

На правах рукописи

Гимранова Ирина Анатольевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ОРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА: ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ, ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

1.5.11. Микробиология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Оренбург – 2025

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

Научный консультант:

Гриценко Виктор Александрович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов.

Официальные оппоненты:

1. **Свитич Оксана Анатольевна**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», директор;

2. **Червинец Вячеслав Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Тверской государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии;

3. **Лямин Артем Викторович**, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры медицинской микробиологии и иммунологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

Защита диссертации состоится «12» февраля 2026 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.445.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Оренбургском федеральном исследовательском центре Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИКВС УрО РАН – обособленном структурном подразделении ОФИЦ УрО РАН (г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11, каб. 311) и на сайте ОФИЦ УрО РАН – <https://orennc.ru/> (в разделе «Диссовет»).

Автореферат разослан: «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент, профессор РАН

Перунова Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Заболевания пародонта представляют собой актуальную проблему общественного здравоохранения, затрагивающую около 20-50% людей во всем мире, число которых, по прогнозам, будет увеличиваться (Гилева О.С. и др., 2023; Nazir M. et al., 2020). Неправильные пищевые привычки и плохая гигиена полости рта могут нарушить баланс между составом микроорганизмов биопленок и иммунной реакцией человека, вызывая воспалительные заболевания пародонта, такие как гингивит, пародонтит и другие (Pathak J.L. et al., 2021). Гингивит проявляется признаками воспаления, покраснением и отеком десен (Гаража Н.Н. и др., 2020; Murakami S. et al., 2018). В отличие от пародонтита при гингивите возможно полное выздоровление десен, так как сам процесс на этой стадии обратим. Своевременное лечение и контроль гингивита с определением этиологически значимых микроорганизмов могут предотвратить прогрессирующее течение процесса. Одним из наиболее серьезных воспалительных заболеваний пародонта является пародонтит, характеризующийся хроническим течением, склонностью к генерализации и прогрессированию патологического процесса, который приводит к разрушению структурных компонентов опорного аппарата зубов, их подвижности и, в конечном счете, потере. Следует отметить, что в этиологии и патогенезе пародонтита ключевая роль принадлежит микроорганизмам, прежде всего – бактериям (Abdulkareem A.A. et al., 2023), и их взаимодействию с гуморальными и клеточными эффекторами иммунитета макроорганизма, о чем свидетельствуют результаты многочисленных исследований, посвященных указанной проблеме (Sharifovich A.D. et al., 2023).

Формирование биопленки начинается с прикрепления бактерий-первичных колонизаторов, таких как *Actinomyces* spp. и *Streptococcus* spp., над десной, что обеспечивает основу для прикрепления других бактерий, в частности *Corynebacterium* spp., на которых могут закрепляться микроорганизмы других видов. Увеличение массы и формирование сложной структуры зубной биопленки создаёт в её центре бескислородную среду, которая идеально подходит для роста капнофильных видов, таких как *Capnocytophaga* spp. и *Fusobacterium* spp., которые способствуют появлению предполагаемых патогенов пародонта, к которым относятся *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и др. В условиях возникшего дисбиоза в ротовой полости некоторые потенциальные патогенные бактерии, например *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus viridans*, могут проявлять свой патогенный потенциал, способствуя усилению воспалительной реакции в тканях пародонта (Park O.J. et al., 2020). Примечательно, что инфекционный процесс при пародонтите вызывает воспалительную реакцию иммунной системы не только местного, но и системного характера в виде обострения других хронических заболеваний (Царёв В.Н. и др., 2018).

Общепризнанными этиологически значимыми пародонтопатогенами при развитии пародонтита являются микроорганизмы видов *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* и *Tannerella forsythia*, а также *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros* и рода *Spirochetes* (Джавадова Л.М., 2022). Наиболее значимую роль отводят *Porphyromonas gingivalis*, который способен нарушать баланс микробных сообществ и вызывать инфекционный процесс (Янушевич О.О. и др., 2022; Gasmi B.A. et al., 2022). Кроме того, *Porphyromonas gingivalis* взаимодействует с другими микроорганизмами, которые колонизируют пародонтальный карман на ранних стадиях заболевания, что способствует прогрессированию пародонтита и необратимым изменениям опорно-удерживающих тканей зуба и альвеолярной кости, в итоге, потере зуба (Gasmi B.A. et al., 2022). Недавние исследования указывают на присутствие в поддесневом пространстве новых видов бактерий, которые могут играть определенную роль в

развитии пародонтита, в частности, *Filifactor alocis*. *F. alocis* обладает уникальными свойствами вирулентности, связанными с наличием у них таких факторов/особенностей, как внеклеточные везикулы, липотейхоевая кислота, устойчивость к окислительному стрессу и протеазная активность, которые вместе запускают провоспалительный цитокиновый ответ тканей пародонта (Балмасова И.П. и др., 2020; Янушевич О.О. и др., 2022; Ozuna H. et al., 2022). Имеются данные о том, что *F. alocis* является синергистом *P. gingivalis*, а сочетанное присутствие этих возбудителей взаимно повышает их инвазивные свойства и значительно усиливает процессы формирования биоплёнки в целом (Балмасова И.П. и др., 2021; Янушевич О.О. и др., 2022). Сегодня измененные микробные сообщества ротовой полости рассматриваются как потенциально патогенные ассоциации микроорганизмов, способные вызвать развитие заболеваний пародонта.

Наряду с традиционно используемыми бактериологическими методами этиологической диагностики воспалительных заболеваний пародонта, начинают активно внедряться молекулярно-генетические методы, такие как секвенирование 16S рРНК и метагеномный анализ, которые позволяют выявлять весь спектр микроорганизмов, присутствующих в биопленках полости рта, включая некультивируемые виды (Korona–Główniak I. et al., 2017). Также появилась возможность детектировать гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам у пародонтопатогенов и определять генетические маркеры патогенности бактерий для более глубокого понимания механизмов, лежащих в основе развития пародонтита (Isola G., 2020; Ardila C.M. et al., 2022). Учитывая сложность терапии пародонтита и высокий риск хронического рецидивирующего течения заболевания, в настоящее время расширяются исследования по поиску новых эффективных лекарственных препаратов, в том числе пробиотических, нацеленных на снижение агрессивного потенциала микробных биопленок в полости рта (Koroleva I. et al., 2021; Mendonça C.D. et al., 2024).

Таким образом, высокая распространенность воспалительных заболеваний пародонта, недостаточная эффективность и длительные сроки их терапии, склонность данной патологии к хроническому и рецидивирующему течению с вовлечением в патогенетический круг многочисленных иммунных механизмов обуславливают актуальность проблемы оптимизации диагностики заболеваний пародонта, в частности пародонтита. Всестороннее понимание экологии оральной микробиоты и выявление особенностей динамической взаимосвязи между развитием воспалительных заболеваний пародонта и поддесневым микробным сообществом являются многообещающей основой для разработки новых критериев в диагностике и прогнозировании пародонтита, совершенствования и повышения эффективности профилактики и лечения данной патологии.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время отмечается увеличение количества исследований, посвященных связи между составом оральной микробиоты и развитием воспалительных заболеваний пародонта. Однако уточнение роли отдельных видов микроорганизмов и особенностей их взаимодействий остается актуальным. Для понимания молекулярных механизмов повреждения пародонта и разработки эффективной таргетной терапии пародонтита особую ценность представляют данные по идентификации этиологически значимых видов микроорганизмов, участвующих в формировании дисбиотических сдвигов орального микробиома при прогрессировании гингивита и пародонтита. Такая информация может быть получена в рамках проведения метагеномных исследований, при которых можно не только всесторонне охарактеризовать пародонтальные микробные консорциумы, но и обнаружить в них новые виды микроорганизмов, ассоциированные с развитием и прогрессированием гингивита и пародонтита, в том числе в

сравнении с составом микробиома здоровых лиц, идентифицируя в них доминирующие виды бактерий и их факторов патогенности. При этом необходимо большое количество исследований, изучающих влияние генетических, иммунных и других факторов человека на состав и функции микробиоты полости рта и развитие заболеваний пародонта. Перспективным является разработка лекарственных препаратов и терапевтических стратегий, нацеленных на специфические патогены или пути их патогенности. В этом случае необходимы исследования возможности использования не только лекарственных, но и пробиотических препаратов для восстановления баланса оральной микробиоты и предотвращения развития пародонтита. Необходимо выявить эффективные штаммы и определить оптимальные режимы применения в качестве персонализированной терапии. Таким образом, дальнейшие научные исследования в данной области актуальны и должны сосредоточиться на интеграции данных о микробиоте с данными о факторах хозяина, чтобы создать более полную картину патогенеза воспалительных заболеваний пародонта и разработать эффективные методы диагностики, прогнозирования и лечения.

Цель исследования

Охарактеризовать особенности оральной микробиоты у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта и оптимизировать подходы к диагностике, терапии и профилактике.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ таксономических составов микробных ассоциаций в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степенями тяжести и десневой борозде пациентов с гингивитом и здоровых лиц, выявленных бактериологическим методом и секвенированием 16S рНК.

2. Определить частоту обнаружения приоритетных пародонтопатогенов и других вероятных возбудителей при гингивите и хроническом генерализованном пародонтите легкой и средней степенями тяжести.

3. Проанализировать взаимосвязи видового состава оральной микробиоты в десневой борозде и пародонтальном кармане с формой и степенью тяжести патологии у лиц с воспалительными заболеваниями пародонта.

4. Определить в образцах от пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта генетические детерминанты патогенности бактерий *Streptococcus gordonii* и *Filifactor alocis* как потенциальных пародонтопатогенов.

5. Оценить состояние цитокинового профиля и показателей иммунного ответа у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта и провести анализ взаимосвязей иммунологических параметров с количественно-качественными характеристиками оральной микробиоты при данной патологии.

6. На основе микробиологических, клинико-иммунологических и молекулярно-генетических критериев разработать алгоритм лабораторной диагностики пародонтита.

7. Охарактеризовать в опытах *in vitro* комплекс биологических свойств и пробиотический потенциал штаммов *Lactobacillus* spp., выделенных из содержимого десневой борозды здоровых лиц/пациентов с гингивитом и пародонтальных карманов пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, для отбора потенциальных кандидатов, перспективных при создании оральных пробиотиков лечебно-профилактической направленности.

Научная новизна. На основе результатов бактериологического исследования и корреляционного анализа установлена взаимосвязь между формой заболевания пародонта и определенным составом микробиоты содержимого десневой борозды и пародонтального кармана.

Проведенный сравнительный анализ геномного состава оральной микробиоты у здоровых лиц и пациентов с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степенями тяжести показал статистически значимые различия на уровне типов, родов и видов бактерий, что отражает сложность и динамичность микробных сообществ при различных состояниях пародонта. У пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта идентифицированы «специфические» консорциумы микроорганизмов, характерные как для начальных этапов воспаления пародонта (гингивит), так и для прогрессирующего течения воспалительного процесса (пародонтит), что позволяет рассматривать их в качестве микробиологических маркеров и дифференциально-диагностических критериев данной патологии. В частности, установлено, что при гингивите в микробиоте десневой борозды часто (82%) выявляются ассоциации микроорганизмов таких видов, как *Streptococcus anginosus*, *Gemella haemolysans*, *Haemophilus haemolyticus*, *Aggregatibacter segnis*, *Campylobacter gracilis*, тогда как при хроническом генерализованном пародонтите в формировании микробиоты пародонтальных карманов принимают участие не только известные пародонтопатогены (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*), но и не тривиальные потенциально пародонтопатогенные бактерии (*Streptococcus gordonii*, *Gemella morbillorum*, *Phocaeicola abscessus*, *Veillonella dispar*, *Capnocytophaga sputigena*, *Filifactor alocis*, *Desulfobulbus* spp.).

Впервые на основе комплексного подхода с использованием иммунологического и метагеномного анализов выявлены иммуно-микробиологические параллели, характеризующие состояние здоровья пародонта и его отклонения на ранних и прогрессирующих стадиях пародонтита, и установлено, что сочетанное присутствие в оральном микробиоме у пациентов *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis* и *Veillonella dispar* способствует угнетению клеточного и гуморального звеньев иммунитета и является биомаркером прогрессирующего течения пародонтита.

Впервые молекулярно-генетическим методом с использованием подобранных олигонуклеотидных праймеров к генам, кодирующим факторы патогенности *hsa* (кодирующего антиген Hs) и *GspB* (кодирующего поверхностный белок B) у *Streptococcus gordonii*, *ftxA* (кодирующего белок RTX) у *Filifactor alocis*, определена частота их встречаемости в клинических образцах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта и обоснована их индикаторная роль в оценке риска развития, тяжести течения заболевания и эффективности проводимой терапии.

Обоснованы дополнительные микробиологические, клиничко-иммунологические и молекулярно-генетические критерии воспалительных заболеваний пародонта, на основе которых разработан алгоритм лабораторной диагностики данной патологии.

У выделенных из содержимого десневой борозды здоровых лиц/пациентов с гингивитом и пародонтальных карманов пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом штаммов *Lactobacillus* spp. охарактеризован комплекс биологических свойств (адгезивная способность, антагонистическая активность, способность к биопленкообразованию, антибиотикорезистентность, биосовместимость), что позволило оценить их пробиотический потенциал и отобрать изоляты лактобацилл в качестве потенциальных кандидатов для создания оральных пробиотиков лечебно-профилактической направленности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе выполнения работы микробиологические, клиничко-лабораторные и экспериментальные данные расширяют представления о роли оральной микробиоты, в целом, отдельных ее представителей и формирующихся бактериальных ассоциаций в этиологии воспалительных заболеваний пародонта

и их влиянии на течение данной патологии. Они явились теоретическими предпосылками для разработки подходов к повышению эффективности диагностики, прогнозирования, лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта.

В процессе исследований разработаны питательная среда для выделения чистых культур такого признанного пародонтопатогена, как *Porphyromonas gingivalis* (Патент РФ на изобретение № 2802078) и новый способ для определения особенностей формирования биопленок штаммами *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus casei*, выделенными из пародонтальных карманов, на инертных поверхностях (Патенты РФ на изобретение №№ 2817419 и 2819447).

На основе выявленных бактериологическим методом особенностей составов микробиоты содержимого десневой борозды и пародонтального кармана и их взаимосвязи с характером течения воспалительных заболеваний пародонта разработан способ прогнозирования тяжести данной патологии (Патент РФ на изобретение № 2819447).

Для оценки тяжести и прогнозирования дальнейшего развития воспалительных заболеваний пародонта подобраны праймеры и на их основе разработаны тест-системы ПЦР-идентификации генов патогенности *hsa* (кодирующего антиген Hs) и *GspB* (кодирующего поверхностный белок B) *Streptococcus gordonii*, а также *ftxA* (кодирующего белок RTX) *Filifactor alocis* (Заявки на выдачу патентов РФ на изобретение: от 09.04.2025 № 2025108766, от 17.04.2025 № 2025109709, от 23.04.2025 № 2025110387).

На основе выявленных микробиологических, клинико-иммунологических и молекулярно-генетических критериев, оптимизирован алгоритм лабораторной диагностики воспалительных заболеваний пародонта, внедрение которого в практику будет способствовать стандартизации и повышению эффективности лечения и профилактики данной патологии.

На основе результатов оценки пробиотического потенциала отобраны клинические изоляты *Lactobacillus* spp., которые могут служить потенциальными кандидатами для создания оральных пробиотиков лечебно-профилактической направленности как эффективного средства профилактики и лечения пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования построена на анализе современной литературы по диагностике и лечению гингивита и хронического генерализованного пародонтита, а также на оценке актуальности темы. Исследование проводилось последовательно по разработанному плану, включающему выбор объектов и современных методов исследования, соответствующих поставленным целям и задачам. Объектом исследования были 287 пациентов из них: с диагнозами К 05.1 Хронический гингивит (65 человек) и К 05.3 Хронический генерализованный пародонтит легкой (80 пациентов) и средней (87 пациентов) степенями тяжести, а также 55 здоровых лиц составили контрольную группу. В процессе диссертационного исследования применяли общеклинические и специальные методы исследования, включающие бактериологические, микробиологические, молекулярно-генетические, иммунологические, статистические и биоинформатические методы. Результаты исследований интерпретировали, опираясь на логику и имеющиеся литературные источники; выводы формулировали с применением научно обоснованной методологии доказательной медицины.

Положения, выносимые на защиту

1. Особенности состава микробиоты десневой борозды и пародонтального кармана отражают характер течения воспалительных заболеваний пародонта (гингивит, пародонтит), указывают на важную этиологическую роль микроорганизмов в их развитии и могут служить диагностическим/прогностическим биомаркером тяжести данной патологии.

2. Консорциумы микроорганизмов, выявляемые метагеномным исследованием, могут рассматриваться в качестве дифференциально-диагностических критериев определения тяжести воспалительного процесса при патологии пародонта и микробиологическим маркером её прогрессирования.

3. Сочетанное присутствие в оральном микробиоме у пациентов с пародонтитом *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis* и *Veillonella dispar* сопровождается угнетением клеточного и гуморального звеньев иммунитета и является биомаркером прогрессирующего течения данной патологии.

4. Идентификация методом ПЦР в содержимом зубной борозды и пародонтальных карманов у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта генов факторов патогенности *hsa* (кодирующего антиген Hs) и *GspB* (кодирующего поверхностный белок B) *Streptococcus gordonii* и *ftxA* (кодирующего белок RTX) *Filifactor alocis* является дополнительным диагностическим критерием для оценки тяжести и прогрессирующего течения пародонтита и определения эффективности его терапии.

5. Комплекс выявленных микробиологических, клинико-иммунологических и молекулярно-генетических биомаркеров воспалительных заболеваний пародонта использован для оптимизации и повышения алгоритма лабораторной диагностики данной патологии.

6. Характеристика комплекса биологических свойств (адгезивная способность, антагонистическая активность, способность к биопленкообразованию, антибиотикорезистентность, биосовместимость) у штаммов *Lactobacillus* spp. позволяет оценить их пробиотический потенциал и отобрать из них потенциальных кандидатов для создания оральных пробиотиков лечебно-профилактической направленности.

Степень достоверности и апробация результатов. Использование современных методик микробиологического исследования, значительный объем полученных данных и их статистическая обработка с помощью современного программного обеспечения позволили получить достоверные результаты исследования.

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на научно-практических мероприятиях регионального, всероссийского и международного уровнях: Научно-практическая конференция с международным участием «Наука, образование и практика: 20 лет вместе», приуроченная к празднованию 20-летия кафедры лабораторной диагностики ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, (Уфа, 2023 г.); II Международный форум геномных и биомедицинских технологий (Сургут, 2023 г.); Международная научная конференция «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (Пекин (КНР), 2023 г.); II Российский конгресс с международным участием по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва 2024 г.); Научно-практическая конференция стоматологов с международным участием «Актуальные вопросы стоматологической помощи» в рамках 4-й специализированной выставки ДЕНТАЛ-ЭКСПО (Уфа, 2024 г.); Ежегодная междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Клиника, генетика, лаборатория» (Уфа, 2024 г.); X Белорусский международный стоматологический конгресс (Минск (Беларусь), 2024 г.); III Российский конгресс с международным участием по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва, 2025 г.); Международная научно-практическая конференция, посвященная 70-летию профессора Абдумомунова Абдыкалила Оморбаевича на тему: «Актуальные вопросы пародонтологии и мукологии» (Бишкек (Кыргызстан), 2025 г.); Ежегодная междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Клиника, генетика, лаборатория» (Уфа, 2025 г.).

Диссертационная работа апробирована на совместном расширенном заседании кафедр

фундаментальной и прикладной микробиологии, микробиологии и вирусологии, инфекционных болезней, лабораторной медицины, эпидемиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России) (Протокол №38 от 25.06.2025 г.). Приняты положительная оценка и заключение по научно-исследовательской работе диссертационного исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.11. Микробиология (медицинские науки) – систематика и филогения микроорганизмов; биологическое разнообразие микроорганизмов, включая разнообразие типов энергетического обмена и источников углерода; физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста микроорганизмов; продукция биологически активных веществ микроорганизмами; ферменты микроорганизмов; геномный и метагеномный анализ микроорганизмов и их сообществ; патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности; симбиотические микробные сообщества, в том числе микробиота человека и животных; структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки; межмикробные взаимодействия, включая синтрофные ассоциации и чувство кворума, согласно пунктам 1, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 15, 16 соответственно.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в практическую работу врачей стоматологов стоматологической поликлиники № 6 и стоматологической клиники «Примадент» г. Уфы, а также используются в образовательном процессе обучающихся на базе кафедр фундаментальной и прикладной микробиологии и терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора в исследование. Автор участвовала в определении цели и задач диссертационного исследования, его планировании и разработке дизайна. Автором самостоятельно проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Для реализации практической части исследования освоены методики взятия микробиологического материала от пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. Автором лично проведены микробиологические и иммунологические исследования клинического материала, а также молекулярно-генетические исследования, включая подбор праймеров к генам факторов патогенности, экстракция ДНК из образцов, постановка ПЦР с электрофоретической детекцией на базе кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (г. Уфа). Секвенирование 16S рРНК и биоинформатический анализ полученных данных проведены в лаборатории Сербалаб (г. Санкт-Петербург). Автор принимал непосредственное участие в статистической обработке, интерпретации полученных данных и написании диссертации, лично участвовал в апробации и внедрении результатов исследования в практику, а также в подготовке всех публикаций и заявок на патенты на изобретения по теме диссертационной работы совместно с д.м.н., профессором В.А. Гриценко – главным научным сотрудником Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. На основании проведенных исследований автор лично провела анализ результатов, их обобщение, формулировку выводов и практических рекомендаций.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, в том числе, 12 публикаций в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из них 9 работ в научных изданиях, входящих в базу данных Scopus, получено 4 патента РФ на изобретения и подано 3 заявки на государственную регистрацию объектов интеллектуальной собственности.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 240 страницах.

Состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, главы результатов собственных исследований и обсуждения с заключением, выводов. В диссертационной работе 5 глав, отдельно представлен список сокращений и список литературы, содержащий 368 источников, из них 85 отечественных и 283 зарубежных. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 27 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Рабочая гипотеза и дизайн исследования. В основу исследования легло современное понимание хронического генерализованного пародонтита как динамического процесса, при котором метагеномные характеристики ротовой микробиоты могут служить ключевыми биомаркерами для прогнозирования течения заболевания. Предполагалось, что комплексный анализ микробиома полости рта в сочетании с клинико-иммунологическими характеристиками пациента позволяет разработать эффективную систему прогнозирования течения воспалительных заболеваний пародонта. Для этого необходимо провести интегральную оценку соотношения патогенных и комменсальных микроорганизмов с выявлением специфических микробных ассоциаций, ассоциированных с риском обострений, оценить показатели иммунного ответа, определить возможные корреляции. В качестве разработки подходов к персонализированной терапии требовалось оценить возможность использования аутохтонных микроорганизмов в качестве пробиотических препаратов. Исходя из этих предположений, было спланировано наше исследование и подготовлен его дизайн (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (от 18.12.2024, протокол №10). Все обследуемые лица на приеме у врача-пародонтолога давали информированное согласие на проведение им клинико-лабораторных исследований, гарантирующее добровольность и осознанность их участия в процессе.

Материал исследования. Для решения поставленных в диссертационной работе задач

проведено изучение результатов клинического и лабораторного обследования 287 человек в возрасте от 26 до 59 лет (165 женщин, 122 мужчины), обратившиеся к врачу-пародонтологу в стоматологическую поликлинику № 2 и стоматологическую клинику «Примадент» (г. Уфа) в период с 2021 по 2024 гг., из них: 65 пациентов с диагнозом гингивит (средний возраст $29,1 \pm 2,4$ года); 80 – с диагнозом ХГП легкой степени тяжести ($48,4 \pm 3,8$ года); 87 – с диагнозом ХГП средней степени тяжести ($51,2 \pm 7,8$ года), а также 55 здоровых людей ($29,2 \pm 3,2$ года), которые составили контрольную группу.

Критериями включения пациентов в исследование были: наличие клинических проявлений гингивита и хронического генерализованного пародонтита, позволяющих поставить диагноз гингивит или хронический генерализованный пародонтит легкой или средней степени тяжести; наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании.

Критерии невключения: отсутствие клинических проявлений гингивита или хронического генерализованного пародонтита, позволяющих поставить диагноз гингивит или хронический генерализованный пародонтит легкой или средней степени тяжести; наличие в анамнезе генетически обусловленных системных заболеваний, острых и хронических соматических заболеваний в стадии декомпенсации; наличие курения в анамнезе; наличие онкологических заболеваний; прохождение курсов лучевой и химиотерапии менее чем за 5 лет до включения в исследование по данным анамнеза и медицинской документации; наличие ВИЧ-инфекции, гепатитов В или С по данным анамнеза и медицинской документации; прием за 4 месяца до исследования антибиотиков, и за 6 месяцев до исследования гормональных препаратов, цитостатиков; беременность, кормление грудью.

Критерии исключения пациентов: несоблюдение протокола исследования; отказ пациента от проведения исследования.

Для обеспечения научной достоверности исследования установлены строгие критерии отбора участников. В исследование включались пациенты с подтвержденным диагнозом гингивит или хронический генерализованный пародонтит легкой и средней степенями тяжести, здоровые лица без признаков воспалительных заболеваний пародонта. При осмотре врач-пародонтолог устанавливал диагноз на основе клинико-anamнестических и инструментальных данных: данные анамнеза, наличие жалоб пациента (наличие стоматологических жалоб, запах изо рта, кровоточивость десен, отечность, гиперемия десен), оценивал гигиенический, пародонтологический и пародонтальный индексы, наличие пародонтального кармана и его глубину, экссудата, подвижности зубов, а также оценивал данные рентгенологического исследования (степень резорбции костной ткани альвеолярного отростка). Данный подход обеспечил репрезентативность выборки и минимизировал влияние посторонних факторов на результаты исследования.

Взятие материала для исследования. Для проведения исследования микробиоты бактериологическим и молекулярно-генетическим методами производился забор биоматериала содержимого десневой борозды у здоровых людей и пациентов с гингивитом и содержимого пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при помощи стерильных бумажных штифтов Absorbent Paper Points (META BIOMED, Южная Корея) (размер №25 по ISO). Забор биологического материала проводился утром (в 8-9 часов) до использования зубной щетки и других средств гигиены рта натошак. Стерильным пинцетом штифт вводился в наиболее глубокие участки пародонтальных карманов на 15 секунд, затем немедленно помещался в стерильные пробирки типа Eppendorf 1,5 мл объема с транспортной средой. Транспортировка биологического материала в лабораторию осуществлялась в

термоконтейнере. Для определения иммунного статуса у пациентов также брали кровь из локтевой вены утром, натощак.

Бактериологическое исследование. Производили посев исследуемого материала, в том числе в различных разведениях, на питательные среды. Инкубировали 24-120 ч при температуре 37°C; для роста анаэробных бактерий использовали анаэроостаты, заполняемые бескислородной газовой смесью стандартного состава. Использовали простые и сложные питательные среды российского (г. Оболенск, г. Махачкала) и импортного производства (HiMedia, Индия). Для получения чистой культуры *P. gingivalis* была подобрана и запатентована питательная среда с селективными добавками витамин К2 (менахинон) и чёрный альбумин (Патент РФ № 2802078). Количество микроорганизмов определяли путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл исследуемого материала (lg КОЕ/мл). Идентификацию бактерий проводили с помощью морфологических, культуральных, биохимических методов и масс-спектрометрии с помощью VITEK® MS (bioMérieux, Франция) и Autof MS (AutoBionics, Китай).

Выделение ДНК бактерий. Для молекулярно-генетических исследований из образцов биоматериала выделялась тотальная ДНК. Высококачественную ДНК для последующего анализа получали с помощью набора реагентов Qiagen, следуя инструкциям производителя. Данный метод позволил получить высокую чистоту и достаточный выход ДНК для дальнейшего секвенирования, что было подтверждено на спектрофотометре Nano Drop oneC (Thermo Fisher Scientific, США).

Секвенирование 16S рРНК и биоинформатический анализ. Для полного анализа бактериального состава анализируемых образцов использовалась технология секвенирования гена 16S рРНК, процедура подготовки библиотек для секвенирования осуществлялась с использованием стандартизированного протокола Illumina. Амплификация выбранного участка гена 16S рРНК (V3-V4) проводилась методом ПЦР с использованием реагентов (КАРА HiFi HotStart ReadyMix, Roche Diagnostics). Оптимизированные параметры ПЦР (25 циклов) позволяли получить достаточное количество ампликонов для секвенирования, обеспечивая при этом высокое качество данных. Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью специализированного программного комплекса, разработанного на языках программирования R и Python. Комплекс выполнял автоматизированную обработку данных, включающую удаление артефактов секвенирования, фильтрацию некачественных и коротких последовательностей (с качеством по Фреду ниже 10 и длиной менее 200 нуклеотидов), определение точных последовательностей ампликонов (ASV) с помощью алгоритма DADA2 (Callahan B.J., et al., 2016). Таксономическая классификация ASV проводилась на основе алгоритма «наивного Байеса» (Qiong W. et al., 2007) и базы данных SILVA v138 (Quast C. et al., 2013). Идентификация бактериальных видов осуществлялась путем сравнения ASV с эталонными последовательностями из базы SILVA v138 с помощью алгоритма точного соответствия и специализированных скриптов. В основе анализа полученных данных лежал расчет индекса Шеннона; для его вычисления использовался пакет «vegan» в среде программирования R. Для сравнения признаков использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для выявления специфических таксонов, наиболее сильно различающихся между группами пациентов, применен частичный дискриминантный анализ по методу наименьших квадратов (sPLS-DA), реализованный с помощью пакета «mixOmics» в R. sPLS-DA (Love C.J. et al., 2022).

Подбор праймеров к генам факторов патогенности *Streptococcus gordonii* и *Filifactor alocis*. Были проанализированы гены факторов патогенности *S. gordonii* и *F. alocis*. Затем к определенным участкам выбранных генов (*hsa*, *GspB*, *ftxA*) были подобраны соответствующие праймеры (Таблица 1), с использованием программы PrimerSelect из пакета программ Lasergene

(DNASTAR, Inc США), для выявления консервативных участков последовательностей данных генов использовалась программа Megaline (Lasergene). Подобранные праймеры синтезировали по нашему заказу в фирме «СИНТОЛ» (г. Москва).

ПЦР с электрофоретической детекцией. Выделенная из образцов ДНК была использована в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и амплификации гена *hsa*, кодирующего антиген Hs, и гена *GspB*, кодирующего поверхностный белок В *S. gordonii*, а также гена *ftxA*, кодирующего белок RTX *F. alocis*. Процедуры проводили в амплификаторе GeneExplorer GE-96G (Bioer, Китай) по следующим параметрам реакции (Таблица 1): 94°C – 30 сек.; 30 циклов: денатурация при 94°C – 30 сек., отжиг праймеров (t°C) – 30 сек., элонгация при 72°C – 3 мин. 30 сек.; конечная элонгация при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 1,5% агарозном геле и после окрашивания геля бромидом этидия идентифицировали в ультрафиолетовом свете в гель-документирующей системе BioRad ChemiDoc MP. В качестве маркера использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЗАО ЕвроГен, Москва).

Таблица 1 – Праймеры, использованные в работе

Ген	Олигонуклеотидная последовательность (5'-3')	Температура отжига (t°C)	Размер продукта, пн.
<i>hsa</i> <i>Streptococcus gordonii</i>	F-ggcttcgtgcggtacatctca-	57	276
	R-ttgctgcttcttcgcttaaactgct-		
<i>GspB</i> <i>Streptococcus gordonii</i>	F-acgataccgggtggggaagaagtcaaac-	53	434
	R-ggcatccgtagctacaacataac-		
<i>ftxA</i> <i>Filifactor alocis</i>	F-tggcaacggtaacaagagcata-	53	405
	R-ttcccaaatccaaccacaataat-		

Иммунологические методы исследования. Концентрацию цитокинов (ФНО α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-2 и секреторного иммуноглобулина А (sIgA)) в содержимом десневой борозды и пародонтального кармана определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием реактивов фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Для оценки состояния гуморального и клеточного иммунитета проводили взятие крови у обследуемых лиц из локтевой вены натощак. Определяли уровень содержания иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием моноспецифических антисывороток. Уровень циркулирующих иммунных комплексов (мол. масса – 6000) определяли осаждением полиэтиленгликолем с последующим фотометрическим определением плотности преципитата. Для определения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов проводили иммунофенотипирование лимфоцитов с использованием моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (США), методом проточной цитометрии (BD FACS Conton, США). Для определения фагоцитарной активности нейтрофилов использовали метод с латексными частицами, а также проводили НСТ-тест.

Выделение штаммов *Lactobacillus* spp. из исследуемого материала и их биологическая характеристика. Для выделения *Lactobacillus* spp. производили посев исследуемого материала из различных разведений на агаризованную МРС-среду (*Lactobacillus* MRS agar) (HiMedia, Индия), инкубировали 48 часов при температуре 37°C в анаэробных

условиях. Выделенные штаммы лактобацилл проходили контроль на чистоту культур с использованием общепринятых методов; определение содержания колониеобразующих единиц (КОЕ) *Lactobacillus* spp. проводили на агаризованной среде МРС в разведениях 10^{-6} и 10^{-7} .

Определение адгезивной способности штаммов *Lactobacillus* spp. Для изучения индивидуальной адгезии использовали методику изучения адгезивной активности микроорганизмов по Бойцову А.Г. в нашей модификации на модели эпителиоцитов щеки (Бойцов А.Г. и др., 2004). При исследовании адгезии бактериальных культур использовали суточные культуры штаммов лактобактерий, содержащие 2×10^9 КОЕ/мл. Подсчет проводили не менее чем у 5 клеток эпителиоцитов и определяли индекс адгезивности (ИАМ) по среднему числу адгезировавшихся микроорганизмов.

Определение антагонистической активности штаммов *Lactobacillus* spp. Антагонистическую активность лактобацилл определяли диффузионным методом (методика перпендикулярных штрихов, методика блоков или методика лунок), основанный на диффузии антибиотических веществ, образуемых испытуемыми штаммами лактобацилл, в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру тест-штаммов *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, ATCC и *Staphylococcus aureus* 206 ATCC из коллекции ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, а также клинических штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из исследуемого материала, не касаясь в зоне 1 мм штриха лактобацилл.

Определение способности *Lactobacillus* spp. к биопленкообразованию. Формирование биопленок оценивали в лунках полистиролового 48-луночного планшета («SARSTEDT», Германия). Суспензии суточных культур *Lactobacillus* spp. выращенные на МРС-1 доводили до титра 10^7 КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 300 мкл полученной бактериальной суспензии. Часть лунок использовали в качестве контроля, куда добавляли 300 мкл стерильной среды МРС-1. Планшет накрывали крышкой, заворачивали плёнкой Parafilm («Amcog», США) и инкубировали 3 сут., 1 и 2 нед. при 37°C . После инкубации для количественного определения интенсивности образования биопленок использовали метод окрашивания генцианом фиолетовым (кристаллическим фиолетовым) («Агат-Мед», Россия) (Вершинина З.Р. и др., 2021). Краситель, связанный с адгезированными клетками, элюировали этанолом. Результаты учитывали спектрофотометрически с использованием прибора SuPerMax 3000 (Китай).

Определение биосовместимости штаммов *Lactobacillus* spp. Была проведена оценка биосовместимости выделенных культур по отношению друг к другу. Биологическую совместимость определяли диско-диффузионным методом на плотных питательных средах. Для установления биосовместимости выделенных чистых культур микроорганизмов определяли их антагонистические взаимоотношения друг с другом. Использовали 2-х суточные культуры бактерий, выращенные в жидких питательных средах.

Определение чувствительности *Lactobacillus* spp. к антибактериальным препаратам (АБП). Использовали диско-диффузионный метод (ДДМ) в качестве носителя АБП бумажные диски. Для оценки чувствительности бактерий к антибиотикам использовали агар Мюллера-Хинтон (МХА). Оценка результатов проводилась через 18–24 часов инкубации.

Методы статистической обработки полученных данных. Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью методов медико-биологической статистики, используя методы параметрической и непараметрической статистики. Данные, полученные в процессе клинического обследования пациентов, бактериологического, иммунологического и молекулярно-генетического исследования отобранного у них материала, первоначально заносились в электронную таблицу EXEL, а далее при обработке конвертировались в электронные таблицы программного пакета Statistica 10, в модулях которого осуществлялись все расчеты и графическое

отображение их результатов (Боев В.М. и др., 2014). Предварительно каждый исследуемый параметр при помощи критерия Колмогорова-Смирнова проверялся на его соответствие нормальному распределению Гаусса.

При использовании параметрических методов для отражения сводных результатов использовались средние значения $\pm Sd$, а при непараметрических методах – медианы (Me), квартили (Q1 и Q3) и границы вариации (min-max). Для сравнения рассматриваемых групп использовался метод дисперсионного анализа. Для оценки конкретных межгрупповых различий использовались либо *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок, либо аналогичный ранговый критерий Манна-Уитни. Для оценки значимости различий категориальных (номинальных) переменных использовали критерий сравнения процентных долей Фишера – ϕ . Для оценки тесноты связей между количественными параметрами использовали коэффициент ранговой корреляции Кендела – « τ ». Для оценки связи между категориальными переменными использовали коэффициент корреляции Крамера (V) (Гржибовский А.М., 2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ результатов бактериологического исследования образцов. В результате бактериологического исследования охарактеризованы видовые составы микробиоты десневой борозды здоровых людей и пациентов с гингивитом, а также пародонтальных карманов пациентов с ХГП легкой (ХГП-ЛС) и средней (ХГП-СС) степенями тяжести. Сравнительный анализ полученных данных выявил качественное и количественное преобладание микроорганизмов в содержимом пародонтальных карманов пациентов с ХГП, где были идентифицированы бактерии 37 видов и грибы 6 видов. При этом пародонтопатогены I и II порядка, а именно *Porphyromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum*, идентифицированы только у пациентов с пародонтитом в содержимом пародонтальных карманов, причем статистически значимо ($p < 0,05$) чаще у пациентов с ХГП-СС до 37,9%. Данные бактерии не были обнаружены в содержимом десневых борозд здоровых людей и пациентов с гингивитом, что согласуется с литературными источниками, где также рассматриваемые пародонтопатогены ассоциированы с пародонтитом и отсутствуют у людей без признаков воспаления (Царев В.Н. и др., 2017, Копытов А.А. и др., 2020, Ji S. et al., 2023). Кроме того, в содержимом десневой борозды у всех здоровых людей идентифицировались представители нормобиоты ротовой полости, в частности, бактерии разных видов из родов *Streptococcus* и *Lactobacillus*.

Так, частота обнаружения видов *S. salivarius* в 6,6 раза (среднее количество $2,2 \pm 0,6$ lgКОЕ/мл), *S. sanguis* в 11,6 раза ($2,1 \pm 0,2$ lgКОЕ/мл), *S. oralis* 5,6 раза ($1,8 \pm 0,5$ lgКОЕ/мл), *S. mutans* в 2,4 раза ($2,2 \pm 0,6$ lgКОЕ/мл) и *S. mitis* в 1,8 раза (среднее количество $2,2 \pm 0,6$ lgКОЕ/мл) статистически значимо ($p < 0,05$) чаще и с большей концентрацией встречались в исследуемом материале здоровых лиц по сравнению с изученными образцами от пациентов с ХГП-СС. Однако бактерии вида *S. viridans* регистрировались в образцах от здоровых людей всего в 3,6% случаев, а по мере возрастания тяжести патологии пародонта наблюдалось статистически значимое увеличение в 6,7 раз ($p < 0,05$) частоты их обнаружения в содержимом пародонтальных карманов пациентов с ХГП-СС с увеличением концентрации в десятки раз (в среднем до $4,2 \pm 0,8$ lgКОЕ/мл). *S. anginosus* был идентифицирован только в исследуемом материале от пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, в превалирующем варианте – в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП-ЛС до 10% (среднее количество $1,8 \pm 1,8$ lgКОЕ/мл). Представители видов *S. vestibularis*, *S. gordonii* и *S. infantis* встречались только в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП, а стрептококки таких видов, как *S. lutetiensis*, *S. constellatus* и *S. gallolyticus* исключительно – у

пациентов с ХГП-СС, но с частотой не более 6,9% случаев. Эти результаты, очевидно, отражают вариабельную вовлеченность стрептококков разных видов в формирование патологического процесса в пародонте.

Такие типичные представители оральной нормобиоты, как лактобациллы видов *L. fermentum* (в 6,7 раз), *L. paracasei* (в 3,5 раза), *L. casei* (в 15 раз), *L. salivarius* (в 6,5 раза), *L. paraplantarum* (в 4,9 раза), *L. gasseri* (в 1,8 раза) встречались статистически значимо реже и в меньшем количестве в содержимом пародонтальных карманов пациентов с ХГП-СС по сравнению с исследуемым материалом от здоровых лиц (Таблица 2).

Таблица 2 – Распространенность и количество разных видов *Lactobacillus* spp. в содержимом десневых борозд / пародонтальных карманов у лиц в анализируемых группах

Виды микроорганизмов	Здоровые (n=55)		Гингивит (n=65)		ХГП-ЛС (n=80)		ХГП-СС (n=87)	
	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ /мл)	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ /мл)	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ /мл)	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ/мл)
<i>L. fermentum</i>	92,7±1,8	2,6±0,5	64,6±0,4 (p ₁ *)	2,2±0,8	5,0±1,2 (p ₁ * p ₂ *)	2,1±0,4	13,8±1,1 (p ₁ *p ₂ *p ₃ *)	0,6±0,2
<i>L. paracasei</i>	63,6±3,7	2,2±0,8	52,3±1,5 (p ₁ *)	3,1±0,4	22,5±0,5 (p ₁ * p ₂ *)	1,9±0,2	18,4±1,1 (p ₁ *p ₂ *)	0,8±0,4
<i>L. salivarius</i>	74,5±1,6	2,2±0,5	61,5±0,8 (p ₁ *)	4,2±0,3	10,0±3,7 (p ₁ * p ₂ *)	2,4±0,2	11,5±2,2 (p ₁ *p ₂ *)	1,8±0,3
<i>L. casei</i>	85,5±3,6	2,6±0,8	58,5±1,5 (p ₁ *)	3,2±0,6	15,0±1,2 (p ₁ * p ₂ *)	2,2±0,2	5,7±1,1 (p ₁ *p ₂ *p ₃ *)	1,0±0,4
<i>L. paraplantarum</i>	50,9±3,6	2,2±0,6	32,3±0,5 (p ₁ *)	4,2±0,2	26,3±1,5 (p ₁ * p ₂ *)	2,4±0,6	10,3±1,2 (p ₁ *p ₂ *p ₃ *)	1,1±0,2
<i>L. gasseri</i>	50,9±1,8	2,4±0,8	30,8±1,5 (p ₁ *)	1,4±0,8	20,0±0,8 (p ₁ * p ₂ *)	0,6±0,2	27,6±1,1 (p ₁ *p ₂ *p ₃ *)	0,5±0,2
<i>L. zeae</i>	0	0	4,6±1,8 (p ₁ *)	1,2±0,2	8,8±2,0 (p ₁ *)	1,4±0,8	11,5±0,8 (p ₁ *)	2,4±1,2

Примечание: * - различия статистически значимы (p<0,05). p₁ – уровень значимости в сравнении с результатами в группе здоровых людей; p₂ – уровень значимости в сравнении с результатами в группе пациентов с гингивитом; p₃ – уровень значимости в сравнении с результатами в группе пациентов с ХГП-ЛС.

Примечательно, что вид *L. zeae* демонстрировал противоположную динамику – его представители не были выявлены в исследуемом материале здоровых лиц, но по нарастающей достоверно чаще (в 2,5 раза) регистрировались у пациентов с ХГП-СС по сравнению с пациентами с гингивитом, что коррелирует с данными другого исследования (Chen Y.-W. et al., 2024) и позволяет предполагать наличие у данного вида лактобацилл патогенного потенциала.

Бактерии *Neisseria* spp. встречались в исследуемом материале от лиц всех анализируемых групп, причем на достаточно высоком уровне. В содержимом десневых борозд *Neisseria* spp. обнаружены у 60,0% здоровых людей (среднее количество 1,2±0,2 lgКОЕ/мл) и у 64,6% пациентов с гингивитом (3,0±0,6 lgКОЕ/мл). У пациентов с ХГП-ЛС по сравнению со всеми тремя остальными группами *Neisseria* spp. идентифицировались статистически значимо реже – в 45% случаев (среднее количество 3,2±0,4 lgКОЕ/мл), что согласуется с гипотезой об их участии в дисбиотических сдвигах оральной микробиоты при развитии патологии пародонта. При этом самая высокая частота обнаружения (73,6%) с наибольшей концентрацией (5,4±0,5

IgKOE/мл) представителей рода *Neisseria* отмечалась в содержимом пародонтальных карманов в группе пациентов с ХГП-СС, что, возможно, является результатом вторичной колонизации данными бактериями указанного биотопа на фоне протекающего хронического воспаления.

Gemella spp. преимущественно встречались в исследуемом материале от здоровых людей и пациентов с гингивитом (соответственно – в 54,5% случаев со средней концентрацией $1,8 \pm 0,4$ IgKOE/мл и в 52,3%, $3,2 \pm 1,5$ IgKOE/мл) по сравнению с пациентами с ХГП-ЛС (8,8%, $1,2 \pm 0,2$ IgKOE/мл) и совсем не были детектированы у пациентов с ХГП-СС. При этом известно, что бактерии вида *G. haemolysans*, являясь частью симбиотической микробиоты, рассматриваются как ранние колонизаторы биопленок в ротовой полости (Heller D. et al., 2016).

У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом около 60% выделенных бактерий рода *Staphylococcus* относились к виду *S. aureus*; они редко и в небольшом количестве обнаруживались в исследуемом материале у пациентов с гингивитом (4,6% случаев; среднее количество $0,8 \pm 0,2$ IgKOE/мл), но в материале от пациентов с диагнозом ХГП-СС частота их обнаружения и концентрация существенно возрастали (до 62,1% и $4,8 \pm 1,2$ IgKOE/мл). При этом бактерии таких коагулазотрицательных видов стафилококков, как *S. saprophyticus* и *S. equorum*, встречались только в содержимом пародонтальных карманов пациентов с ХГП-ЛС и ХГП-СС. Представители вида *S. capitis* чаще всего встречались у пациентов с гингивитом (до 41,5%, среднее количество $1,5 \pm 0,6$ IgKOE/мл), а при ХГП разной степени тяжести их численность существенно снижалась. В то же время обнаружение *S. epidermidis* заметно возрастало с 5,5% (среднее количество $1,05 \pm 0,5$ IgKOE/мл) у здоровых людей до 41,4% (среднее количество $4,1 \pm 0,4$ IgKOE/мл) у пациентов с ХГП-СС. Известно, что стафилококки разных видов могут присутствовать в слюне, зубном налете и десневой борозде (Spirito F.D. et al., 2024), что согласуется с полученными нами данными, которые указывают на их вклад в бактериальную обсемененность тканей пародонта по мере прогрессирования заболевания и утяжеления воспалительного процесса.

В проведенном нами исследовании энтеробактерии статистически значимо чаще и в большем количестве выявлялись в исследуемом материале при ХГП: *Escherichia coli* – в 48,3% случаев (среднее количество $2,1 \pm 0,5$ IgKOE/мл) у пациентов ХГП-СС, а *Klebsiella pneumonia* выделена в содержимом пародонтальных карманов у 10,0% пациентов с ХГП-ЛС (среднее количество $2,1 \pm 0,2$ IgKOE/мл) и 18,4% – с ХГП-СС ($4,2 \pm 0,6$ IgKOE/мл). Кроме того, установлено, что энтерококки вида *E. faecalis* редко встречались у здоровых лиц, тогда как у пациентов с ХГП-СС частота их встречаемости и количество увеличивались до 42,5% (среднее количество $3,4 \pm 0,4$ IgKOE/мл). Представители другого вида энтерококков (*E. faecium*) обнаруживались в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП – несколько реже при ХГП-ЛС в 17,5% случаев (среднее количество $2,0 \pm 0,5$ IgKOE/мл), а при ХГП-СС у 21,8% пациентов ($2,5 \pm 0,2$ IgKOE/мл).

Бактерии вида *Corynebacterium amycolatum* обнаруживались в исследуемом материале как у пациентов с гингивитом (6,2%, среднее количество $1,4 \pm 0,8$ IgKOE/мл), так и у пациентов с ХГП, но при средней степени тяжести пародонтита значительно чаще, чем при легкой (20,7%, $3,2 \pm 0,5$ IgKOE/мл против 8,8%, $3,4 \pm 0,4$ IgKOE/мл соответственно). Коринебактерии другого вида (*C. afermentas*) были зарегистрированы только в содержимом пародонтальных карманов пациентов с ХГП. Также в исследуемом материале пациентов с ХГП были идентифицированы другие виды грамположительных бактерий – *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus* и *Kocuria rhizophila*. Помимо бактериальной микробиоты, у пациентов с легкой и средней степенями тяжести ХГП в содержимом пародонтальных карманов увеличивался рост грибов, особенно рода *Candida* (Таблица 3).

Таблица 3 – Распространенность и количество грибов разных видов, выделенных бактериологическим методом в содержимом десневых борозд/ пародонтальных карманов у лиц в анализируемых группах

Виды микроорганизмов	Гингивит (n=65)		ХГП-ЛС (n=80)		ХГП-СС (n=87)	
	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ/мл)	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ/мл)	Частота встречаемости (%)	Титр (lgКОЕ/мл)
<i>Candida albicans</i>	21,5±2,6	2,1±0,6	40,0±0,5 (p ₁ *)	4,2±0,8	48,3±1,1 (p ₁ * p ₂ *)	5,5±0,4
<i>Candida crusei</i>	13,8±1,5	1,8±0,3	18,8±2,4 (p ₁ *)	3,8±0,2	21,8±1,1 (p ₁ *)	4,2±0,6
<i>Candida tropicalis</i>	6,2±0,6	2,3±0,4	12,5±1,3 (p ₁ *)	2,2±0,2	11,5±1,1 (p ₁ *)	4,5±0,8
<i>Candida kefyr</i>	0	-	2,5±0,6	1,6±0,4	4,6±0,5	1,4±0,6
<i>Candida dubliniensis</i>	0	-	0	-	2,3±1,1	1,2±0,2
<i>Alternaria alternata</i>	0	-	0	-	2,3±1,1	1,0±0,2

Примечание: * - различия статистически значимы (p<0,05). p₁ – уровень значимости в сравнении с результатами в группе пациентов с гингивитом; p₂ – уровень значимости в сравнении с результатами в группе пациентов с ХГП-ЛС.

На основе полученных результатов бактериологического исследования и данных проведенного сравнительного анализа были предложены критерии и разработан способ прогнозирования тяжести воспалительных заболеваний пародонта, учитывающий особенности составы микробиоты содержимого десневой борозды и пародонтального кармана (Патент РФ на изобретение № 2849647). Таким образом, информация о составе микробиоты содержимого десневой борозды и пародонтального кармана у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта имеет не только теоретическое значение, но и практическую ценность и может быть использована для прогнозирования тяжести течения данной патологии и разработки эффективных методов ее профилактики и терапии.

Особенности микробиомов десневых борозд и пародонтальных карманов у здоровых лиц и пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. Для метагеномного анализа и сравнения оральных микробиомов проводили секвенирование по 16s рРНК 158 отобранных образцов, из них: содержимое десневых борозд от 32 здоровых людей и 31 пациента с гингивитом, содержимое пародонтальных карманов от 40 пациентов с ХГП-ЛС и 55 пациентов с ХГП-СС.

Результаты анализа метагеномных данных образцов в исследуемых группах на уровне типа бактерий. По результатам проведенного секвенирования в исследуемом материале идентифицированы 10 филумов; из них преобладали представители типов *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, которые обнаруживались во всех исследуемых группах (Рисунок 2).

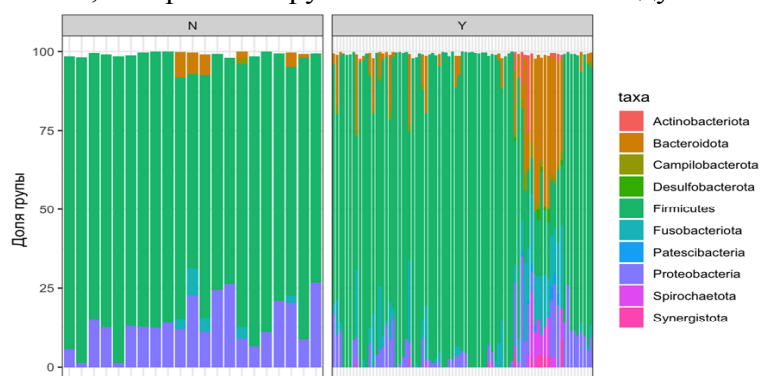


Рисунок 2 – Состав микробиома на уровне филума / типов бактерий с учетом разделения на группы здоровых лиц (N) и пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (Y)

Firmicutes обнаружены во всех исследуемых образцах; расчёт количественных показателей во всех четырех группах показал наиболее высокие медианные уровни от 85 до 94% данного типа, причем межгрупповые различия оказались незначимыми ($p>0,17$). Представители типа *Proteobacteria* также идентифицированы во всех образцах, но в заметных количествах встречались лишь в группе здоровых людей и у пациентов с гингивитом (13 и 10% соответственно), хотя с частотой почти на порядок ниже, чем для типа *Firmicutes*. В группах же пациентов с ХГП медианный уровень встречаемости бактерий этого типа был еще ниже – всего 2%; межгрупповые различия оказались статистически значимыми ($p<0,01$). Тип *Bacteroidota* был обнаружен во всех исследуемых группах обследованных лиц с превалированием по количеству у пациентов с ХГП-ЛС и ХГП-СС (медианный уровень составил 9,3 и 11,5% соответственно), а в группе здоровых людей их уровень не превышал 0,7% ($p<0,001$). Несмотря на то, что бактерии типа *Fusobacteriota* были обнаружены у обследованных лиц всех четырех групп, частота их выявления значительно варьировала ($p<0,01$): если у здоровых лиц и пациентов с гингивитом они детектировались на низком уровне (до 3,9% в каждом образце), то в группах пациентов с ХГП наблюдалось существенное увеличение их представленности – медианный уровень 6,7% в группе ХГП-ЛС и 18,6% в группе ХГП-СС ($p<0,05$) (Рисунок 3).

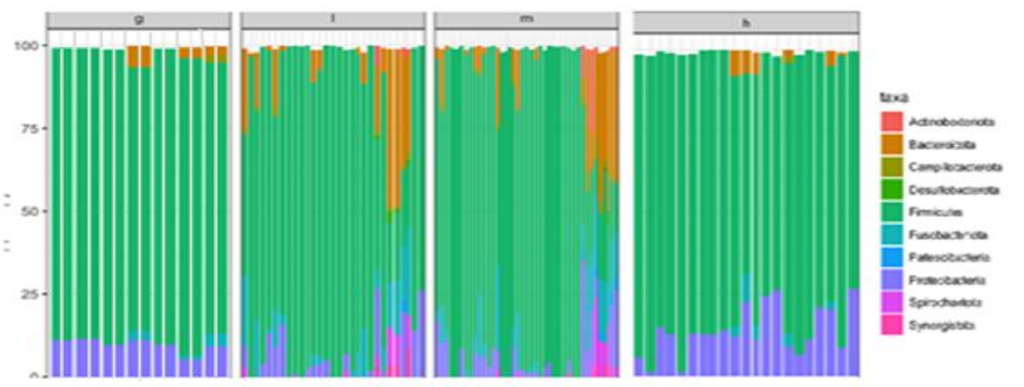


Рисунок 3 – Сравнение результатов состава микробиома на уровне филума / типов бактерий у пациентов с гингивитом (g), хроническим генерализованным пародонтитом легкой (l) и средней (m) степенями тяжести и здоровых лиц (h)

Представители филумов *Campilobacterota* и *Actinobacteriota* были обнаружены во всех группах; общая частота их обнаружения составила 75 и 83% соответственно; межгрупповых статистически значимых различий не отмечалось. Во всех группах обследованных лиц детектированы представители типа *Patescibacteria* (Рисунок 4).

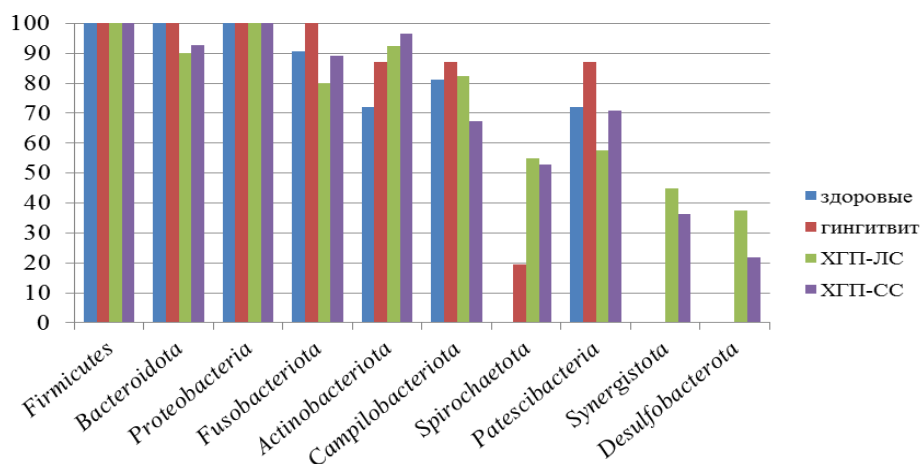


Рисунок 4 – Сравнительная характеристика частоты обнаружения типов бактерий в содержимом десневых борозд / пародонтальных карманов у лиц в исследуемых группах

Современные исследования указывают на то, что они, скорее всего, ведут зависимый образ жизни и являются потенциальными участниками сложных взаимодействий в оральной микробиоте, а их присутствие может быть индикатором определенных состояний пародонта (Wang Y. et al., 2023). Бактерии типов *Spirochaetota*, *Synergistota*, *Desulfobacterota* идентифицированы исключительно в группах лиц с патологией пародонта (в 47,0, 26,4 и 18,6% случаев соответственно), причем в превалирующем варианте у пациентов с легкой и средней степенью тяжести пародонтита

Результаты анализа метагеномных данных образцов в исследуемых группах на уровне рода бактерий. В целом, в исследуемом материале от обследованных лиц определены бактерии 147 родов в различных вариациях. В содержимом десневой борозды здоровых людей отмечалась высокая частота встречаемости представителей таких родов бактерий, как *Streptococcus*, *Actinobacillus*, *Lactobacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria* и *Tumebacillus* (Рисунок 5).

Бактерии рода *Streptococcus* определялись во всех образцах от обследованных лиц всех исследуемых групп. Однако у здоровых людей и пациентов с гингивитом медианные значения частоты их встречаемости составили 77 и 79% соответственно, тогда как у пациентов с ХГП-ЛС и ХГП-СС они обнаруживались значительно реже (50 и 48% соответственно, $p < 0,0002$), чем в первых двух группах обследованных лиц.

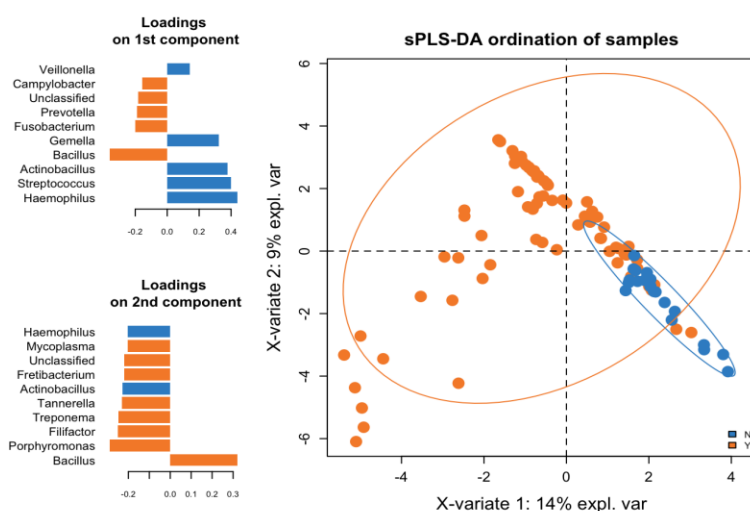


Рисунок 5 – Таксоны бактерий на уровне рода, преобладание которых характерно для здоровых людей (N) и пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (Y)

Actinobacillus spp. были идентифицированы в 87,5% случаев у здоровых людей, но в умеренных количествах (с удельным весом не более 7,2% в каждом образце), что было статистически значительно чаще, чем в группах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, где обнаружение данных бактерий в каждом образце определялось лишь в следовых количествах – не более 1,1% ($p < 0,01$). Бактерии рода *Lactobacillus* значительно чаще встречались у здоровых лиц и пациентов с гингивитом (90,6 и 80,6% соответственно). В отличие от этого, в группах пациентов с ХГП-ЛС и ХГП-СС частота их обнаружения была вдвое ниже ($p < 0,0001$).

Представители рода *Haemophilus* присутствовали в образцах также всех исследуемых групп, при этом в группах здоровых лиц и пациентов с гингивитом в 100% случаев (медианные значения их удельного веса составили 4,1 и 4,9% соответственно), однако, значительно снижались ($p < 0,05$) в группах пациентов с ХГП-ЛС (2,7%) и ХГП-СС (1,5%). Бактерии родов *Neisseria* и *Tumebacillus* детектированы в исследуемом материале обследованных лиц из всех групп, но в образцах содержимого десневой борозды (группа здоровых людей и пациентов с гингивитом) они встречались в 100% случаев, а в содержимом пародонтальных карманов частота их

выявления была статистически значимо ($p < 0,05$) ниже – у пациентов с ХГП-ЛС в 80 и 91%, а у пациентов с ХГП-СС в 35 и 22% случаев соответственно. Для определения этиологической или протективной роли этих бактерий в развитии воспалительных заболеваний пародонта необходимо проведение дальнейших исследований (Cui Z. et al., 2025). Особенно, это касается участия в формировании данной патологии бактерий рода *Tumebacillus*, поскольку информация по этому вопросу крайне ограничена, что пока не позволяет однозначно судить об их вкладе в развитие тех или иных заболеваний полости рта.

Для пациентов с гингивитом было характерным увеличение частоты встречаемости в содержимом десневой борозды бактерий таких родов, как *Gemella*, *Aggregatibacter*, *Lautropia*, *Actinomyces* и *Streptococcus*, что предположительно косвенно указывает на участие данных бактерий в начальных этапах нарушения микробного баланса в пародонте. Помимо этого, в биоматериале у пациентов данной группы значительно чаще, чем у здоровых людей, определялись пародонтопатогенные микроорганизмы родов *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Treponema*, *Tannerella* и т.д. (Рисунок 6). Вполне вероятно, что наличие и увеличение количества данных бактерий в биотопе может стимулировать иммунный ответ организма, приводя к усилению воспалительной реакции в десневой борозде и появлению характерных клинических признаков гингивита.

Для пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степенями тяжести в сравнении с контрольной группой и пациентами с гингивитом микробиом характеризовался преобладанием таких родов, как *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Treponema*, *Tannerella*, *Desulfobulbus*, *Bacillus*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Lysinibacillus*, *Veillonella*, *Lentimicrobium*, *Fusobacterium*, *Prevotella* (Рисунок 6). По данным литературы (Cui Z. et al., 2025), *Capnocytophaga* spp. проявляют двойственную природу: при низкой численности эти бактерии способствуют поддержанию здорового микробного баланса, в то время как при высокой численности они часто связаны с заболеваниями пародонта.

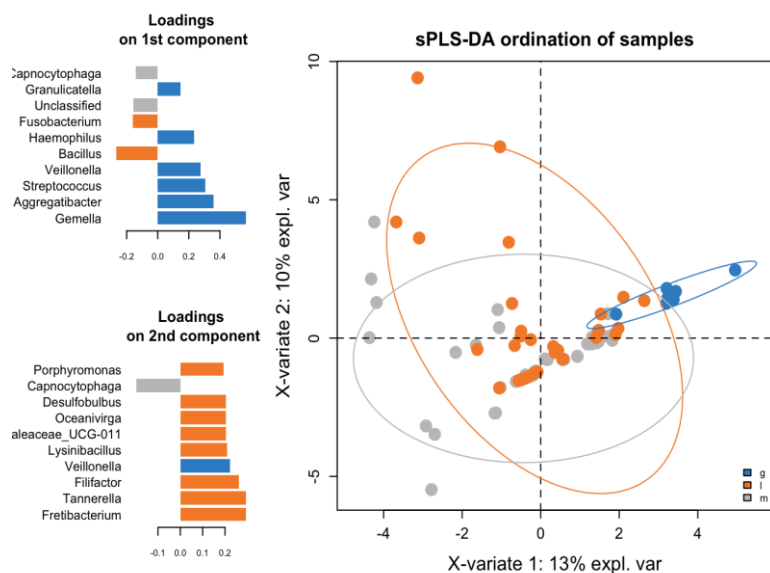


Рисунок 6 – Таксоны бактерий на уровне рода, преобладание которых характерно для пациентов с гингивитом (g), пациентов с ХГП легкой степени тяжести (l) и пациентов с ХГП средней степени тяжести (m)

В группе пациентов с ХГП-ЛС отмечается статистически значимая ($p < 0,05$) высокая частота обнаружения бактерий рода *Desulfobulbus* (37,5%), как по сравнению с группой ХГП-СС (16,4%), так и с группой здоровых лиц, где данные бактерии отсутствовали, хотя уровень в каждом отдельном образце был не высокий – до 1,5%. Данные микроорганизмы, являясь сульфатредуцирующими и адаптированными к росту в поддесневой части полости рта человека,

могут вызывать провоспалительную реакцию в эпителиальных клетках полости рта (Cross K.L. et al., 2018). *Treponema* spp. были обнаружены в образцах от пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, причем они при ХГП-ЛС статистически не значимо преобладали (60,0% случаев) в сравнении с гингивитом (51,6%) и ХГП-СС (52,7%), тогда как у здоровых людей бактерии данного рода не выявлялись. Представители рода *Lysinobacillus* идентифицированы только в содержимом пародонтальных карманах пациентов с ХГП, в преобладающем варианте с легкой степенью тяжести (65,0% случаев), хотя уровень в каждом образце не превышал 1%, тогда как в исследуемом материале от здоровых лиц и пациентов с гингивитом они не были обнаружены. Подобная картина, но с меньшей частотой обнаружения, наблюдалась в отношении представителей рода *Lentimicrobium*: они детектировались статистически значимо чаще у пациентов с ХГП-ЛС (в 35,0% случаев, $p < 0,05$), чем при ХГП-СС (16,4% случаев), а у обследованных лиц из двух других групп не были обнаружены вообще.

Для пациентов с ХГП-СС характерно уменьшение представительства бактерий родов *Lautropia*, *Actinomyces*, *Tunebacillus* и увеличение – *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Filifactor*. Микроорганизмы рода *Fusobacterium* обнаружены в образцах из всех исследуемых групп, причем статистически значимо чаще в группах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. Кроме того, значительно ($p < 0,04$) отличался медианный уровень обнаружения этих бактерий в каждом образце: в группе ХГП-СС он составил 5,2%, ХГП-ЛС – 2,6%, гингивита – 1,2%, а у здоровых лиц – всего лишь 0,5%. Во всех исследуемых группах также детектированы *Porphyromonas* spp., но в статистически значимом ($p < 0,0001$) преобладающем варианте – в пародонтальных карманах пациентов с ХГП-СС (85,5% случаев) по сравнению с контрольной группой (9,4% случаев), а в образцах пациентов с гингивитом и ХГП-ЛС частота их обнаружения составила 29,1 и 72,5% случаев соответственно. При этом следует отметить, что значительно отличался уровень идентификации бактерий данного рода в каждом отдельном образце, если в группе пациентов с ХГП он достигал 34,2%, то в контрольной группе не превышал 0,7%. В исследовании была подтверждена этиопатогенетическая роль *Filifactor* spp.; представители данного рода были детектированы только у лиц с воспалительной патологией пародонта, чаще при пародонтите: у пациентов с ХГП-ЛС – в 55,0%, с ХГП-СС – в 65,5%, а с гингивитом – всего в 3,2% случаев, что согласуется с данными литературы (Dahlen G. et al., 2019; Miralda I. et al., 2019; Manenzhe S.C. et al., 2024). Уровень представленности этих бактерий в каждом отдельном образце не превышал 2,5% (Рисунок 7).

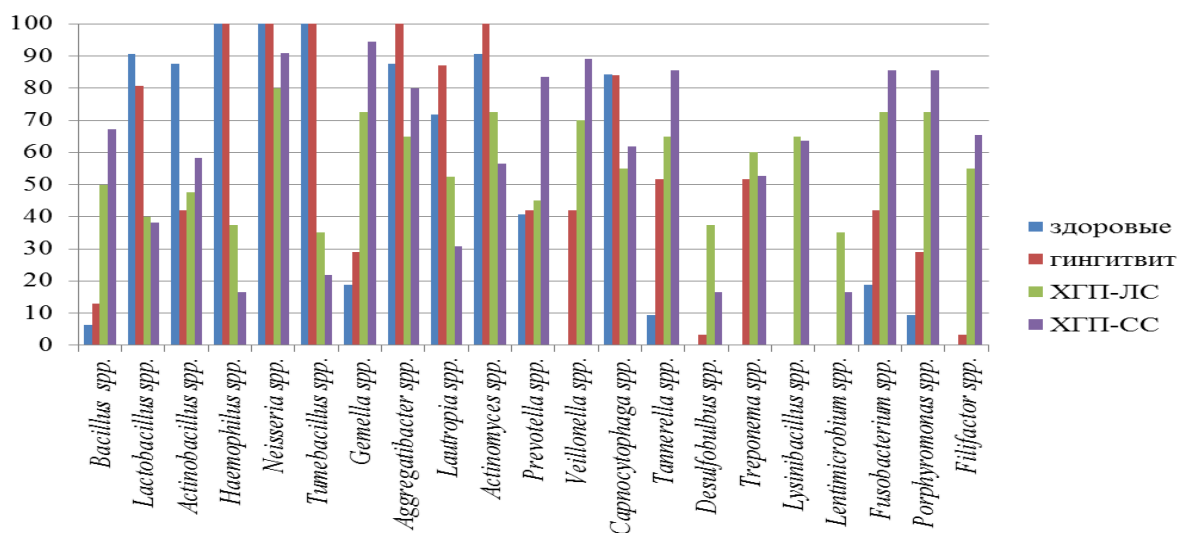


Рисунок 7 – Сравнительная характеристика частоты обнаружения родов бактерий в содержимом десневых борозд / пародонтальных карманов у лиц в исследуемых группах

Результаты анализа метагеномных данных образцов в исследуемых группах на уровне вида бактерий. Комплексный подход, включающий как количественную оценку видового разнообразия, так и качественный анализ преобладающих видов бактерий, по нашему мнению, может обеспечить более полное и детальное описание структуры микробных сообществ у обследованных лиц в каждой группе, что способствует более глубокому пониманию различий в микробиомах у здоровых лиц и пациентов с разными формами воспалительных заболеваний пародонта. Сопоставление данных, представленных на рисунке 8, с рассчитанными значениями индекса Шеннона, позволило установить взаимосвязь между богатством и равномерностью видового состава и доминированием определенных таксонов в микробиоме отдельных групп.

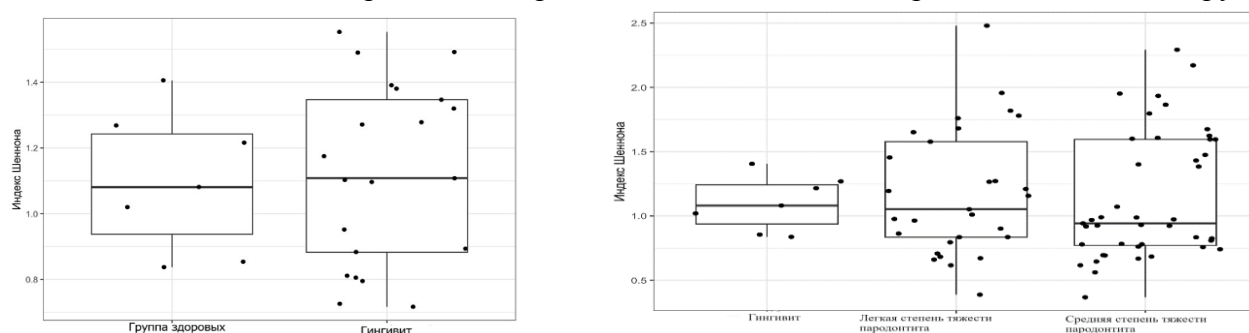


Рисунок 8 – Сравнительная оценка видового разнообразия микробиомов в образцах от обследованных лиц разных групп с учетом индекса Шеннона

Число видов бактерий, идентифицированных в результате секвенирования 16S рРНК и биоинформатического анализа полученных данных составило 229. Для группы здоровых людей пациентов было характерно преобладание в оральном микробиоме таких видов бактерий, как *Streptococcus pseudopneumoniae*, *S. parasanguinis*, *Haemophilus haemolyticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Neisseria meningitidis* на фоне уменьшения бактерий вида *Fusobacterium canifelinum* по сравнению с микробиомами лиц с воспалительными заболеваниями пародонта (Рисунок 9).

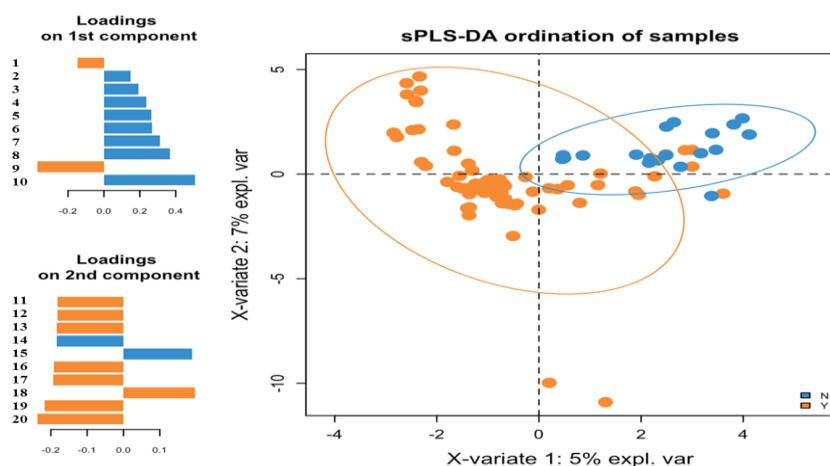


Рисунок 9 – Таксоны бактерий на уровне вида, преобладание которых характерно для здоровых людей (N) и пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (Y)

(1 – *Fusobacterium nucleatum*, 2 – *Neisseria meningitidis*, 3 – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 4 – *Streptococcus pseudopneumoniae*, 5 – *Streptococcus mitis/pneumoniae*, 6 – *Haemophilus influenzae*, 7 – *Veillonella dispar*, 8 – *Gemella haemolysans*, 9 – *Streptococcus anginosus*, 10 – *Streptococcus pneumoniae/pseudopneumoniae/sanguinis*, 11 – *Bacillus mycoides*, 12 – *Lactobacillus fermentum/plantarum/reuteri/salivarius*, 13 – *Actinomyces naeslundii*, 14 – *Streptococcus cristatus*, 15 – *Streptococcus mitis/pneumoniae/pseudopneumoniae*, 16 – *Leptotrichia goodfellowii*, 17 – *Campylobacter gracilis*, 18 – *Filifactor alocis*, 19 – *Veillonella parvula*, 20 – *Aggregatibacter segnis*).

В содержимом десневых борозд пациентов с гингивитом отмечалось преобладание *Gemella haemolysans*, *Streptococcus anginosus*, *Aggregatibacter segnis*, *Veillonella parvula*, *Leptotrichia wadei* и уменьшение таких видов бактерий, как *Aggregatibacter aphrophilus* в сравнении с контрольной группой (Рисунок 10).

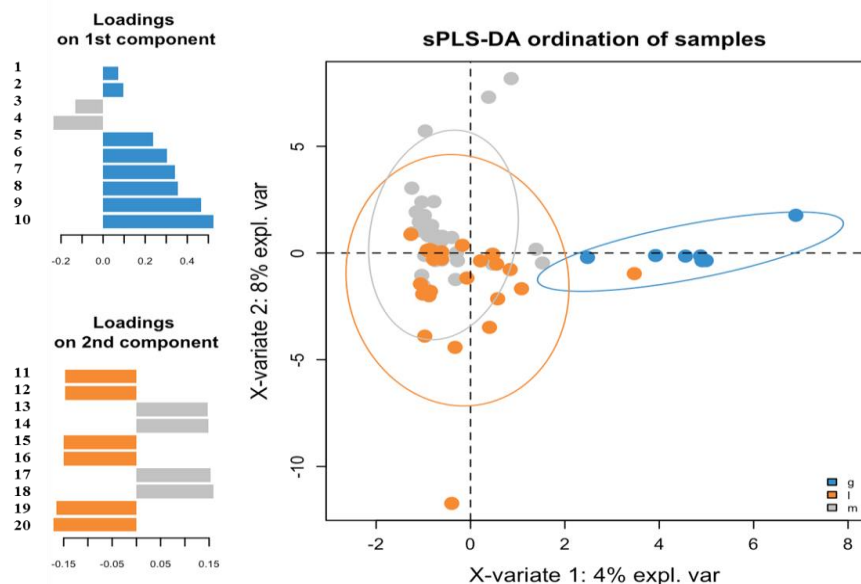


Рисунок 10 – Таксоны бактерий на уровне вида, преобладание которых характерно для пациентов с гингивитом (g), пациентов с ХГП легкой степени тяжести (I) и пациентов с ХГП средней степени тяжести (m)

(1 – *Haemophilus influenzae*, 2 – *Streptococcus cristatus*, 3 – Unclassified, 4 – *Streptococcus anginosus*, 5 – *Haemophilus sputorum*, 6 – *Veillonella dispar*, 7 – *Streptococcus pseudopneumoniae*, 8 – *Leptotrichia wadei*, 9 – *Streptococcus mitis*, 10 – *Gemella haemolysans*, 11 – *Streptococcus oralis*, 12 – *Tannerella forsythia*, 13 – *Actinomyces naeslundii*, 14 – *Lautropia mirabilis*, 15 – *Lysinibacillus boronitolerans*, 16 – *Treponema lecithinolyticum*, 17 – *Fusobacterium canifelinum*, 18 – *Peptostreptococcus stomatis*, 19 – *Veillonella tobetsuensis*, 20 – *Streptococcus intermedius*).

Детальный анализ показал, что у пациентов с легкой формой пародонтита наблюдалось увеличение численности *Phocaeicola abscessus*, *Leptotrichia wadei*, *Neisseria meningitidis*, *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella dispar*, *Actinomyces naeslundii*, в то время как количество *Aggregatibacter aphrophilus*, *Streptococcus parasanguinis* и *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Lactobacillus fermentum* снижалось. В то же время у пациентов с ХГП-СС увеличивалось количество *Capnocytophaga sputigena*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Gemella morbillorum*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii*, *Haemophilus parainfluenzae*. Следует отметить, что, по данным некоторых источников, *C. sputigena* относят к патогенам пародонта (Idate U. B. et al., 2020).

Особый интерес вызывает вид *Filifactor alocis*, который, по мнению ряда авторов, может рассматриваться как биомаркер развития пародонтита в силу, что практически не обнаруживается у здоровых людей (Балмасова И.П. и др., 2020; Ажа Е., et al., 2021; Ji. S. et al., 2023). Считается, что при ассоциации *F. alocis* с *P. gingivalis* усиливаются их инвазивные свойства и способность к формированию биопленок в целом (Янушевич О.О. и др., 2022; Oliveira R.R. et al., 2016), способствующие развитию и прогрессированию в пародонте воспалительного процесса, который крайне сложно купировать проводимой терапией. «Дуэт» *P. gingivalis* и *F. alocis* статистически значимо превалировал в образцах от пациентов с ХГП легкой и средней степенями тяжести. Полная информация по сравнительной характеристике частоты обнаружения значимых видов

бактерий в исследуемом материале от обследованных лиц всех групп представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Распространённость некоторых видов бактерий в содержимом десневых борозд/ пародонтальных карманов у лиц анализируемых групп по результатам секвенирования 16s рРНК

Вид бактерий	Частота обнаружения (%)			
	Здоровые (n=32)	Гингивит (n=31)	ХГП-ЛС (n=40)	ХГП-СС (n=55)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0	0	77,5***	83,6***
<i>Fusobacterium canifelinum</i>	25,0	74,2	37,5*	49,1*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	6,3	14	68,6**	82,0***
<i>Veillonella dispar</i>	0	0	75,0***	52,7***
<i>Veillonella parvula</i>	0	45,2***	22,5**	27,3**
<i>Veillonella atypica</i>	0	3,2	30,0*	29,1*
<i>Filifactor alocis</i>	0	3,2	55,0***	65,5***
<i>Lactobacillus fermentum/ plantarum/reuteri/salivarius</i>	84,4	80,6	3,2***	19,3***
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	20,0**	20,0**	10,9*
<i>Streptococcus gordonii</i>	0	9,7	35,0**	49,1***
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	100	70,9 *	50,0**	43,6**
<i>Tanerella forsythia</i>	9,4	51,6*	65,0**	85,5***
<i>Prevotella intermedia</i>	31,3	54,8*	82,5*	83,6*
<i>Treponema denticola</i>	0	41,9**	47,5**	56,4**
<i>Phocaeicola abscessus</i>	0	0	17,5	20,0
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	9,4	0	25,0*	29,1*
<i>Aggregatibacter segnis</i>	43,8	58,1	22,5*	23,6*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0	6,5	10,0*	18,2*
<i>Gemella haemolysans</i>	15,6	64,5**	27,5	27,3
<i>Gemella morbillorum</i>	9,3	0	65,0**	61,8**
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	43,8	100***	25,0	21,8
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	3,2	3,2	67,5**	81,8**
<i>Actinomyces naeslundii</i>	9,4	3,2	20,0	9,1
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0	6,4	27,5*	29,1*
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	0	3,2	27,5*	27,3*
<i>Neisseria meningitidis</i>	43,8	3,2**	47,5	34,5
<i>Leptotrichia wadei</i>	9,4	29,0*	30,0**	27,3*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых лиц; ** $p < 0,001$ по сравнению с группой здоровых лиц; *** $p < 0,0001$ по сравнению с группой здоровых лиц.

Оценка взаимосвязи состава орального микробиома и формы воспалительного заболевания пародонта. Одной из основных задач данной работы был поиск связей между наличием тех или иных видов бактерий и развитием разных форм воспалительной патологии пародонта (гингивит, ХГП). Для оценки связи между этими категориями использовался коэффициент корреляции Крамера (V) (Гржибовский А.М., 2008). В расчет принимались лишь те зависимости частоты встречаемости бактерий от групповой принадлежности пациентов, у которых коэффициент корреляции имел практический смысл (от 0,5 и более). В результате анализа выявлена статистически достоверная корреляция ($p < 0,0001$) между обнаружением в ротовой полости *F. nucleatum* и наличием у пациентов ХГП. Статистически достоверная

корреляция ($p < 0,0001$) выявлена между частотой встречаемости *V. dispar* и групповой принадлежностью пациентов: доли пациентов с ХГП разной степени тяжести, у которых данный вид был обнаружен, различались не существенно, однако данные микроорганизмы у здоровых лиц и больных гингивитом в содержимом десневой борозды не регистрировались (Таблица 5).

Таблица 5 – Частота встречаемости бактерий некоторых видов в содержимом десневой борозды/пародонтальном кармане у обследованных лиц в анализируемых группах и её достоверная корреляция с групповой принадлежностью пациентов

Вид бактерий	Частота встречаемости бактерий данного вида (%)				Коэффициент корреляции Крамера (V)
	Здоровые (n=32)	Гингивит (n=31)	ХГП-ЛС (n=40)	ХГП-СС (n=55)	
<i>F. nucleatum</i>	0	0	77,5	83,6	0.70
<i>V. dispar</i>	0	0	75,0	52,7	0.56
<i>P. gingivalis</i>	6,3	14	68,6	82,0	0.64
<i>F. alocis</i>	0	3,2	55,0	65,5	0.60
<i>T. denticola</i>	0	41,9	47,5	56,4	0,54
<i>S. gordonii</i>	0	9,7	35,0	49,1	0,54
<i>F. canifelinum</i>	25,0	74,2	37,5	49,1	0,52
<i>G. haemolysans</i>	15,6	64,5	27,5	27,3	0,50
<i>H. haemolyticus</i>	43,8	100	25,0	21,8	0,60

Кроме того, у подавляющего большинства пациентов при ХГП обнаруживались бактерии вида *P. gingivalis* ($p < 0,0001$), причем при переходе ХГП от легкой к средней степени тяжести данный пародонтопатоген встречался несколько чаще, хотя это различие оказалось статистически незначимым ($p > 0,23$). Полученные результаты подтверждаются данными других исследований (Юрищева А.Ю. и др., 2024; Hou Y. et al., 2022; Babikow E. et al., 2023). Помимо этого, при проведении сравнительного анализа выявлена корреляционная зависимость ($V=0,50$, $p < 0,0001$) частоты встречаемости *F. nucleatum*, *P. gingivalis* и *V. dispar* (изолированно и/или в виде ассоциаций) от групповой принадлежности пациентов. Были подсчитаны случаи, при которых у обследованных лиц бактерии этих видов встречались по отдельности, в виде пар или триплетной комбинации. Установлено, что в исследуемом материале от здоровых людей и больных гингивитом, как правило (93,7 и 86% соответственно), эти бактерии не выявлялись ни поодиночке, ни в виде 2- и 3-х компонентных ассоциаций, тогда как среди пациентов с ХГП легкой и средней степенями тяжести, наоборот, преобладали случаи с обнаружением данных микроорганизмов в пародонтальных карманах – 86 и 96% соответственно, причем достаточно часто у них встречались парные бактериальные ассоциации в различном сочетании (38 и 48% соответственно) и трехвидовые комплексы этих микроорганизмов (в 47% случаях в обеих группах). Следует отметить, что случаи изолированного выявления бактерий одного из трех видов либо отсутствовали (у пациентов с ХГП легкой степени тяжести), либо были крайне редки – 2% среди пациентов с ХГП средней степени тяжести.

Определена статистически значимая корреляционная зависимость частоты встречаемости *F. alocis* ($V=0,60$, $p < 0,0001$) у пациентов с ХГП. Частота выявления *S. sputigena* и *G. morbillorum* в исследуемом материале относительно рассматриваемых групп обследованных

лиц была практически похожей и статистически значимо высокой лишь в отношении больных с ХГП ($V=0,52$, $p<0,0001$) и ($V=0,68$, $p<<0,0001$) соответственно. В образцах содержимого десневой борозды здоровых людей *T. denticola* не обнаружена, а у пациентов с гингивитом и ХГП частота выявления данного вида бактерии была одинаково высокой. Статистически значимая корреляция ($p<<0,0001$) подтверждает причастность *T. denticola* к развитию воспалительных заболеваний пародонта независимо от их формы. То же заключение можно сделать и в отношении детектированных *S. gordonii* ($V=0,54$, $p<0,0001$) и *P. abscessus* ($V=0,52$, $p<0,001$), которые были определены только в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП, причем чаще при ХГП-СС. Следует отметить, что сочетания этих бактерий встречались крайне редко (в 7,2% случаев) и исключительно у пациентов с ХГП-СС, что предполагает их самостоятельное участие в прогрессировании патологии.

Несколько менее выраженные различия наличия/отсутствия в группах с пародонтитом имели место для *P. intermedia*. Данный вид встречался во всех четырех рассматриваемых группах с преобладанием в группах пациентов с ХГП, отражением чего является более слабая корреляция ($V=0,50$, $p<0,0001$). Диспропорция детектирования *T. forsythia* в исследуемых группах обследованных лиц оказалась менее выраженной и корреляция оказалась более слабой, чем в описанных выше случаях ($V=0,46$, $p<0,0001$), поскольку в группе здоровых людей бактерии данного вида встречались в 39,4% случаев, а в группе пациентов с ХГП-СС – в 85,5% случаев, в результате разница была менее очевидной.

В результате математического анализа полученных данных выявлена статистически достоверная корреляция обнаружения в содержимом десневой борозды *F. canifelinum* ($p<0,0001$), *G. haemolysans* ($p<0,0001$) и *H. haemolyticus* ($p<0,0001$) с наличием у пациентов гингивита (Таблица 5). Следует отметить, что данные микроорганизмы определялись и у лиц всех остальных трех групп, но со значительно меньшей частотой, что позволяет предположить их важную роль в этиопатогенезе гингивита.

Выявлена и «обратная» корреляционная зависимость частоты встречаемости бактерий, в частности *Streptococcus parasanguinis/pneumoniae/pseudopneumoniae*, от наличия у пациентов ХГП средней степени тяжести ($V=0,50$, $p<0,0001$). Так, в этой группе лиц данные бактерии были детектированы лишь в 43,6% случаев, а при ХГП-ЛС – в 50% случаев, тогда как у пациентов с гингивитом – в 70,9%, а у здоровых людей – в 100% случаев. Подобная корреляционная зависимость ($V=0,70$, $p<0,0001$) отмечалась при учете частоты встречаемости представителей нормальной микрофлоры полости рта *Lactobacillus fermentum/plantarum/reuteri/salivarius*. Эти бактерии обнаруживались в ротовой полости у большинства здоровых лиц (84,4%) и пациентов с гингивитом (80,6% случаев), тогда как у пациентов с ХГП-ЛС и ХГП-СС они встречались заметно реже – в 3,2% и 19,3% случаев соответственно.

Таким образом, результаты исследования свидетельствовали о существенных изменениях в оральной микробиоте/оральном микробиоме пациентов с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом по сравнению со здоровыми людьми. Полученные данные подтверждают необходимость проведения метагеномных исследований для изучения микробного состава, идентификации новых пародонтопатогенов, анализа их взаимодействия и синергизма, а также возможной оценки влияния микробиоты на развитие не только воспалительной патологии пародонта, но и сопутствующих заболеваний, поскольку предполагается роль оральной микробиоты в выработке токсичных метаболитов, распространении инфекции за пределы своего биотопа и инициации системного воспаления. Выявленные консорциумы микроорганизмов в различных комбинациях видов *G. haemolysans*, *S. anginosus*, *A. segnis*, *F. canifelinum*, *H. haemolyticus* могут стать новыми биомаркерами гингивита, а разнородные

ассоциации *Porphyromonas gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *C. sputigena*, *S. gordonii*, *F. alocis*, *G. morbillorum*, *P. abscessus*, *F. nucleatum*, *V. dispar*, *Desulfobulbus* spp. – новыми биоиндикаторами пародонтита. В то же время различные комбинации таких видов бактерий, как *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *V. dispar*, *S. gordonii*, *F. alocis*, *P. abscessus*, способны информативно отражать прогрессирующий характер течения пародонтита.

Результаты иммунологического исследования обследованных лиц в анализируемых группах. Для комплексной характеристики обследованных лиц в каждой группе у них оценивали особенности иммунологической реактивности, анализируя показатели местного, гуморального и клеточного иммунитета, а также цитокиновый статус.

Обнаружена статистически значимая связь ($\eta^2=75\%$, $F=97,5$, $p<<0,0001$) между уровнем секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в биообразцах и групповой принадлежностью обследованных лиц. При этом концентрация таких провоспалительных цитокинов, как ФНО α ($\chi^2=83$, $p<<0,0001$) и ИЛ-2 ($\chi^2=88,2$, $p<<0,0001$), напрямую зависела от тяжести пародонтита, достигая максимума при средней степени тяжести ХГП. Повышение уровня содержания ФНО α при воспалительных заболеваниях пародонта подтверждается рядом других исследований (Большедворская Н.Е. и др., 2017), что доказывает диагностическую ценность ФНО α в качестве раннего маркера воспаления в тканях пародонта даже до появления видимых клинических симптомов, таких как отечность, кровоточивость десен или подвижность зубов. Статистически значимая связь между уровнем ИЛ-2 и стадиями воспалительного заболевания пародонта подтверждает роль данного цитокина в патогенезе пародонтита и, очевидно, указывает на его участие в развитии и прогрессировании заболевания (Таблица 6). Определена подобная и статистически значимая зависимость в отношении уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-4 ($\chi^2=82,5$, $p<<0,0001$). Учитывая, что ИЛ-4 является противовоспалительным цитокином, полученные данные могут указывать на сложную, нелинейную роль ИЛ-4 в патогенезе развития пародонтита.

Таблица 6 – Иммунологические показатели в содержимом десневой борозды / пародонтального кармана у обследованных лиц в анализируемых группах

Показатель	Средние уровни иммунологических показателей у обследованных лиц в анализируемых группах, Ме (Q ₁ и Q ₂)			
	Здоровые люди (n=32)	Гингивит (n=37)	ХГП-ЛС (n=42)	ХГП-СС (n=57)
ФНО α (пг/мл)	3,3 (2,7; 4,2)	9,5 (8,5; 15,6)*	19,4 (17,5; 23,2)*	44,8 (41,6; 48,8)*
ИЛ-2 (пг/мл)	11,3 (11,0; 11,6)	12,8 (12,5; 13,1)*	15,4 (14,3; 16,2)*	26,5 (24,3; 27,0)*
ИЛ-6 (пг/мл)	0,98 (0,94; 1,0)	0,92 (0,89; 0,96)*	0,91 (0,70; 0,95)*	0,79 (0,77; 0,81)*
ИЛ-4 (пг/мл)	3,3 (3,1; 4,0)	4,3 (4,3; 4,8)	4,6 (4,2; 4,9)	6,8 (6,3; 6,1)*
ИЛ-10 (пг/мл)	9,5 (8,9; 9,8)	8,1 (7,8; 8,2)*	4,1 (3,9; 4,5)*	2,2 (2,0; 2,4)*
sIgA (г/л)	211,0 (159,8; 262,2)	176,0 (138,9; 213,1)	389,9 (327,7; 461,1)*	466,4 (393,34; 539,5)*

Примечание: * - достоверные изменения по сравнению с группой здоровых лиц ($p<0,05$).

Зависимость уровня цитокина ИЛ-10 от групповой принадлежности пациентов оказалась достаточно выраженной и значимой ($\chi^2=82,9$, $p<<0,0001$), но была «зеркальной» по отношению к вышеописанным: в содержимом десневой борозды у лиц контрольной группы уровень ИЛ-10 был достоверно выше, чем в исследуемом материале от лиц всех остальных анализируемых групп. Подобная «обратная», но значимая зависимость получена по результатам оценки в исследуемом материале ИЛ-6 ($\chi^2=64,2$, $p<<0,0001$). Выявленные модификации «цитокинового

статуса» и sIgA в содержимом десневых борозд при гингивите и пародонтальных карманов при ХГП, очевидно, можно оценить как проявления воспалительного ответа «смешанного» характера с преобладанием провоспалительной реакции. Повышение уровней провоспалительных цитокинов (ФНО α и ИЛ-2) указывает на активное воспаление, а одновременное с этим повышение содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-4 и уровня sIgA может отражать «стремление» организма взять под регуляторный контроль течение воспалительного процесса. Однако снижение уровней ИЛ-10 (важного противовоспалительного цитокина) и ИЛ-6 (имеющего как про-, так и противовоспалительные функции), вероятно, подтверждает недостаточность противовоспалительного контроля и указывает на дисбаланс в иммунном ответе со сдвигом в сторону воспаления.

Изменения в показателях врождённого иммунитета у пациентов с ХГП проявились преимущественно снижением фагоцитарной активности клеток по сравнению с параметрами в группах здоровых людей и пациентов с гингивитом. При этом у пациентов с ХГП разной степени тяжести различия были выражены менее заметно, хотя, в целом, данный показатель значимо изменялся в зависимости от групповой принадлежности пациентов ($\chi^2=55$, $p<<0,0001$). Зависимость средних значений НСТ-теста от групповой принадлежности пациентов оказалась также достоверной ($\eta^2=41\%$, $F=23,6$, $p<<0,0001$) и свидетельствовала о существенном снижении активности внутриклеточных антибактериальных систем при прогрессировании пародонтита.

При определении у обследованных лиц уровней сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG выявлены зависимости данных показателей ($\chi^2=75,6$, $p<<0,0001$; $\chi^2=48,6$, $p<<0,0001$; $\eta^2=40\%$, $F=22,6$, $p<<0,0001$, соответственно) от клинической формы заболевания, хотя они имели нечеткий характер. Влияние «фактора заболевания и его формы» на уровень циркулирующих иммунных комплексов в исследуемых группах оказалось умеренным ($\eta^2=61\%$, $F=51,2$, $p<<0,0001$) (Таблица 7).

Таблица 7 – Иммунологические показатели гуморального звена иммунитета у обследованных лиц в анализируемых группах

Показатель	Средние уровни иммунологических показателей у обследованных лиц в анализируемых группах, Ме (Q ₁ и Q ₂)			
	Здоровые люди (n=32)	Гингивит (n=37)	ХГП-ЛС (n=42)	ХГП-СС (n=57)
IgA (г/л)	1,57 (1,37; 1,87)	1,84 (1,52; 2,34)	1,95 (1,45; 2,3)*	4,21 (3,67; 4,98)*
IgM (г/л)	1,38 (1,05; 1,63)	1,37 (1,03; 1,63)	1,29 (1,03; 1,58)	2,1 (1,05; 3,6)*
IgG (г/л)	13,5 (12,0; 15,0)	12,9 (12,0; 13,8)	14,0 (9,64; 14,4)	20,2 (15,8; 24,6)*
ЦИК, у.е.	21,6 (14,3; 28,9)	28,3 (17,6; 39)	37,0 (26,4; 47,6)*	62,7 (45,8; 79,6)*

Примечание: * - достоверные изменения по сравнению с группой здоровых лиц ($p<0,05$).

При анализе показателей популяционного и субпопуляционного составов лимфоцитов, представленных в таблице 8, установлено, что значимая ($\eta^2=40\%$, $F=22,2$, $p<<0,0001$) зависимость уровня содержания CD3⁺ от формы заболевания имела нелинейный характер; зависимость среднего уровня содержания CD4⁺ оказалась выраженной ($\eta^2=58\%$, $F=44,8$, $p<<0,0001$). Сходные результаты получены при определении уровня лимфоцитов с фенотипом CD16⁺ ($\eta^2=67,4\%$, $F=67,5$, $p<<0,0001$); зависимость уровня цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) от формы заболевания оказалась достаточно выраженной и значимой ($\chi^2=66,0$, $p<<0,0001$).

Полученные результаты иммунофенотипирования лимфоцитов свидетельствовали о достоверно значимых изменениях показателей у пациентов с ХГП (особенно, средней степени тяжести) и указывали на дисбаланс в клеточном звене иммунитета, а именно: снижение CD3⁺ и

CD8+ лимфоцитов на фоне повышения доли клеток с фенотипом CD4+, CD16+,56+ и CD19+. Повышение уровня Т-хелперов-индукторов (CD4⁺), очевидно, ассоциировано с иммунным самоподдерживающимся ответом и подавлением способности иммунокомпетентных клеток уничтожать патогены, что приводит к формированию аутоиммунного процесса (Чуйкин С.В. и др., 2019). Следует отметить, что содержание CD3⁺ и CD19⁺ в периферической крови обследуемых лиц резко снижалось по мере прогрессирования пародонтита, что характерно при формировании гипоиммунных состояний.

Таблица 8 – Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов у обследованных лиц в анализируемых группах

Показатель	Средние показатели иммунофенотипирования лимфоцитов у обследованных лиц в анализируемых группах, Ме (Q ₁ и Q ₂)			
	Здоровые люди (n=32)	Гингивит (n=37)	ХГП-ЛС (n=42)	ХГП-СС (n=57)
CD3+ (%)	63,1 (62,0; 64,3)	64,8 (62,8; 66,8)	68,2 (65,5; 70,8)*	58,0 (56,5; 59,5)*
CD4+ (%)	39,6 (38,3; 41,0)	39,4 (37,1; 41,7)	45,7 (44,7; 46,9)*	51,1 (49,5; 52,5)*
CD8+ (%)	27,7 (26,3; 28,5)	27,7 (25,2; 28,7)	21,6 (19,5; 22,9)*	17,4 (16,5; 18,4)*
CD16+,56+ (%)	11,5 (10,6; 12,4)	11,0 (10,0; 12,0)	14,2 (12,9; 15,5)*	21,2 (20,2; 22,1)*
CD19+ (%)	12,8 (11,5; 13,6)	12,8 (12,4; 13,8)	12,7 (11,9; 14,4)	23,1 (21,6; 24,6)*

Примечание: * - достоверные изменения по сравнению с группой здоровых лиц (p<0,05).

Таким образом, у пациентов с ХГП выявлен дисбаланс между врожденным и адаптивным иммунитетом, проявляющийся в дисрегуляции иммунного ответа и развитии вторичного иммунодефицита, очевидно, из-за длительной антигенной стимуляции при вялотекущем воспалении. Эти данные убеждают в необходимости включения в диагностические алгоритмы для оценки характера течения воспалительных заболеваний пародонта методов для определения иммунологических показателей в дополнение к другим методам обследования.

Клинико-иммунологические показатели и маркеры микробиома как предикторы воспалительных заболеваний пародонта. Взаимодействие между оральным микробиомом и дисрегулированным иммунитетом – ключевое звено патогенеза пародонтита. Углубленное изучение микробно-иммунологических взаимосвязей может открыть путь к новым стратегиям лечения, направленным не только на уничтожение патогенов, но и на восстановление иммунологического баланса. Учитывая вышеизложенное, одной из задач исследования явилась проверка наличия связей между встречаемостью некоторых видов бактерий и уровнем выраженности иммунологических параметров. Поскольку, как показала проверка критерием Колмогорова-Смирнова, индивидуальные вариации содержания бактерий и индикаторов иммунной активности нельзя было рассматривать как модификации нормального распределения Гаусса, для оценки тесноты связей между этими параметрами мы использовали коэффициент ранговой корреляции Кендела (τ); значимыми считали коэффициенты с величиной $\tau > 0,13$.

После обработки данных достоверная «положительная» корреляция выявлена между значениями некоторых иммунологических показателей и наличием в пародонтальных карманах у пациентов с ХГП бактерий *V. dispar*, присутствие которых, в частности, сопровождалось повышением уровней ФНО α , ИЛ-2, ИЛ-4 и sIgA ($\tau=0,32$; $\tau=0,27$; $\tau=0,36$; $\tau=0,36$ соответственно, $p < 0,05$), а также ассоциировалось со снижением фагоцитарной активности нейтрофилов и количества цитотоксических Т-лимфоцитов CD8+ ($\tau=-0,78$ и $\tau=-0,32$ соответственно, $p < 0,01$). Полученные результаты позволяют предположить, что вегетирование в оральном биотопе

бактерий вида *V. dispar* может играть существенную патогенетическую роль в развитии хронического воспаления пародонта путем индукции провоспалительного ответа и одновременного ингибирования механизмов врожденного иммунитета, вызывая дисрегуляцию иммунного ответа с нарушением элиминации инфицированных клеток, что проявляется функциональной недостаточностью CD8⁺ лимфоцитов, которые обеспечивают распознавание и, в конечном итоге, уничтожение клеток, инфицированных внутриклеточными патогенами. Также «положительная» корреляция выявлена в отношении обнаружения в содержимом десневой борозды и пародонтального кармана *G. haemolysans* и характерных изменений иммунного статуса в виде повышения уровней ФНО α , ИЛ-2, ИЛ-4 и sIgA ($\tau=0,34$; $\tau=0,33$; $\tau=0,28$; $\tau=0,36$ соответственно, $p<0,05$) и относительного повышения содержания CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов (в обоих случаях $\tau=0,28$; $p<0,05$) на фоне снижения фагоцитарной активности нейтрофилов и цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺ ($\tau=-0,77$, $\tau=-0,34$ соответственно, $p<0,01$).

На основании представленных данных о «положительной» корреляции и учитывая, что бактерии вида *G. haemolysans* достоверно чаще обнаруживались в содержимом десневой борозды пациентов с гингивитом, можно говорить о возможной ассоциации этих микроорганизмов с ранними стадиями воспаления десен. Присутствие в оральной микробиоте *G. haemolysans* сопровождалось активной, но «извращенной» иммунной реакцией: стимуляцией гуморального ответа (sIgA) и выработкой провоспалительных цитокинов на фоне критического подавления основных механизмов бактериального клиренса (фагоцитоз нейтрофилов) и клеточного иммунитета (CD8⁺ лимфоциты). Этот иммунный дисбаланс, вероятно, способствует персистенции бактерии и хронизации воспаления, играя существенную роль в прогрессировании заболевания пародонта до пародонтита. Полученные данные подчеркивают важное диагностическое и прогностическое значение в определении наличия или отсутствия данных видов бактерий и открывают перспективы для разработки таргетных иммунокорректирующих подходов в терапии заболевания. Напротив, в случае детекции в содержимом десневой борозды и пародонтального кармана бактерий *Lactobacillus fermentum/plantarum/reuteri/salivarius* наблюдалась «отрицательная» корреляция их наличия с такими иммунологическими показателями в ротовой жидкости, как ФНО α , ИЛ-2, ИЛ-4, sIgA и циркуляторных иммунных комплексов (соответственно – $\tau=-0,36$; $\tau=-0,34$; $\tau=-0,28$; $\tau=-0,32$; $\tau=-0,33$, $p<0,05$), при этом фагоцитарная активность лейкоцитов повышалась ($\tau=0,78$; $p<0,01$). Эти изменения иммунологических параметров, возможно, связаны со способностью *Lactobacillus* spp. ингибировать патогенные микроорганизмы посредством запуска иммунного ответа и/или проявлять в отношении пародонтопатогенов антагонистическую активность (Jamal M. et al., 2018; Barzegari A. et al., 2020; Vasiee A. et al., 2022). Полученные корреляционные взаимосвязи определенного вида лактобацилл с показателями иммунного ответа демонстрируют потенциал данных бактерий в модуляции воспалительных процессов в тканях пародонта. Обнаруженные закономерности позволяют рассматривать *L. fermentum* как перспективный биомаркер благоприятного течения пародонтита, а также в качестве основы для создания пробиотических препаратов и обоснования новых стратегий микробиом-таргетной терапии.

В результате анализа взаимосвязей иммунологическими параметрами с бактериями других видов, изолированно встречающихся в ротовой полости, значимых корреляций выявлено не было. В то же время установлено, что выраженность ряда иммунологических параметров коррелировала с вегетированием в ротовой полости 2-х и 3-х компонентных ассоциаций некоторых микроорганизмов. Так, выявлена «отрицательная» корреляция между наличием в оральной биоте *F. nucleatum*, *F. alocis*, *T. forsythia*, (в различных сочетаниях) и уровнями ФНО α , ИЛ-2, ИЛ-4 и sIgA ($\tau=-0,57\dots-0,86$; $p<0,01$), а также показателями гуморального

иммунитета, а именно IgA, IgM и IgG ($\tau=-0,57...-0,71$; $p<0,01$). Не исключено, что данные пародонтопатогены могут выделять вещества, подавляющие продукцию цитокинов и sIgA, тем самым, «извращая» иммунный ответ, что способствует персистенции возбудителей в организме, обуславливая хроническое течение заболевания и прогрессирование пародонтита.

Определение факторов патогенности *Streptococcus gordonii* и *Filifactor alocis* как маркеров прогрессирующего течения пародонтита. Исследования показывают, когда естественный баланс между видами бактерий нарушается, вызывая проявления дисбиоза, некоторые бактерии, например *Streptococcus gordonii*, могут проявлять свои патогенные свойства, способствуя усилению воспалительной реакции в тканях пародонта (Darveau R.P. et al., 2010). Роль бактерий, имеющих факторы вирулентности, особенно значима при переходе от здорового пародонта к патологически измененному. Патогенный потенциал *S. gordonii* зависит, прежде всего, от адгезинов, локализованных на клеточной стенке бактерий: антигена Hs и поверхностного белка В. Антиген Hs, кодируемый геном *hsa*, связывается с сиалированными рецепторами на клетках хозяина, обеспечивая адгезию бактерий к поверхностям полости рта и их конкуренцию с другими В. В одном из исследований *in vitro* на модели развития бактериальных ассоциаций было показано, что *S. gordonii* препятствовал накоплению *F. alocis* в сообществе из двух видов, а также в консорциуме из трёх видов *S. gordonii*, *F. nucleatum* и *F. alocis*, причем антагонистическое воздействие *S. gordonii* преобладало над синергетическим взаимодействием *F. nucleatum* с *F. alocis* (Wang Q. et al., 2013). Благодаря включенности в метаболизм аргинина, выраженной протеазной активности, наличию широкого спектра факторов патогенности *F. alocis* интенсивно колонизирует ткани пародонта. Проведены исследования, свидетельствующие о том, что около половины штаммов *F. alocis* несут ген *ftxA*, кодирующий синтез белка RTX (Oscarsson J. et al., 2020; Ozuna H. et al., 2022). Наличие этого гена у *F. alocis* демонстрирует более высокую нагрузку бактерией при прогрессивной форме пародонтита с разрывом пародонтальной связки (Razooqi Z. et al., 2024). С учетом вышесказанного для прогнозирования тяжелого течения пародонтита были подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры (Таблица 1) для классической ПЦР к генам патогенности *S. gordonii* – *has* и *GspB*, кодирующим адгезины, и *ftxA*, кодирующему RTX-белок *F. alocis*. Сконструированные праймеры к генам *has* и *GspB* *S. gordonii* были апробированы на ДНК, выделенной из чистых культур *S. gordonii* (6 штаммов), изолированных из пародонтальных карманов пациентов с ХГП (Рисунок 11,12).

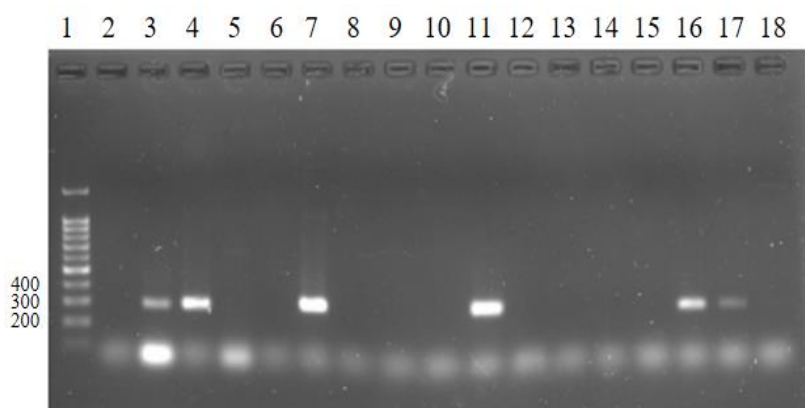


Рисунок 11 – Электрофореграмма амплификации ДНК чистой культуры *Streptococcus gordonii* и ДНК образцов содержимого пародонтальных карманов пациентов с ХГП размером 276 п.н. на наличие гена *hsa* *Streptococcus gordonii*, где: 1 – маркер длин ДНК (100 п.н., Евроген); 2 – отрицательный контроль (вода); 3, 4 – ДНК чистой культуры *S. gordonii*; 5 – отрицательный контроль (ДНК чистой культуры *S. mutans*); 6-18 – ДНК исследуемых образцов.

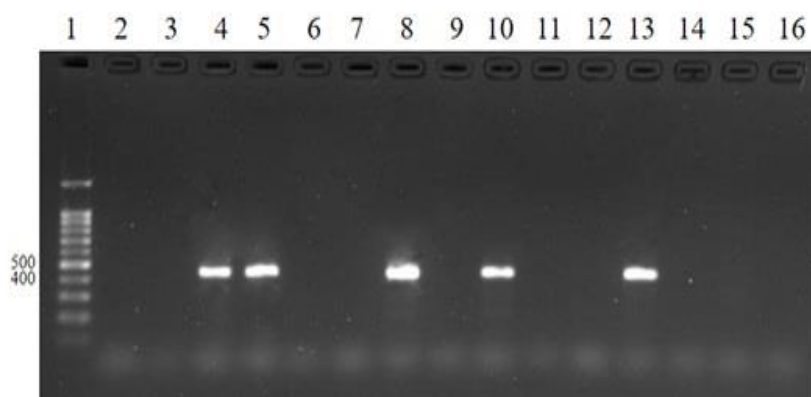


Рисунок 12 – Электрофореграмма амплификации ДНК чистой культуры *Streptococcus gordonii* и ДНК образцов содержимого пародонтальных карманов пациентов с ХГП размером 434 п.н. на наличие гена *GspB Streptococcus gordonii*, где: 1 – маркер длин ДНК (100 п.н., Евроген); 2 – отрицательный контроль (вода); 3 – отрицательный контроль (ДНК чистой культуры *S. mutans*); 4,5 – ДНК чистой культуры *S. gordonii*; 6-16 – ДНК исследуемых образцов.

Указанные обстоятельства свидетельствовали о возможности использования созданных праймеров для детекции указанных генов патогенности *S. gordonii* в клиническом материале.

В случае детекции гена *ftxA*, кодирующего RTX-белок *F. alocis*, выделить чистую культуру данного патогена из клинического материала не удалось, поэтому ориентировались на клинические образцы, в которых идентифицирован данный патоген пародонта по результатам метагеномного исследования (Рисунок 13).

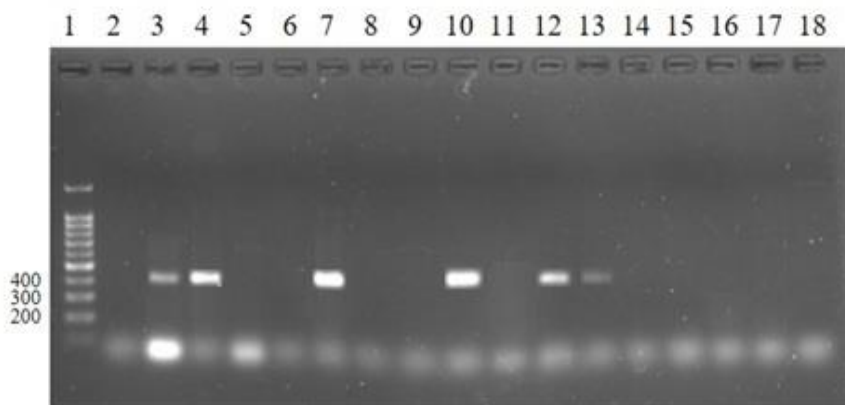


Рисунок 13 – Электрофореграмма амплификации ДНК образцов содержимого пародонтальных карманов пациентов с ХГП размером 405 п.н. на наличие гена *ftxA Filifactor alocis*, где: 1 – маркер длин ДНК (100 п.н., Евроген); 2 – отрицательный контроль (вода); 3, 4 – ДНК образцов с положительным результатом на *F. alocis*; 5 – отрицательный контроль (ДНК *S. mutans*); 6-18 – ДНК исследуемых образцов.

Анализ методом ПЦР наличия в исследованных образцах генов вирулентности *hsa*, *GspB* (кодирующих адгезины *S. gordonii*) и *ftxA* (кодирующего RTX-белок *F. alocis*) показал различную частоту встречаемости этих генов (Таблица 9). Наблюдаемая разница в частоте сочетанного присутствия генов *hsa* и *GspB* в зависимости от тяжести заболевания может указывать на то, что эти гены играют существенную роль в патогенезе ХГП, и их совместное наличие коррелирует с прогрессированием заболевания. Сочетанное обнаружение гена *ftxA F.*

alocis и генов *hsa* и (или) *GspB S. gordonii* обнаружено лишь в одном из исследуемых образцов пациентов с ХГП-СС, поскольку эти бактерии сочетано идентифицировались относительно редко и только у пациентов с ХГП средней степени тяжести. *F. alocis* и *S. gordonii* могут занимать разные экологические ниши в биопленке, что, возможно, снижает частоту их совместного выявления, а редкость сочетания генов *ftxA* и *hsa/GspB* подчеркивает сложность микробных взаимодействий при пародонтите, но выявление даже в одном случае требует внимания как к потенциальному триггеру прогрессирования.

Таблица 9 – Наличие исследуемых генов факторов патогенности *Streptococcus gordonii* и *Filifactor alocis* у обследованных лиц в анализируемых группах

Группа пациентов	Наличие исследуемых генов (абс./%)									
	<i>hsa</i> <i>S. gordonii</i>		<i>GspB</i> <i>S. gordonii</i>		<i>hsa + GspB</i> <i>S. gordonii</i>		<i>ftxA</i> <i>F. alocis</i>		<i>hsa/ GspB</i> <i>S. gordonii+</i> <i>ftxA F. alocis</i>	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Гингивит (n=31)	0		2	6,5	0		0		0	
ХГП-ЛС (n=40)	10	25,0	7	17,5	7	17,5	11	27,5	0	
ХГП-СС (n=55)	15	27,3	21	38,2	13	23,6	22	40,0	1	1,8

Более частое присутствие гена *ftxA* в образцах от пациентов с ХГП средней степени тяжести (40,0 против 27,5 % при легкой степени тяжести заболевания) может быть связано с участием RTX-белка в детерминации выраженного воспалительного процесса, ассоциированного с деструкцией тканей пародонта, что позволяет рассматривать ген *ftxA* в качестве информативного биомаркера при диагностике/прогнозировании более агрессивной формы ХГП. Таким образом, дана характеристика факторов патогенности бактерий видов *S. gordonii* и *F. alocis*, которые являются частью оральной микробиоты, связанной с воспалительными заболеваниями пародонта, и показана их взаимосвязь с тяжестью течения данной патологии.

Алгоритм лабораторной диагностики пародонтита на основе микробиологических, клинико-иммунологических и молекулярно-генетических критериев. В современной пародонтологии особое значение приобретает разработка и внедрение в клиническую практику стандартизированных диагностических алгоритмов, позволяющих осуществлять персонализированный подход к ведению пациентов. Предлагаемый нами алгоритм представляет собой интегративную схему диагностики, сочетающую традиционные клинические протоколы с инновационными лабораторными технологиями, применение которых позволяет осуществлять раннее выявление воспалительных заболеваний пародонта, проводить дифференциальную диагностику форм заболевания, прогнозировать течение патологического процесса, разрабатывать персонализированные программы лечения, оптимизировать профилактические мероприятия.

Интеграция клинических и современных лабораторных методов в представленном алгоритме создает новые возможности для прецизионной пародонтологии, позволяя перейти от эмпирического подхода к научно обоснованной персонализированной терапии воспалительных заболеваний пародонта (схема алгоритма представлена ниже).

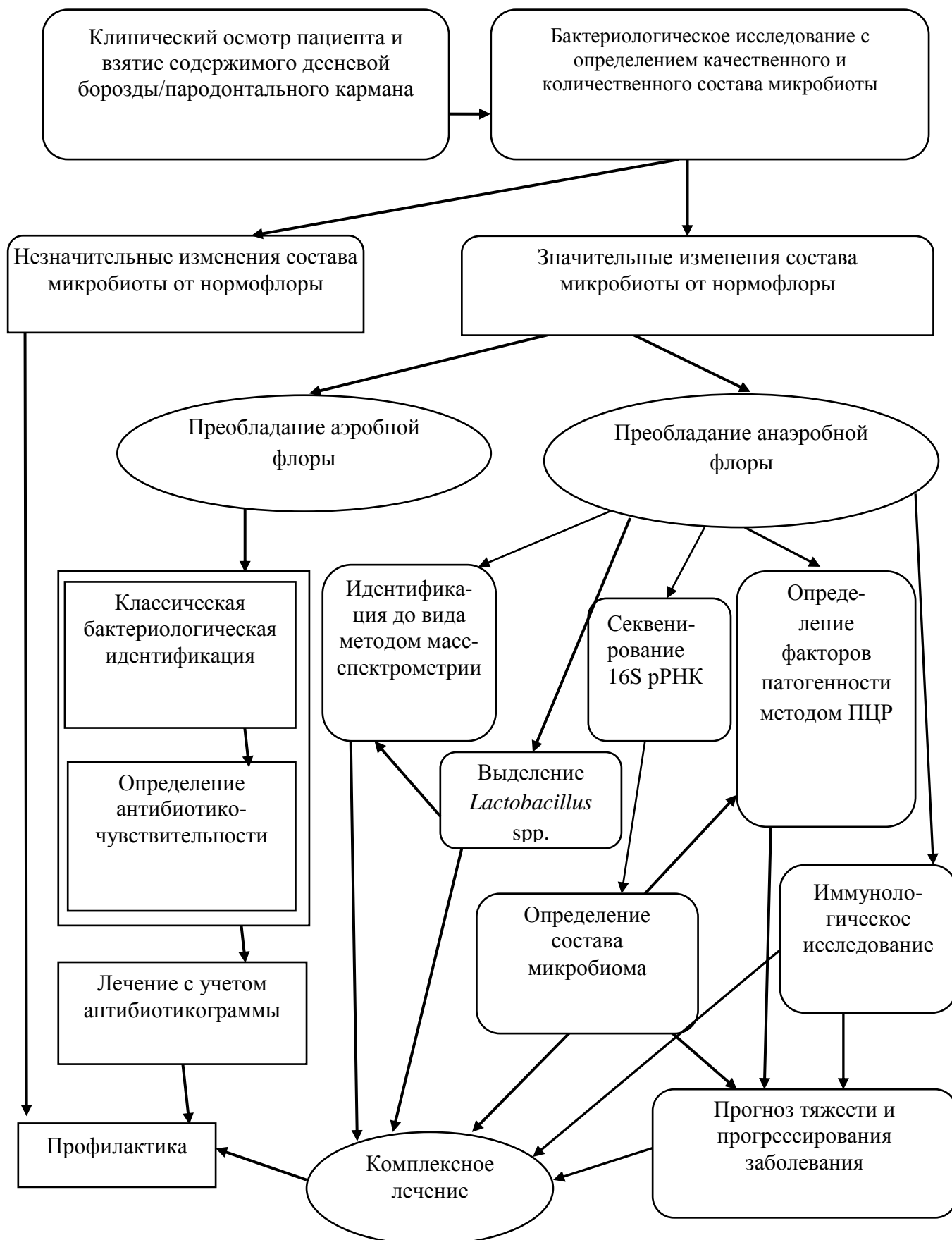


Схема – Алгоритм клинико-лабораторного обследования пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

Видовая структура оральных штаммов *Lactobacillus* spp. Пробиотики на основе лактобацилл – перспективное дополнение к терапии и профилактике воспалительной патологии пародонта, в том числе пародонтита, особенно, при легкой и средней степени тяжести заболевания. Учитывая повышенный интерес к данному направлению, одной из задач работы явилось исследование биологических свойств, выделенных из исследуемого материала и идентифицированных бактерий рода *Lactobacillus* spp. В результате бактериологического исследования из содержимого десневых борозд и пародонтальных карманов лактобациллы были выделены от обследованных лиц во всех исследуемых группах, но в различном процентном соотношении в зависимости от вида микроорганизмов (Рисунок 14).

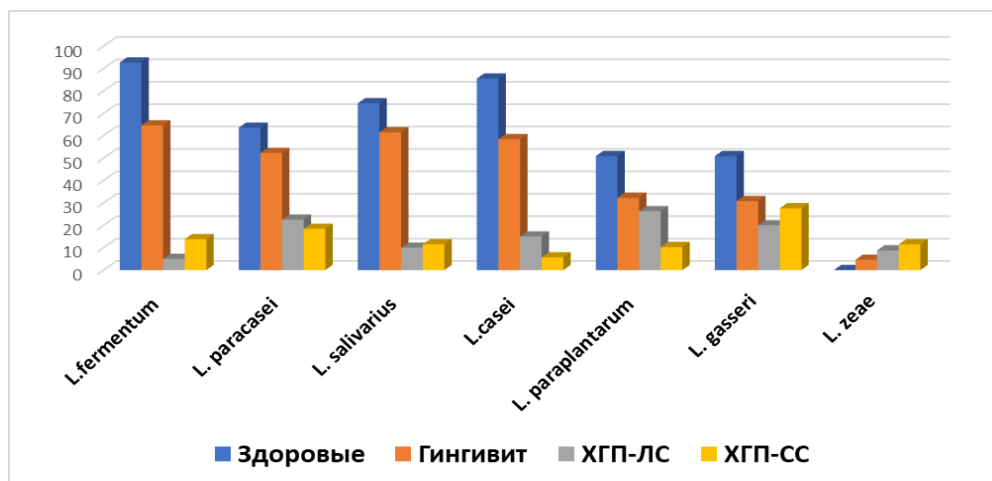


Рисунок 14 - Частота обнаружения (%) видов *Lactobacillus* spp. у обследованных лиц в анализируемых группах

Всего было идентифицировано 593 штамма лактобацилл, относящихся к 7 видам. (Таблица 10). Все штаммы одного вида были отобраны от разных пациентов для исследования генетически разнообразных лактобацилл.

Таблица 10 – Видовое разнообразие *Lactobacillus* spp., выделенных из содержимого десневых борозд и пародонтальных карманов у лиц в исследуемых группах

Вид <i>Lactobacillus</i> spp.	Количество штаммов
<i>Lactobacillus fermentum</i> (<i>Limosilactobacillus fermentum</i>)	107
<i>Lactobacillus paracasei</i> (<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>)	101
<i>Lactobacillus gasseri</i>	86
<i>Lactobacillus salivarius</i> (<i>Ligilactobacillus salivarius</i>)	98
<i>Lactobacillus casei</i> (<i>Lacticaseibacillus casei</i>)	101
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	77
<i>Lactobacillus zeae</i>	23

Адгезивная способность штаммов *Lactobacillus* spp. к буккальному эпителию. После видовой идентификации выделенные штаммы лактобацилл исследовали на наличие адгезивных свойств. Установлено, что штаммы, выделенные от конкретного индивидуума,

демонстрировали максимальную адгезивную способность (Индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) $\geq 40,0$) к его собственным буккальным эпителиоцитам по сравнению с клетками других людей. Однако при изучении перекрестной адгезии выявлено, что только 5,2% (n=31) отдельных штаммов *Lactobacillus* spp. имели высокую адгезивную способность и эффективно прикреплялись к эпителию разных людей. Такие штаммы лактобацилл с высокими показателями индекса адгезии представляют особый интерес для разработки универсальных пробиотических препаратов. К категории низкоадгезивных (ИАМ $\leq 12,5$) были отнесены 296 бактериальных штаммов (49,9% от общего количества выделенных культур). Среднеадгезивными (ИАМ от 12,51 до 39,5) оказались 266 изолятов (44,9% от общего количества выделенных культур).

Далее отобранные штаммы *Lactobacillus* spp. (n=31), которые имели высокий уровень адгезии к эпителиоцитам других людей, были исследованы на наличие таких биологических свойств, как антагонистическая активность, антибиотикочувствительность, биопленкообразование и биосовместимость.

Антагонистические свойства штаммов *Lactobacillus* spp. Антагонистические свойства изолятов лактобацилл с высокой адгезивной способностью определяли в отношении условно-патогенных микроорганизмов (тест-штаммов): *P. aeruginosa*, *E. coli* и *S. aureus*, а также к клиническим штаммам микроорганизмов – *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, выделенных из содержимого пародонтальных карманов пациентов с ХГП) (Таблица 11).

Таблица 11 – Антагонизм изолятов *Lactobacillus* spp. в отношении других микроорганизмов

Штаммы <i>Lactobacillus</i> spp. (Всего, n=31)	Диаметр зон задержки роста индикаторных клинических штаммов микроорганизмов, мм (средние показатели, p<0.05)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>L. fermentum</i> (n=13)	19±3	23±1	15±2	35±2	36±2
<i>L. casei</i> (n=18)	15±2	16±2	19±1	23±1	37±1

По результатам была отмечена антагонистическая активность лактобацилл против грамположительных бактерий, а именно *S. aureus* и *S. mutans*. Оба вида лактобацилл проявили активность, но *L. fermentum* показал более выраженное подавление роста *S. aureus* и был в среднем в 1,44 раза активнее. В случае ингибирования роста *S. mutans* наблюдалась обратная ситуация: *L. casei* демонстрирует большую активность в отношении этих бактерий – также в среднем в 1,44 раза. При этом следует отметить, что *S. mutans* в нашем исследовании выделялся не только из исследуемого материала пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, но и из содержимого десневой борозды здоровых людей, в отличие *S. aureus*, который не определялся вообще в образцах контрольной группы.

При определении антагонистической активности на граммотрицательные бактерии, а именно: *E. coli* и *P. aeruginosa*, штаммы *L. fermentum* существенно эффективнее ингибировали рост, как *E. coli* (в среднем в 1,44 раза), так и *P. aeruginosa* (в среднем в 1,52 раза). Следует отметить, что в отношении воздействия на рост *P. aeruginosa* штаммы лактобацилл обоих видов были значительно активнее.

Помимо антибактериальной активности, у штаммов лактобацилл обоих тестируемых видов выявлялась и противогрибковая активность в отношении *C. albicans* в равной степени, что указывает на их потенциал в борьбе с грибковыми инфекциями.

Данные о межвидовых взаимоотношениях микроорганизмов позволили выделить группу изолятов бактерий рода *Lactobacillus*, наиболее перспективных в отношении совместного культивирования. В результате проведенного исследования были отобраны 8 штаммов *L. fermentum* и 5 штаммов *L. casei*, которые обладали выраженным антагонизмом по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.

Способность штаммов *Lactobacillus* spp. к биопленкообразованию. При исследовании способности к биопленкообразованию у выделенных штаммов лактобацилл установлено, что изоляты значительно отличались как по динамике изменений, так и по самим значениям относительной оптической плотности сформированных биопленок на протяжении трех периодов культивирования: 3, 7 и 14 суток как в отношении штаммов *L. fermentum* (Рисунок 15), так и штаммов *L. casei* (Рисунок 16).

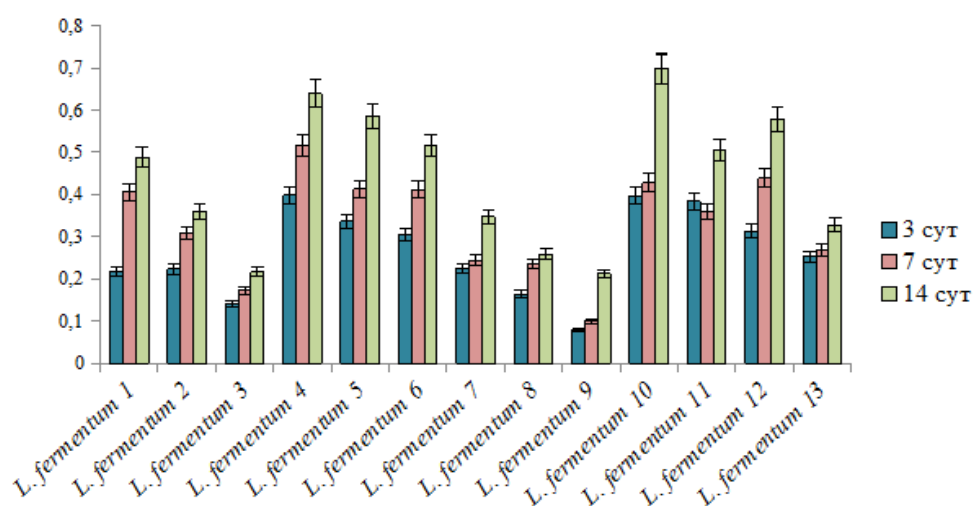


Рисунок 15 – Сравнение изменений в относительной биомассе биопленок штаммов *L. fermentum* в 3-х периодах времени

Примечание: в графиках указаны средние значения экспериментов в трех повторах.

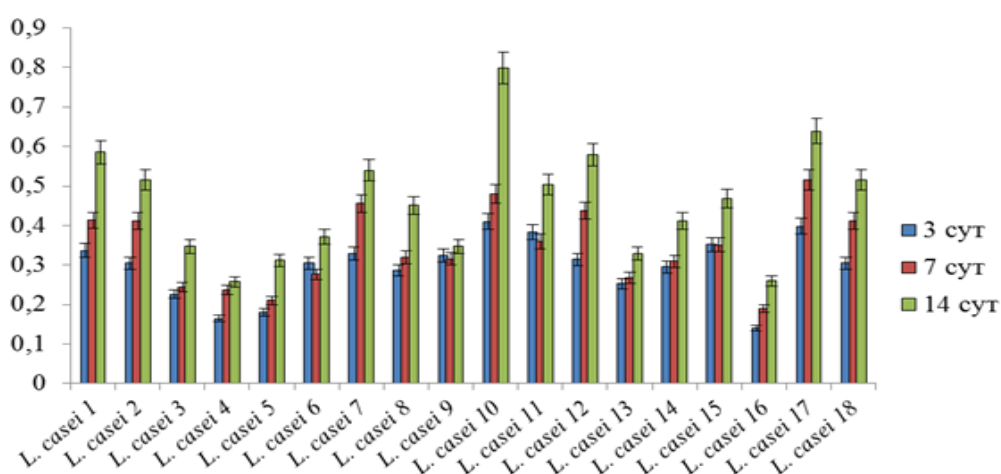


Рисунок 16 – Сравнение изменений в относительной биомассе биопленок штаммов *L. casei* в 3-х периодах времени

Примечание: в графиках указаны средние значения экспериментов в трех повторах.

В результате проведенных исследований *in vitro* установлено, что наиболее выраженной биопленкообразующей способностью характеризовались 4 штамма *L. fermentum* и 4 штамма *L.*

casei. Примечательно, что практически у всех штаммов лактобацилл наибольший прирост относительной оптической плотности биопленок достигался между 7 и 14 сутками культивирования, то есть самая высокая концентрация бактерий в биопленках регистрировалась через 2 недели. Следует отметить, что те изоляты лактобацилл, которые имели высокую способность к биопленкообразованию, одновременно характеризовались и высокой адгезивной способностью к буккальному эпителию и хорошей антагонистической активностью, что относит их к наиболее перспективным кандидатам в пробиотики.

Изучение антибиотикоустойчивости штаммов *Lactobacillus* spp. Анализ данных по определению антибиотикоустойчивости штаммов лактобацилл показал, что все изоляты (n=31) проявляли устойчивость к ванкомицину. Промежуточную устойчивость к антибиотику норфлоксацину имели 3 штамма *L. fermentum* и 8 штаммов *L. casei*; 2 изолята *L. casei* оказались умеренно устойчивыми к амикацину. К остальным антибиотикам изученные штаммы лактобацилл были чувствительны. Эти данные об антибиотикорезистентности *Lactobacillus* spp. могут представлять интерес для клиницистов при лечении инфекций ротовой полости, особенно в случаях комбинированной терапии с пробиотиками.

Биосовместимость штаммов *Lactobacillus* spp. Для оценки возможности создания пробиотических консорциумов нами проанализирована биосовместимость культур штаммов методом совместного культивирования на агаризованной питательной среде. В зонах совмещенного проникновения культуры лактобацилл развивались при взаимном присутствии (совместное культивирование), конкурируя друг с другом. По результатам экспериментов *in vitro* было сделано заключение, что все исследованные штаммы лактобацилл проявляют высокую степень биосовместимости с другими штаммами. Полную совместимость с остальными лактобациллами показали штаммы *L. fermentum* 4, 6, 9, 11 и 12, а также *L. casei* 15, 16, 21, 24, 25, 28, 30 и 31. У других штаммов проявлялась небольшая антагонистическая активность по отношению к другим лактобациллам.

В результате этих исследований были выявлены 13 штаммов (из них 8 – *Lactobacillus fermentum* (*Limosilactobacillus fermentum*) и 5 – *Lactobacillus casei* (*Lacticaseibacillus casei*)), обладающих всеми положительными характеристиками (то есть выраженным пробиотическим потенциалом), что показывает целесообразность их рассмотрения в качестве штаммов-кандидатов для последующего создания пробиотиков на основе одного штамма или в составе мультиштаммовых пробиотиков. Их использование может способствовать восстановлению микробиоценоза полости рта при дисбиотических нарушениях и повышать эффективность терапии воспалительных заболеваний пародонта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило охарактеризовать особенности состава оральной микробиоты у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, а именно – с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степенями тяжести, в сравнении со здоровыми лицами, а также выявить взаимосвязи микробиологических параметров с показателями иммунологической реактивности макроорганизма, что расширяет наши представления об этиологии и патогенезе данной патологии. Полученные результаты позволили обосновать новые подходы к оптимизации диагностики, лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта с учетом как микробиологических, так и иммунологических критериев указанной патологии. Дальнейшие исследования в этой области могут быть направлены на изучение долгосрочных эффектов пробиотической терапии/профилактики воспалительных

заболеваний пародонта и разработку новых стратегий коррекции дисбиоза ротовой полости.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Результаты данного исследования создают научную базу для дальнейшего изучения взаимосвязей между составом орального микробиоценоза и развитием воспалительных заболеваний пародонта. Особое внимание необходимо уделить роли метаболической активности нормобиоты и патогенов в этиологии и патогенезе данной группы заболеваний. Перспективным направлением научного поиска представляется разработка подходов к микробиологическому контролю патогенной биопленки с учетом индивидуальных особенностей пациента. Полученные данные могут открыть новые возможности для совершенствования диагностических/прогностических алгоритмов и разработки персонализированных подходов к лечению и профилактике стоматологической патологии. Результаты исследований в этой предметной области послужат фундаментом для создания новых терапевтических стратегий, направленных на коррекцию оральной микробиоты.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены отличия в составах оральной микробиоты пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (гингивит, пародонтит) и здоровых лиц. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом статистически значимо чаще ($p < 0,001$) выделялись микроорганизмы видов: *Streptococcus agalactiae*, *S. lutetiensis*, *S. infantis*, *S. constellatus*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii*, *Staphylococcus equorum*, *S. saprophyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pseudomycooides*, *B. megaterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rhizophila*, *Candida kefyr*, *C. dubliniensis* и *Alternaria alternata*. У пациентов с гингивитом – *Streptococcus anginosus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium amycolatum*, *Candida albicans*, *C. crusei* и *C. tropicalis* ($p < 0,001$). У лиц с хроническим генерализованным пародонтитом в оральной микробиоте многократно реже определялись комменсальные бактерии (*Streptococcus* spp. в 5,8 раза и *Lactobacillus* spp. в 4,5 раза), чем при гингивите.

2. В результате сравнительного анализа таксономического состава в содержимом десневых борозд здоровых людей и пациентов с гингивитом и пародонтальных карманов пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степенями тяжести методом секвенирования 16S рРНК установлено, что видовое разнообразие микробиома достоверно возросло с прогрессированием заболевания ($p < 0,001$). Идентифицированные консорциумы микроорганизмов в различной комбинации видов *Gemella haemolysans*, *Aggregatibacter segnis*, *Streptococcus anginosus*, *Fusobacterium canifelinum*, *Haemophilus haemolyticus*, *Veillonella parvula* и *Campylobacter gracilis* достоверно ($p < 0,05$... $p < 0,001$) чаще определялись в содержимом десневой борозды у пациентов с гингивитом по сравнению с контрольной группой, а различные ассоциации *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter sputigena*, *Streptococcus gordonii*, *Filifactor alocis*, *Gemella morbillorum*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella dispar*, *Phocaeicola abscessus* и *Desulfobulbus* sp. достоверно ($p < 0,05$... $p < 0,0001$) чаще встречались у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. При этом *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella dispar*, *Phocaeicola abscessus* не были идентифицированы в содержимом десневой борозды здоровых лиц и пациентов с гингивитом.

3. Выявлены статистически достоверные корреляции между детекцией в содержимом десневой борозды *F. canifelinum*, *G. haemolysans* и *H. haemolyticus* и наличием у пациентов гингивита ($V = 0,50 - 0,60$; $p < 0,001$), а также ассоциированность присутствия в содержимом

пародонтального кармана *F. nucleatum*, *V. dispar*, *P. gingivalis*, *F. alocis*, *C. sputigena*, *G. morbillorum*, *T. denticola* и *P. intermedia* с хроническим генерализованным пародонтитом ($V=0,50 - 0,70$; $p < 0,001$). В то же время, определены «обратные» корреляционные зависимости частоты встречаемости бактерий родов *Streptococcus* и *Lactobacillus* ($V=0,50$ и $V=0,70$ соответственно, $p < 0,001$) от наличия у пациентов хронического генерализованного пародонтита средней степени тяжести.

4. Подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры для классической ПЦР к генам *hsa* (кодирующему антиген Hs) и *GspB* (кодирующему поверхностный белок B) *Streptococcus gordonii* и *ftxA* (кодирующему белок RTX) *Filifactor alocis*. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести чаще детектированы гены факторов патогенности *S. gordonii* - *hsa* на 2,3% ($p < 0,05$), *GspB* на 20,7% ($p < 0,0001$), ген *ftxA* *F. alocis* на 12,5% ($p < 0,001$), чем у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести. Указанные гены патогенности у здоровых лиц не выявлялись, а у пациентов с гингивитом определен только ген *GspB* *S. gordonii* (всего в 6,5% случаев). Это позволяет рассматривать данные гены как биоиндикаторы тяжести течения воспалительных заболеваний пародонта.

5. Выявлены достоверные ($p < 0,05$) различия в иммунологических показателях у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степенями тяжести по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с гингивитом; у них зафиксировано значительное повышение уровней провоспалительных цитокинов – ФНО α , ИЛ-2, также уровня sIgA на фоне снижения содержания противовоспалительного маркера ИЛ-10 и фагоцитарной активности нейтрофилов. Эти данные указывают на прогрессирующий дисбаланс иммунного ответа при развитии хронического генерализованного пародонтита.

6. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом присутствие *V. dispar*, *G. haemolysans* и их ассоциаций с *F. alocis* / *F. nucleatum* / *T. forsythia* коррелирует с активацией провоспалительного ответа (повышение ФНО α , ИЛ-2, sIgA; $\tau=0,27 - 0,36$) на фоне угнетения фагоцитарной активности лейкоцитов ($\tau=-0,78$) и цитотоксической активности CD8+ лимфоцитов ($\tau=-0,34$), что сопряжено с развитием хронического воспаления в пародонте. Обнаружение *Lactobacillus fermentum/plantarum/reuteri/salivarius* ассоциировалось с подавлением провоспалительных маркеров ($\tau=-0,36$) и усилением фагоцитарной активности ($\tau=0,78$), что указывало на протективный потенциал лактобацилл.

7. Выявленный комплекс микробиологических, клинико-иммунологических и молекулярно-генетических биомаркеров воспалительных заболеваний пародонта использован при оптимизации алгоритма лабораторной диагностики данной патологии.

8. Выделены и идентифицированы 593 штамма *Lactobacillus* spp., относящихся к 7 видам: *L. fermentum* (18,1%), *L. paracasei* (17,0%), *L. gasseri* (14,5%), *L. salivarius* (16,5%), *L. casei* (17,0%), *L. paraplantarum* (13,0%) и *L. zeae* (3,9%), из которых 31 штамм (13 штаммов *L. fermentum* и 18 штаммов *L. casei*) обладали высокой перекрестной адгезией. Из них у 41,9% изолятов (9 штаммов *L. fermentum* и 4 штамма *L. casei*) выявлены высокая антогонистическая активность к условно-патогенным микроорганизмам, способность к биопленкообразованию, наличие устойчивости к антибактериальным препаратам, положительная межштаммовая биосовместимость, что позволяет считать их перспективными в качестве кандидатов для создания моно- или мультиштаммовых оральных пробиотиков для терапии воспалительных заболеваний пародонта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности диагностики гингивита и хронического генерализованного пародонтита и разработки оптимального плана лечения и профилактики данной патологии необходимо проводить бактериологическое исследование и секвенирование содержимого оральной микробиоты с определением *Gemella haemolysans*, *Streptococcus anginosus*, *Aggregatibacter segnis*, *Fusobacterium canifelinum*, *Haemophilus haemolyticus*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter sputigena*, *Streptococcus gordonii*, *Filifactor alocis*, *Gemella morbillorum*, *Phocaeicola abscessus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella dispar*, *Desulfobulbus* spp. и их факторов патогенности.

2. Для повышения эффективности диагностики и прогнозирования течения воспалительных заболеваний пародонта необходимо внедрить разработанный алгоритм лабораторной диагностики гингивита и пародонтита, основанный на микробиологических, клинико-иммунологических и молекулярно-генетических критериях, в практику стоматологических клиник.

3. Для оценки тяжести хронического генерализованного пародонтита и контроля за эффективностью профилактических и терапевтических мероприятий целесообразно использование тест-системы на основе разработанных праймеров для идентификации генов факторов патогенности (*hsa*, *GspB*, *ftxA*) *Streptococcus gordonii* и *Filifactor alocis*.

4. Выявленные и охарактеризованные штаммы *Lactobacillus* spp. (*L. fermentum* и *L. casei*) с высоким пробиотическим потенциалом следует использовать для создания оральных пробиотиков как эффективных средств профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Молекулярно-генетическая характеристика микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, перенесших Covid-19 / О.С. Гилева, Г.М. Акмалова, Ф.З. Мирсаева, **И.А. Гимранова** [и др.] // Проблемы стоматологии. - 2023. - Т. 19, № 1. - С. 30-34.
2. Характеристика оральной микробиоты у пациентов с заболеваниями слизистой оболочки рта, перенесших новую коронавирусную инфекцию / И.М. Рабинович, О.С. Гилева, Г.М. Акмалова, М.Ф. Кабирова, **И.А. Гимранова** [и др.] // Клиническая стоматология. - 2023. - Т. 26, № 2. - С. 38-43.
3. **Современные методы диагностики заболеваний пародонта: возможности и перспективы** / **И.А. Гимранова**, Л.Р. Хакимова, Г.М. Акмалова, Г.Р. Газизуллина // Клиническая лабораторная диагностика. - 2023. - Т. 68, № 9. - С. 570-577.
4. **Изучение биологических свойств аутоштаммов *Lactobacillus* spp. Для создания пробиотиков** / Л.Р. Хакимова, С.М. Потапова, Л.Р. Ахметова, **И.А. Гимранова** // Клиническая лабораторная диагностика. - 2023. - Т. 68, № 8. - С. 480-488.
5. **Гимранова, И.А. Сравнительная характеристика видового состава микробиома ротовой полости у пациентов с гингивитом и пародонтитом** / **И.А. Гимранова**, В.А. Гриценко, Г.М. Акмалова // Клиническая стоматология. - 2024. - Т. 27, № 4. - С. 76-81.
6. **Изучение биологических свойств *Lactobacillus* spp., выделенных у пациентов с заболеваниями пародонта** / **И.А. Гимранова**, Л.Р. Хакимова, Г.Р. Газизуллина [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2024. - Т. 69, № 7. - С. 341-348.

7. Культивирование *Porphyromonas gingivalis*, выделенных у пациентов с хроническим пародонтитом в лабораторных условиях / И.А. Гимранова, Л.Р. Хакимова, Г.М. Акмалова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2024. - Т. 69, № 6. - С. 272-277.
8. Роль оральной микробиоты в этиологии, патогенезе пародонтита и в системной патологии / И.А. Гимранова, В.А. Гриценко, И.М. Рабинович [и др.] // Клиническая стоматология. - 2025. - Т. 28, № 1. - С. 179-185.
9. Гимранова, И.А. Особенности микробиома пародонтальных карманов у пациентов с пародонтитом различной степени тяжести / И.А. Гимранова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2025. - Т. 70, № 6. - С. 424-433.
10. Микробиота ротовой полости пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом / И.А. Гимранова, В.А. Гриценко, Г.М. Акмалова [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2025. - Т. 21, № 1. - С.23-28.
11. Иммунологические параллели у пациентов с гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом / И.А. Гимранова, Г.М. Акмалова, Е.М. Гареев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2025. - Т. 70, № 7. - С. 477-483.
12. Факторы патогенности *Filifactor alocis* и *Streptococcus gordonii*, идентифицированных у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / И.А. Гимранова, А.Х. Баймиев, Г.М. Акмалова, В.А. Гриценко // Пародонтология. – 2025. - Т. 30, № 2. - С. 161-169.
13. Анализ состава микробиоты слизистой оболочки рта и рецидивирующих афт / Г.М. Акмалова, Р.В. Галеев, Г.Р. Маннапова, И.А. Гимранова // Российский стоматологический журнал. - 2024. - Т. 28, № 1. - С. 87-92.
14. Сравнительная характеристика микробиоты зубного камня и содержимого пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом / Д.Ю. Швец, И.А. Гимранова, Г.М. Акмалова [и др.] // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. - 2025. - № 3. - С. 61-68.
15. Молекулярные методы диагностики у пациентов с пародонтитом средней степени тяжести / И.А. Гимранова, А.Р. Мавзютов, Д.Е. Николаева, Д.М. Саньчиков // Белые цветы: сборник тезисов IX международного молодежного научного медицинского форума. – Казань, 2022. С. 306.
16. Количественный анализ микробиоты пародонтальных карманов у больных после новой коронавирусной инфекции / Д.А. Николаева, А.Р. Мавзютов, А.А. Азнагулов, И.А. Гимранова [и др.] // Проблемы медицинской микологии. - 2022. - Т. 24, № 2. - С. 108.
17. **Gimranova, I.A.** Microbiological assessment of the contents of periodontal pockets in patients with chronic generalized periodontitis / **I.A. Gimranova**, G.R. Gazizullina, A.A. Aznagulov // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration: proceedings of the International Conference. - Beijing, 2024. - P. 57-60.
18. Характеристика оральной микробиоты у пациентов с пародонтитом в постковидный период / И.А. Гимранова, Г.М. Акмалова, Д.Ю. Швец [и др.] // От рождения до активного долголетия: сборник тезисов докладов II Международного форума геномных и биомедицинских технологий. - Сургут, 2024. - С. 20-21.
19. Биопленкообразование штаммов *Lactobacillus* spp. выделенных из пародонтальных карманов пациентов с пародонтитом / И.А. Гимранова, Л.Р. Хакимова, Г.М. Акмалова [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа: материалы II Российского конгресса

по медицинской микробиологии и инфектологии. – М., 2024. - С. 296-298.

20. Сравнительная характеристика видового состава микробиома ротовой полости у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / И.А. **Гимранова**, В.А. Гриценко, Г.М. Акмалова [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа: материалы III Российского конгресса по медицинской микробиологии и инфектологии. – М., 2025. - С. 290-292.
21. Абрамишвили, Я.Р. Микробиота ротовой полости пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом / Я.Р. Абрамишвили, **И.А. Гимранова** // Мечниковские чтения – 2025: материалы 98-й Всероссийской научно-практической конференции студенческого научного общества с международным участием. – М., 2025. - С. 256.
22. Первушин, А.В. Изучение биологических свойств *Lactobacillus* spp., выделенных у пациентов с заболеваниями пародонта / А.В. Первушин, **И.А. Гимранова** // Мечниковские чтения – 2025: материалы 98-й Всероссийской научно-практической конференции студенческого научного общества с международным участием. – М., 2025. - С. 270.
23. **Гимранова, И.А.** Микробиом пародонтальных карманов пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом / **И.А. Гимранова** // Проблемы медицинской микологии. – 2025. - Т. 27, № 2. - С. 115.
24. Особенности микробиоты зубного камня у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта / Д.З. Валиахметова, **И.А. Гимранова**, Г.Р. Газизуллина [и др.] // Проблемы медицинской микологии. - 2025. - Т. 27, № 2. - С. 105.
25. Оксидативный стресс и состав микробиоты зубного камня: анализ взаимосвязи / А.В. Первушин, Ю.Л. Борцова, **И.А. Гимранова** [и др.] // Клиника, генетика, лаборатория – 2025: материалы Ежегодной научно-практической конференции. – СПб., 2025. - С. 46-47.

Результаты интеллектуальной деятельности

26. Питательная среда для выделения чистой культуры *Porphyromonas gingivalis*: пат. Рос. Федерация № 2802078, RU, C12N 1/20; C12N 1/02; C12R 1/01 / **Гимранова И.А.**, Хлопова К.В., Николаева Д.А., Акмалова Г.М., Азнагулов А.А., Газизуллина Г.Р. - Заявл. 31.03.2023; опубл. 22.08.2023; Бюллетень «Изобретения. Полезные модели», 2023. № 24.
27. Способ формирования биопленки *Lactobacillus fermentum*, выделенных из пародонтальных карманов, на инертных поверхностях: пат. Рос. Федерация № 2817419, RU, C12N 1/20 / **Гимранова И.А.**, Газизуллина Г.Р., Акмалова Г.М., Хакимова Л.Р., Швец Д.Ю., Азнагулов А.А. - Заявл. 24.11.2023; опубл. 16.04.2024; Бюллетень «Изобретения. Полезные модели», 2024. № 11.
28. Способ формирования биопленки *Lactobacillus casei*, выделенных из пародонтальных карманов, на инертных поверхностях: пат. Рос. Федерация № 2819447, RU, C12N 1/20 C12N 11/14; C12R 2001/245 / **Гимранова И.А.**, Газизуллина Г.Р., Акмалова Г.М., Хакимова Л.Р., Швец Д.Ю., Азнагулов А.А. - Заявл. 24.11.2023; опубл. 21.05.2024; Бюллетень «Изобретения. Полезные модели», 2024. № 15.
29. Способ прогнозирования тяжести воспалительных заболеваний пародонта по составу микробиоты: пат. Рос. Федерация № 2849647, RU, C12Q 1/14 / **Гимранова И.А.**, Акмалова Г.М., Швец Д.Ю., Газизуллина Г.Р. - Заявл. 27.01.2025; опубл. 28.10.2025; Бюллетень «Изобретения. Полезные модели», 2025. № 31.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБП – антибактериальные препараты

ИАМ – индекс адгезивности микроорганизмов

ИФА – иммуноферментный анализ

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

sIgA – секреторный иммуноглобулин А

КОЕ – колониеобразующие единицы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФНО α – фактор некроза опухоли-альфа

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

ХГП-ЛС – хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести

ХГП-СС – хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести