

# Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа

В.Н.Царёв<sup>1</sup>, С.Д.Арутюнов<sup>1</sup>, И.П.Балмасова<sup>1</sup>, Э.А.Бабаев<sup>1</sup>,  
Е.Н.Николаева<sup>1</sup>, Е.В.Ипполитов<sup>1</sup>, Е.Н.Ильина<sup>2</sup>, А.Г.Габибов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

Известно, что маркерами развивающегося пародонтита могут служить микробы-прокариоты так называемого «red-complex», или пародонтопатогены 1-го порядка – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Течение сахарного диабета II типа сопровождается прогрессирующей атрофией альвеолярной костной ткани, развитием хронического пародонтита, приводящего к полной потере зубов. При анализе метагенома зубодесневой борозды, основанном на секвенировании 16S ДНК бактерий, статистически значимым было различие по наличию при пародонтите представителей семейств *Porphyromonadaceae* и *Fusobacteriaceae*, которые в случае сочетания пародонтита с сахарным диабетом II типа встречались в 1,9 раза чаще и в состав которых входили пародонтопатогены 1-го порядка, установленные методом ПЦР. При пародонтите отмечено достоверное снижение в биопленке бактерий семейства *Sphingobacteriaceae*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу изменения микробиоты при сочетанной патологии и возможного патогенетического значения наблюдаемых изменений.

**Ключевые слова:** пародонтит, сахарный диабет II типа, пародонтопатогены 1-го порядка, 16S секвенирование, метагеномный анализ, ПЦР, микробиота, *Sphingobacteriaceae*

**Для цитирования:** Царёв В.Н., Арутюнов С.Д., Балмасова И.П., Бабаев Э.А., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Ильина Е.Н., Габибов А.Г. Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа. Бактериология. 2018; 3(2): 30–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37

## Molecular diagnostic of periodontitis and metagenomic analysis of the periodontum microbiota in patients by type II diabetes mellitus

V.N.Tsarev<sup>1</sup>, S.D.Arutunov<sup>1</sup>, I.P.Balmasova<sup>1</sup>, E.A.Babaev<sup>1</sup>,  
E.N.Nikolaeva<sup>1</sup>, E.V.Ippolitov<sup>1</sup>, E.N.Ilina<sup>2</sup>, A.G.Gabibov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

It is known that the markers of periodontitis progression is linked with the development of “red-complex” prokaryotes or periodontopathogenes of type I – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. It is widely accepted that diabetes mellitus is associated with several complications such as: progressive atrophy of alveolar

### Для корреспонденции:

Царёв Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России

Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1

Телефон: (495) 609-6700

E-mail: nikola777@rambler.ru

Статья поступила 17.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

### For correspondence:

Viktor N. Tsarev, MD, PhD, DSc, professor, director of Research Institute of Medicine and Dentistry, head of department by microbiology, virology, immunology of A.I.Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry

Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation

Phone: (495) 609-6700

E-mail: nikola777@rambler.ru

The article was received 17.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

bone tissue, development of periodontitis, leading to complete loss of teeth. Metagenomic analysis of the microbiota of the dentogingival sulcus, based on the sequencing of 16S DNA bacteria, showed statistically significant difference in the presence of representatives of the *Porphyromonadaceae* and *Fusobacteriaceae*, which in the case of a combination of periodontitis with type 2 diabetes were 1.9 times more common. A significant reduction of bacteria of *Sphingobacteriaceae* representatives have also observed in periodontitis biofilms. The results support the change in the microbiota in the studied combined pathology and possible pathogenetic values observed changes.

**Keywords:** *periodontitis, type II diabetes, periodontopathogenes of type I, 16S sequencing, metagenomic analysis, PCR, microbiota, Sphingobacteriaceae*

**For citation:** Tsarev V.N., Arutunov S.D., Balmasova I.P., Babaev E.A., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V., Ilina E.N., Gabibov A.G. Molecular diagnostic of periodontitis and metagenomic analysis of the periodontum microbiota in patients by type II diabetes mellitus. *Bacteriology*. 2018; 3(2): 30–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37

**В** последнее время все больше утверждается концепция, что хронический генерализованный пародонтит нельзя рассматривать в рамках частной патологии. Установлено, что это заболевание имеет ассоциативные взаимосвязи с различными эндокринными, иммунологическими и другими системными расстройствами, которые, в свою очередь, могут быть причиной других болезней, возможно, являющихся вторичными по отношению к самому пародонтиту. Одной из безусловно сопряженных патологий является сахарный диабет. Пародонтит у больных сахарным диабетом имеет те же формы по клиническому течению, по тяжести проявлений, по онтогенетическому признаку, по распространенности, что и у лиц, страдающих пародонтитом, но не имеющих сахарного диабета. Однако, пародонтит у больных сахарным диабетом, по мнению многих авторов, плохо поддается лечению и имеет неблагоприятный прогноз [1–3].

В России в настоящее время более 2,5 млн человек страдают сахарным диабетом, среди которых 90% приходится на сахарный диабет II типа. Примерно через год после выявления сахарного диабета 100% пациентов имеют признаки хронического пародонтита с перспективой полной потери зубов [4]. С другой стороны, по результатам многочисленных исследований проблемы, пародонтит является самым частым осложнением сахарного диабета, который неизбежно развивается практически у каждого заболевшего. При этом пародонтит не только сам является осложнением, но и увеличивает риск других осложнений, так как затрудняет проведение полноценной диетотерапии и коррекцию присущих диабету метаболических нарушений, снижает регенеративную способность тканей пародонта и резко ухудшает качество жизни больных диабетом [1, 5].

Важными патогенетическими звеньями в развитии и прогрессировании заболеваний пародонта при сахарном диабете считают микроциркуляторные расстройства (диабетические микроангиопатии), нарушения в иммунной системе, ацидоз. Расстройства микроциркуляции и функций иммунных клеток могут быть как первичными (под влиянием сахарного диабета), так и вторичными (под влиянием воспалительного процесса в пародонте). Причина воспалительных процессов в пародонте – ксеростомия и вторичный иммунодефицит. Заболевания пародонта можно отнести к группе малых признаков сахарного диабета [2, 6].

Авторы многоцентровых исследований в мире склоняются к выводу о том, что пародонтопатогенные бактерии явля-

ются одним из факторов, инициирующих развитие сахарного диабета [1, 2, 7].

Условия для достаточно устойчивой взаимосвязи пародонтита с сахарным диабетом II типа возникают в связи с тем, что сахарному диабету сопутствует целый ряд метаболических и иммунологических сдвигов, включающих оксидативный стресс, изменение профиля цитокинной продукции в иммунной системе, модуляцию рецепторного аппарата клеток и т.д. [1, 3, 6, 8]. Указанные сдвиги в сочетании с ростом содержания глюкозы в ротовой жидкости создают условия для изменения микробиоты полости рта, появления в ее составе пародонтопатогенных видов и, как следствие, – развития хронического рецидивирующего воспалительного процесса в пародонте с последующей деструкцией альвеолярной кости и выпадением зубов [5, 9].

Перечисленные выше факторы определяют прогрессирование пародонтита, первичным звеном которого является, как известно, колонизация поддесневой биопленки пародонтопатогенными видами «красного комплекса», или 1 порядка. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* – основные пародонтопатогены 1 порядка, обладающие высокой вирулентностью и способностью к внутриклеточному паразитизму, которые определяют развитие воспалительно-деструктивного процесса, составляющего клиническую и морфологическую сущность пародонтита [2, 5, 9–11].

Существенную роль в деструкции тканей пародонта при наличии прочих факторов риска и образования устойчивых ассоциаций ранних, промежуточных и поздних колонизаторов играют пародонтопатогенные виды 2 порядка – *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Wolinella recta*. Параллельно рассматриваются такие неблагоприятные факторы, как неудовлетворительная гигиена полости рта, профессиональные вредности, нерациональная диета, в частности, снижение употребления белковых продуктов и отсутствие грубой пищи, снижающей нагрузку на пародонт, курение, неблагоприятные экологические факторы [1, 2, 5, 9].

Учитывая тот факт, что в составе биопленки микробиота функционирует как единый биологический комплекс [12], особое значение в расшифровке патогенеза пародонтита, в частности, при сахарном диабете II типа, приобретает получение с помощью новых технологий «микробного портрета» биопленки десневого кармана, что создает перспективу

прогнозирования риска развития и тяжести течения хронического пародонтита, а в дальнейшем – разработку новых принципов коррекции пародонтопатогенного характера микробиоты при данной патологии как элемента персонифицированной медицины будущего.

В связи с этим целью исследования было определение особенностей микробного состава биопленки зубодесневой борозды при хроническом пародонтите и сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом II типа на основе применения современных молекулярных и метагеномных технологий.

### Пациенты и методы

Нами проведено комплексное стоматологическое обследование 74 пациентов, обратившихся к стоматологу для лечения или с профилактической целью, которые соответствовали критериям включения в исследование и заполнили информированное согласие.

Группу 1 составили 22 пациента (11 мужчин и 11 женщин в возрасте 47–63 лет), у которых СД II типа сочетался с явлениями хронического пародонтита. Им был поставлен диагноз пародонтита средней степени тяжести, подтвержденный детальной характеристикой стоматологического статуса (табл. 1) и результатами ПЦР-диагностики на обнаружение генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий 1-го и 2-го порядка.

В группу 2 вошли 30 пациентов (13 мужчин и 17 женщин в возрасте 42–60 лет), которые не предъявляли жалоб, а воспалительные заболевания пародонта были выявлены у них при обращении по поводу лечения кариеса и его осложнений. На основании клинических данных, показателей пародонтальных индексов (табл. 1) и результатов ПЦР-диагностики им был поставлен диагноз «пародонтит средней степени тяжести», подтвержденный детальной характеристикой стоматологического статуса (табл. 1) и результатами ПЦР-диагностики.

Контрольную группу 3 сформировали 22 лица (9 мужчин и 13 женщин в возрасте 25–28 лет) со здоровым (интактным) пародонтом и отсутствием СД II типа. В эту группу включены только обследуемые с отрицательными результатами ПЦР-диагностики на обнаружение генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий 1-го и 2-го порядка.

Гигиеническое состояние пациентов групп сравнения 1 и 2 было удовлетворительным и сопоставимым. По данным анамнеза у пациентов этих групп были выявлены следующие коморбидные заболевания: вегето-сосудистая дистония, симптоматическая артериальная гипертензия, артериальная гипертензия. Давность заболевания пародонтитом составляла 5–10 лет. Проводимое ранее пародонтологическое лечение пациентов обеих групп включало удаление зубных отложений, местную противовоспалительную терапию и по показаниям – юретаж пародонтальных карманов.

У обследуемых контрольной группы 3 (без хронического пародонтита и СД II типа) гигиеническое состояние десен было хорошим, а пародонтологические индексы соответствовали нормальным значениям (см. табл. 1).

Срок наблюдения за всеми обследуемыми был 1,5 года.

Таблица 1. Состояние гигиены и пародонтальные индексы обследуемых в группах сравнения

| №  | Группа                                                          | Индексы       |     |                |     |     |
|----|-----------------------------------------------------------------|---------------|-----|----------------|-----|-----|
|    |                                                                 | гигиенические |     | пародонтальные |     |     |
|    |                                                                 | ОHI-S         | RHP | PMA            | PI  | PDI |
| 1. | Пародонтит (+) СД тип 2 (+)                                     | 1,1           | 1,1 | 56,4%          | 3,9 | 3,4 |
| 2. | Пародонтит (+) СД тип 2 (–)                                     | 0,7           | 0,7 | 44,8%          | 3,6 | 3,1 |
| 3. | Здоровый пародонт:                                              |               |     |                |     |     |
|    | Пародонтит (–) СД тип 2 (–)                                     | 0,6           | 0,5 | 11,7%          | 0   | 2,1 |
| 3. | Пародонтит (+) СД тип 2 (–),<br>но через 1,5 года: СД тип 2 (+) | 1,2           | 1,1 | 47,6%          | 3,8 | 3,2 |

Взятие материала проводилось из 4 участков в области зубодесневой борозды с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (№30), которые помещали в пробирку с 0,2 мл физиологического раствора.

**Молекулярно-генетические исследования.** Экстракцию ДНК выполняли с использованием набора ДНК-экспресс (ООО НПФ «Литех») в соответствии с инструкцией производителя. В случае необходимости выделенную ДНК хранили при температуре –20°C. Качественную оценку частоты выявления маркерной ДНК пародонтопатогенов 1 и части пародонтопатогенов 2 порядка (*T. denticola*, *P. intermedia*) проводили с помощью системы Мульти-Дент-5 (ООО НПФ «ГенЛаб», Россия). Для выявления остальных пародонтопатогенов 2 порядка использовали систему Micro-IDent@plus («Hain Lifescience», Германия), использующую принцип обратной гибридизации [11].

Количественную оценку содержания маркерной ДНК *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *F. nucleatum/periodonticum*, *P. endodontalis* в зубодесневом налете проводили с использованием набора «Дентоскрин» производства ООО НПФ «Литех», в соответствии с инструкцией (количественная ПЦР в реальном времени) [7].

Тотальную ДНК из образцов зубного налета выделяли с использованием QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Библиотеку ампликонов для 16S секвенирования готовили с использованием праймеров 341F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') и 801R (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Part #15044223 Rev. B). Секвенирование библиотеки и анализ полученных данных осуществляли с использованием генетического анализатора MiSeq (Illumina) и MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycle) в соответствии с инструкциями производителя. Визуализацию результатов осуществляли с использованием программы MEGAN5 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan5/>).

Статистическую обработку результатов проводили посредством пакета статистических программ SPSS, версия 21.

### Результаты и обсуждение

При использовании классического подхода оценки частоты обнаружения маркерной ДНК пародонтопатогенных видов, прежде всего, мы обращали внимание на выделение пародонтопатогенных бактерий «красного комплекса», или 1 порядка [11, 12]. При этом были установлены существен-

Таблица 2. Показатели содержания пародонтопатогенных бактерий в десневой жидкости пациентов групп сравнения

| Вид пародонтопатогенных бактерий  | Медиана [минимум; максимум] в геном-эквивалентах на 1 мл десневой жидкости |                      |                     | Вероятность различий по критерию $\chi^2$ |        |       |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------------|--------|-------|
|                                   | больные сахарным диабетом и пародонтитом                                   | больные пародонтитом | здоровые лица       | $p_1$                                     | $p_2$  | $p_3$ |
| <i>P. gingivalis</i>              | 45 258 [0; 860000]                                                         | 27 [0; 71900]        | 0 [0; 102]          | 0,001*                                    | 0,001* | 0,238 |
| <i>T. forsythia</i>               | 1215 [0; 750000]                                                           | 124 [0; 624000]      | 0 [0; 293000]       | 0,308                                     | 0,046* | 0,313 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i>   | 649 [0; 138000]                                                            | 177 [0; 2990000]     | 0 [0; 2990000]      | 0,355                                     | 0,865  | 0,539 |
| <i>T. denticola</i>               | 54 200 [0; 1160000]                                                        | 1053 [0; 2890000]    | 0 [0; 2890000]      | 0,005*                                    | 0,005* | 0,769 |
| <i>P. intermedia</i>              | 138 [0; 940000]                                                            | 76 [0; 471000]       | 0 [0; 95200]        | 0,300                                     | 0,261  | 0,920 |
| <i>F. nucleatum/periodonticum</i> | 72 800 [120; 732000]                                                       | 3000 [0; 2320000]    | 57 400 [0; 2320000] | 0,030*                                    | 0,336  | 0,441 |
| <i>P. endodontalis</i>            | 5840 [0; 880000]                                                           | 546 [0; 1160000]     | 0 [0; 1160000]      | 0,298                                     | 0,300  | 0,968 |

Примечание:  $p_1$  – вероятность различий в группах больных сахарным диабетом/пародонтитом и только пародонтитом,  $p_2$  – вероятность различий в группах больных сахарным диабетом/пародонтитом и здоровых лиц,  $p_3$  – вероятность различий в группах больных пародонтитом и здоровых лиц, \* – достоверность различий по критерию Манна–Уитни при  $p < 0,05$ .

ные различия по частоте ассоциаций пародонтопатогенов и их видовому составу, то есть по числу входящих в их состав видов. Оказалось, что только у одного из 22 человек контрольной группы с интактным пародонтом (4,6%) была выявлена ДНК *A. actinomycetemcomitans*, у двух человек (9,1%) – *T. forsythia*, а *P. gingivalis* в норме не выявляли. Частота обнаружения пародонтопатогенов 2 порядка в этой группе была следующей: у одного пациента (4,6%) выявлена ДНК *T. denticola* и *P. intermedia*, *P. micra* выявили в четырех образцах (18,1%), *C. rectus*, *E. nodatum* – в трех (13,6%), *E. corrodens* – в одном (4,6%) и чаще всего – *F. nucleatum* и *Capnocytophaga spp.* – в семи (31,8%) образцах.

В итоге у 17 человек контрольной группы с интактным пародонтом в области зубодесневой борозды (77,3%) не было выявлено ни одного из исследуемых нами видов пародонтопатогенов 2 порядка, у 5 (22,7%) – выявлена маркерная ДНК одного вида, и у одного (4,5%) – двух видов.

Напротив, у больных хроническим пародонтитом (30 пациентов) хотя бы один вид из трех представителей пародонтопатогенной группы 1 порядка определяли у всех больных хроническим пародонтитом. Один вид пародонтопатогенов 1 порядка был определен у двух пациентов (6,6%), два вида – у пяти (16,7%), три вида – у десяти (33,3%), четыре вида – у шести (20%) и пять видов – у пяти (16,7%) больных хроническим пародонтитом (с участием пародонтопатогенов 2 порядка).

Схожая картина наблюдалась при пародонтите, осложнившем течение сахарного диабета II типа (22 пациента). Хотя бы один вид из трех представителей пародонтопатогенной группы 1 порядка определяли у всех больных хроническим пародонтитом с сахарным диабетом, так же, как и без такового, однако частота выявления разных видов в ассоциациях у пациентов данной группы существенно возрас- тала ( $p < 0,05$ ). Так, один вид пародонтопатогенов 1 порядка был определен у трех пациентов (14,6%), два вида – у пяти (22,7%), три вида – у одиннадцати (50,0%), четыре вида – у шести (27,2%) и пять видов – у семи (31,8 %) больных хроническим пародонтитом (с участием пародонтопатогенов 2 порядка).

Таким образом, многовидовые ассоциации пародонтопатогенных бактерий гораздо чаще встречались в области зубодесневой борозды у больных хроническим пародонтитом при его сочетании с сахарным диабетом. Причем примерно у 2/3 пациентов с хроническим пародонтитом были выявлены ассоциации 2–4 видов пародонтопатогенов 1 и 2 порядка, а частота выявления ассо-

циаций пародонтопатогенных бактерий 1 и 2 порядка у больных пародонтитом и сахарным диабетом II типа была в 1,5–2 раза выше, чем при пародонтите без сахарного диабета.

Интересные результаты были получены по данным молекулярной диагностики с помощью ПЦР в реальном времени при анализе частоты выделения пародонтопатогенов 1 и 2 порядка в составе микробиоты зубодесневой борозды. В процессе исследования мы регистрировали частоту встречаемости каждого из 7 определяемых видов бактерий у пациентов основной группы и групп сравнения в количестве, превышающем установленные пороговые значения:  $10^4$  – для *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,  $10^5$  – для *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*,  $10^6$  – для *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*. В контрольной группе здоровых лиц с интактным пародонтом указанные пороговые значения были превышены в единичных случаях. Одновременно проводили сопоставление абсолютных значений количественной ПЦР в реальном времени, выраженных в геном-эквиваленте/мл между группами сравнения,

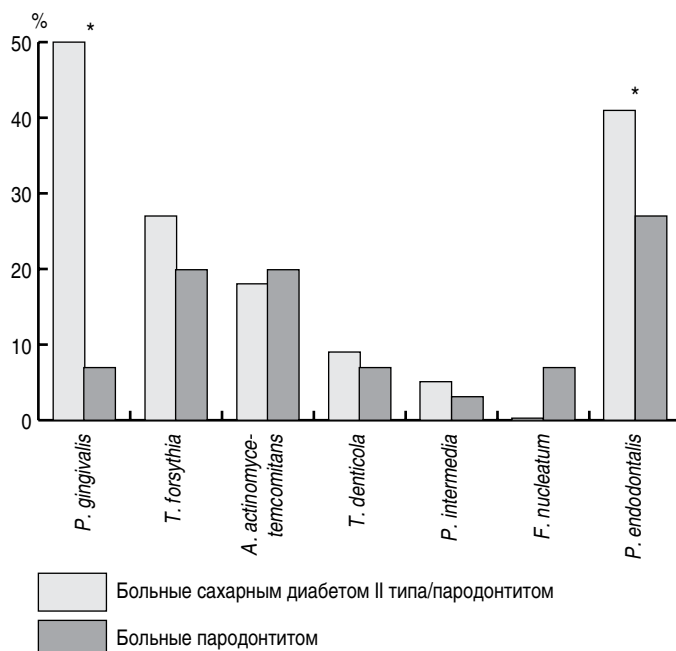


Рис. 1. Частота выделения маркерной ДНК отдельных видов пародонтопатогенных бактерий у больных сахарным диабетом II типа + хроническим пародонтитом и только хроническим пародонтитом по данным ПЦР в реальном времени.



которые продемонстрировали статистически значимые различия (табл. 2).

Анализ частоты выделения маркерной ДНК показал, что наиболее часто встречающимися видами пародонтопатогенных микроорганизмов были *Porphyromonas gingivalis* – возбудитель, обладающий наиболее значительным набором факторов патогенности из группы пародонтопатогенных видов, и близкий к нему – *Porphyromonas endodontalis*. Именно эти пародонтопатогены регистрировались с достоверно более высокой частотой при пародонтите, развившемся на фоне сахарного диабета II типа (рис. 1).

Однако более детальный сравнительный анализ количественного содержания пародонтопатогенных видов микроорганизмов, в отличие от описанного выше классического

частотного способа, принятого в клинко-стоматологической практике, позволил выявить гораздо более широкий спектр различий, особенно при сопоставлении с группой здоровых лиц.

Так, у больных сахарным диабетом II типа развитие пародонтита сопровождалось достоверным ростом содержания в жидкости зубодесневой борозды *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, а при сопоставлении с группой больных пародонтитом – еще и *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, при отсутствии различий по содержанию *Tanerella forsythia* и других идентифицированных видов.

Далее была сделана попытка выяснить, не влияет ли сахарный диабет II типа на вовлечение в поражение паронихии.

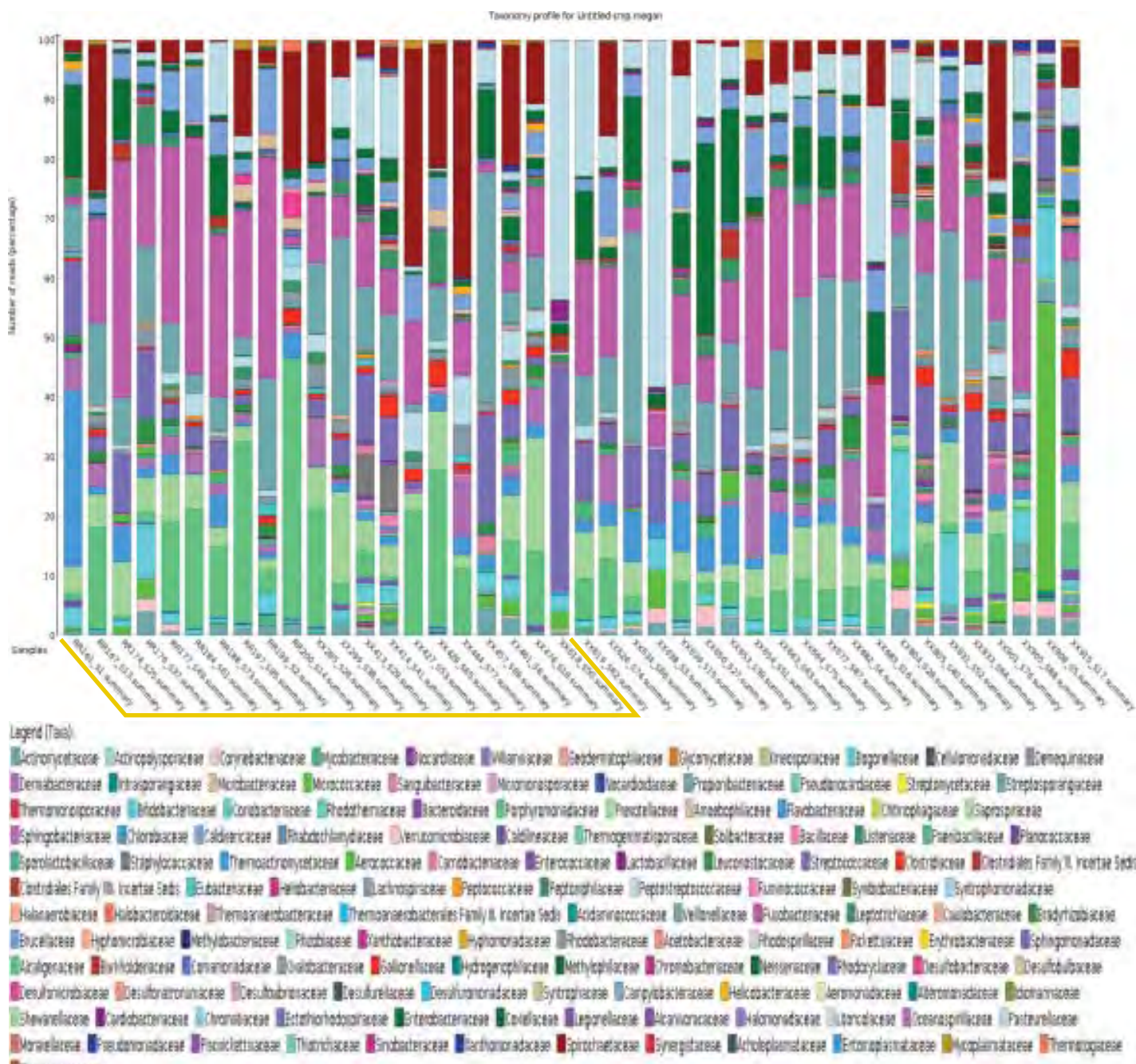


Рис. 2. Таксономический профиль больных пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом II типа и в отсутствие сопутствующей патологии по данным метагеномного анализа (желтым цветом отмечены больные сахарным диабетом II типа/пародонтитом).

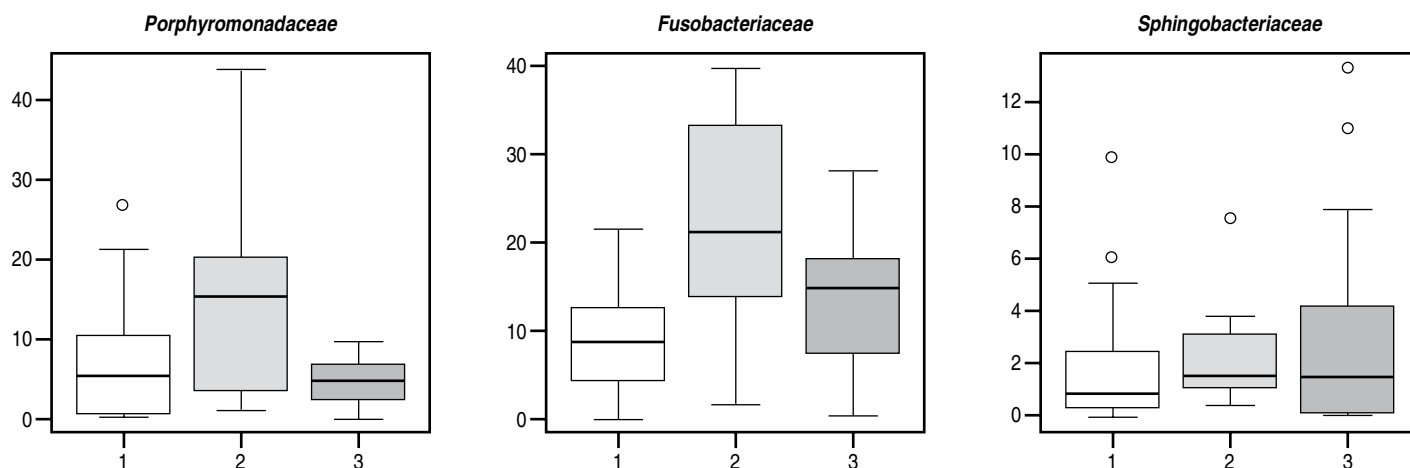


Рис. 3. 95% доверительные интервалы частоты встречаемости в составе микробиоты зубодесневой борозды представителей семейств *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* (1 – больные пародонтитом, 2 – больные сахарным диабетом II типа/пародонтитом, 3 – здоровые лица группы контроля).

донта представителей каких-либо других семейств бактерий, определяемых методом секвенирования гена 16S рибосомной РНК. Результаты такого исследования по определению таксономического профиля микробиоты зубодесневой борозды у больных групп сравнения представлены на рисунке 2.

Установлено, что статистически значимым было только различие по наличию в составе микробиоты зубодесневой борозды представителей семейств *Porphyromonadaceae* и *Fusobacteriaceae*, которые в случае сочетания пародонтита с сахарным диабетом II типа встречались в 1,9 раза чаще (рис. 3). В состав именно этих семейств входят *Porphyromonas gingivalis* и *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, этиологическое значение которых при сочетании названных патологических состояний уже было отмечено выше.

Есть и еще одно интересное наблюдение, которое свидетельствует о значительном уменьшении в составе биопленок при пародонтите независимо от сопутствующей патологии представителей семейства *Sphingobacteriaceae* (рис. 3), которые, возможно, принимают участие в формировании компонентов матрикса смешанных биопленок в организме, что по-новому позволяет объяснить структурные различия биопленок, формируемых в норме и при пародонтите, выявленные ранее с помощью сканирующей электронной микроскопии [10].

В заключение следует отметить следующее. В настоящей работе представлен материал, обобщающий метагеномные исследования микрофлоры пародонта у представителей населения Московской области. Основная особенность формирования пародонтопатогенной микрофлоры у больных сахарным диабетом II типа касалась более значительной роли в этиологии пародонтита наиболее патогенного вида – *Porphyromonas gingivalis*, который относится к пародонтопатогенным видам 1 порядка [6]. Что касается *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*, то их роль в этиологии пародонтита оставалась неизменной независимо от сопутствующей патологии. Определенное этиологическое значение имели также и пародонтопатогенные виды 2 порядка, выполняющие при формировании биопленок роль промежу-

точных колонизаторов, в частности, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*.

При этом отдельного внимания требует вновь установленный факт снижения в составе биопленки при пародонтите бактерий семейства *Sphingobacteriaceae*, участвующих в продукции и обмене сфинголипидов с их способностью влиять на обменные процессы, в том числе и на чувствительность клеток к инсулину [13]. Описанный феномен лишний раз подтверждает концепцию о первичной роли пародонтита в патогенезе сахарного диабета II типа.

Возможно, что одной из причин прогрессирования диабета является индукция пародонтопатогенными видами в очаге воспаления провоспалительных цитокинов, которые, как известно, повышают резистентность к инсулину. Повидимому, хроническое рецидивирующее воспаление при пародонтите способствует развитию дисбиотических сдвигов, а затем – диабета и сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6, 8].

На основании полученных данных можно заключить, что современные технологии анализа микробиоты биопленки полости рта расширяют наши возможности в раскрытии новых сторон патогенеза такого частого стоматологического заболевания как хронический пародонтит в его взаимодействии с соматической патологией, в частности, с сахарным диабетом II типа. Очевидно, что в результате введения в лабораторную практику новых молекулярно-биологических технологий, основанных на приемах ПЦР-диагностики и высокопроизводительного секвенирования, удалось обнаружить и другие микроорганизмы, которые культивируются и не выявляются при обычном бактериологическом исследовании, в частности, представители семейства *Sphingobacteriaceae*.

## Литература

1. Янушевич ОО, Царев ВН, Парунова СН. Влияние микрофлоры полости рта на регенерацию тканей пародонта у больных сахарным диабетом. Ортодонтия. 2004;3:15-7.
2. Matsushita K, Hamaguchi M, Hashimoto M, Yamazaki M, Yamazaki T, Asai K, et al. The novel association between red complex of oral microbe and body mass index

- in healthy Japanese: a population based cross-sectional study. *J Clin Biochem Nutr.* 2015 Sep;57(2):135-9. DOI: 10.3164/jcbs.15-19.
3. Patil VS, Patil VP, Gokhale N, Acharya A, Kangokar P. Chronic periodontitis in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress as a common factor in periodontal tissue injury. *J Clin Diagn Res.* 2016 Apr;10(4):BC12-6. DOI: 10.7860/JCDR/2016/17350.7542
4. Богомолов МВ. Пародонтит как неспецифическое осложнение сахарного диабета. Подходы к профилактике. *Русский медицинский журнал.* 2011; 13:828-32.
5. Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, Dong Q. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One.* 2013 Apr 22;8(4):e61516. DOI: 10.1371/journal.pone.0061516
6. Орехова ЛЮ, Осипова МВ. Патология пародонта при сахарном диабете. В кн.: Национальное руководство. Пародонтология. Под ред. чл.-корр. РАН, проф. О.О.Янушевича, проф. Л.А. Дмитриевой. 2-е издание. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2018, с. 293-297.
7. Ребриков ДВ. ПЦР в реальном времени. М.: БИНОМ, 2014, 223 с.
8. Wang G.P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Med.* 2015 Apr 27;7(1):40. DOI: 10.1186/s13073-015-0165-z.
9. Царев ВН, Николаева ЕН, Ипполитов ЕВ. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2017;5:101-12.
10. Ипполитов ЕВ, Диденко ЛВ, Царёв ВН. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015;60(12):59-64.
11. Николаева ЕН, Царев ВН, Панин АМ, Чувилин ВИ, Ипполитов ЕВ, Хитаршвили МВ, и др. Ассоциативные связи пародонтопатогенных видов бактерий I и II порядков в смешанных биопленках у пациентов с перимплантитом. *Стоматология для всех.* 2014;4:38-42.
12. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Feb;19(2):107-12. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.
13. Straczowski M, Kowalska I. The role of skeletal muscle sphingolipids in the development of insulin resistance. *Rev Diabet Stud.* 2008 Spring;5(1):13-24. DOI: 10.1900/RDS.2008.5.13
6. Orekhova LYU, Osipova MV. Pathology of periodontal disease in diabetes mellitus. In: O.O.Yanushevich, L.A.Dmitriyev. *Periodontics.* 2nd ed. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2018, pp. 293-7. (In Russian).
7. Rebrikov DV. Real-time PCR. Moscow: "BINOM" Publ., 2014, 223 p. (In Russian).
8. Wang G.P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Med.* 2015 Apr 27;7(1):40. DOI: 10.1186/s13073-015-0165-z.
9. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Ippolitov EV. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2017;5:101-12. (In Russian).
10. Ippolitov EV, Didenko LV, Tsarev VN. The characteristics of morphology of biofilm of periodontium under inflammatory diseases of gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, Candida-associated periodontitis) according results of electronic microscopy. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2015;60(12):59-64. (In Russian).
11. Nikolaeva EN, Tsarev VN, Panin AM, Chuvilkin VI, Ippolitov EV, Hitarshvili MV, et al. Studying associative communications of periodontal pathogenic kinds of bacteria of I and II orders at patients with peri-implantitis. *Stomatologiya dlya vsekh (International Dental Review).* 2014;4:38-42.
12. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Feb;19(2):107-12. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x.
13. Straczowski M, Kowalska I. The role of skeletal muscle sphingolipids in the development of insulin resistance. *Rev Diabet Stud.* 2008 Spring;5(1):13-24. DOI: 10.1900/RDS.2008.5.13

## References

### Информация о соавторах:

Арутюнов Сергей Дарчоевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России  
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: arutunov.sd@mail.ru

Балмасова Ирина Петровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России  
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: immunolab@mail.ru

Бабаев Эмир А., аспирант кафедры пропедевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России  
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: babaev@mail.ru

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России  
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Ипполитов Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России  
Адрес: 123425, Москва, ул. Делегатская, 20/1  
Телефон: (495) 609-6700  
E-mail: ippo@bk.ru

Ильина Елена Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе, руководитель отдела молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»  
Адрес: 119146, Москва, ул. Большая Пироговская, 19, стр. 1  
Телефон: (499) 245-0471

Габиров Александр Габирович, доктор химических наук, директор ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук  
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
Телефон: (495) 727-3860  
E-mail: gabibov@mx.ibch.ru



#### Information about co-authors:

Sergey D. Arutjunov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of propedeutic dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: arutjunov.sd@mail.ru

Irina P. Balmasova, MD, PhD, DSc, professor, department of infectious diseases and epidemiology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: immunolab@mail.ru

Emir A. Babaev, junior research associate, department of propedeutic dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: babaev@mail.ru

Elena N. Nikolaeva, MD, PhD, DSc, professor, department of microbiology, virology, immunology of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: elnikolaeva@bk.ru

Yevgeniy V. Ippolitov, MD, PhD, DSc, professor, head of department of fundamental sciences, research institute of medicine and dentistry of A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry  
Address: 20/1 Delegatskaya str., Moscow, 123425, Russian Federation  
Phone: (495) 609-6700  
E-mail: ippo@bk.ru

Elena N. Ilina, DSc in Biology, professor, Deputy Director General for science, head of the department of molecular biology and genetics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine Federal Medical Biological Agency  
Address: 19/1 Bol'shaya Pirogovskaya str., Moscow, 119146, Russian Federation  
Phone: (499) 245-0471

Aleksandr G. Gabibov, DSc in Chemistry, professor, director of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences  
Address: 16/10 Miklukho-Maklaya str., GSP-7, Moscow, 117997, Russian Federation  
Phone: (495) 727-3860  
E-mail: gabibov@mx.ibch.ru

## НОВОСТИ НАУКИ

### Вирусы сотрудничают для преодоления иммунной защиты бактерий

Установлено, что частицы одного типа вируса могут атаковать волнами – сначала ослабляя бактерии, а затем убивая их. Бактерии обладают системами защиты от вирусов типа CRISPR-Cas. Фаги противодействуют этой защите посредством молекул, называемых «анти-CRISPR». Показано, что отдельные вирусные частицы не могут полностью противодействовать CRISPR-Cas самостоятельно, но если достаточное количество частиц присутствует вместе, «совместная работа» позволяет им преодолеть его и создать инфекцию в популяции бактерий.

Количество фаговых частиц, превышающее некий порог, позволяет фагам захватывать бактерии, одновременно или последовательно заражая данную бактерию. Полагают, что два вируса, обладающие молекулами анти-CRISPR, одновременно атакуют одну и ту же бактерию, тем самым объединяя силы для инактивации защиты CRISPR-Cas. Исследователи обнаружили, что, учитывая достаточно большое количество вирусов, присутствующих в окружающей среде, «последовательные инфекции» бактерий приводят к возникновению эпидемии в популяции бактерий.

Первый вирус, вторгающийся в бактерию, частично ослабляет бактериальную иммунную систему с ее анти-CRISPR-молекулами, блокируя некоторые из существующих защит CRISPR-Cas, но не может правильно заразить клетку и в конечном итоге был уничтожается оставшейся активной CRISPR-Cas системой.

Второй вирус затем способен преодолеть остатки CRISPR-Cas с его анти-CRISPR-молекулами и успешно заражает и убивает бактерии.

Фаги могут работать вместе, чтобы отключить бактериальные иммунные системы, и это имеет важные последствия для использования фага для лечения человеческих инфекций, поскольку доза фага, который используется, может определить, способен ли фаг убивать бактерии.

Вирусы могут работать вместе неожиданным образом, когда они могут вызвать внезапные всплески болезни, если их число превышает критические пороговые значения.

*Landsberger M, Gandon S, Meaden S, Rollie C, Chevallereau A, Chabas H, et al.  
Anti-CRISPR Phages Cooperate to Overcome CRISPR-Cas Immunity.  
Cell. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.058>*

### Компонент коричневого масла может помочь в лечении некоторых бактериальных инфекций

Исследование показало, что коричневый альдегид (cinnamaldehyde) разрушал 75,6% биопленок *P. aeruginosa*. В дополнение к этому, CAD также влиял на формирование биопленок и способность бактерий распространяться. Эти результаты определенно способствуют поиску новых противомикробных препаратов.

*Topa SH, Subramoni S, Palombo EA, Kingshott P, et al.  
Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*.  
Microbiology 2018; DOI 10.1099/mic.0.000692*