразность пересмотра существующих подходов к профилактике и лечению (Cope A.L. et al., 2016; Halling F. et al., 2017; Цепов Л.М. и др. 2019; Kusumoto J. et al., 2021).

Цель исследования

Обосновать диагностически значимые микробиологические показатели в развитии воспалительных процессов в области установленных имплантатов.

Задачи исследования:

1. Проанализировать роль культивируемых облигатных анаэробов в развитии периимплантита.
2. Оценить значение культивируемых факультативных аэробов и анаэробов в развитии периимплантита.
3. Установить закономерности частоты встречаемости и количества некультивируемых анаэробов у лиц с периимплантитами.
4. Изучить участие *H. pylori* в развитии периимплантита.
5. Оценить значимость выявленных микробиологических показателей в развитии периимплантитов при независимом течении и с сопутствующим пародонтитом.
6. Провести анализ чувствительности значимых в развитии периимплантитов микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Научная новизна

Впервые на основании определения прямой и обратной корреляционной зависимости между количеством микроорганизмов, с одной стороны, и степенью выраженности клинических, гигиенических и рентгенологических изменений, с другой – обоснованы культивируемые облигатные анаэробы, способствующие развитию патологических процессов в периимплантной зоне – *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*), *Prevotella* spp. (*P. buccalis*, *P. nigrescens*), *Peptostreptococcus* spp. (*P. anaerobius*, *P. stomatis*), *Actinomyces* spp. (*A. cardiffensis*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*) и уменьшающие развитие воспалительных изменений при периимплантите – *Veillonella parvula*, *Bifidobacterium dentium*, *Neisseria* spp. (*N. flava*, *N. mucosa*, *N. perflava*, *N. subflava*), *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*). При этом данная закономерность более выражена во всех группах лиц с пародонтитом.

В группах лиц с мукозитом при сопутствующем течении с пародонтитом установлено статистически значимое повышение количества культивируемых факультативных аэробов и анаэробов – *Streptococcus* spp. (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*), *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Rothia* spp. (*R. dentocariosa*, *R. aerea*, *R. mucilaginosus*) с наличием прямых статистически значимых корреляционных связей между количеством данных микроорганизмов и степенью выраженности клинических, гигиенических и рентгенологических изменений.

С помощью молекулярно-генетического метода (ПЦР в режиме реального времени) определено увеличение частоты встречаемости и количества плохо культивируемых микроорганизмов – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* (*Tannerella forsythensis* или *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Candida albicans* при прогрессировании периимплантита с преимущественным преобладанием количества микроорганизмов в периимплантных зонах у лиц с пародонтитом.

Доказано влияние *H. pylori* на развитие патологических процессов в периимплантной области. Выявлен высокий процент лиц с имплантатами, контаминированными *H. pylori*, независимо от наличия у пациентов пародонтита. При этом среди лиц с мукозитом и прогрессирующим периимплантитом преобладают пациенты, из периимплантных зон которых выделены штаммы *H. pylori*, синтезирующие белок патогенности CagA.

Определены микроорганизмы по преимущественной значимости их влияния на развитие периимплантита при независимом и с сопутствующим пародонтитом течении.

Разработан способ получения наночастиц коллоидного серебра, основанный на пошаговой методике получения наночастиц размером 30 ± 3 нм при восстановлении и стабилизации нитрата серебра (AgNO_3) цитратом натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) при соотношении концентраций растворов $\text{AgNO}_3/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 - 1:0,75$ и их объемов 5:1 (Патент на изобретение РФ № 2729991).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Систематизированы научные данные о существующих проблемах в дентальной имплантологии, в том числе о формировании воспалительных процессов в периимплантной зоне, связанных с влиянием отдельных представителей микробиоты на течение периимплантита.

Расширены современные представления о взаимном влиянии хеликобактериоза на течение периимплантита и наоборот, основанные на взаимосвязи, с одной стороны, патологического воспалительного процесса в костной ткани челюсти, непосредственно прилегающей к зубному имплантату, с носительством *H. pylori*, с другой стороны, о влиянии данного микроорганизма на рецидивирующее течение хеликобактериоза и возможности реинфицирования после эрадикационной терапии.

Дополнены научные данные о возрастающей устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам, используемым в стоматологической практике, которые обосновывают решение проблемы периимплантита в виде проведения прецизионной терапии пациентов после идентификации бактериальных патогенов и анализа чувствительности их к применяемым антибактериальным препаратам, а также путем использования способов иммунокоррекции микробиоценоза.

Полученные данные о высоком проценте лиц с имплантатами, контаминированными *H. pylori*, и значимости микроорганизма в развитии периимплантита обосновывают целесообразность ее эрадикации перед установкой импланта с целью улучшения результатов имплантации.

Разработанный пошаговый способ получения наночастиц коллоидного серебра (НчКс), может быть использован в различных областях медицины, в том числе для разработки на основе НчКс, обладающих антимикробными и антитоксическими свойствами, иммунобиологического препарата для профилактики и лечения периимплантитов.

Для ускорения ожидаемого противовоспалительного эффекта в качестве препаратов первой линии обосновано применение антимикробных препаратов с максимальной (более 80,0 %) активностью в отношении значимых в развитии периимплантита микроорганизмов, а именно: амоксиклава, цефидерокола, цефалексина, цефтриаксона, цефтазидима, цефтолозана, метронидазола, тейкопланина и ванкомицина.

Сформированная и депонированная на базе централизованной клинико-диагностической лаборатории Кировского областного государственного бюджетного учреждения здравоохранения

«Кировская областная клиническая больница» рабочая коллекция микроорганизмов может быть использована для научных исследований, а также для разработки иммунобиологического препарата для профилактики и лечения периимплантита.

Подготовлено учебное пособие «Микробиология ротовой полости» (утверждено Центральным методическим советом ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России, протокол № 1 от 17.02.2022 г.), которое внедрено в образовательный процесс на кафедре микробиологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации: для обучения студентов лечебного и стоматологического факультетов по специальностям 31.05.03 «Стоматология», 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия» по дисциплинам «Микробиология, вирусология – микробиология полости рта», «Микробиология, вирусология», «Клиническая микробиология» (акт внедрения от 17.02.2022 г.).

Подготовлены методические рекомендации «Профилактика и лечение периимплантита» (утверждены Центральным методическим советом ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России, протокол № 1 от 17.02.2022 г.), которые внедрены в образовательный процесс Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации для обучения ординаторов по специальностям 31.08.73 «Стоматология терапевтическая», 31.08.74 «Стоматология хирургическая», 31.08.75 «Стоматология ортопедическая», 31.08.76 «Стоматология детская» по дисциплине «Микробиология» (акт внедрения от 17.02.2022 г.); в практическую деятельность клиник: ООО «Ортосолю» (акт внедрения от 11.04.2022 г.); ООО «МедХим» (акт внедрения от 11.04.2022 г.).

Методология и методы исследования

Методология исследований основана на современных подходах к изучению микробиоты периимплантных зон и полностью соответствует цели и поставленным задачам.

Исследования проводили на базе централизованной клинико-диагностической лаборатории Кировского областного государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Кировская областная клиническая больница» (договора на проведение исследования № 39–19/258В–МУ-04-2019 от 21.03.2019 г.; № 41-21/479В–МУ-04-2021 от 12.05.2021 г.) и на кафедре микробиологии и вирусологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Предмет исследования – микроорганизмы, выделенные из биологического материала периимплантных зон пациентов. Объект изучения – биологический материал, полученный из периимплантных зон пациентов, наблюдающихся и получающих лечение в частной стоматологической клинике ООО «Стоматологическая клиника», г. Киров.

Исследования с участием пациентов проводили согласно разрешению Локального этического комитета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации – Протокол № 31/2018 от 12.11.2018 г. и № 2/2022 от 21.02.2022 г.

Объекты исследования – 127 пациентов (48 % женщин и 52 % мужчин) в возрасте от 35 до 69 лет ($53,8 \pm 1,9$ лет), у которых с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов проводили исследование микробиоты периимплантных зон.

С каждым пациентом было подписано «Добровольное информированное согласие на обследование». Работа была проведена в соответствии с биомедицинской этикой, на основании требований Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г.; с изменениями и дополнениями на 2008 г.). В работе руководствовались клиническими рекомендациями лечения больных с диагнозом пародонтит, с частичным или полным отсутствием зубов. Критериями включения добровольцев в исследование являлись: верифицированный диагноз по МКБ 10: К 08.1 – Потеря зубов вследствие несчастного случая, удаления или локальной периодонтальной болезни; наличие у данных пациентов дентальных имплантатов, установленных в ООО «Стоматологическая клиника»; отсутствие заболеваний пародонта, либо пародонтит в стадии ремиссии на момент установки дентальных имплантатов; возраст от 35 до 69 лет; отсутствие сопутствующих заболеваний, либо наличие состояния ремиссии по имеющимся хроническим нозологическим формам. Критериями исключения были лица, имеющие в анамнезе хронический фиброзный периодонтит, хронический пульпит, кариес эмали и дентина; имеющие сопутствующие хронические заболевания в стадии обострения; имеющие аллергическую непереносимость отдельных фармакологических препаратов.

Методы исследования

Методы оценки состояния местного пародонтального статуса и периимплантных зон

Клиническое обследование включало индексные методы оценки состояния пародонта: «индекс гигиены Green Vermillion» и «пародонтальный индекс Russel» (Жулев Е.Н. и др., 2020); периимплантных зон: «модифицированный индекс налёта по Mombelli» и «гингивальный индекс по Arpe» (Франк Ш., 2014). Состояние костных структур периимплантных зон оценивали с помощью компьютерного томографа «KaVo OP300 Maxio» (Германия). Для анализа деструктивных изменений костной ткани в рамках диссертационной работы была предложена балльная оценка: 0 баллов – отсутствие нарушения целостности костных структур, окружающих имплантат; 1 балл – истончение кортикальной пластины, окружающей имплантат, нарушение ее целостности, но не более 2 мм; 2 балла – горизонтальная и вертикальная резорбция костной ткани альвеолярного отростка вокруг имплантов от 2 мм до 4 мм; 3 балла – горизонтальная и вертикальная резорбция костной ткани альвеолярного отростка вокруг имплантов от 4 мм до полной деструкции кости. Для

анализа клинических симптомов у пациентов с имплантатами была также предложена балльная оценка: при наличии симптома (гиперемия слизистой оболочки периимплантной зоны; отек мягких тканей вокруг имплантата; дискомфорт, боль в периимплантной области; свищевой ход на слизистой оболочке; импланто-десневой карман с гнойным отделяемым; увеличение региональных лимфоузлов) ему присваивали 1 балл, при отсутствии – 0 баллов.

Микробиологические методы. Для посева содержимого периимплантных зон пациентов использовали питательные среды: 5 % кровяной и «шоколадный» агар на основе триптиказеино-соевого агара, агар Шадлера, маннит-солевой агар, хромогенный агар для грибов рода *Candida*, агар Эндо, агар для выделения энтерококков, бульон Рогозы или агар MRS для выделения лактобактерий («Pronadisa», Испания), бульон для бифидобактерий (модифицированный с 0,1 % агара) («HiMedia», Индия), среда Вильсона-Блера (ООО «НИЦФ», Россия), бульон Омата («HiMedia», Индия), колумбийский агар («Oxoid LDT», Англия) с добавлением крови и АМП, сахарный бульон на основе триптиказеино-соевого бульона (среда накопления) («Pronadisa», Испания). Посев материала на плотные питательные среды проводили по методу Голда, на жидкие – методом титрования. Материал инкубировали при 37 °С в течение 72–96 часов с использованием газогенераторных пакетов для капнофилов и анаэробов («Oxoid TM CO2Gen TM Compact Sachet», Part № CD0020C, Великобритания). Рассев и инкубацию чистых культур осуществляли в аналогичных условиях. Для идентификации выделенных чистых культур использовали времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (Vitek MS, BioMerieux, Франция). Определение чувствительности выделенных культур к антимикробным препаратам проводили на бактериологическом анализаторе «Vitek2 Compact» («bioMerieux», Франция). В качестве дополнительного метода был использован диско-диффузионный метод с дисками («НИФЦ», Санкт-Петербург). При анализе антибиотикочувствительности микроорганизмов использовали препараты, рекомендуемые EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам).

Молекулярно-генетические методы. Для идентификации микроорганизмов использовали тест-системы ПЦР «Пародонтоскрин» (ООО «ДНК технология», Россия). Для анализа ДНК использовали амплификатор с детекцией в режиме реального времени «CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad», США). Определение гена патогенности *cagA* *H. pylori* проводили с помощью ПЦР с использованием набора реагентов «Хеликопол СА» (НПФ «Литех», Россия).

Иммунохроматографический метод. Для выявления антигенов *H. pylori* в работе использовали тест-систему «РЭД Helicobacter pylori» («РЭД», Россия).

Метод синтеза наночастиц коллоидного серебра. Для синтеза НЧКС был применен цитратный метод Туркевича (Turkevich, J. A. et al., 1951). Были использованы реагенты: нитрат серебра AgNO₃ («Sigma-Aldrich», США), цитрат натрия Na₃C₆H₅O₇ безводный («Sigma-Aldrich», США),

дистиллированная вода (ГОСТ 6709–72). Все реагенты готовили на деионизированной воде (ГОСТ 11.029.003–80). Процесс синтеза осуществляли в стеклянной колбе, используя обратный холодильник и магнитную мешалку с подогревом («Meidolph», Германия). Оценка полученных препаратов коллоидного серебра проводили на электронном трансмиссионном микроскопе JEM1011 («Jeol», Япония).

Методы статистического анализа. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программных пакетов MS Excel, Statsoft Statistica 10.0, WinBUGS 1.4.3. Оценка нормальности распределения количественных учетных признаков выполнена с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилка. Количественные величины представлены медианой Me и интервалом между 25-м и 75-м перцентилями (интерквартильным размахом). Качественные учетные признаки представлены абсолютными (N) и относительными (P , %) величинами, а также 95 % доверительными интервалами относительных величин (P , % (CI95 %)). Расчет доверительных интервалов относительных величин выполнен методом Монте-Карло с помощью программы WinBUGS 1.4.3. Множественная оценка статистической значимости различий количественных данных выполнена с помощью критерия Краскелла-Уоллиса. Апостериорная оценка статистической значимости различия количественных величин в несвязанных выборках выполнена с помощью критерия Манна-Уитни. Оценка статистической значимости различия выборочных качественных данных выполнена с помощью критерия Хи-квадрат. Оценка силы связи между качественными признаками выполнена с помощью критерия V Крамера, а между количественными признаками с помощью оценки значимости коэффициента корреляции. Критический уровень статистической значимости различий выборочных данных (p) представлен уровнем $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Диссертант лично провела анализ научной литературы по теме диссертации; разработала дизайн исследования; проводила отбор пациентов для исследования; осуществляла клинический осмотр и оценку индексов гигиены у пациентов; проводила все этапы экспериментального исследования по выделению и идентификации культур.

Бактериологическое и молекулярно-генетическое исследования были выполнены на базе централизованной клинико-диагностической лаборатории Кировского областного государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Кировская областная клиническая больница» совместно с главным внештатным специалистом по клинической микробиологии и антимикробной резистентности МЗ Кировской области А. Н. Частоедовой. Статистическую обработку данных проводили совместно с доцентом кафедры гигиены Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к. м. н. С. Б. Петровым.

Положения, выносимые на защиту

1. Закономерность, основанная на корреляционной зависимости между количеством микроорганизмов и выраженностью клинических, гигиенических и рентгенологических изменений у лиц с имплантатами, позволяет выделить среди культивируемых облигатных анаэробов микроорганизмы, увеличивающие и уменьшающие развитие воспалительных изменений при периимплантите.

2. Высокий процент лиц с имплантатами, контаминированными *H. pylori*, преобладание у лиц с мукозитами патогенных штаммов, способных синтезировать белок патогенности CagA, наличие положительной корреляционной связи между количеством микроорганизма в периимплантных зонах и выраженностью клинико-рентгенологических изменений определяет его к категории значимых в развитии периимплантита.

3. Статистически обоснованное распределение культивируемых облигатных анаэробов, факультативных аэробов и анаэробов, а также анаэробов, идентифицированных с помощью молекулярно-генетического метода (ПЦР в режиме реального времени) позволяет определить значимость их участия в развитии периимплантита при независимом течении и с сопутствующим пародонтизом.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается использованием достаточного количества экспериментов, современных методов исследования, соответствующих поставленным задачам, воспроизводимостью результатов и применением методов статистического анализа.

Диссертация апробирована на научно-проблемном совете ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 22.04.2022 г.) с участием представителей кафедр инфекционных болезней; патофизиологии; микробиологии и вирусологии; гистологии, эмбриологии и цитологии; патологической анатомии; стоматологии; биологии; фармакологии; безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф; педиатрии; неврологии, нейрохирургии и нейрореабилитации; химии; биохимии; нормальной физиологии; анатомии; топографической анатомии и оперативной хирургии; начальника научно-инновационного отдела; отдела подготовки кадров высшей квалификации; декана лечебного факультета.

Основные материалы диссертации представлены и обсуждены на: XX Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2019 г.); XXI Всероссийской научной заочной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2020 г.); XXII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки РФ, лауреата Государственной премии РФ, член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора В. А. Журавлева «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2021 г.); VIII Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием, посвященной

100-летию кафедры микробиологии имени академика В.М. Аристовского ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России и 120-летию ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора «Микробиология в современной медицине» (Казань, 2020 г.); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов 2021» (Москва, 2021 г.); Всероссийской V научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии» (Киров, 2021 г.); XXIV Кашкинских чтениях (Санкт-Петербург, 6-11 июня 2021 г.); XXIII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 35-летию со дня образования Кировского государственного медицинского университета «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2022 г.); VII Национальном конгрессе бактериологов (Санкт-Петербург, 2022 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, 3 – статьи в других изданиях, 1 тезис – в рецензируемом издании, 1 методические рекомендации, 1 монография в соавторстве, 1 учебное пособие и 1 патент на изобретение РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, три главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 21 рисунком. Список литературы включает 152 источника, 107 из которых – отечественные, 45 – зарубежные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Учитывая данные научных исследований о том, что пародонтит часто является спутником периимплантита, на этапе экспериментального исследования группы пациентов были сформированы таким образом, чтобы провести сравнительную оценку микробиоты периимплантных зон при независимом течении и с сопутствующим пародонтитом. С целью установления статистических закономерностей по возможному влиянию микрофлоры на течение периимплантита на первом этапе работы использовали существующую систему балльной оценки гигиенических индексов: «Индекс гигиены Green Vermillion», «Пародонтальный индекс Russel» (Жулев Е.Н. и др., 2020), гингивальный индекс по Arpe, индекс оценки налёта вокруг имплантатов по Mombelli (Франк Ш., 2014), а также разработанную в рамках диссертационной работы систему балльной оценки клинических симптомов и рентгенологического состояния местного пародонтального статуса и зон дентальных конструкций (Таблица 1).

В группах 2.1.1, 2.1.2 (группы с мукозитом) и 2.3.1, 2.3.2 (группы с периимплантитом) количество вышеуказанных микроорганизмов статистически значимо ($p < 0,05$) было меньше, чем в контрольных группах 1.1 и 1.2. При оценке изменений количества микроорганизмов в группах с учетом пародонтита было отмечено, что статистически значимое ($p < 0,05$) более низкое содержание *B. dentium* и представителей *Lactobacillus* spp. отмечается в группах с пародонтитом. В отношении

Neisseria spp. (*N. flava*, *N. mucosa*, *N. perflava*, *N. subflava*) и *V. parvula* количество микроорганизмов было снижено только в группе 2.1.2 относительно 2.1.1. Несколько иная динамика изменения количества микроорганизмов в экспериментальных группах с периимплантитом относительно контрольных наблюдалась в отношении таких микроорганизмов как *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*), *Prevotella* spp. (*P. buccalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*), *Peptostreptococcus* spp. (*P. anaerobius*, *P. stomatis*), *Actinomyces* spp. (*A. cardiffensis*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*).

Таблица 1 – Результаты балльной и индексной оценки клинических симптомов, гигиенических индексов и рентгенологического состояния у исследуемых групп пациентов с имплантатами

Группа пациентов	Количество человек в группе, n	Среднее количество баллов в группах при оценке					рентгенологического статуса
		клинических симптомов	значения индекса				
			Green Vermilion	Russe 1	Mombelli	Apse	
1.1	15	0,00	0,75	1,07	0,20	0,00	0,00
1.2	19	0,53	1,67	3,16	1,21	0,00	0,00
2.1.1	15	1,16	1,35	1,82	1,50	1,17	0,00
2.1.2	18	2,16	2,32	4,24	2,40	1,80	0,22
2.2.1	15	0,00	0,80	0,73	0,00	0,33	1,00
2.2.2	15	1,80	1,73	3,52	1,88	1,38	1,60
2.3.1	15	4,67	2,90	1,37	2,70	2,70	3,00
2.3.2	15	5,38	2,51	4,86	2,75	2,75	2,88

Примечание – группы пациентов: 1.1 – контрольная группа пациентов без периимплантита и пародонтита; 1.2 – контрольная группа пациентов без периимплантита с пародонтитом; 2.1.1 – группа пациентов с мукозитом без патологических изменений в пародонте; 2.1.2 – группа пациентов с мукозитом с патологическими изменениями в пародонте; 2.2.1 – группа пациентов с периимплантитом в стадии ремиссии без патологических изменений в пародонте; 2.2.2 – группа пациентов с периимплантитом в стадии ремиссии с патологическими изменениями в пародонте; 2.3.1 – группа пациентов с периимплантитом, быстрым прогрессированием заболевания и потерей имплантата без патологических изменений в пародонте; 2.3.2 – группа пациентов с периимплантитом, быстрым прогрессированием заболевания и потерей имплантата с патологическими изменениями в пародонте

Количество данных микроорганизмов было повышено в экспериментальных группах с мукозитом и периимплантитом. При этом статистически значимо ($p < 0,05$) в сторону увеличения отмечалось содержание представителей родов *Bacteroides* spp. и *Prevotella* spp. Кроме того, прослеживалась некоторая зависимость в отношении преобладания более высокого количества бактерий в группах лиц с пародонтитом, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований, в отношении представителей данных родов микроорганизмов (Царев В.Н. и др., 2017). Достоверное повышение количества микроорганизмов только в группах 2.1.1 и 2.3.1 без пародонтита наблюдалось в отношении представителей родов *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., что может свидетельствовать об участии данных микроорганизмов в активном воспалительном процессе при периимплантите (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительная оценка количества микроорганизмов облигатных анаэробов (lg КОЕ/мл) в группах лиц с имплантатами

Вид микроорганизма	Количество облигатных анаэробов в группах, lg КОЕ/мл (Ме (25%–75%))							
	1.1	1.2	2.1.1	2.1.2	2.2.1	2.2.2	2.3.1	2.3.2
<i>V. parvula</i>	8,70 (6,48-9,92)	8,50 (7,48-9,53)	4,85 (3,85-5,85)*	3,60 (2,60-4,65)*	8,85 (7,78-9,90)	8,78 (6,78-9,78)	3,85 (3,70-3,95)*	3,90 (3,70-4,10)*
<i>Bacteroides</i> spp. (<i>B. fragilis</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. ovatus</i>)	2,63 (2,39-2,88)	3,70 (3,65-3,78)	5,20 (4,30-5,60)*	5,30 (4,30-6,30)*	3,78 (2,70-4,85)	3,80 (3,70-3,90)*	5,78 (3,78-6,78)*	4,55 (3,70-5,57)*
<i>Prevotella</i> spp. (<i>P. buccalis</i> , <i>P. nigrescens</i>)	2,40 (1,90-2,90)	3,49 (2,40-4,58)	5,88 (4,33-7,43)*	6,57 (4,90-8,20)*	2,30 (2,10-2,50)	2,85 (2,40-3,95)*	5,85 (3,85-7,51)*	4,57 (4,40-5,42)
<i>F. nucleatum</i>	H	H	5,85 (5,75-5,95)	H	H	H	H	H
<i>L. buccalis</i>	H	H	5,60 (5,40-5,78)	4,85 (4,70-4,95)	H	H	H	H
<i>Peptostreptococcus</i> spp. (<i>P. anaerobius</i> , <i>P. stomatis</i>)	3,67 (3,30-4,04)	4,67 (3,78-5,56)	5,48 (3,48-7,48)*	5,07 (3,60-6,54)	4,60 (3,60-5,60)	4,75 (4,60-4,90)	5,78 (4,70-6,85)*	4,78 (4,48-5,08)
<i>B. dentium</i>	5,42 (4,90-5,90)	5,36 (3,30-5,40)	4,48 (3,6-5,36)*	3,48 (3,48-3,50)*	5,48 (4,45-6,51)	5,31 (4,60-6,08)	3,85 (3,85-3,85)*	3,70 (3,65-3,78)*
<i>Neisseria</i> spp. (<i>N. flava</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. perflava</i> , <i>N. subflava</i>)	4,54 (3,85-5,23)	5,35 (4,70-5,90)	4,09 (3,78-4,38)*	3,90 (2,72-5,15)*	4,87 (3,85-5,80)	4,85 (3,85-5,70)	4,19 (3,48-4,90)*	4,25 (3,60-4,90)*
<i>Actinomyces</i> spp. (<i>A. cardiffensis</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. oris</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. viscosus</i>)	5,92 (5,60-6,25)	6,03 (5,39-6,62)	6,48 (5,30-7,66)*	6,08 (5,78-6,30)	5,70 (4,70-6,5)	5,90 (5,70-6,2)	6,78 (6,48-7,08)*	5,90 (5,40-6,5)
<i>Lactobacillus</i> spp. (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>)	4,85 (4,63-5,07)	4,52 (3,54-5,51)	4,39 (3,82-4,97)*	3,70 (3,59-3,8)*	4,67 (4,48-4,88)	4,53 (3,48 - 5,58)	3,90 (2,48-5,31)*	3,78 (3,10-4,48)*
Примечания:								
1. Ме (25% - 75%) – медиана и интервал между 25-м и 75-м процентиллями (интерквартильный размах)								
2. «*» различие с показателями сравниваемых групп с периимплантитом относительно контрольных групп без периимплантита статистически значимо (p<0,05)								
3. Значения, выделенные жирным шрифтом – различия внутри групп с пародонтитом и без пародонтита статистически значимы (p<0,05)								
4. H – микроорганизм не был выделен								

Далее провели корреляционный анализ между количеством микроорганизмов и выраженностью клинических, гигиенических и рентгенологических показателей в зонах дентальных конструкций. При этом для корреляционной оценки использовали результаты балльной оценки показателей, полученные на первом этапе работы. По результатам данного этапа работа на основании выявленной статистической закономерности по наличию обратной корреляционной связи между количеством микроорганизмов и клинико-рентгенологическими показателями были определены облигатные культивируемые микроорганизмы, которые уменьшают развитие воспалительных изменений в пародонте на фоне имплантатов, пародонтопротекторы, – *V. parvula*, *B. dentium*, *Neisseria* spp. (*N. flava*, *N. mucosa*, *N. perflava*, *N. subflava*), *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), на основании прямой корреляционной зависимости – представители микробной флоры, которые оказывают неблагоприятное влияние на клинический статус периимплантных зон, в том числе влияют на прогрессирование дегенеративных изменений в костной ткани, пародонтопатогены, – *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*), *Prevotella* spp. (*P. buccalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*), *Peptostreptococcus* spp. (*P. anaerobius*, *P. stomatis*), *Actinomyces* spp. (*A. cardiffensis*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*) (Таблица 3).

Таблица 3 – Анализ корреляционной зависимости между количеством облигатных анаэробов (lg КОЕ/мл) и клиническими, гигиеническими, рентгенологическими показателями

Вид микроорганизма	Уровень корреляционной зависимости между количеством облигатных анаэробов (lg КОЕ/мл) и балльной оценкой					
	клинических симптомов	индекса Green Vermilion	индекса Russel	индекса Mombelli	индекса Arpe	рентгенологического статуса
<i>V. parvula</i>	-0,92*	-0,71*	-0,34	-0,71*	-0,76*	-0,66*
<i>Bacteroides</i> spp. (<i>B. fragilis</i> , <i>B. vulgatus</i> , <i>B. ovatus</i>)	0,63*	0,60*	0,10	0,65*	0,69*	0,39*
<i>Prevotella</i> spp. (<i>P. buccalis</i> , <i>P. nigrescens</i>)	0,57*	0,45*	0,13	0,58*	0,61*	0,20
<i>F. nucleatum</i>	-0,16	-0,21	-0,20	-0,03	-0,03	-0,34
<i>Leptotrichia buccalis</i>	-0,10	-0,18	0,00	0,06	0,00	-0,47
<i>Peptostreptococcus</i> spp. (<i>P. anaerobius</i> , <i>P. stomatis</i>)	0,42*	0,33*	-0,23	0,33*	0,38*	0,20
<i>B. dentium</i>	-0,93*	-0,86*	-0,29	-0,84*	-0,88*	-0,73*
<i>Neisseria</i> spp. (<i>N. flava</i> , <i>N. mucosa</i> , <i>N. perflava</i> , <i>N. subflava</i>)	-0,64*	-0,37	-0,28	-0,54*	-0,66*	-0,30
<i>Actinomyces</i> spp. (<i>A. cardiffensis</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. oris</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. viscosus</i>)	0,49*	0,55*	-0,04	0,51*	0,46*	0,26
<i>Lactobacillus</i> spp. (<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>)	-0,95*	-0,77*	-0,27	-0,73*	-0,85*	-0,84*
Примечания:						
1. «*» – корреляционная связь статистически значима (p<0,05)						
2. Положительное значение показателя – прямая (положительная) корреляция; отрицательное значение – обратная (отрицательная) корреляция						

Кроме того, на бактериологическом этапе исследования провели статистический анализ влияния количества микроорганизмов факультативных анаэробов и аэробов, которые имели достоверное различие в группе с мукозитом и сопутствующим пародонтитом на течение клинического процесса, гигиенические показатели и рентгенологическое состояние периимплантных зон (Таблица 4). Результаты показали наличие сильных и умеренных прямых статистически значимых корреляционных связей между количеством микроорганизмов, с одной стороны, и большинством клинических, гигиенических и рентгенологических критериев, с другой стороны, у отдельных представителей анализируемой группы микроорганизмов, таких как *P. aeruginosa*, *Rothia* spp. (*R. dentocariosa*, *R. aerea*, *R. mucilaginoso*), *S. aureus*, *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*). В отношении оральных стрептококков – *Streptococcus* spp. (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*) и *Streptococcus* spp. (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*) определена в первом случае только прямая корреляция между количеством микроорганизмов и клиническими проявлениями, во втором – между количеством, клиническими проявлениями и гигиеническим индексом Mombelli. Наличие положительной корреляционной зависимости между сравниваемыми показателями позволило также определить вышеуказанные микроорганизмы в перечень значимых в развитии и прогрессировании периимплантита.

Таблица 4 – Анализ корреляционной зависимости между количеством факультативных аэробов и анаэробов (lg КОЕ/мл), клиническими, рентгенологическими и гигиеническими показателями

Вид микроорганизма	Уровень корреляционной зависимости между количеством облигатных анаэробов (lg КОЕ/мл) и балльной оценкой					
	клинических симптомов	индекса Green Vermilion	индекса Russel	индекса Mombelli	индекса Apse	рентгенологического статуса
<i>Streptococcus</i> spp. (<i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i>)	0,512*	0,260	0,260	0,330	0,314	-0,024
<i>Streptococcus</i> spp. (<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. vestibularis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. anginosus</i>)	0,635*	0,401	0,311	0,552*	0,571	0,225
<i>S. aureus</i>	0,690*	0,520	0,850*	0,650*	0,660*	0,420*
<i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. epidermidis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. saprophyticus</i>)	0,890*	0,760	0,480	0,830*	0,900*	0,660*
<i>Rothia</i> spp. (<i>R. dentocariosa</i> , <i>R. aerea</i> , <i>R. mucilaginoso</i>)	0,538*	0,260	0,388*	0,430	0,300	0,655*
<i>Haemophilus</i> spp.	0,252	0,080	0,205	0,080	0,080	-0,080
<i>Klebsiella</i> spp.	0,091	-0,162	0,091	-0,020	-0,020	-0,420
<i>E. faecalis</i>	0,160	-0,220	0,241	0,062	0,081	-0,271
<i>P. aeruginosa</i>	0,643*	0,340	0,590*	0,450	0,450*	0,255
<i>Clostridium</i> spp.	-0,083	-0,252	-0,086	-0,083	-0,085	-0,420
Примечания:						
1. «*» корреляционная связь статистически значима ($p < 0,05$).						
2. Положительное значение показателя – прямая (положительная) корреляция; отрицательное значение – обратная (отрицательная)						

Сравнение частоты и уровня контаминации периимплантных зон микроорганизмами, трудно поддающимися культивированию (для идентификации использовали полимеразную цепную реакцию), в анализируемых группах пациентов проводили по аналогичному принципу. Если говорить о частоте встречаемости микроорганизмов, то в контрольной группе с пародонтитом (группа 1.2) в сравнении с группой без пародонтита (группа 1.1) было выявлено увеличение частоты встречаемости в пародонтальных карманах *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* соответственно в 1,50; в 1,18, 4,16; в 35,00 раз. Примерно такое же соотношение по преобладанию вышеперечисленных микроорганизмов на фоне пародонтита было выявлено в группе лиц с мукозитом и периимплантитом в состоянии ремиссии. Если сравнивать пациентов с прогрессирующим периимплантитом (группы 2.3.1 и 2.3.2), то видимые различия по частоте встречаемости микроорганизмов от наличия пародонтита можно выявить только в отношении *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* (Рисунок 1).

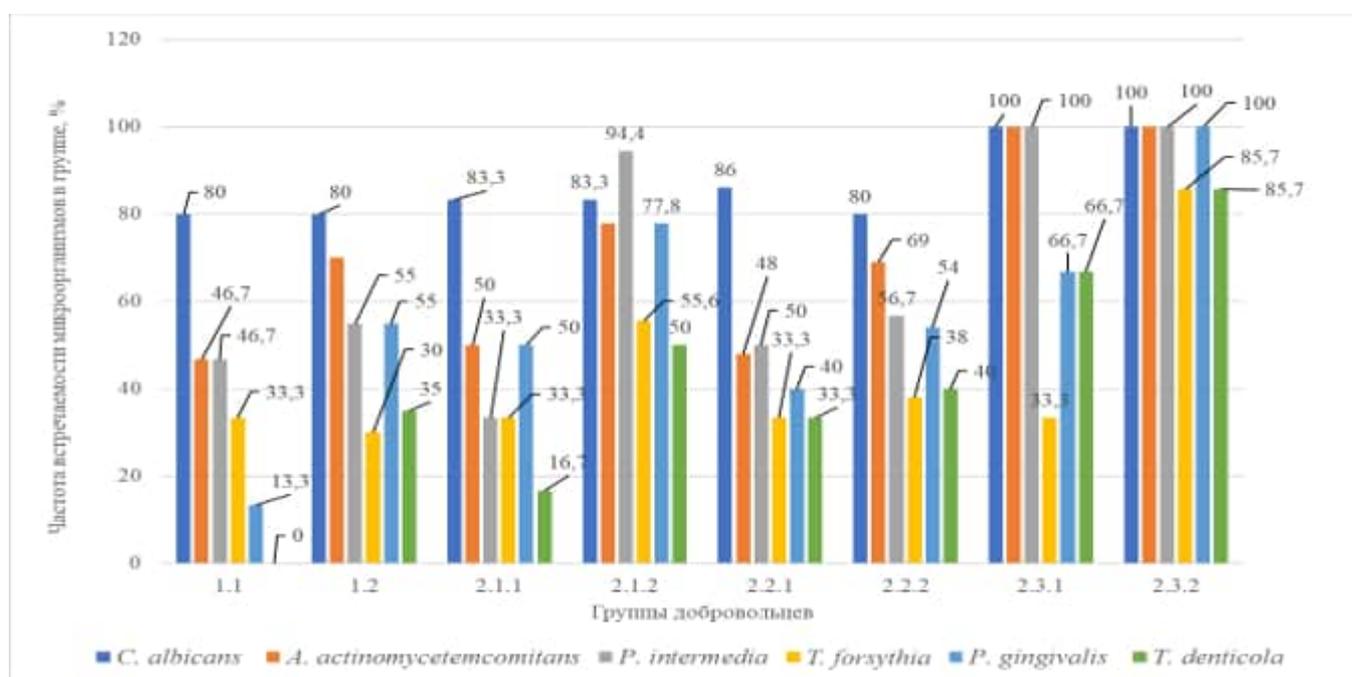


Рисунок 1– Сравнительная оценка частоты встречаемости микроорганизмов в группах

При анализе влияние анаэробов на процесс прогрессирования периимплантита без учета пародонтита было выявлено, что частота встречаемости у пациентов с мукозитом (группа 2.1.1) в сравнении с группой контроля (группа 1.1) выше в отношении *P. gingivalis* в 3,76 раз; *T. denticola* – в 16,70 раз. При сравнении группы пациентов с мукозитом (группа 2.1.1) и прогрессирующим периимплантитом (группа 2.3.1) частота встречаемости практически всех оцениваемых при помощи молекулярно-генетического анализа микроорганизмов увеличивается. Частота встречаемости увеличилась в отношении *C. albicans* с 83,3 % до 100,0 %; *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis* – с 50,0 % до 100,0 % и до 66,7 % соответственно; *P. intermedia* – с 33,3 % до 100,0 %; *T. denticola* – с 16,7 % до 66,7 %.

Количество микроорганизмов статистически значимо отличалось в группах с пародонтитом: *C. albicans* – в группе 1.2 против 1.1 и в группе 2.1.2 против 2.1.1; *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis* – в группах 1.2 против 1.1, 2.1.2 против 2.1.1 и 2.2.2 против 2.2.1.

При оценке влияния количества микроорганизмов на динамику развития воспалительного процесса в периимплантных зонах без пародонтита было выявлено, что количество микроорганизмов значимо увеличивалась от мукозита к прогрессирующему периимплантитом в отношении *C. albicans* с 2,78 lg КОЕ/мл до 4,70 lg КОЕ/мл; *P. intermedia* – с 3,80 lg КОЕ/мл до 4,25 lg КОЕ/мл; *T. forsythia* – с 3,05 lg КОЕ/мл до 4,33 lg КОЕ/мл; *P. gingivalis* – с 3,87 lg КОЕ/мл до 4,62 lg КОЕ/мл; *T. denticola* – с 3,51 lg КОЕ/мл до 4,14 lg КОЕ/мл. Подводя итог данному этапу работы, определили факт высокого количества микроорганизмов при сочетанном течении мукозита и пародонтита.

Среди прочих микробиологических факторов в работе была изучена роль в прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта *H. pylori*. Учитывая данные научных исследований о высоком уровне контаминации *H. pylori* населения, исследование добровольцев с имплантатами провели независимо от наличия заболеваний желудочно-кишечного тракта (Shevela T. L. et al., 2017; Орлова Е.С. и др., 2020; Смирнова Д.Н., 2021). С этой целью провели анализ содержимого зубодесневых карманов у всех 127 добровольцев на предмет наличия микроорганизма.

Особенность вызывать патологические процессы штаммами *H. pylori*, которые способны синтезировать белок патогенности CagA, обосновала целесообразность изучения биологического материала пациентов с использованием различных методов диагностики: бактериологического метода на предмет оценки общей контаминации пациентов как патогенными, так и непатогенными штаммами; ПЦР для определения доли лиц, имеющих ген *cagA* *H. pylori*, наличие которого не обязательно может сопровождаться продукцией микроорганизмом белка патогенности CagA; иммунохроматографического метода с использованием тест-системы для выявления патогенного белка CagA.

Сравнительный анализ сформированных нами групп показал, что доля лиц, у которых *H. pylori* идентифицирована бактериологическим методом, увеличивается по мере прогрессирования периимплантита. В группе с мукозитом и прогрессирующим периимплантитом без пародонтита доля лиц, контаминированных *H. pylori* составила 50,0 % и 66,7 % соответственно против 40,0 % в группе контроля. В группах с пародонтитом динамика сохранялась, но доля контаминированных лиц была выше, чем в группах без пародонтита, и составила 61,1 % и 71,4 % соответственно против группы контроля с пародонтитом – 50,0 %. При анализе чистых культур *H. pylori*, выделенных в результате культивирования биологического материала зубодесневых карманов, молекулярно-генетическим методом ген *cagA* был выявлен в сравнении с контролем в большем проценте случаев также у пациентов с мукозитом и прогрессирующим периимплантитом в группах лиц, не имеющих пародонтит. Выявленные патогенные штаммы *H. pylori*, способные синтезировать белок CagA, чаще встречались при мукозите и прогрессирующем периимплантите у пациентов без пародонтита: в

группе 2.1.1 данный показатель превышал таковой в группе 2.1.2 в 1,13 раза, а в группе 2.3.1 количество лиц, у которых были выявлены штаммы, продуцирующие патогенный белок, превышал таковой в группе 2.3.2 в 1,5 раза. В группе лиц с ремиссией периимплантита уровень контаминации *H. pylori* не отличался от показателей в контрольной группе (Рисунок 2).

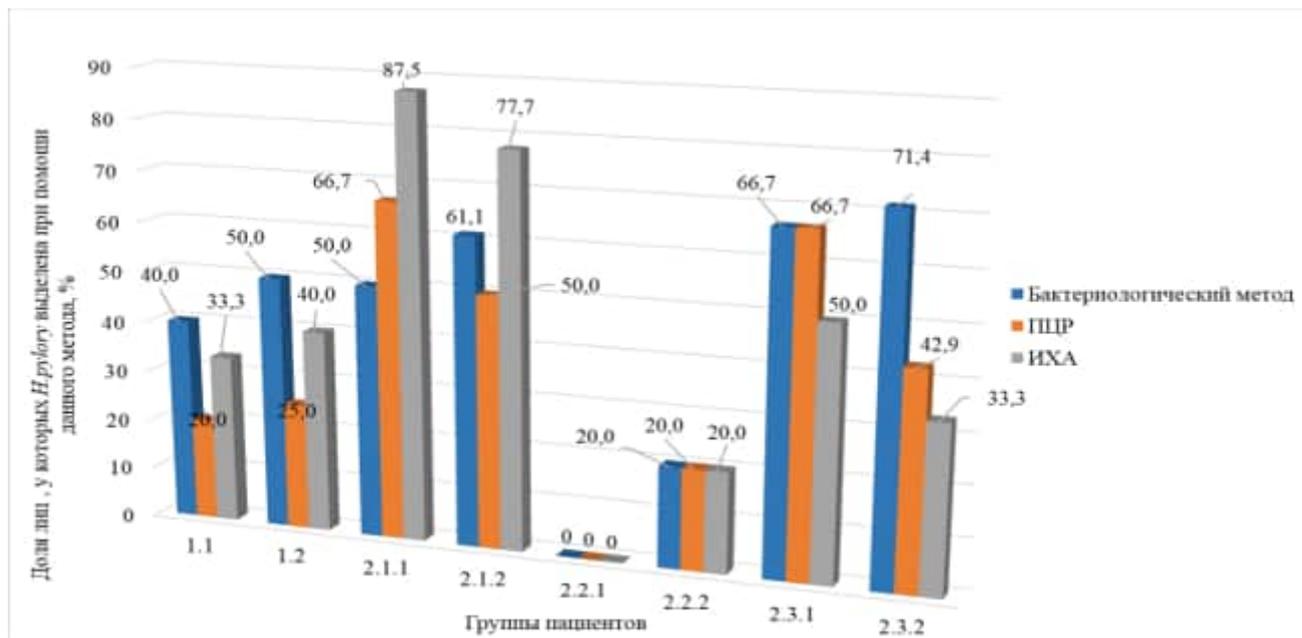


Рисунок 2 – Сравнительный анализ доли лиц с периимплантитами, у которых *H. pylori* из материала зубодесневых карманов выделена и идентифицирована бактериологическим методом, ген *cagA* выявлен молекулярно-генетическим методом, а продукция белка CagA микроорганизмом подтверждена иммунохроматографическим методом

Результаты данного этапа исследования показали, что 48,03 % лиц с имплантатами и наличием воспалительного процесса инфицированы *H. pylori* независимо от наличия сопутствующего пародонтита, среди них 18,11 % являются носителями патогенных штаммов. Статистический анализ уровня инфицирования *H. pylori* пациентов с периимплантитами позволяет рассматривать его в качестве микроорганизма, влияющего на обострение и прогрессирование процесса. При этом у лиц с мукозитом было выявлено преобладание носителей патогенных штаммов, синтезирующих белок патогенности CagA (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Процентное соотношение пациентов, в биологическом материале периимплантных зон которых выявлена *H. pylori* с использованием различных методов диагностики

Статистический анализ уровня инфицирования *H. pylori* пациентов с периимплантатами позволяет рассматривать его в качестве микроорганизма, влияющего на обострение и прогрессирование процесса.

Далее провели оценку корреляционной зависимости между количеством выделенных и определенных к группе статистически значимых облигатных анаэробов, факультативных анаэробов, аэробов и микроаэрофилов по влиянию их действия на клиническую картину и рентгенологические показатели, выраженные в баллах, как наиболее значимые для прогрессирования процесса периимплантита у пациентов в двух группах: без пародонтита, объединив группы 2.1.1 и 2.3.1 (группа А), и с пародонтитом, объединив группы 2.1.2 и 2.3.2 (группа В). При этом приняли решение определить уровень значимости участия микроорганизмов в развитии и прогрессировании периимплантита при независимом и сопутствующем с пародонтитом течении в зависимости от уровня корреляции между количеством микроорганизмов и клинко-рентгенологическими изменениями, сформировав отдельные цветные комплексы, используемые ранее только в отношении отдельно протекающего пародонтита.

В результате микроорганизмы по уровню влияния на процесс развития и прогрессирования периимплантита были распределены следующим образом: очень низкий уровень влияния – уровень корреляционной зависимости от 0,10 до 0,20 (желтый комплекс); низкий уровень влияния – уровень корреляционной зависимости от 0,21 до 0,40 (пурпурный комплекс); средний уровень влияния – уровень корреляционной зависимости от 0,41 до 0,60 (зеленый комплекс); высокий уровень влияния на процесс развития периимплантита – уровень корреляционной зависимости от 0,61 до 0,80 (оранжевый комплекс); очень высокий уровень влияния на процесс развития периимплантита – уровень корреляционной зависимости от 0,81 до 1,00 (красный комплекс).

Результаты исследования позволили распределить микроорганизмы по преимущественной значимости их влияния на развитие периимплантита при независимом течении или с сопутствующим пародонтитом.

У лиц с периимплантитом, протекающим без пародонтита, по мере убывания значимости микроорганизмы расположились следующим образом: очень высокая значимость – для *T. forsythia* (средняя корреляция в группе составила – $r=0,823$ ($p<0,05$)); средняя – для *P. gingivalis* и *Peptostreptococcus* spp. (*P. anaerobius*, *P. stomatis*) (средняя корреляция в группе составила $r=0,745$ и $r=0,799$ ($p<0,05$) соответственно).

У лиц с периимплантитом, протекающим совместно с пародонтитом, была определена очень высокая значимость для *Rothia* spp. (*R. dentocariosa*, *R. aeria*, *R. mucilaginoso*), средняя корреляция в группе составила $r=0,896$; высокая – для *T. denticola*, *Peptococcus* spp., *Actinomyces* spp. (*A. cardiffensis*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*), *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*), средняя корреляция в группе составила $r=0,750$, $r=0,745$, $r=0,665$, $r=0,633$ соответственно; средняя – для *S. aureus*, *Prevotella* spp. (*P. buccalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*),

Streptococcus spp. (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*), *P. aeruginosa*, *A. ctinomycescomitans*, средняя корреляция в группе составила $r=0,555$, $r=0,492$, $r=0,465$, $r=0,449$, $r=0,441$ соответственно; низкая – для *Streptococcus* spp. (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*), *C. albicans*, средняя корреляция в группе составила $r=0,389$, $r=0,354$ соответственно.

У лиц с периимплантитом как без, так и с пародонтитом одинаковая значимость в развитии клиничко-рентгенологических изменений была определена для микроорганизмов: *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*), средняя корреляция в группе А составила $r=0,775$, в группе В – $r=0,701$; *H. Pylori*, средняя корреляция в группе А составила $r=0,467$, в группе В – $r=0,536$.

Далее среди рекомендуемых Европейским комитетом (EUCAST) антимикробных препаратов обоснованным по результатам работы в развитии периимплантитов микроорганизмам определили те, что имеют максимальную (более 80 %) активность: амоксилав, цефидерокол, цефалексин, цефтриаксон, цефтазидим, цефтолозан, метронидазол, тейкопланин и ванкомицин (Рисунок 4).

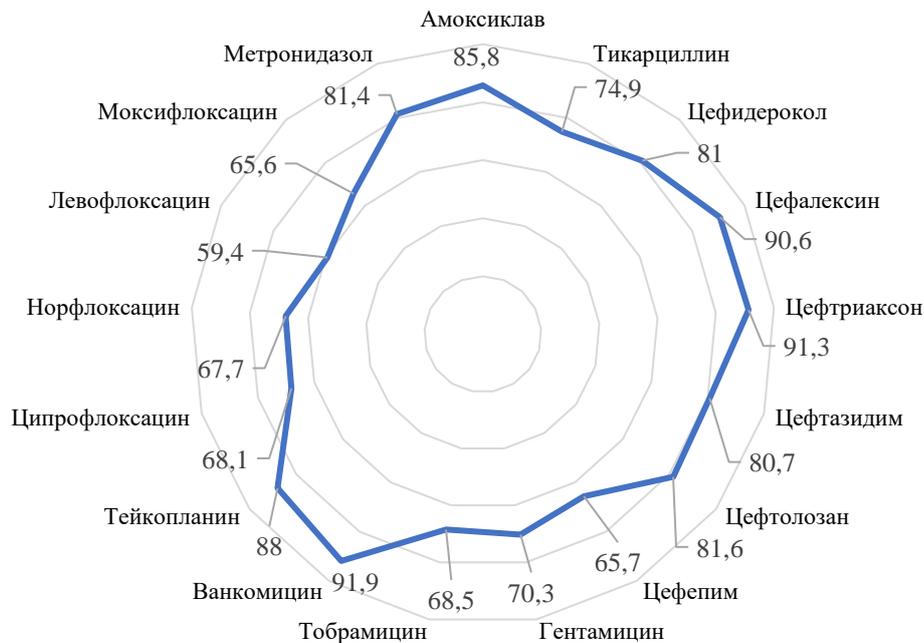


Рисунок 4 – Антимикробные препараты, проявившие максимальный спектр активности к большинству микроорганизмов, значимых в развитии периимплантита

Определение значимых микробиологических закономерностей в развитии периимплантита, поиск путей преодоления антибиотикорезистентности обосновывает целесообразность разработки иммунобиологического препарата, одним из компонентов которого кроме значимых микробных агентов, могут являться наночастицы коллоидного серебра. В связи с этим в диссертационной работе одним из этапов исследования стала разработка пошаговой методики получения наночастиц серебра размером 30 ± 3 нм при восстановлении и стабилизации нитрата серебра (AgNO_3) цитратом натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) при соотношении концентраций растворов $\text{AgNO}_3/\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 1:0,75 и их объемов 5:1 (Патент на изобретение РФ № 2729991).

ВЫВОДЫ

1. *V. parvula*, *B. dentium*, *Neisseria* spp. (*N. flava*, *N. mucosa*, *N. perflava*, *N. subflava*), *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*) определены к категории микроорганизмов, которые уменьшают развитие воспалительных изменений, а *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*), *Prevotella* spp. (*P. buccalis*, *P. nigrescens*), *Peptostreptococcus* spp. (*P. anaerobius*, *P. stomatis*), *Actinomyces* spp. (*A. cardiffensis*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. oris*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*) – к представителям микробной флоры, которые оказывают неблагоприятное влияние на клинико-рентгенологический статус периимплантных зон.

2. У лиц с периимплантитами при сопутствующем течении с пародонтитом определены в достоверно значимом количестве ($p < 0,05$) *Streptococcus* spp. (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*), *Staphylococcus* spp. (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*), *P. aeruginosa*, *Rothia* spp. (*R. dentocariosa*, *R. aerea*, *R. mucilaginosa*).

3. С помощью молекулярно-генетического метода (ПЦР в режиме реального времени) определено увеличение частоты встречаемости и количества *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *C. albicans* с преимущественным преобладанием количества микроорганизмов в периимплантных зонах у лиц с пародонтитом.

4. *H. pylori* идентифицирована у 48,03 % лиц с периимплантитами, среди них 18,11 % являются носителями патогенных штаммов, которые синтезируют белок патогенности CagA. При этом доля лиц, у которых выявлены штаммы *H. pylori*, способные синтезировать белок CagA, достоверно выше при мукозите и прогрессирующем периимплантите независимо от пародонтита ($< 0,001$).

5. У лиц с периимплантитом, протекающем без пародонтита, оценена очень высокая значимость для *T. forsythia* ($r=0,823$); средняя – для *Peptostreptococcus* spp. ($r=0,799$), *P. gingivalis* ($r=0,745$). У лиц с периимплантитом, протекающим совместно с пародонтитом, очень высокая значимость определена для *Rothia* spp. ($r=0,896$), высокая – для *T. denticola* ($r=0,750$), *Actinomyces* spp. ($r=0,665$), *Bacteroides* spp. ($r=0,633$); средняя – для *S. aureus* ($r=0,555$), *Prevotella* spp. ($r=0,492$), *Streptococcus* spp. ($r=0,465$), *P. aeruginosa* ($r=0,449$), *A. actinomycetemcomitans* ($r=0,441$); низкая – для *C. albicans* ($r=0,354$). У лиц с периимплантитом как без, так и с пародонтитом одинаково высокая значимость выявлена для *Staphylococcus* spp. $r=0,775$ и $r=0,701$, для *H. pylori* – $r=0,467$ и $r=0,536$ соответственно.

6. Чувствительность значимых в развитии периимплантита микроорганизмов к амоксиклаву была выявлена в 85,8 %, к цефидероколу – в 81,0 %, к цефалексину – в 90,6 %, к цефтриаксону – в 91,3 %, к цефтазидиму – 80,7 %, цефтолозану – 81,6 %, к метронидазолу – в 81,4 %, к тейкопланину – в 88,0 % и к ванкомицину – в 91,9 % случаев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные данные о высоком проценте лиц с имплантатами, контаминированными *H. pylori*, и о значимости этого микроорганизма в развитии периимплантита обосновывают целесообразность эрадикационной терапии перед установкой имплантата с целью улучшения результатов имплантации.

2. Обоснованные по результатам работы антимикробные препараты, обладающие максимальной активностью в отношении значимых в развитии периимплантита микроорганизмов, а именно, амоксилав, цефидерокол, цефалексин, цефтриаксон, цефтазидим, цефтолозан, метронидазол, тейкопланин и ванкомицин, рекомендовано применять у пациентов с периимплантатами в качестве препаратов выбора для ускорения противовоспалительного эффекта.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Необходимо продолжить изучение микробиологических и иммунологических механизмов развития периимплантитов для определения их приоритетной роли в прогрессировании воспалительного процесса.

2. Развить научное направление по изучению возможности использования наночастиц коллоидного серебра в различных областях медицины, в том числе для разработки иммунобиологического препарата с целью профилактики и лечения периимплантитов.

3. Продолжить научные исследования по поиску новых подходов к преодолению устойчивости к антимикробным препаратам, в том числе по разработке иммунобиологических препаратов на основе обоснованных по результатам работы значимых в развитии периимплантитов микроорганизмов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Богачева, Н. В. Изучение микробной ассоциации зубодесневых карманов у больных Хеликобактериозом / Н. В. Богачева, Н. А. Тунева, Е. П. Колеватых, И. В. Зайцева // Вятский медицинский вестник. – 2018. – № 3 (59). – С. 85–90.

2. Богачева, Н. В. Разработка биологической модели иммуносупрессии при помощи дексаметазона / Н. В. Богачева, Н. А. Тунева, А. А. Смирнов, Д. А. Галямова, Л. И. Попеску // Вятский медицинский вестник – 2018. – № 4 (60). – С. 39–43.

3. Тунева, Н. А. Проблемы дентальной имплантации / Н. А. Тунева, Н. В. Богачева, Ю. О. Тунева // Вятский медицинский вестник – 2019. – № 2 (62). – С. 86–93.

4. Богачева, Н. В. Сравнительная оценка микробиома у пациентов с периимплантатами и пародонтитами / Н. В. Богачева, Н. А. Тунева // Проблемы медицинской микологии. – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 57–58.

5. Богачева, Н. В. **Фундаментальные и прикладные научные исследования в области медицины, фармакологии и здравоохранения: актуальные вопросы, достижения и инновации** : монография / Н. В. Богачева, Е. А. Бызов, А. И. Грицук, Е. П. Колеватых, Л. В. Лагунова, О. В. Лапина, С. В. Потехина, К. А. Рямова, **Н. А. Тунева**. – Нижний Новгород : НОО «Профессиональная наука», 2021. – 57 с.
6. **Тунева, Н. А.** Профилактика и лечение периимплантита : методические рекомендации / Н. А. Тунева, Н. В. Богачева. – Нижний Новгород : НОО «Профессиональная наука», 2021. – 49 с.
7. **Тунева, Н. А.** Сравнительная оценка микробной контаминации при пародонтите и периимплантите. Обзор / Н. А. Тунева, Н. В. Богачева // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2021. – № 2. – С. 101–109.
8. **Тунева, Н. А.** Диагностически значимые культивируемые облигатные микроорганизмы в развитии периимплантитов / Н. А. Тунева, Н. В. Богачева, А. Н. Частоедова, Т. С. Кокарева // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2021. – Т. 26, № 4. – С.174–186.
9. **Смирнова Д.Н.** Сравнительная оценка сопоставимости результатов выявления **CagA-положительных штаммов *Helicobacter pylori*** молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами в различном биологическом материале / Д. Н. Смирнова, Н. В. Богачева, С. Б. Петров, Н. А. Тунева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т. 67, № 1. – С.48–52.
10. Аккузина, С. Г. Микробиология ротовой полости : учебное пособие / С. Г. Аккузина, Е. П. Колеватых, **Н. А. Тунева**, Н. В. Богачева, Ю. А. Поярков – Киров, 2022. – 209 с.
11. **Патент 2729991 Российская Федерация МПК В01J 13/00, В82В 3/00, В22F 9/24. Способ получения наночастиц серебра размером 30±3 нм : № 2019130690 / Н. В. Богачева, К. А. Тарбеева, Н. Ю. Огородова, З. Р. Хасаншина, А. В. Чернядьев, Н. А. Тунева; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России) (RU).** – заявл. 26.09.2019 : опубл. 13.08.2020, Бюл. № 23. – 12 с.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

МПК – минимально подавляющая концентрация

cagA – цитокин ассоциированный ген – cytotoxic-associated gene штаммов *H. pylori*

CagA – белок патогенности штаммов *H. pylori*