

На правах рукописи

ШИБАЕВА АННА ВАЛЕРЬЕВНА

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОНСОРЦИУМОВ В
КАЧЕСТВЕ ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНЕЙ
ПАРОДОНТА

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель
доктор биологических наук

Шевелев Алексей Борисович

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел микробиологии и клинической фармакологии, заведующая отделом

Ризванов Альберт Анатольевич - доктор биологических наук, Казанский (Приволжский) федеральный университет, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан, САЕ Трансляционная 7П медицина, заместитель руководителя; кафедра генетики Института фундаментальной медицины и биологии, главный научный сотрудник, профессор; отдел поисковых исследований НОЦ фармацевтики, заведующий отделом.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 в 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, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Актуальность работы обусловлена увеличением частоты встречаемости болезней пародонта, отмечающимся в последние годы, прежде всего, в странах с высоким уровнем развития экономики. К потенциальным факторам, ответственным за эту негативную тенденцию, можно отнести изменение качества пищи, загрязнение окружающей среды, усиление стрессовых воздействий на человека и расширение объёмов применяемых медикаментозных средств (Гуревич К.Г. и соавторами, 2016).

Хотя пародонтит затрагивает абсолютное большинство населения Земли в возрасте свыше 50 лет, механизм развития этого заболевания остаётся недостаточно изученным. Не вызывает сомнений ключевая роль в этом процессе микрофлоры пародонта и неадекватная реакция на неё со стороны иммунной системы человека. Большинство работ, направленных на исследование микробиома пародонта, отводят основную роль в развитии патологии комплексу из пяти ключевых пародонтопатогенов по Сокранскому: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *Treponema denticola*, но практически не рассматривают природных антагонистов патогенных бактерий, способных выступать в роли пародонтопротекторов (Ximenez-Fyvie L.A. с соавторами, 2000). Вместе с тем, функциональные взаимосвязи между патогенными бактериями в норме и при развитии болезней пародонта, тем не менее, нуждаются в дополнительном исследовании.

Важным аспектом, способным пролить свет на механизм развития болезней пародонта, является давно отмечаемая клиницистами гормональная зависимость этого процесса («пародонтит беременных» и ускорение разрушения пародонта под влиянием оральных контрацептивов) (Heasman P.A., Hughes F.J., 2014). Тем не менее, до настоящего времени в литературе нет данных о наличии либо отсутствии гендерно обусловленных различий в составе микробиома пародонта человека (Hajishengallis E. с соавторами, 2014).

На данный момент ни в России, ни в одной другой стране мира не внедрена методика рутинного определения бактериальной обсемененности пародонта. ПЦР в реальном времени можно рассматривать как наиболее подходящий для этих целей инструмент, так как он позволяет проводить не только качественное, но и количественное исследование. Внедрение методики количественного определения ключевых пародонтопатогенов и пародонтопротекторов с помощью ПЦР в реальном времени в практику рутинного пародонтологического обследования позволило бы индивидуально оценивать результативность проведенной (проводимой) терапии пародонтита с точки зрения долговременности достигнутого лечебного эффекта. Однако, создание эффективных диагностических систем для анализа состава микробиома пародонта требует наличия представлений о границах нормы и патологии, характере взаимосвязей между численностью патогенов и нормальной микрофлоры (потенциальных пародонтопротекторов). Фундаментальной целью нашего исследования

является выработка таких представлений, а практической – создание применимой в клинике системы для качественного анализа состава микробиома пародонта.

Степень разработанности темы исследования

Большинство работ по пародонтологии, публикуемых в международных журналах, оперируют понятием выявленного в 1990 годах комплекса пяти ключевых пародонтопатогенов по Сокранскому: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *Treponema denticola*. Работа (Ximenez-Fyvie L.A. с соавторами, 2000) впервые зафиксировала представление об основополагающей роли пародонтопатогенов «по Сокранскому» в развитии пародонтита с использованием методов молекулярной таксономии. В последние годы появился ряд работ по характеристике состава микробиома пародонта с применением методов метагеномного секвенирования, из которых наиболее значимой является исследование (Jünemann S. с соавторами, 2012). Недостатком этой работы является крайне ограниченное число пациентов (4-6 человек в работе), что обусловлено малой доступностью методов высокопроизводительного анализа генома даже в развитых странах. Работы по широкомасштабному исследованию микробиома пародонта методами ПЦР в реальном времени практически не проводились. Работа Torrunguang K. с соавторами (2015 г.) остается единственным известным нам исключением.

В работе (Захаров А.А., Ильина Н.А., 2007) авторы высказали тезис о том, что большая часть микрофлоры полости рта относится комменсалам, т.е. их присутствие не причиняет человеку вреда. Вопреки мнению зарубежных специалистов, авторы этой работы используют термин «нормальная микрофлора полости рта», подразумевая под этим виды микроорганизмов, регулярно выделяемые от здоровых людей. В работе (Брофман И.Д. с соавторами 2016) утверждается, что применение антибиотикотерапии приводит к увеличению обсеменённости полости рта нормофлорой.

Интересные данные, касающиеся защитной роли нормальной микрофлоры пародонта, приведены в работе (Царев В.Н., Ипполитов Е.В. 2013). Используя животную модель пародонта, авторы предложили принцип использования в качестве пробиотиков, подавляющих развитие патогенной микрофлоры на пародонте штаммов *Veillonella parvula* и *Streptococcus sanguinis*. В качестве исходных данных, позволивших выбрать именно эти виды, авторы ссылаются на работы (А.И. Воложин с соавторами, 2004; Самоукина А.М., 2006; Соколова С.И. с соавторами, 2007), где штаммы *V. parvula* и *S. salivarius* классифицируют как эубиотические. При этом они сообщают о многочисленных, но безуспешных попытках использовать для лечения пародонтита более традиционных пробиотиков – штаммов бифидобактерий, лактобацилл и молочнокислых стрептококков, хорошо зарекомендовавших себя при лечении дисбиозов кишечника и урогенитального тракта.

Цель исследования - сопоставление состава микробиома мягкого зубного налёта у пациентов с высокой и низкой сохранностью зубодесневого прикрепления для выявления бактерий кандидатных пародонтопротекторов.

Задачи исследования:

1. Разработать методическую базу для использования мягкого зубного налёта в качестве материала для получения достоверных (воспроизводимых) данных исследования микробиома пародонта молекулярными методами – метагеномным секвенированием и полимеразной цепной реакцией в реальном времени.
2. Методом метагеномного анализа мягкого зубного налета выявить роды бактерий, характерные для здорового пародонта и ассоциированные с диагнозом «агрессивный пародонтит».
3. Выявить тенденцию к формированию ассоциаций (комплексов) бактерий в мягком зубном налёте при развитии хронического пародонтита.
4. Методом ПЦР в реальном времени подтвердить статистическую достоверность корреляции встречаемости потенциальных пародонтопротекторов, выявленных в мягком зубном налете, методами метагеномного анализа, со степенью сохранности пародонта и содержанием в мягком зубном налёте пародонтопатогенов.
5. Исследовать различия в взаимозависимостях, определяющих содержание пародонтопатогенов и потенциальных пародонтопротекторов у мужчин и женщин.

Научная новизна

Впервые доказано, что использование для диагностики состава микробиома пародонта мягкого зубного налета пациента более эффективно, чем использование твёрдого зубного налета. При работе с мягким зубным налётом наблюдается большая сходимость результатов количественного анализа для различных участков пародонта одного больного, чем в случае твердого зубного налёта.

С применением метода глубокого секвенирования банков 16S рДНК проведено комплексное исследование состава микробиома мягкого зубного налёта человека. Были выявлены роды бактерий характерные для здорового пародонта: *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Corynebacterium* и роды, ассоциированные с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. Впервые идентифицированы виды бактерий, ассоциированные со здоровым пародонтом: *Veillonella parvula* и *Streptococcus sanguinis*. Для сравнительного анализа представленности бактерий на пародонте впервые использованы таксономические группировки низкого ранга: род и вид. Результаты анализа депонированы в базе данных NCBI BioProject Submissions system под номером доступа ID SUB588191; BioProject ID PRJNA256234

Разработаны оригинальные тест-системы на основе ПЦР в реальном времени формата Taqman для количественного анализа *V. parvula* и *S. sanguinis*, подтверждена их специфичность в отношении целевых видов бактерий при анализе мягкого зубного налёта (заявка на патент на изобретение РФ № 2015147190 от 03.11.2015 (решение о выдаче патента от 24.01.2017) и заявка на патент на изобретение РФ № 2015147189 от 03.11.2015 (решение о выдаче патента от 24.01.2017).

С применением разработанных ПЦР тест-систем для количественного анализа *V. parvula* и *S. sanguinis* выявлено, что повышенная доля этих бактерий в мягком зубном

налёте характерна для пациентов из контрольной группы. Снижение доли кандидатных пародонтопротекторов в составе микробиома пародонта коррелирует с увеличением доли признанных пародонтопатогенов: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*.

Впервые показаны статистически достоверные гендерные различия содержания пародонтопатогенных бактерий и потенциальных пародонтопротекторов в мягком зубном налёте в норме и при патологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые был выдвинут и экспериментально подтверждён тезис о существовании эубиотического компонента микрофлоры пародонта, повышенное содержание которого в мягком зубном налёте характерно для пациентов с высокой сохранностью пародонта или коррелирует с пониженным содержанием в мягком зубном налёте пародонтопатогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* (*B. forsythus*) и *T. denticola*. Обоими этими признаками обладают бактерии видов *V. parvula* и *S. sanguinis*, которым предложено присвоить обозначение «потенциальные пародонтопротекторы».

Разработан оригинальный методологический подход к описанию видового состава микрофлоры пародонта с применением генодиагностической технологии – количественного определения ДНК бактерий в биологическом материале, направленный на исследование изменения состава и состояния микробиома в норме при патологии.

Предложен оригинальный алгоритм определения порогового уровня обсеменённости мягкого зубного налёта пародонтопатогенами с применением набора «Дентофлор», обеспечивающий возможность интерпретации данных ПЦР-анализа в интересах клинической диагностики для отслеживания динамики развития пародонтита (заявка на патент на изобретение РФ № 2015120411 от 29.05.2015; решение о выдаче патента от 21.10.2016). Впервые введено понятие доли патогенной микрофлоры в микробном консорциуме пародонта.

Разработаны и апробированы ПЦР тест-системы в реальном времени, предназначенные для количественного определения содержания доли потенциальных пародонтопротекторов *V. parvula* и *S. sanguinis* в микробиоме мягкого зубного налёта пациентов, позволяющие оценить эффективность проводимого лечения пациентов с воспалительными поражениями пародонта. Применение разработанных в рамках диссертационной работы тест-систем уже сейчас позволяет оперативно вносить изменения в тактику лечения в случае её неэффективности. В перспективе, по мере накопления массива данных, полученных с помощью новых тест-систем, могут быть разработаны методические указания (рекомендации) для лечения конкретных нозологических форм пародонтита, которые в настоящее время не удастся различить без использования методов молекулярной диагностики.

Собрана и охарактеризована коллекция образцов ДНК микробиома пародонта от 153 пациентов с различной степенью сохранности пародонта, которую можно использовать для исследования симбиотических и антагонистических отношений между различными видами бактерий в норме и при патологии.

В рамках исследования описаны способы оценки иммунного ответа на микробную инфекцию пародонта у индивидуальных пациентов в интересах клинической диагностики и поданы две заявки на патент РФ: № 2015120410 от 29.05.2015; решение о выдаче патента от 16.02.2017, № 2015120412 от 29.05.2015; решение о выдаче патента от 26.09.2016.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре пародонтологии и используются при подготовке студентов и ординаторов в соответствии с ФГОС по специальности «Стоматология терапевтическая», проведении практических занятий со студентами и ординаторами в рамках курса «Методы обследования и лечения больных с заболеваниями пародонта», а также в лекционном материале по теме «Функциональная диагностика в пародонтологии» ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (акт внедрения от 15.12.2016). Тест-системы для определения *V. parvula* и *S. sanguinis* в микробиоме мягкого зубного налета пациентов серийно выпускаются ООО «Иннотех-21» (акт внедрения от 10.04.2017).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования стали проблемы, связанные с формированием групп пациентов со здоровым пародонтом, больных агрессивным и хроническим пародонтитом, сбалансированных по полу и возрасту, разработкой методов сбора мягкого зубного налёта и выделения из него суммарной ДНК с целью получения препаратов, максимально отражающих состав микробиома пародонта пациента в целом. Анализ литературы в предметной области исследования выполнен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось с применением специфических методов молекулярного анализа микробиома (высокопроизводительное метагеномное секвенирование и ПЦР в реальном времени). Обработка результатов проводилась с применением общепринятых методов статистического анализа.

Материалы для исследования

Клинический материал

Биологический материал для формирования выборок был собран на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ЦНИИСиЧЛХ" Минздрава России) (д.м.н. Зориной О.А.) и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России) (к.м.н. Айвазовой Р.А.). В работе был использован материал от двух выборок пациентов, в разное время сформированных, для проведения исследования (репрезентативность групп не контролировалась). В них были включены все пациенты, проходившие пародонтологический осмотр, соответствовавшие

критериям включения, и давшие информированное согласие на участие в исследовании. Таким образом, термин «выборка» является условным по отношению к сформированным группам пациентов. Его использование в тексте обусловлено необходимостью терминологического обособления групп сравнения, использованных в двух последовательно выполненных частях работы.

Выборка №1 состояла из 10 человек: 5 пациентов с агрессивным пародонтитом и 5 лиц без признаков поражения пародонта. Эта ограниченная по размеру выборка, группы которой были сбалансированы по половозрастным характеристикам, использовалась в исследовании микробиома пародонта с помощью метагеномного секвенирования (глубокого секвенирования или NGS).

Выборка №2 (Таблица 1) состояла из 153 пациентов в возрасте от 16 до 70 лет без тяжёлой общесоматической патологии. При выполнении ряда анализов выборка №2, а также входившие в неё группы и подгруппы, расчленялась на 3 возрастные категории: кат. №1 (до 30 лет), кат. №2 (от 30 до 50 лет) и кат. №3 (пациенты старше 50 лет).

Таблица 1 - Состав групп и подгрупп выборки №2

Выборка №2 (153 пациента) 16-70 лет				
Группы				
контрольная, (К)	основная, (О)	мужчины, (♂)	женщины, (♀)	
78	75	61	92	кол-во пациентов
27,7±10,8	42,6±11,3	33,8±13,4	36±13,2	ср. возраст, (лет)
Подгруппы				
♂, К	♂, О	♀, К	♀, О	
27	34	51	41	кол-во пациентов
26,5±9,7	41,2±12,4	28,4±11,4	43,8±10,2	ср. возраст, (лет)

Микробиологические методы

Выделение ДНК

Было проведено сравнение эффективности выделения суммарной бактериальной ДНК из образцов мягкого зубного налета у 5 пациентов выборки №2 тремя методами: с помощью наборов «Пробы-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «Проба Репид» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и методом фенольной экстракции. По итогам сравнения результатов для дальнейших исследований был выбран метод с использованием набора «Пробы-ГС». При проведении ПЦР исследований выделение ДНК всегда проводилось по унифицированному протоколу с точным соблюдением абсолютных объёмов всех используемых реагентов, согласно инструкции производителя.

Молекулярно-генетические методы:

Высокопроизводительное метагеномное секвенирование

Были созданы библиотеки ДНК всех пациентов выборки №1 со специфическими праймерами на область V6 16S рДНК с помощью ПЦР. Библиотеки анализировали с помощью NGS-секвенатора Illumina MiSeq (США). Для каждого образца удалось определить около 10 тыс. индивидуальных последовательностей. Установленные последовательности 16S рДНК относили к определенному роду бактерий с помощью

процедуры автоматического поиска «Blast» по базе данных NCBI GenBank. Результаты анализа депонированы в базе данных NCBI BioProject Submissions system под номером доступа ID SUB588191; BioProject ID PRJNA256234.

ПЦР в реальном времени

Были использованы ранее разработанные наборы реагентов, состоящие из специфичных праймеров и специфичного к последовательности продукта флуоресцентно меченого зонда типа TaqMan к пяти пародонтопатогенным агентам *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* и двум кандидатным пародонтопротекторам: *V. parvula* и *S. sanguinis*.

По результатам анализа для каждого образца фиксировали величину параметра «абсолютного Ct», который автоматически определяется встроенным программным обеспечением амплификатора в оптическом канале Fam. С целью нормировки сигнала (учёта разброса в количестве взятого биоматериала и эффективности экстракции ДНК) для каждого образца определяли величину «относительного Ct». Для этого из величины абсолютного Ct для специфического набора праймеров и зонда, усреднённого по двум образцам одной серии, вычитали усреднённую величину Ct общей бактериальной массы для тех же двух образцов серии. Статистической обработке подвергали данные, выраженные в форме «относительного Ct».

Статистическая обработка результатов

Статистическая разница в представленности каждого рода бактерий у пациентов с агрессивным пародонтитом и в контрольной группе рассчитывалось с помощью пакета Statistica 8,0 для Windows (StatSoft, США), при этом для сравнения различий в представленности видов и родов в выборках использовалось соотношение критериев Фишера ($p \leq 0,05$) и Манна-Уитни.

Статистическую обработку данных ПЦР в реальном времени проводили с помощью пакета Statistica 8,0 для Windows (StatSoft, США), по стандартным методикам вариационной статистики. Для проверки достоверности гипотезы о наличии различий между группами по исследуемому параметру (представленность в образце конкретной бактерий) использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. При анализе взаимосвязей внутри пары количественных или порядковых качественных признаков использовали корреляционный анализ по методу Спирмана. Во всех случаях уровень статистической значимости принимали за 95% ($p \leq 0,05$).

Личное участие автора в получении результатов

Биологические материалы предоставлены д.м.н. О.А. Зориной («Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации), к.м.н. Р.А. Айвазовой (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации).

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в выполнении молекулярно-биологического анализа образцов клинических материалов (выделение ДНК, изготовление банков ДНК для метагеномного анализа, их

анализ методом ПЦР в реальном времени) в базе центра коллективного пользования «Генетический полиморфизм» ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН». Статистическая обработка результатов метагеномного секвенирования и ПЦР в реальном времени, разработка олигонуклеотидных праймеров проводилась в лаборатории процессов фотосенсибилизации ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. В проведении метагеномного анализа и разработке праймеров помощь диссертанту оказывал директор ЦКП «Генетический полиморфизм» при Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова д.б.н. Д.В. Ребриков.

Первичная статистическая обработка материалов метагеномного анализа 16S рДНК (до стадии формирования таблицы данных о представленности OTU в образцах) выполнена совместно с к.б.н. Е.С. Шубиной («ООО «НПО ДНК-Технология», Россия»). Статистическая обработка данных ПЦР с применением метода анализа по Манну-Уитни, Краскаллу-Уоллису и Спирману проводилась совместно с заведующей межфакультетской лабораторией «Генетика» ФГБОУ ВО «Курский Государственный университет» д.б.н. Е.В. Трубниковой.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Проведенное сопоставление величины различий в показателях микробной обсемененности различных участков пародонта показало, что использование мягкого зубного налёта в качестве объекта исследования даёт более объективную характеристику индивидуального состава микробиома пародонта при использовании ограниченного набора образцов от одного пациента, чем использование образцов твёрдого зубного налёта.

2. Впервые экспериментально показан факт существования бактерий, повышенное содержание которых в мягком зубном налёте характерно для пациентов с высокой сохранностью пародонта и коррелирует с пониженным содержанием в мягком зубном налёте пародонтопатогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* (*B. forsythus*) и *T. denticola*. Бактериям *V. parvula* и *S. sanguinis*, выявленных в рамках исследования, предложено присвоить обозначение «потенциальные пародонтопротекторы». Гипотеза о существовании бактерий-пародонтопротекторов находится в противоречии с устоявшейся в современной литературе концепцией о патогенетической роли бактериальной биоплёнки.

3. Впервые показано, что гендерная принадлежность пациента непосредственно влияет на состав микробного консорциума его пародонта. Риск развития хронического пародонтита у мужчин и женщин в разной мере определяется пародонтопатогеном *P. gingivalis*, и комплексом *T. forsythensis*/*T. denticola*.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов работы с применением метагеномного секвенирования обеспечивалась точным следованием рекомендациям мирового лидера в этой области, производителем использованного оборудования компанией Illumina. Достоверность анализа состава микробиома у пациентов выборки №1 при небольшом числе проанализированных образцов гарантируется высокой плотностью покрытия, составившей более 100 млн. прочтений для каждого образца. Первичные данные

метагеномного анализа, приведшие к идентификации видов *V. parvula* и *S. sanguinis*, в качестве потенциальных пародонтопротекторов, были подтверждены с помощью ПЦР в реальном времени на выборке №2, в которую вошли 153 пациента. Для проведения ПЦР в реальном времени использовались стандартизованные методики, а оборудование проверено. Статистическая обработка осуществлялась при помощи лицензионного программного обеспечения.

Диссертация апробирована на заседании межлабораторного семинара Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (протокол № 14 от 20.10.2016 г).

Материалы диссертации были представлены на 2-ой Всероссийской научно-практической конференции по геномному секвенированию «Геномное секвенирование 2014» (Москва, 2014); «Геномное секвенирование 2015» (Москва, 2015); Форуме Университетской науки – 2015. «Научное медицинское прогнозирование: молекулярно-генетические аспекты, триггеры патогенеза, ятрогенные влияния» (Москва, 2015); Тематическом секционном заседании XXXVII Итоговой Научной конференции ОМУ, (Москва, 2015).

Публикации. По теме работы опубликовано 11 печатных работ, из них 8 - в рецензируемых журналах, 2 - в материалах конференций, 1 - в другом издании.

Структура работы. Диссертации изложена на 178 страницах машинописного текста и состоит из введения, описания материалов и методик, обзора литературы, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и приложений. Диссертация иллюстрирована 16 рисунками, 40 таблицами. Библиографический указатель включает 260 источников литературы, из них 30 работ отечественных и 230 работ зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка методологии молекулярного анализа микробиома пародонта человека

В настоящее время ПЦР-диагностика пародонтального консорциума не внедрена в рутинную стоматологическую практику ни в одной стране мира. Основной причиной этого является сложность создания методики сбора образцов клинического материала смывов пародонта, позволяющих оценивать его состояние для ротовой полости пациента в целом, а не отдельных его участков.

При сравнении вариабельности микрофлоры мягкого и твёрдого зубного налёта отбирали образцы с 8 зубов различного типа верхней и нижней челюстей у шести пациентов выборки №2, в том числе, у трёх пациентов группы контроля и у трёх пациентов основной группы (в том числе, два пациента с диагнозом «хронический пародонтит тяжелой степени» и один пациент с диагнозом «хронический пародонтит средней степени»). Суммарную ДНК выделяли с помощью набора «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и анализировали при помощи набора для ПЦР в

реальном времени «Дентофлор» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), позволяющего количественно определять пять пародонтопатогенов: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *T. denticola*.

Выполненные нами исследования на ограниченной группе пациентов из выборки №2 показали, что мягкий зубной налёт имеет преимущество в качестве исследуемого материала для ПЦР над твёрдым зубным налетом (используемым в большинстве зарубежных работ), поскольку по содержанию в нём патогенов он достаточно стандартен в любой точке ротовой полости пациента (Таблица 2). Правда, эта закономерность наблюдается только для пациентов с выраженными симптомами пародонтита при исследовании обсемененности пародонта всеми пародонтопатогенами за исключением *T. forsythensis*. В контрольной группе разброс результатов анализа мягкого и твёрдого налёта настолько велик, что не позволяет оценивать состояние пародонта по результатам анализа образца из одной точки.

Таким образом, можно предполагать, что процесс возникновения или обострения пародонтита характеризуется резкой интенсификацией циркуляции *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* и *T. denticola* в пределах ротовой полости, что легко может быть выявлено с помощью количественной ПЦР. Важно отметить, что в случае *P. intermedia* и *T. forsythensis* подобной закономерности не отмечается: разброс результатов для этих патогенов велик как в твёрдом, так и в мягком налете, однако, значение разброса для *T. forsythensis* в мягком налете всё же несколько меньше.

Таблица 2 - Средние значения коэффициента вариации представленности различных видов бактерий в твёрдом и мягком налёте основной и контрольной групп пациентов

группа	<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>P. intermedia</i>		<i>T. forsythensis</i>		<i>T. denticola</i>	
контрольная	12,2	19,3	0,0	0,0	24,1	25,9	19,2	19,6	18,2	20,6
основная	22,6	11,8	22,6	12,3	16,0	15,3	19,2	15,1	18,1	6,1
Тип налета	Тв.	Мягк.	Тв.	Мягк.	Тв.	Мягк.	Тв.	Мягк.	Тв.	Мягк.

Следовательно, для получения более достоверного результата анализа обсеменённости пародонта *P. intermedia* и *T. forsythensis* целесообразно проводить отбор нескольких образцов мягкого налёта из разных участков пародонта.

Анализируя собственные результаты, касающиеся методики сбора и исследования образцов, важно отметить, что при выделении ДНК из образцов мягкого налёта двумя принципиально разными методами: с помощью фенольной экстракции и с помощью сорбентного набора «Проба-ГС» в сочетании с системой ПЦР в реальном времени «Дентофлор» были получены сопоставимые результаты. Таким образом, можно считать, что выбранный методический подход к решению дальнейших задач исследования адекватен и не вносит искажений в наблюдаемую картину.

2. Исследование состава микробиома мягкого зубного налёта методом метагеномного секвенирования

Отработав методику получения препаратов суммарной ДНК бактериального консорциума мягкого зубного налёта, мы перешли к исследованию состава микробиома в норме и при патологии методами глубокого секвенирования банков области V6 16S рДНК. Основным направлением поиска при этом было выявление таксономических группировок бактерий ранга рода и вида, доля которых в пародонтальном консорциуме относительно высока в норме, но снижается при возникновении пародонтита. Такие группировки в дальнейшем предполагалось рассматривать в качестве потенциальных пародонтопротекторов.

Выполненное статистическое сравнение групп выборки №1 по представленности в микробиоме мягкого зубного налёта каждой таксономической группировки (OTU), позволило выявить пять OTU ранга рода, характерных для здорового пародонта: это рода *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella* и *Corynebacterium*. Было также обнаружено 9 OTU ранга рода, ассоциированных с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. Интересно, что преобладание родов *Treponema*, *Synergistes* и *Filifactor* сильнее всего ассоциируется с заболеванием, в то время как роды, к которым принадлежат общеизвестные пародонтальные патогены: *Porphyromonas* и *Tannerella*, показывают лишь слабую тенденцию к такой связи.

Среди OTU ранга вида наиболее значимую статистическую ассоциацию со здоровым пародонтом показали *S. sanguinis* и *V. parvula*, а также предполагаемый неизвестный вид рода *Veillonella* - *V. spp.* Было установлено, что в контрольной группе выборки №1 в среднем в 10 раз повышена доля этих видов, по сравнению с основной группой (пациенты с агрессивным пародонтитом). Поэтому вывод о защитной роли *S. sanguinis* и *V. parvula* требовалось подтвердить путём исследования группы пациентов с хроническим пародонтитом и гингивитом. Для этого была задействована выборка №2, причём исследование было проведено методом ПЦР в реальном времени.

3. Проверка специфичности работы праймеров ПЦР в реальном времени

Уникальным преимуществом анализа состава мягкого зубного налёта методом глубокого секвенирования банков 16S рДНК является возможность наблюдать за всем бактериальным консорциумом вне зависимости от начальной гипотезы о роли той или иной OTU в этиологии заболевания. Однако, высокая стоимость такого анализа ограничивает возможность исследования больших выборок пациентов. Поэтому наблюдения, сделанные по результатам анализа данных глубокого секвенирования, послужили в качестве отправной точки для исследования большой выборки пациентов (выборка №2) методом ПЦР в реальном времени. Для этой работы были использованы готовые тест-системы для количественного определения пародонтопатогенов *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, входящие в набор «Дентофлор», а также разработанные нами оригинальные тест-системы для детекции вновь выявленных кандидатных пародонтопротекторов *V. parvula* и *S. sanguinis*.

В качестве гена-мишени для идентификации *V. parvula* и родственного ей, но не идентичного вида *Veillonella spp.*, был выбран ген лактат-пермеазы. Поскольку способность к утилизации экзогенного лактата в качестве основного субстрата является идентификационным систематическим признаком рода *Veillonella*, было предположено, что этот ген будет обладать высокой консервативностью в пределах вида. Последовательность выбранной ДНК-мишени получена из полногеномной последовательности коллекционного штамма *V. parvula* DSM2008 из базы данных NCBI GenBank (номер доступа NC_013520.1.).

Фрагмент последовательности длиной 1637 п.н. (с 1816454 по 1818091) при использовании процедуры BLAST обнаружил отсутствие выраженной гомологии с геномами других видов рода *Veillonella*, депонированными в базе данных NCBI GenBank.

Был подобран следующий набор праймеров и зондов для идентификации *V. parvula* и родственного ей, но не идентичного вида *Veillonella spp.*:

Veil-d2	ATCGGTTCTTTCATCATCGCTATT;
Veil-r2	TTAGTGGGTCAAAACCTACGGCAA;
Veil-p2	(BHQ1)-GCGGCACCT(FdT)CAAGGGCACCCAGTG-P.

где BHQ1 – тушитель флуоресценции Black Hole Quencher 1, FdT – тимин, меченный флуорофором FAM. Праймеры имели расчётную температуру отжига 60,6°C и 61,1°C и обеспечивали синтез продукта длиной 322 п.н. Расчётная температура плавления зонда составила 69,5°C.

В качестве гена-мишени для идентификации *S. sanguinis* был использован ген *IgA1*-специфичной протеазы, ответственной за деградацию секреторных антител, и имеющего важное адаптивное значение для выживания бактерий в слюне человека, отличающейся высоким содержанием антител класса IgA. Последовательность выбранной ДНК-мишени из полногеномной последовательности коллекционного штамма *S. sanguinis* SK36 была получена из базы данных NCBI GenBank (номер доступа CP000387.1.). Фрагмент последовательности длиной 1040 п.н. (с 2339412 по 2340452) при использовании процедуры BLAST обнаружил отсутствие выраженной гомологии с геномами других видов рода *Streptococcus*, депонированных в базе данных NCBI GenBank, за исключением гена *IgA1*-протеазы *Streptococcus oralis* (81% совпадений). Практического значения он не имеет в виду малой представленности *S. oralis* в мягком зубном налёте большинства пациентов.

Для идентификации *S. sanguinis* был подобран следующий набор праймеров и зондов.

StrS-d1	TAGCGGCTAGAAACCTCGTCAT;
StrS-r1	GTGCGCTTCCCTGAGATTCTT;
StrS-p1	(BHQ1)-CTTCCACA(FdT)AAGCGCTGGCATCCG-P.

где BHQ1 – тушитель флуоресценции Black Hole Quencher 1, FdT – тимин, меченный флуорофором FAM. Праймеры имели расчётную температуру отжига 60,9°C и 61,2°C и обеспечивали синтез продукта длиной 232 п.н. Расчётная температура плавления зонда составила 69,1°C.

Проверка специфичности работы праймеров Veil-d2/Veil-r2 и StrS-d1/StrS-r1 осуществлялась путём проведения ПЦР в реальном времени с ДНК образцов от пациентов, которые по данным глубокого секвенирования отличались высокой и низкой обсемененностью *V. parvula* и *S. sanguinis*, а также на коллекционных штаммах ATCC 17745 и ATCC 10556, соответственно. Чувствительность разработанных тест-систем составила $2,1 \times 10^2$ геном-эквивалентов в мкл для *V. parvula* и $2,9 \times 10^2$ геном-эквивалентов в мкл для *S. sanguinis*.

Данные, полученные по результатам нашего исследования с использованием ПЦР в реальном времени, в основном согласуются с результатами работ других авторов. Так сравнение контрольной и основной групп выборки №2 без разделения на возрастные категории, позволило установить, что наиболее жёсткие связи с развитием патологии пародонта обнаруживаются для пародонтопатогенов *T. forsythensis* и *T. denticola*. Несколько меньшие значения силы связи получены для *P. gingivalis* и *P. intermedia* (Рисунок 1).

Рисунок 1 - Виды, для которых установлено статистически достоверное отличие обсемененности пародонта патогенами в контрольной и основной группах выборки №2 ($p < 0,05$)

Для возрастной категории №2 наряду с *T. forsythensis* (Z=3,7) сильную ассоциацию с патологией пародонта обнаруживает *P. gingivalis* (Z=3,4), а ассоциация *T. denticola* и *P. intermedia* слабее (Z=3 и Z=2,9, соответственно).

Единственным известным в литературе пародонтопатогеном, для которого не было обнаружено достоверных количественных различий в основной и контрольной группах выборки №2, оказался *A. actinomycetemcomitans*. Комментируя этот вывод, необходимо отметить, что в литературе существуют весьма противоречивые оценки этиологической

роли этой бактерии в развитии поражений пародонта. В качестве практического вывода из проделанной нами работы можно сказать, что ПЦР-анализ мягкого зубного налета с помощью набора «Дентофлор» не может рассматриваться в качестве эффективного средства оценки состояния пародонта в связи с инфекцией *A. actinomycetemcomitans*.

Ещё одним важным аспектом является то, что пародонтопатогены нередко обнаруживаются у пациентов со здоровым пародонтом. Выявление патогенных бактерий у клинически здоровых лиц, особенно в наддесневом налёте, может рассматриваться в качестве важного диагностического критерия при диагностике и лечении пародонтита. ПЦР в реальном времени даёт возможность количественно определять необходимые виды бактерий в широком диапазоне концентраций. Таким образом, этот метод наилучшим образом подходит для определения пороговой обсемененности при патологии. В связи с этим в нашей работе был введён параметр пороговой обсемененности пародонта: значения относительного C_t менее 15 циклов считаются патологией, в то время как значение относительного C_t более 15 циклов рассматриваются в качестве нормы. В литературе утверждается, что даже незначительная обсеменённость твёрдого зубного налёта *P. gingivalis* ассоциирована с существенным увеличением риска возникновения хронического пародонтита тяжелой степени, а виды *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* и *P. intermedia* существенно увеличивают риск возникновения хронического пародонтита тяжелой степени только при достижении ими характерных для каждого вида пороговых уровней обсеменённости. В нашей работе аналогичные связи для мягкого зубного налета были выявлены только в отношении *T. denticola* и *P. intermedia*.

Поскольку в настоящее время взаимодействие патогенов в процессе инфекции часто рассматривается в качестве ключевого фактора патогенеза, важным аспектом служило исследование статистических ассоциаций в представленности различных патогенов в мягком зубном налёте. По результатам нашего исследования с применением корреляционного анализа по Спирману, единственным пародонтопатогеном, не проявляющим склонности к формированию комплексов с другими патогенами, является *A. actinomycetemcomitans*. Остальные патогены в той или иной степени имеют склонность к участию в коинфекции (Таблица 3).

Таблица 3 - Парные корреляции между представленностью пародонтопатогенов в мягком зубном налёте, выявленные с помощью непараметрического критерия Спирмана в выборке №2 (153 человека)

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>	p-level
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	
<i>P. gingivalis</i>	0,14		$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	
<i>P. intermedia</i>	-0,06	0,37		$p < 0,001$	$p < 0,001$	
<i>T. forsythensis</i>	-0,05	0,50	0,48		$p < 0,001$	
<i>T. denticola</i>	-0,01	0,46	0,46	0,60		
Коэффициент Спирмана						

Наиболее значимые корреляции наблюдаются для пародонтопатогенов *T. forsythensis* и *T. denticola* (значение $R=0,6$). При этом в литературе нет данных, подтверждающих склонность пародонтопатогенов *T. forsythensis* и *T. denticola* к

коагрегации. Кроме того, по нашим данным, обсемененность мягкого зубного налета *T. forsythensis* хорошо коррелирует с повышенной обсемененностью его *P. gingivalis* и *P. intermedia*, что уже находит многочисленные подтверждения в работах других авторов. Обнаружены положительные корреляции для пар *T. denticola* - *P. gingivalis* и *T. denticola* *P. intermedia*. Корреляция представленности в мягком зубном налете пародонтопатогенов *P. gingivalis* и *P. intermedia* была несколько менее выраженной.

В современной литературе господствует мнение о том, что определяя степень гиперколонизации пародонта *P. gingivalis* и *T. denticola*, можно отказаться от наблюдения за *T. forsythensis*, как от фактора, не имеющего самостоятельного значения в развитии пародонтита. Действительно, абсолютная обсемененность пародонта *T. forsythensis* высока, по сравнению с другими патогенами, не только при патологии, но и в норме. Однако, не исключено, что эти статистические характеристики отражают важную роль *T. forsythensis* на начальных стадиях развития болезни, при которых трудно отнести конкретного пациента к основной или контрольной группе внутри выборки. С этой точки зрения *T. forsythensis* может играть первостепенную роль в запуске патологических процессов.

Напротив, присутствие пародонтопатогена *P. intermedia* на пародонте является однозначным признаком патологического состояния и чаще тяжелого поражения, в то время как у здоровых пациентов патологическая обсемененность этим патогеном практически не встречается. В то же время, подобно *T. forsythensis*, *P. intermedia* не проявляет склонности к моноинфекции у больных пародонтитом, а выступает исключительно в качестве компонента комплекса патогенов.

Как уже подчеркивалось, по результатам нашей работы сложно говорить о первостепенной роли *P. gingivalis* в процессе образования комплекса пародонтопатогенов, однако при анализе выборки пациентов с диагнозом «пародонтит» при помощи корреляционного анализа по Спирману, установлено, что наряду с высокими корреляциями в паре *T. forsythensis* - *T. denticola* ($R=0,39$) наблюдается рост коэффициентов корреляции, характеризующих синхронное изменение содержания в мягком зубном налете *P. gingivalis* с *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, что является косвенным подтверждением активного участия *P. gingivalis* в развитии пародонтита (Таблица 4).

Таблица 4 - Парные корреляции между представленностью пародонтопатогенов в мягком зубном налёте, выявленные с помощью непараметрического критерия Спирмана в основной группе выборки №2 (75 человек)

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>	p-level
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	
<i>P. gingivalis</i>	0,01		$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	
<i>P. intermedia</i>	-0,10	0,30		$p < 0,05$	$p < 0,01$	
<i>T. forsythensis</i>	-0,19	0,48	0,26		$p < 0,001$	
<i>T. denticola</i>	-0,22	0,32	0,33	0,39		
Коэффициент Спирмана						

группу по признаку наличия/отсутствия патологической обсеменённости мягкого зубного налёта соответствующим протектором, после чего полученные парные группы сравнивались с применением непараметрического критерия Манна-Уитни по представленности патогенов в мягком зубном налёте (Таблица 5).

Таблица 5 - Сравнительный анализ групп из состава выборки №2, выделенных по критерию $\Delta Ct V. parvula < 15 / \Delta Ct V. parvula > 15$

	Z	p	Размер группы	
			$\Delta Ct V. parvula < 15$	$\Delta Ct V. parvula > 15$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-0,09	$p > 0,05$	107	46
<i>P. gingivalis</i>	3,40	$p < 0,001$	107	46
<i>P. intermedia</i>	2,90	$p < 0,01$	107	46
<i>T. forsythensis</i>	3,12	$p < 0,01$	107	46
<i>T. denticola</i>	1,24	$p > 0,05$	107	46
<i>S. sanguinis</i>	-2,45	$p < 0,05$	107	46

Примечание: Серым выделены строки, в которых выявлено достоверное различие между группами ($p < 0,05$).

Этим методом было показано, что кандидатные пародонтопротекторы находятся в антагонистических отношениях с пародонтопатогенами. Так *V. parvula* обнаруживает, наиболее сильную обратную связь с *P. gingivalis* ($Z=3,4$). Менее сильная, но все же достоверная отрицательная связь обнаруживается в парах *V. parvula* – *T. forsythensis* ($Z=3,1$) и *V. parvula* – *P. intermedia* ($Z=2,9$). Достоверной связи в паре *V. parvula* – *T. denticola* обнаружено не было.

Для *S. sanguinis* наиболее сильные обратные связи обнаружены с представленностью в мягком налёте комплекса *T. forsythensis* – *T. denticola* ($Z=3,2$, и $Z=2,8$). Представленность в мягком зубном налёте *S. sanguinis* в некоторой мере статистически связана с обсемененностью пародонта пародонтопатогенами *P. gingivalis* и *P. intermedia*, однако эта связь слабее: $Z=2,3$ и $Z=2,1$, соответственно (Таблица 6).

Таблица 6 - Сравнительный анализ групп из состава выборки №2, выделенных по критерию $\Delta Ct S. sanguinis < 15 / \Delta Ct S. sanguinis > 15$

	Z	p	Размер группы	
			$\Delta Ct S. sanguinis < 15$	$\Delta Ct S. sanguinis > 15$
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,13	$p > 0,05$	89	64
<i>P. gingivalis</i>	2,29	$p < 0,05$	89	64
<i>P. intermedia</i>	2,05	$p < 0,05$	89	64
<i>T. forsythensis</i>	3,16	$p < 0,01$	89	64
<i>T. denticola</i>	2,80	$p < 0,01$	89	64
<i>V. parvula</i>	-2,04	$p < 0,05$	89	64

Примечание: Серым выделены строки, в которых выявлено достоверное различие между группами ($p < 0,05$).

На основании изложенного можно предположить, что антагонистическое действие каждого из кандидатных пародонтопротекторов направлено на сдерживание определенных видов бактерий или их групп. Так численность в мягком зубном налёте *V. parvula* обратно пропорциональна численности *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и

P. intermedia, в то время как представленность на пародонте *S. sanguinis* снижается с ростом обсемененности мягкого зубного налета комплексом *T. forsythensis* - *T. denticola*.

Эти результаты находят подтверждение и при использовании корреляционного анализа по Спирману во всей выборке (Рисунок 3). Обсемененность пародонта потенциальными пародонтопротекторами *V. parvula* и *S. sanguinis* показывает обратную корреляцию с патологической обсемененностью всеми анализируемыми пародонтопатогенами. Так *V. parvula* показала себя как потенциальный антагонист для *T. forsythensis* и *P. intermedia*, корреляции *V. parvula* с представленностью в образцах *P. gingivalis* и *T. denticola* были на порядок ниже.

Для *S. sanguinis* наиболее значимые коэффициенты обратной корреляции зафиксированы по отношению к комплексу *T. forsythensis* /*T. denticola* и *P. gingivalis*, в то время как значения коэффициентов корреляции для *P. intermedia* не велики. Кроме того, наблюдается прямая корреляция между кандидатными пародонтопротекторами *V. parvula* и *S. sanguinis*.

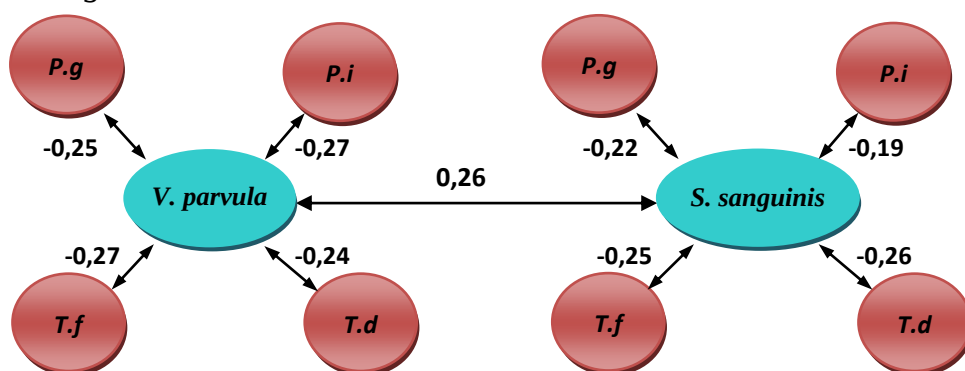


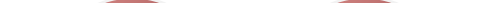
Рисунок 3 - Коэффициенты корреляции кандидатных пародонтопротекторов и пародонтопатогенов по Сокранскому

При исследовании корреляций в основной группе пациентов выборки №2 с использованием критерия Спирмана обратные корреляции получены только для *V. parvula* по отношению к пародонтопатогенам *P. intermedia* и *T. forsythensis*. Падение величин коэффициентов корреляции, по сравнению с суммарной выборкой, может быть результатом дробления выборки, что само по себе снижает достоверность анализа.

Результаты, полученные при анализе кандидатных пародонтопротекторов, нельзя считать исчерпывающими, однако, они позволяют говорить о наличии аспектов изучения нормальной и патогенной микрофлоры пародонта, полностью выпавших из поля зрения большинства исследований, и требующих всестороннего изучения и анализа.

6. Анализ гендерных различий выборки №2 методом ПЦР в реальном времени

Независимый анализ выборок мужчин и женщин позволил нам выявить наличие некоторых отличий в динамике развития у них заболеваний пародонта (Рисунок 4). Так развитие пародонтита у мужчин более строго ассоциировано с представленностью в мягком зубном налёте комплекса *T. forsythensis* /*T. denticola*, в то время как у женщин наравне с комплексом *T. forsythensis* /*T. denticola* обнаруживается сильная ассоциация с представленностью в мягком зубном налёте *P. gingivalis*. Кроме того, анализ



Таким образом, наши данные впервые позволили строгими количественными методами подтвердить факт влияния женских половых гормонов на состав микробиома пародонта.

1. Показана целесообразность использования в качестве материала для исследования микробиома пародонта молекулярными методами мягкого зубного налёта.

3. При развитии хронического пародонтита наблюдается тенденция к формированию комплекса, состоящего из патогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в мягком зубном налёте. Наиболее устойчивая положительная корреляция наблюдается для видов *T. forsythensis* и *T. denticola*.

5. Впервые показано, что характер изменений состава микробного консорциума при развитии поражения пародонта у мужчин и женщин отличается. В частности, для женщин наибольшее значение имеет увеличение численности на пародонте *P. gingivalis*, а для мужчин – формирование комплекса *T. forsythensis* и *T. denticola*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется внедрить в рутинную клиническую практику врача-пародонтолога анализ содержания в мягком зубном налете пародонтопатогенов *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, а также кандидатных пародонтопротекторов *V. parvula* и *S. sanguinis* с применением наборов для ПЦР в реальном времени, разработанных в рамках диссертационной работы. Для использования диагностического метода в интересах практического здравоохранения рекомендуется провести испытания и государственную регистрацию набора для анализа микробиома пародонта.

2. При постановке первичного пародонтологического диагноза и при мониторинге эффективности лечения заболеваний пародонта рекомендуется использовать обобщенный параметр, определяемый с помощью ПЦР в реальном времени, и характеризующий отношение доли пародонтопатогенов к доле кандидатных пародонтопротекторов в микробиоме пародонта. Увеличение или сохранение этого параметра должно рассматриваться, как негативный прогностический признак даже при условии снижения общей бактериальной обсемененности пародонта в результате мероприятий по профессиональной гигиене пародонта и антибиотикотерапии. Снижение этого параметра, напротив, указывает на позитивный долгосрочный прогноз, свидетельствующий о нормализации состава микробиома пародонта.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. В развитие диссертационного исследования целесообразно провести расширенные исследования генетического полиморфизма вида *A. actinomycetemcomitans* с целью выявления генетических маркеров, ответственных за пародонтопатогенность штаммов. С использованием этих маркеров предлагается создать системы для количественного определения в составе консорциума пародонта содержания патогенных штаммов *A. actinomycetemcomitans*.

2. Необходимым продолжением диссертационной работы является проверка гипотезы о пародонтопротекторном действии *V. parvula* и *S. sanguinis* с применением методов микробиологического культивирования, изучение вопроса об антагонистических отношениях между этими видами и признанными пародонтопатогенами.

3. Предлагается провести исследования влияния гормонального фона мужчин и женщин на эффективность защитного действия иммунной системы человека в отношении бактериальных пародонтопатогенов, в частности, на уровень колонизации пародонта патогенами, количество и качество антител против их ключевых антигенов, на скорость разрушения зубодесневого прикрепления при наличии патогенной микрофлоры.

4. Целесообразно проведение экспериментальной проверки высказанной в диссертационной работе гипотезы о пародонтопротекторном действии *V. parvula* и *S. sanguinis*, в частности, о наличии антагонистических отношений между этими бактериями и пародонтопротекторами по Сокранскому (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*). В случае выявления пародонтопротекторного действия или антагонистического эффекта *V. parvula* и *S. sanguinis* в отношении патогенов предлагается рассмотреть возможность

использовании этих бактерий в качестве маркеров для оценки эффективности терапии пародонтита существующими лекарственными средствами.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Янушевич, О.О. Использование комплексной ПЦР-диагностики в обследовании пациентов с сочетанной патологией гастродуоденальной зоны и пародонта / О.О. Янушевич, Р.А. Айвазова, **А.В. Шибаева**, Ю.К. Кудыкина, А.Б. Шевелев // Стоматология детского возраста и профилактика. - 2014. - Т. 13. - № 3. - С. 48-51.

2. **Шибаева, А.В.** NGS в стоматологии: бактериальные консорциумы пародонта в норме и при агрессивном пародонтите / **А.В. Шибаева**, А.Б. Шевелев, О.А. Зорина, О.А. Борискина, Е.С. Шубина, О.В. Осипенкова, Д.В. Ребриков // Геномное секвенирование NGS – 2014. - 2014. - Сборник тезисов. - С. 23.

3. Зорина, О.А. Идентификация ключевых элементов нормальной и патогенной микрофлоры, определяющей состояние пародонта, методом NGS-секвенирования банков 16S-рДНК бактериальных консорциумов пародонта / О.А. Зорина, Н.Б. Петрухина, А.А. Басова, **А.В. Шибаева**, Е.В. Трубникова, А.Б. Шевелев // Стоматология. - 2014. - Т. 93. - № 6. - С. 25-31.

4. Янушевич, О.О. Особенности микробиома у пациентов с кислотозависимой патологией желудочно-кишечного тракта и воспалительными заболеваниями тканей пародонта / О.О. Янушевич, Р.А. Айвазова, И.В. Маев, А.А. Самсонов, А.Б. Шевелев, **А.В. Шибаева** // Dental Forum. - 2015. - № 2. - С. 20-24.

5. Шевелев, А.Б. Изучение взаимовлияния состава консорциумов кишечника и пародонта методом NGS-секвенирования / А.Б. Шевелев, **А.В. Шибаева**, Н.Б. Петрухина, О.А. Зорина, Е.В. Трубникова, Ю.К. Кудыкина, А.Ю. Сунцова, Е.О. Болдинова, Е.В. Шубина, Д.В. Ребриков // Геномное секвенирование NGS – 2015. - 2015. - Сборник тезисов. - С. 18.

6. **Шибаева, А.В.** Изучение роли *Prevotella intermedia* в развитии хронического пародонтита методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / **А.В. Шибаева**, Н.К. Аймадинова, Е.В. Трубникова, Т.В. Кузнецова, О.А. Зорина, Ю.К. Кудыкина, А.Б. Шевелев // Вестник РГМУ. - 2015. - №4. - С. 11-15.

7. Янушевич, О.О. ПЦР в реальном времени в комплексной диагностике сочетанной патологии пародонта и гастродуоденальной зоны / О.О. Янушевич, И.В. Маев, Р.А. Айвазова, **А.В. Шибаева**, А.Б. Шевелев // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2015. - № 9. - С. 4-7.

8. Янушевич, О.О. Исследование *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и комплекса *Treponema denticola/ Tannerella forsythensis* в качестве этиологического фактора хронического пародонтита методами количественной ПЦР / О.О. Янушевич, Р.А. Айвазова, **А.В. Шибаева**, Д.В. Ребриков, Е.В. Трубникова, Ю.К. Кудыкина, М.В. Зылькова, Р.С. Зарипова, А.Б. Шевелев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2015. - Т. 160. - № 10. - С. 502-504.

9. **Шибаева, А.В.** Применение метода ПЦР в реальном времени для изучения микробиома пародонта у пациентов с сочетанной патологией гастродуоденальной зоны

и хроническим пародонтитом / **А.В. Шибаета**, Р.А. Айвазова, Д.В. Ребриков, Е.В. Трубникова, Ю.К. Кудыкина, А.В. Белякова, Р.С. Зарипова, А.Б. Шевелев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2016. - №1. - С. 26-30.

10. Петрухина Н.Б. Изучение взаимосвязи состава микробиома пародонта и кишечника в норме и при патологии методами глубокого секвенирования / Н.Б. Петрухина, О.А. Зорина, Е.В. Ших, **А.В. Шибаета**, А.Б. Шевелев // Стоматология. - 2016. - Т. 95. - № 2. - С. 8-13.

11. Zorina, O. Identification of Key Components of The Healthy Periodontium Microbiome That Protect Against Aggressive Periodontitis by Metagenomic Sequencing / O. Zorina, N. Petrukhnina, **A. Shibaeva**, A. Basova, A. Shevelev // PARIPEX - Indian journal of research. - 2015. - V. 4. - № 5. - P. 109-114.

Список сокращений

ПЦР – полимеразная цепная реакция

16S рДНК – ДНК, кодирующая малую субъединицу рибосомы бактерии

OTU – операционная таксономическая единица метагеномного анализа

Благодарности

Автор благодарит «ООО «НПО ДНК-Технология», Россия» и директора ЦКП «Генетический полиморфизм» при Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова д.б.н. Д.В. Ребрикова за помощь в разработке системы для выявления *V. parvula* и *S. sanguinis*, за предоставленные лабораторные материалы и возможность использования оборудования. Биологические материалы предоставлены д.м.н. О.А. Зориной (ФГБУ "ЦНИИСиЧЛХ" Минздрава России), к.м.н. Р.А. Айвазовой и А.Ю. Сунцовой (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России). Автор выражает благодарность Е.С. Шубиной («ООО «НПО ДНК-Технология», Россия») за помощь в статистической обработке материалов метагеномного анализа 16S рДНК («ООО «НПО ДНК-Технология», Россия») и д.б.н. Е.В. Трубниковой (Курский Государственный университет), оказавшей содействие в статистической обработке данных ПЦР в реальном времени.