

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Абдрахманов
Айрат Камилевич

**КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И СТРУКТУРА МИКРОБИОТЫ
ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА У ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА**

14.01.14 – стоматология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Елена Владимировна Мамаева

КАЗАНЬ

2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Медико-социальные аспекты воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста.....	15
1.2. Современные представления о роли микробных сообществ в развитии воспалительных заболеваниях пародонта.....	26
1.3. Метагеномика как современный метод определения маркеров микробного происхождения: состояние вопроса и перспективы применения в медицине, стоматологии и пародонтологии.....	37
1.4. Современные представления о нанообъектах (нанобактериях) как особой форме жизнедеятельности микроорганизмов, методах идентификации и их роли в развитии заболеваний организма человека.....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Материал клинического исследования.....	51
2.2. Методы клинического исследования.....	56
2.3. Определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов..	62
2.4. Метагеномный анализ: выделение ДНК гена 16S рРНК секвенирование	65
2.5. Метод просвечивающей электронной микроскопии (метод негативного контрастирования).....	68
2.6. Методы статистического анализа	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
3.1. Клиническая характеристика воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста.....	71
3.2. Результаты оценки видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных у лиц молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта	96
3.3. Результаты метагеномного анализа у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта	102

3.4. Результаты определения кальцинированных наночастиц в ротовой жидкости пациентов молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ВЫВОДЫ.....	130
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	132
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	135
ПРИЛОЖЕНИЕ1	178
ПРИЛОЖЕНИЕ2.....	179
ПРИЛОЖЕНИЕ3.....	181
ПРИЛОЖЕНИЕ4.....	183

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Полость рта человека населена многочисленными микроорганизмами, формирующими одно из наиболее разнообразных микробных сообществ организма человека и представленными более чем 700-тью видами бактерий, часто не культивируемых на простых питательных средах [73, 215, 288, 304, 305, 340, 342, 357]. Особенности видового состава микрофлоры полости рта определяют многочисленные эндо- и экзогенные, местные и системные факторы: уровень гигиенических знаний и навыков, воздействие окружающей среды и климата, особенности питания, наследственная предрасположенность, различная соматическая патология (заболевания эндокринной, пищеварительной, сердечно-сосудистой, опорно-двигательной систем), а также вредные привычки и уровень психоэмоционального напряжения [78, 85, 99, 127, 176, 247, 413, 420]. Действия этих факторов на ткани пародонта проявляются неодинаково и зависят от состояния регуляторных механизмов защиты полости рта и вегетативно-иммунологического состояния организма [62]. Большинство авторов рассматривают полость рта как экологическую систему, в которой различные биологические факторы, совместно взаимодействуя, вызывают неодинаковые патологические процессы [114, 306, 322].

Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) по-прежнему составляют актуальную, не до конца решенную проблему современной стоматологии в связи с сохраняющимся высоким уровнем распространенности гингивита и пародонтита у населения различных популяций, частой манифестацией первых клинических проявлений у лиц молодого трудоспособного возраста, развитием хронического прогрессирующего течения у лиц с сочетанной системной патологией, частотой развития осложнений на фоне нерационального, нередко преимущественно симптоматического, не учитывающего необходимость элиминации всей многообразной пародонтопатогенной флоры, пародонтологического лечения [2, 5, 31, 63, 169]. В течение последних десятилетий выросли показатели распространённости воспалительных заболеваний пародонта, и существенно

поменялась, в сторону повышения более тяжёлых форм, их дифференциальная структура [5, 6]. По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 80% 15-18-летних жителей планеты страдают гингивитом или начальной стадией генерализованного пародонтита [408]. У жителей Российской Федерации частота воспалительных заболеваний пародонта достигает 62-94% [102], причем у лиц в возрасте 18-24 лет, проживающих в различных регионах России, распространенность ВЗП составляет от 83,6% до 96,6% [129]. Также в последнее время произошло резкое увеличение числа лиц молодого возраста с тяжелыми деструктивными и атрофическими изменениями пародонта [10].

При воспалении тканей пародонта происходит нарушение его функций: барьерной, трофической, рефлекторной регуляции жевательного давления, степень которых нарастает по мере длительности течения воспаления, особенно когда к воспалительной деструкции мягких тканей присоединяется деструкция кости альвеолярных отростков, обуславливающая подвижность зубов, существенное поражение функциональной активности жевательного аппарата вплоть до потери зубов [38].

Лица молодого возраста находятся под влиянием активной физиологической перестройки организма и хронического стресса. Все это при одновременном снижении уровня местной резистентности и повышении психоэмоционального напряжения формирует предрасположенность к развитию ВЗП у данной категории лиц [107, 163, 165]. Обсуждается, что заболевания пародонта у детей и подростков могут отличаться рядом клинических характеристик, в частности: не типично массивное отложение зубного камня (в основном у школьников); ведущим признаком является воспаление; с возрастом распространенность заболеваний пародонта нарастает [323]; у детей и подростков почти не встречаются только дистрофические процессы (за исключением наследственного заболевания, сопровождающегося преждевременным старением) [56].

Особая медико-социальная группа молодежи – студенты очной формы обучения, при существующей организации учебного процесса испытывают

постоянное переутомление, находятся в психоэмоциональном напряжении, не имеют возможности полноценного рационального питания, большинство студентов не обладает информацией о способах поддержания и укрепления здоровья, а также не расценивают наличие имеющихся у них симптомы патологии пародонта, как проявление заболевания. Правильные представления об этиологии ВЗП имеют только 9,4 из 100 студентов; комплекс мероприятий по уходу за полостью рта правильно выполняют лишь 2,1% студентов) [192]. Ведущим фактором риска возникновения ВЗП у студентов считается неудовлетворительный уровень гигиены полости рта [193].

Неблагоприятное местное влияние на возникновение ВЗП в молодом возрасте могут оказывать травма десневого края некачественными пломбами, коронками, наличие зубного камня, особенности строения мягких тканей преддверия, частичная адентия, травматическая окклюзия. Среди общих факторов значимы курение, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы (критерий Лямбда-Уилкса $< 0,001$) [192].

На сегодняшний день актуальна разработка стандартов диагностики заболеваний пародонта (в том числе, с учетом особенностей у лиц молодого возраста), которые могут использоваться в повседневной практике врача-стоматолога [87, 196]. Выбор диагностических алгоритмов определяется, в том числе, преимуществами и недостатками каждого метода. Ограничения цитологического метода связывают с возможностью наличия микрофлоры, без возможности определения вида возбудителя и чувствительности к противомикробным средствам. Более информативный, достаточно затратный метод жидкостной цитологии также не дает возможности определения чувствительности к противомикробным средствам. Бактериологическая диагностика позволяет установить видовой состав и чувствительность к антибактериальным препаратам, но, будучи еще более дорогим, имеет чувствительность к забору и транспортировке материала. Метод ПЦР позволяет с высокой точностью определить видовой состав микрофлоры, не требователен к забору и транспортировке материала, дает возможность определения

чувствительности к антибактериальным препаратам, однако имеет высокую стоимость и возможны ложные результаты [111]. Таким образом, комплексная микробиологическая диагностика ВЗП, не всегда представляет развернутую оценку микробиологического представительства во всех биотопах полости рта. Микробиота полости рта человека остается недостаточно изученной, что в значительной степени связано с существованием смешанных микробных биопленок и наличием в их составе неизвестных науке бактерий, обозначаемых как «некультивируемые» и «пока не культивируемые» [175, 183]. Это объясняется выраженной взаимозависимостью микробов, при которой внутри смешанных биопленок происходит обмен жизненно важными факторами, которые тот или иной микроорганизм не в состоянии продуцировать сам и которые отсутствуют в использованных питательных средах. Очевидно, что такие бактерии, относятся к «пока не культивируемым», поскольку имеющиеся методы не позволяют воспроизвести все условия в лаборатории, требующиеся данным микроорганизмам для роста в виде чистых культур [26, 157, 253].

Метагеномика – один из самых развивающихся разделов геномики, посвященный изучению генетического материала (метагенома) сообществ микроорганизмов в совокупности [269]. Важной особенностью метагеномных исследований можно считать отсутствие необходимости в изоляции и культивировании микроорганизмов [88, 333]. Наиболее изучены метагеномы желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей, вовлеченные в ключевые процессы организма [88]. Патогенез большинства заболеваний и, соответственно, особенности их патогенетического лечения связаны с изменением ферментативной и биохимической активности микрофлоры, что предопределяет возрастающий научный интерес к метагеномным исследованиям в медицине и стоматологии [389, 410].

В специальной литературе большее внимание уделено анализу местных факторов пародонтопатогенного риска, роли микробной колонизации и образования бактериальной биопленки на поверхности тканей зуба и десны [7, 57, 64, 69, 74, 103, 242, 319]. Воспалительная реакция играет ключевую роль в

повреждении ткани пародонта [1]. Возрастные аспекты образования микробных биопленок у лиц молодого возраста изучены недостаточно. Вместе с тем, рост распространенности ВЗП у всего населения и все более молодой возраст пациентов пародонтологического профиля свидетельствуют о том, что применяемые методы диагностики несовершенны, а существующие методы лечения недостаточно эффективны [151].

Одним из перспективных направлений в стоматологии, способствующих снижению распространенности и интенсивности заболеваний пародонта, является разработка и внедрение методов ранней пародонтологической диагностики и лечения [87].

Исследования, отражающие профиль представленности и обосновывающие роль различных (хорошо изученных и малоисследованных) маркеров микробного происхождения в поддержании микробного гомеостаза полости рта, а также в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта, весьма многочисленны, но часто не систематизированы, весьма разночтивны, требуют конкретизации применительно к конкретным возрастным группам пациентов, особенно лицам молодого возраста [70, 73, 280, 330, 368]. Вышесказанное послужило основанием для проведения настоящего научного исследования.

Степень разработанности темы исследования

В многочисленных фундаментальных и прикладных работах доказано, что пародонтопатогены выполняют основную патогенетическую роль в развитии ВЗП у лиц различного возраста, причем микробным маркерам отводится иницирующая роль в развитии патологии [148, 178, 190, 412].

Ximenez-Fyvie L.A. и соавт. в 2000 году [412] впервые с помощью методов молекулярной таксономии определили основную роль пародонтопатогенов в развитии пародонтита. В последние годы появился ряд исследований по характеристике состава микробиома пародонта с применением методов

метагеномного секвенирования [190, 294], однако уровень репрезентативности клинико-микробиологических наблюдений невысок, актуальная проблематика не раскрыта в возрастном аспекте, не учитывает специфику лиц молодого возраста.

Таким образом, роль маркеров микробного происхождения в развитии воспалительных заболеваний пародонта до сих пор остается не достаточно изученной и сохраняет актуальность как значимая научно-практическая медицинская и стоматологическая проблема.

В связи с вышеизложенным в работе была поставлена **цель** – совершенствование методических подходов к диагностике воспалительных заболеваний пародонта на основе протеомного и метагеномного анализа микробиоты пародонтальных пространств и выявления нанообъектов в ротовой жидкости пациентов молодого возраста.

Для достижения поставленной цели определены следующие **задачи**:

1. Изучить распространенность и клиническую структуру воспалительных заболеваний пародонта у лиц 18-19 лет, проживающих на территории Республики Татарстан.
2. На основе протеомного анализа определить родовую и видовую структуру микроорганизмов пародонтальных пространств при интактном пародонте, хроническом катаральном гингивите и хроническом пародонтите легкой степени тяжести у пациентов в возрасте 18 – 19 лет.
3. Выполнить сравнение геномного состава микробиоты пародонтальных пространств интактного пародонта, катарального гингивита и пародонтита легкой степени тяжести у лиц молодого возраста.
4. На основе данных электронной микроскопии определить наличие и представить качественные характеристики нанообъектов в ротовой жидкости лиц с интактным пародонтом и пациентов с гингивитом при наличии твердых зубных отложений.

Научная новизна исследования.

Впервые изучены особенности протеомного профиля микробиома пародонтальных пространств на ранних стадиях воспалительных заболеваний пародонта у лиц 18-19 лет – жителей Республики Татарстан, связанные со статистически значимым увеличением доли семейств *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2.127), *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB (2.208), *Corynebacterium variabile* DSM 20132 TDSM (1.71), *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM (2.053). *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB и *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM *Corynebacterium variabile* DSM 20132 TDSM, а также выявлением неопределенных филотипов на уровне родов TM7-3, Mogibacteriaceae.

Установлен новый научный факт частого образования ассоциаций филотипов *Fusobacterium*, *Veillonella* в биотопе десны при гингивите, отражающий инициальный этап воспаления пародонта у лиц молодого возраста.

На основе комплексного подхода с использованием протеомного и метагеномного анализа впервые установлены клинико-микробиологические параллели, характеризующие состояние здоровья пародонта и его отклонения на ранних стадиях воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Результаты исследования позволяют расширить современные представления о развитии воспалительных заболеваний пародонта у молодых людей в возрасте 18 – 19 лет, с углубленной оценкой роли маркеров микробного происхождения. Предложенный комплекс, включающий клинические методы, определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и метагеномный анализ позволил дать оценку характеру изменений архитектуры микробного сообщества пародонтальных пространств у пациентов молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта, обосновать изменения в тактике ведения пациентов и внести соответствующие коррективы в тактику ведения пациентов.

Проведен сравнительный анализ геномного состава микробиот зубодесневой борозды и пародонтального кармана у условно здоровых пациентов

в возрасте 18-19 лет, идентифицировано 183 фило типа на уровне родов, относящиеся к 17 филам, найдены уникальные микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах. Установленный уровень геномного состава микробиот может быть использован в качестве исходных материалов для решения различных клинических и микробиологических задач, в том числе, для прогнозирования течения заболевания и обоснования тактики лечения пациентов.

Для студентов стоматологического факультета подготовлено и издано учебное пособие: «Комплексный подход в диагностике и лечении хронического пародонтита у подростков» [протокол №4 от 10.12.2015 г. заседания ЦКМС ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России], составленное в соответствии программой дисциплины «Детская стоматология», модуль «Детская стоматология», раздел «Болезни пародонта у детей и подростков», который изучается на девятом семестре и относится к циклу профессиональных дисциплин образовательного стандарта высшего профессионального медицинского образования 31.05.03 «Стоматология».

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Диссертация выполнена в дизайне проспективного исследования с использованием клинических, инструментальных, лабораторных и статистических методов.

В начале работы осуществлено эпидемиологическое исследование с целью выявления факторов риска, которым подвержены молодые люди 18-19 лет. Затем было проведено комплексное стоматологическое обследование пациентов (с акцентом на оценку пародонтологического статуса). Далее было выполнено определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов методом прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии. Определен состав метагенома зубодесневого соединения и пародонтального кармана по результатам ДНК секвенирования. В результате электронной

микроскопии (методом негативного контрастирования) были найдены нанообъекты размером 20-200нм.

В конце работы проведен статистический анализ полученных данных и сформированы практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Пародонтологический статус пациентов молодого возраста – жителей г. Казань (18-19 лет) характеризуют: высокая (53,25%) распространенность воспалительных заболеваний пародонта, преимущественно на ранних стадиях, катарального гингивита и хронического пародонтита легкой степени тяжести (23,3%) при неудовлетворительном уровне гигиены полости рта (ГИ = 1,2), что отражает недостаточное качество стандартных методов диагностики и лечения заболеваний пародонта и предопределяет необходимость совершенствования существующих лечебно-диагностических подходов.

2. Практическое применение протеомных и метагеномных исследований микробиоты пародонтальных пространств в комплексе с наноуровневым анализом ротовой жидкости позволяет повысить уровень диагностики ранних стадий воспалительных заболеваний пародонта, обосновывает патогенетическую направленность лечения и профилактики гингивита у пациентов молодого возраста.

Степень достоверности и апробация диссертации

Работа выполнена по плану НИР (номер государственной регистрации темы 01200800209) ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России (ректор – д.м.н., профессор А.С. Созинов) на кафедре стоматологии детского возраста (зав. кафедрой – к.м.н., доцент Р.М. Сафина). Результаты исследования используются в практической работе врачей–стоматологов стоматологической клиники ООО «Камил–Дент» г. Казани, стоматологической поликлиники ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России г. Казань, Государственного автономного учреждения здравоохранения «Республиканская стоматологическая поликлиника Министерства здравоохранения Республики Татарстан» г. Казань. Полученные данные, отображающие особенности распространенности и структуры

воспалительных заболеваний пародонта у молодых лиц, практическое применение протеомных и метагеномных исследований микробиоты пародонтальных пространств в комплексе с наноуровневым анализом ротовой жидкости, включены в лекционную программу и используются при проведении практических занятий на кафедре стоматологии детского возраста и терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России.

Материалы диссертации были доложены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Стоматология XXI века», посвящённая Ф.С. Хамитову, Чебоксары. – 2015г. (20 марта); на IV-ой Всероссийской научно-практической конференции «Профессорские чтения им. Г.Д. Овруцкого. «Актуальные вопросы стоматологии», г.Казань. – 2016г. (март); на VIII-ой Российской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье человека в XXI веке», г.Казань. – 2016г. (31 марта); на международной конференции XV international research and practice conference «European Science and Technology», Munich, Germany. – 2016 (14 – 15 December); на 90-ой Всероссийской научно-практической конференция студентов и молодых ученых, г.Казань. – 2016г. (13 апреля); IX Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке, г.Казань. – 2017г. (30 марта); на 90-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Казань – 2017г. (13 апреля); на Евразийском конгрессе «Стоматологическое здоровье детей в XXI веке», г.Казань. – 2017г. (20 апреля); на 1 Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии детского возраста», г. Казань. – 2018г. (9 февраля).

Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на заседании кафедры стоматологии детского возраста ФГБОУ ВО Казанский ГМУ (выписка из протокола №6) Минздрава России 7 декабря 2017 г., заседании предметно – проблемной комиссии по научным проблемам стоматологии кафедр стоматологии детского возраста, челюстно – лицевой хирургии, терапевтической и ортопедической стоматологий ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России 14 апреля 2018 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 15 печатных работ, в том числе 4 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ

Личный вклад автора в выполнение исследования

Автором осуществлены анализ литературных источников, ретро- и проспективный анализ лечения пациентов. Проведены сбор данных, систематизация и статистическая обработка показателей, полученных в результате исследования. Автором лично проводился забор и транспортировка биоматериала в микробиологическую лабораторию. Диссертант обобщил полученные результаты исследования, подготовил материалы для публикации и выполнил написание и оформление диссертации и автореферата. Личный вклад автора составляет 90%.

Объём и структура диссертации

Диссертация представлена рукописью на русском языке объемом 183 машинописных страниц, построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы; главы с описанием материалов и методов исследования; главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 422 наименований работ, в т.ч. 195 отечественных и 227 иностранных источников. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 10 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Медико-социальные аспекты воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста

В последнее время стоматологи отмечают значительный рост показателей распространённости заболеваний пародонта у лиц в возрасте 18-20 лет, а также тенденцию изменений их клинической структуры в сторону увеличения наиболее тяжёлых форм [5, 63, 75, 87]. Воспалительные заболевания пародонта занимают 11-ое место по распространённости у населения всего мира, согласно данным ВОЗ за 2016 год, что позволяет считать ВЗП глобальной медико-социальной проблемой [267]. Распространённость ВЗП составляет около 95% взрослого населения планеты и 80% детского, причем до 80% 15-18-летних жителей Земли страдают гингивитом или начальной стадией генерализованного пародонтита [408]. Высокий уровень заболеваний пародонта отмечают в возрасте 20-44 лет (65-95%) и 15-19 лет (55-89%) [19, 129, 177]. Характерны тенденция к значительному повышению уровня заболеваемости пародонта лиц молодого возраста, росту числа атипичных форм пародонтита (ювенильный, быстро прогрессирующий) [218]. По результатам второго национального эпидемиологического стоматологического обследования населения из 47 субъектов Российской Федерации распространённость заболеваний пародонта составляет 82% [197], в том числе детей, по данным регистров Минздрава России (2000 год) - 49,2% [24].

Клинико-функциональные и морфологические исследования свидетельствуют, что в этот возрастной период ткани пародонта окончательно не сформированы и находятся в состоянии физиологического «напряжения» [97, 98, 227, 366]. Более частое поражение тканей пародонта выявляется у молодых лиц мужского пола, чем у женщин (в 2,8 раза чаще) [87]. Отмечено, что в структуре заболеваний пародонта у лиц молодого возраста встречаются: хронический генерализованный катаральный гингивит (31,4%), хронический локализованный катаральный гингивит (26,6%), хронический локализованный пародонтит легкой степени (35,5%), локализованные поражения тканей пародонта в молодом

возрасте выявлены в 62,1% наблюдений [87]. Работы этого направления немногочисленны, не всегда адаптированы к конкретным популяционным группам, зачастую не обоснованы результатами современных клинико-микробиологических исследований, представляют практический интерес для определения нуждаемости в оказании пародонтологической помощи и своевременного проведения персонифицированных лечебно-профилактических мероприятий с учетом результатов комплексной оценки.

В настоящее время достаточно хорошо изучены и описаны в литературе ведущие факторы риска развития катарального гингивита [25, 79, 105, 113, 283]. По данным ВОЗ [409], к основным из них относятся: неудовлетворительная гигиена полости рта, употребление табака, вредные воздействия окружающей среды, нарушение микробиоценоза ротовой полости, отсутствие профилактических мероприятий или их нерациональное проведение у конкретного пациента, несбалансированное питание, наследственная предрасположенность, наличие сопутствующих заболеваний и др. Исследование по изучению встречаемости ВЗП в различные возрастные периоды показало, что уже в юношеском возрасте при неудовлетворительной гигиене полости рта ВЗП достаточно распространены среди юношей и девушек (гингивит – в 66,8%, пародонтит – в 6,3% случаев) [75]. Основным этиологическим фактором развития хронического гингивита, так же, как и при кариесе зубов, являются зубные/десневые микробные пленки, представляющие собой особо организованные и специфически функционирующие микроорганизмы зубной бляшки или мягкого зубного налета: *Str. Sanqis*, *Str. mutans*, *Bac. melanogenicus*, *Actinomyces viscosus* и др. На ранних стадиях формирования микробной биопленки в ней преобладают кокковые формы микробов, затем, по мере ее организации, роста и созревания, в бляшке начинают преобладать анаэробы (фузобактерии, спирохеты и др.), а количество стрептококков уменьшается, в среднем, на 30% [29, 42].

Среди факторов, способствующих возникновению ВЗП, важную роль играет наличие у пациента сочетанных системных заболеваний: пищеварительной, эндокринной, нервной, сердечно-сосудистой систем; патологии ЛОР – органов, а также гиповитаминозов и других обменных нарушений [1, 80]. Большое значение в развитии патологии пародонта имеет низкая функциональная активность - гиподинамия зубочелюстной системы (отсутствие активного жевания и полноценной нагрузки на челюстно-лицевой аппарат) [81]. Реализация влияния большинства системных и местных факторов риска развития патологии пародонта может приводить к качественным и количественным изменениям микробиоценоза полости рта, что имеет принципиальное значение в контексте настоящего исследования.

Первичная профилактика заболеваний пародонта подразумевает следующие мероприятия: рациональное и правильное вскармливание ребенка и его последующее питание; тренировку жевательного аппарата с целью нормального формирования пародонта (компенсация недостаточной жевательной нагрузки); обучение основам правил и методов индивидуальной гигиены полости рта; устранение аномалий прикрепления тяжей и уздечек губ, языка, коррекцию мелкого преддверия полости рта; поддержание полости рта в санированном состоянии; борьбу с вредными привычками: курением, чрезмерным употреблением алкоголя и т.д.; своевременное полноценное ортопедическое лечение [159]. Вторичная профилактика заболеваний пародонта заключается в устранении местных травмирующих факторов (зубной камень, нависающие края пломб, некачественные протезы, аномалии прикуса и т. п.); совершенствовании методов проведения индивидуальной гигиены полости рта, осуществлении контроля качества ее проведения при повторных посещениях врача путем определения цифровых показателей индексов гигиены; устранении предвестников заболеваний и лечении их начальных форм [160]. Третичная профилактика заболеваний пародонта заключается в комплексном лечении (консервативном, хирургическом и ортопедическом), направленном на купирование патологических

состояний в тканях пародонта, предупреждение осложнений и восстановление физиологической функции пародонта [44, 159, 160, 161].

Известно, что ведущая роль в развитии воспалительных заболеваний пародонта принадлежит микрофлоре зубной бляшки и зубного налета [149]. Основной задачей на начальном этапе лечения больных гингивитом и пародонтитом является удаление бактериальной биопленки, назубных отложений с поверхности твердых тканей зуба и из пародонтальных карманов [179]. Гигиенический режим ухода за полостью рта, необходимый для удаления химических соединений, оседающих на мягких и твердых тканях полости рта, включает в себя различные этапы, такие как собственно чистка зубов, флоссинг, полоскание с использованием ополаскивателей с антибактериальным активным компонентом, способствует предупреждению формирования и последующего развития зубной бляшки и ее трансформации в мягкий зубной налет, с последующей минерализацией [92, 159, 160].

Доказано, что терапия хронического катарального гингивита должна быть комплексной. Это означает, что в плане лечения следует предусмотреть методы и средства, направленные на устранение симптомов заболевания, нормализацию состояния тканей пародонта и воздействие на организм больного в целом, то есть правильное сочетание, так называемого, местного и общего лечения [42, 96]. Кроме того, необходима строгая индивидуализация комплексной терапии с учетом вида, тяжести заболевания и особенностей клинического течения [42]. Существуют следующие стратегии борьбы с бактериальной инфекцией: эрадикация патогена или ослабление его вирулентности до такой степени, при которой он утрачивает способность адаптироваться к окружающей среде и может быть уничтожен врожденными защитными механизмами хозяина [14]; значительное уменьшение посредством антибактериального воздействия общего числа микроорганизмов в полости рта и в пародонтальных карманах и создание гомеостатического баланса между оставшимися бактериями и макроорганизмом [40]; механическое разрушение закрытого сообщества микроорганизмов

биопленки внутри пародонтального кармана с последующим уничтожением таковых [40, 179]. Удаление биопленки и «зубного» камня являются базовой процедурой в пародонтальной терапии. Эффективным средством воздействия на биопленку может быть физическое разрушение и устранение биопленки посредством механической очистки поверхностей коронки и корней зубов [39, 40, 179]. Для элиминации пародонтопатогенной микрофлоры в пародонтологии применяют поддесневую воздушно-абразивную обработку (технологии Perio-Flow или Air-Flow, в зависимости от глубины пародонтальных карманов) [52, 95, 122, 156], фотодинамическую терапию [124, 180, 355, 371], обработку карманов с использованием пародонтологической системы Vector [101, 121, 125, 143, 221, 346, 381], введение в пародонтальные карманы длительно рассасывающихся (в сроки до трех недель) антибактериальных препаратов: Ligosan, PerioChip, Arestin и др. [399]. В последние годы отечественным стоматологам стали доступны аппараты серии Piezon, являющиеся высокотехнологичными скалерами, создающими истинную кавитацию, которая обеспечивает выраженный очищающий эффект и высвобождает свободный кислород [8], а также использование экзогенного оксида азота, озонотерапии [123, 149], флуктуофореза [123] и других воздействий.

В отсутствии своевременной диагностики и профилактики гингивита на фоне не всегда рационального лечения гингивита в патологический процесс вовлекаются и другие ткани, формирующие пародонтальный комплекс, разрушается зубодесневое прикрепление, формируются и углубляются пародонтальные карманы, в воспалительный процесс вовлекаются другие пародонтальные сегменты, развивается и прогрессирует пародонтит [47, 89, 174, 235].

Воспалительные явления в десне рекомендуют оценивать по следующим признакам: отек и гиперемия межзубных сосочков и десневого края при катаральном гингивите, увеличение десневых сосочков, выраженная деформация десневого края, иногда синюшный оттенок, образование ложных десневых карманов при гипертрофическом гингивите, десквамация, изъязвление, снижение

сопротивляемости тканей при зондировании, увеличение напряженности в тканях свободной десны, выражающиеся в кровоточивости при зондировании или во время чистки зубов [126, 131, 200], болезненная пальпация, плохое гигиеническое состояние полости рта (большое количество мягкого зубного налета, пищевых остатков), неприятный запах изо рта [56]. С прогрессированием процесса появляется ряд новых симптомов: пародонтальные карманы, подвижность зуба, наличие экссудата и др. Общее состояние пациентов обычно не нарушено, за исключением острого катарального, острого или обострения хронического язвенного процессов, при которых наблюдается по-разному выраженная интоксикация организма в зависимости от распространенности и тяжести гингивита (высокая температура тела, общее недомогание). При обследовании больного могут быть выявлены некоторые нервно-соматические заболевания, которые сопутствуют гингивиту и предрасполагают к его возникновению. Воспалительные заболевания пародонта могут сопровождаться и депрессией [39, 56, 115]. Особые этиопатогенетические механизмы и клинические проявления отмечаются при быстро прогрессирующем постювенильном пародонтите [223, 314, 364], при котором у лиц молодого возраста разрушение мягкотканного и костного компонентов пародонтального комплекса происходит агрессивно, на фоне манифестных клинических проявлений, как правило, резистентно к традиционной терапии, особенно в отсутствии эффективной коррекции сочетанных системных нарушений [11, 20, 128]. При проведении высокоуровневой диагностики пародонтологической патологии своевременно начатое комплексное, патогенетически обоснованное лечение, предполагающее целенаправленное воздействие на микроорганизмы зубного налета в составе микробных биопленок полости рта и эффективную коррекцию системных нарушений, может способствовать стабилизации процесса с выходом в долгосрочную ремиссию [48, 53, 100, 184].

Согласно рекомендациям ВОЗ, подростковым возрастом следует считать возраст от 10 до 20 лет. Возраст детей от 13 – 14 лет до полной зрелости (18 – 19 лет) рассматривается как собственно пубертатный.

Процессы формирования альвеолярного гребня, его моделирования продолжаются до 18-25 лет и завершаются с прорезыванием всех зубов. Важную роль в оссификации коллагеновой матрицы отводят гормональной регуляции (надпочечники, гипофиз, гонады) и ферментам (щелочная и кислая фосфотазы, протеаза). Процессы минерализации продолжаются вплоть до 30 лет. Неблагоприятные генетические, гормональные, алиментарные и механические причины в период развития и становления костной ткани способствуют формированию низкого пика костной массы, что может приводить к возникновению зубочелюстных деформаций, различных вариантов нарушений прикуса, являющихся одной из местных причин развития патологии пародонта [30, 99]. Период моделирования и минерализации альвеолярной кости тесно взаимосвязан с функцией гипоталамо-гипофизарной системы подростка. Установлено, что изменения тканей пародонта у большинства пациентов в период полового созревания развиваются на фоне диэнцефальных нарушений [30]. Кроме того, структурно-функциональное состояние тканей пародонта и костной системы тесно взаимосвязано с процессами становления оварио-менструальной функции, фазами полового развития [99].

Достоверное увеличение распространенности выявлено у подростков в возрасте 13-15 лет в период полового созревания, что может быть связано также с процессами вымывания солей кальция и, как следствие, со снижением плотности костной ткани. Гормональные дисфункции в этот период способствуют развитию катарального и гипертрофического гингивита. Функциональная недостаточность гонад обуславливает развитие воспалительных и дистрофических изменений в тканях пародонта [137]. Отмечено, что стойкое отставание ростовых и весовых показателей молодого пациента, характеризующих степень биологического развития, являются причиной генерализованного пародонтита [45].

Обращено внимание на то, что все патологические процессы в пародонте (преимущественно гингивит) «возникают в растущих, развивающихся и перестраивающихся тканях, тканях морфологически и функционально незрелых, способных адекватно и, во всяком случае, не тождественно реагировать на

аналогичные раздражители и причинные факторы, способные вызывать заболевания пародонта и у взрослых» [28].

Студенчество относится к группе населения молодого возраста с повышенным уровнем риска заболеваний в связи с большой психоэмоциональной и умственной нагрузками, необходимостью адаптации к новым условиям проживания и обучения, в связи с незавершенностью роста и развития организма [3, 129]. Одновременное снижение местной резистентности и повышение уровня психоэмоционального напряжения приводит к предрасположенности развития воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста [119, 129, 165]. Диспропорция роста и созревания незрелых структур, возникающие как внутри ротовой полости (зуб, периодонт, альвеолярная кость и т.д.), так и в системах, обеспечивающих устойчивость организма к внешним факторам, играет важную роль в патогенезе заболеваний пародонта у лиц молодого возраста [140, 155].

Формирование структур и реализация функций зубочелюстной системы обуславливает возникновение ювенильных хронических гингивитов, пародонтитов, которые образуются в результате временной, преходящей функциональной ювенильной гипертензии, ювенильного нарушения углеводного обмена. Данные отклонения в состоянии пародонта могут бесследно исчезнуть под влиянием незначительных вмешательств или, несмотря на устранение причин, инициирующих их, приобрести характер самостоятельного прогрессирующего заболевания [27, 394]. Максимальное количество костной массы, достигаемое человеком в течение первых двух десятилетий жизни – важная детерминанта структурно-функционального состояния костной системы у людей старших возрастных групп, развития инволюционного остеопороза [181].

Есть предположения, что в молодом возрасте проявляются, ранее скрытые компенсаторными усилиями организма, факторы морфофункционального дисбаланса. Возникает их «запуск», и он приходится на негативный для этого период жизни. Из факторов риска они трансформируются в патогенетические факторы и в таком качестве включаются в пластические процессы, происходящие в этом периоде. В результате значительно осложняется

как ближайший прогноз (на течение пубертатного периода), так и долгосрочный [132]. После запуска инфекционного процесса поражение пародонта, как правило, прогрессирует с потерей волокон коллагена и их связи с цементом зуба, миграцией апикального эпителия, углублением пародонтальных карманов и резорбцией альвеолярной кости [336].

Результаты научных исследований свидетельствуют о том, что ущерб, нанесённый стоматологическому здоровью в молодости, невосполним, т.к. в среднем возрасте это приводит к значительному разрушению зубочелюстной системы (доклад научной группы ВОЗ 1980, 1992). Прежде всего, это касается ВЗП - хронического генерализованного катарального гингивита и хронического генерализованного пародонтита [2, 147, 194, 311, 337]. У здорового человека при интактном пародонте маргинальная часть десны остроконечной формы, в период, когда зубы начинают прорезываться, десна утолщается и приобретает закруглённые края [39, 54]. Даже в тканях здоровой десны практически всегда обнаруживаются гистологические признаки незначительного воспалительного процесса. С усилением клинически проявляющегося и гистологически подтвержденного воспаления можно наблюдать латеральную пролиферацию соединительного эпителия. В маргинальном отделе он отслаивается от поверхности зуба, разрушается зубодесневое прикрепление, а в образовавшееся пространства проникают бактерии – формируется пародонтальный карман [12, 54].

Между здоровой десной и начальным воспалением десны трудно провести грань [12, 54]. Существенный рост хронического катарального гингивита отмечается у лиц младшего школьного возраста [4, 18, 47, 135]. При взрослении пациента данная патология влияет на развитие более тяжелых форм патологии пародонта, раннюю потерю зубов и, как следствие, приводит к нарушению специфических и интегральных физиологических функций, которые осуществляются при участии органов и тканей зубочелюстной системы [91, 131].

Многие авторы отмечают, что начальные воспалительные процессы в пародонтальном комплексе могут проявляться с 5 – летнего возраста и достигать

своего пика к 12 – 14 годам. Такой процесс очень интенсивно проявляется в области нижних фронтальных зубов и первых моляров.

М. Soory [377] отмечена нарастающая распространенность начальных форм ВЗП у детей и подростков, что, в частности, связывается с гормональным дисбалансом в период полового созревания, когда периоды обострения чередуются с периодами относительно благополучного состояния пародонта, что связывают с эндокринными изменениями в процессе полового созревания.

У определенной части пациентов развитие гингивита может быть связано с изменениями состава зубной бляшки, ответом воспалительных клеток, гормональными изменениями, морфологическими различиями, прорезыванием зубов и др. Это определено авторами после изучения структурных и функциональных изменений пародонта, а также становления и созревания микрофлоры рта и иммунных защитных реакций к пародонтопатогенам у подростков [245, 385]. Особенно важное значение имеют влияние гормонов на ткань десны и на состав зубной бляшки [379]. Андрогены и эстрогены оказывают физиологическое влияние на соединительную ткань, кость и периодонт в период полового созревания, при этом микрофлора сама стимулирует продукцию этих гормонов фибробластами, а также использует гормоны в качестве источника питания [231].

Классические клинические проявления пародонтита описаны в многочисленных публикациях [56, 73, 126, 183].

Так, для хронического пародонтита легкой степени тяжести характерно наличие зубных отложений, незначительной кровоточивости десны, наличие пародонтального кармана глубиной 3 – 4 мм, деструкции костной ткани межальвеолярных перегородок начальной – I степени (исчезновение компактной пластинки, остеопороз, деструкция не превышающая 1/3 перегородки или длины корня зуба) [56].

При хроническом пародонтите средней степени тяжести жалобы сводятся к значительной кровоточивости десны при приеме пищи, появлению запаха изо рта, подвижности и смещения зубов, изменению цвета, вида десны. Во время осмотра

можно оценить наличие неплотного прилегания десны к зубу, налета, наддесневого зубного камня, гиперемии с цианотическим оттенком свободной и прикрепленной десны. Десневые сосочки изменяют конфигурацию за счет клеточной инфильтрации и отека [56]. При зондировании глубина пародонтального кармана составляет 4 – 5 мм, отмечается болезненная подвижность зубов в большинстве случаев I, реже II степени и развитие травматической окклюзии. Разрушение костной ткани достигает 1/2 межзубной перегородки [56, 158].

Характерными жалобами при хроническом пародонтите тяжелой степени являются: выраженная кровоточивость десен, боли в деснах и затруднение жевания, неприятный запах изо рта, смещение зубов. Вследствие болевого синдрома пациенты пренебрегают гигиеной полости рта. Это приводит к образованию налета и поддесневых зубных камней, что усугубляет патологический процесс. Глубина пародонтального кармана составляет более 5 - 6 мм, имеется деструкция костной ткани альвеолярного отростка (более чем на 1/2) или полное отсутствие костной ткани, патологическая подвижность зубов преимущественно II – III степени, их смещение, выраженная травматическая артикуляция. Пародонтит средней и тяжелой степеней тяжести часто сопровождается гноетечением [126].

Несмотря на большое количество публикаций, отражающих симптоматику основных форм воспалительных заболеваний пародонта, углубленный анализ особенностей их клинических проявлений у лиц молодого возраста, объединенных в особые социо - культурные группы (например, студенческая молодежь), проживающих в конкретных административно-территориальных субъектах РФ, не потерял своей актуальности, как диагностическая, профилактическая и лечебно-организационная проблема медико-социальной значимости.

Несмотря на то, что вопросы этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта, в целом, хорошо изучены, отдельные вопросы требуют более глубокого изучения. Во многом это относится к оценке роли местных

микробных факторов риска, инициирующих пародонтальное воспаление и усугубляющих течение пародонтита. Значение отдельных бактериальных сообществ, контаминирующих ткани пародонтального комплекса, идентификация которых на известных питательных средах не представляется возможной, до конца не определено и составляет актуальную проблему современной микробиологии и пародонтологии [209].

1.2. Современные представления о роли микробных сообществ в развитии воспалительных заболеваний пародонта

В этиопатогенезе заболеваний полости рта, включая ВЗП (гингивит, пародонтит), основная роль принадлежит резидентной и транзитной биоте [187, 273]. Причем, каждой из форм заболеваний пародонта соответствует свой профиль пародонтопатогенных бактерий [317, 374]. Исходя из последних исследований, бактерии играют важную роль в развитии указанной патологии [49, 162, 277, 317]. Однако микробиоценоз ротовой полости в норме и при воспалительных заболеваниях пародонта до сих пор остается недостаточно изученным [26, 49, 182]. Существует мнение, что переход гингивита в пародонтит определяется в большинстве случаев пародонтопатогенами, а также патогенетическими механизмами, которые ослабляют общие защитные механизмы, определяющие сопротивляемость тканей пародонта к патогенным воздействиям [109, 114, 203, 246]. Общеизвестным является факт, что этиологическим фактором воспалительных поражений пародонта являются пародонтопатогены микробной биопленки [22, 175, 183]. Биопленка – это сообщество различных бактерий, грибов и даже вирусов, внедренных в толстый слизистый слой, состоящий из сахаров и протеинов и фиксированный на какой-либо поверхности [32, 116, 268]. Согласно современным представлениям, «зубная» бляшка является стандартным вариантом биопленки – симбионтного сообщества микробных видов, формирующегося в условиях текучих жидких сред [175]. Причем, в 1 мг зубного налета содержится до 300 млн. микробов. Интенсивность роста зубной бляшки во многом зависит от количества

употребляемых углеводов в пище. Максимальная скорость роста наблюдается при активном поступлении таких компонентов, как сахароза, глюкоза и фруктоза, которые являются исходными компонентами синтеза полисахаридов [287]. По мере созревания микробные биопленки полости рта провоцируют воспаление тканей десны за счет микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, что в последствии приводит к разрушению эпителия десневого желобка и воспалению прилежащих тканей. Это связано с присутствием в оболочке бактерий протеолитических ферментов – коллагеназ, а также эндотоксинов, оказывающих повреждающее действие на ткани пародонта [21, 173, 255]. Участие микроорганизмов в патогенезе воспаления тканей пародонта признано как российскими, так и зарубежными исследователями [76, 178, 222, 359]. Ряд опубликованных в последние годы работ (А.С. Григорьян, 2004; Л.А. Дмитриева, 2007; О.О. Янушкевич, 2010; J. Slots et al., 1990; A.D. Haffajee, S.S. Socransky, 1994; A. Tanner et al., 1998; K. Cogo et al., 2009) посвящены роли анаэробных микроорганизмов в развитии пародонтита [110]. Вместе с тем, ряд авторов подвергает сомнению этиологическую роль данных бактерий в развитии воспалительных заболеваний пародонта (И. Вилкова, 2008; W.J. Loesche, et al., 1990; M. Umeda et al., 1996; L.J. Brown, H. Loe, 2000). Перечень анаэробов, участвующих в развитии заболеваний пародонта, известен: грамотрицательные анаэробные микроорганизмы группы бактероидов (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas melaninogenicus*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, в меньшей степени протейные *Filifactor*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* [15, 49, 78], однако роль данных микроорганизмов в развитии хронического пародонтита изучена недостаточно. Это связано с трудностями, возникающими при обнаружении и выделении анаэробов, их идентификации, а также недостатком информации о патогенности этой группы микроорганизмов [110].

В короткие временные промежутки экосистема полости рта достаточно мобильна, ее свойства зависят от множества внутренних и внешних факторов

(скорость слюноотделения, характер питания, эффективность гигиены и применяемых средств по уходу за полостью рта, прием лекарственных препаратов) [59]. Изменения этих факторов приводят к увеличению общего количества микроорганизмов и вегетированию в полости рта штаммов микроорганизмов, не характерных для этой области организма человека [154].

В последнее время в литературе широко обсуждается вопрос о роли вирусов в развитии деструктивных явлений в пародонте и характере трансформации иммунологического статуса больных, страдающих пародонтитом при персистенции вирусов [187, 236].

В 1996 году была выделена особая форма – кандида-ассоциированный пародонтит (КАП), характеризующийся инвазией грибов не только в десневой эпителий, но и в область пародонтальной связки. Присутствие в биотопе пародонтального кармана дрожжеподобных грибов рода *Candida* приводит к изменению клинической картины воспалительного процесса: маломанифестному, торпидному, рефрактерному к традиционной терапии течению, частым рецидивам [310].

Между грибами и бактериями-ассоциантами возникает двусторонняя стимуляция роста и размножения, а также взаимное усиление вирулентности, что в условиях дефицита или элиминации нормофлоры приводит к селекции резистентных штаммов. Этим объясняется устойчивость пародонтита, ассоциированного с кандида-флорой, к традиционному лечению [145]. Кроме того, по данным литературы, дрожжеподобные грибы рода *Candida* являются аллергенами и, создавая аллергический фон, усугубляют тем самым течение воспалительного процесса [153].

Патогенные свойства так называемого «местного» фактора обусловлены микроорганизмами и их токсинами. Они, в свою очередь, в большом количестве находятся в зубном налёте, зубной бляшке и зубном камне, что было выявлено в ходе направленного кумулирования зубного налёта в эксперименте [94, 383]. Микробы и их токсины вызывают деполимеризацию межзубного вещества эпителия пародонта, повышают его проницаемость, дезорганизуют

коллагеновые структуры соединительнотканых образований пародонта, увеличивают проницаемость капилляров, что может привести к развитию патологии [65, 378].

Микроорганизмы – факторы внешней среды, сопровождающие человека в течение всей жизни, образования филогенетически более древние и устойчивые, чем человек [178]. Микроорганизмы, составляющие микробиоценоз человека, условно можно разделить на 3 большие группы [307]:

- нормофлору
- условно-патогенные
- патогенные.

Стабильное нормальное микробное сообщество вытесняет многие патогенные представители микробиоценоза, снижая вероятность заражения [67, 82, 84]. Полость рта представляет собой сложную многокомпонентную экосистему, составными частями которой являются вирусы, грибы и простейшие [55, 67]. В таких биотопах, как слюна, десневая жидкость, пародонтальный карман, обнаружено свыше 700 различных видов микроорганизмов [73, 305, 343]. В современной пародонтологии уместным считается использование собирательного понятия «пародонтологические пространства», которое включает в себя: зубодесневой желобок, зубодесневое соединение при интактном пародонте и катаральном гингивите, пародонтальный карман – при пародонтите. У каждого здорового человека количество и видовой состав микробной флоры рта, является относительно стабильным, поскольку существует ряд факторов, обеспечивающих постоянство состава микрофлоры. Одну из важных ролей в поддержании постоянства микробного состава играет свойственный постоянной микрофлоре антагонизм по отношению к патогенным и условно–патогенным микробам [84, 141, 142].

F.E. Dewhirst et al. [248] считают, что полость рта человека населена одним из наиболее разнообразных микробных сообществ человеческого тела, включающим в себя примерно 700 видов бактерий, многие из которых не растут

на простых питательных средах. Состав микрофлоры у людей разных популяционных групп значительно варьирует вследствие различий в диете, привычках и образе жизни [279].

В основном, в интактной десневой борозде преобладают следующие бактерии: *S. epidermidis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis*, сапрофитные нейссерии, лактобактерии, дифтероиды, гемофилы и др. [58, 70]. При катаральном гингивите число бактерий в ротовой полости в 10 – 20 раз превышает физиологическую норму, при этом факультативно-анаэробные грамположительные микробы доминируют, но несмотря на это, увеличивается и доля облигатно-анаэробных грамотрицательных микроорганизмов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*) [70]. При развившейся стадии заболевания преобладает облигатно-анаэробная грамотрицательная микрофлора – палочки и спирохеты [58].

При воспалительной патологии пародонта обнаружены более высокие уровни бактерий [228], в условиях эксперимента было показано, что количество бактерий внутри десневой ткани положительно коррелируют с Т-клетками инфильтрата и альвеолярной потерей костной ткани [210, 229]. Известно, что некоторые пародонтопатогены обладают иммунно инвазивными характеристиками и способны выживать в макрофагах [278, 398].

Патогенные свойства бактерий проявляются двояко:

1. Прямым пародонтопатогенным действием, вызывающим воспаление и деструкцию в тканях пародонта;
2. Опосредовано, когда микроорганизмы запускают целый комплекс иммунопатогенетических механизмов как ответ на их агрессию [133].

Накапливаются данные, свидетельствующие, что многие заболевания связаны с изменениями бактериальными резидентами бактериальных сообществ, ведущих к дисбактериозу [244, 261]. Пародонтит является заболеванием, вызванным дисбиозом микробиомы человека, в частности субгингивальных сообществ. При этом измененный субгингивальный микробиом индуцирует

воспаление десны, который сопровождается иммунный клеточный инфильтрат, ведущий к разрушению соединительной ткани и альвеолярной части кости [225, 241].

Пародонтит рассматривается как полимикробная инфекция, результат гомеостатического дисбаланса в субгингивальном микробиоме; сдвиги субгингивальной микробиоты от интактного пародонта к пародонтиту достаточно хорошо известны [360].

Если в интактном пародонте преобладают грамположительные аэробы, а доля грамотрицательных составляет 10 – 15%, то при хроническом пародонтите это соотношение становится обратным [178]. По данным ряда авторов [238], эти же микробы наблюдаются и при интактном пародонте, и на начальных стадиях воспаления в пародонтальных тканях при минимальном повреждении пародонта. Установлено, что у людей с интактным пародонтом частота высеваемости пяти основных пародонтопатогенов не превышает 6,6% [195].

Порядка 10 – 15 видов микроорганизмов считаются специфичными пародонтопатогенами, а 5 – 10 – «предупреждающими» заболевания пародонта, но кариесогенными [178]. К числу истинных пародонтопатогенов относят грамотрицательные *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotellaintermedia*, *Bacteroidesforsytus*, *Actinobacillusactinomycetemcomitans*, *Treponemadenticola* [50, 172, 195]. Для них характерна чрезвычайная агрессивность и тенденция к внутриклеточному паразитированию в десневом эпителии и тканях пародонта. В работе S.S. Kirakodu с соавторами приведены данные количественной оценки семи пародонтопатогенных бактерий (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*) [302]. В работе представлено соотношение данных бактерий при различных количествах общей бактериальной массы. К сожалению, авторами не был проведен анализ взаимосвязи между характером бактериального профиля и тяжестью пародонтита.

Можно выделить следующие общие микробиологические признаки, указывающие на риск развития воспаления в пародонтальных тканях:

1. Увеличение общей бактериальной нагрузки;
2. Переход от грамположительных аэробных *Cocci-dominated communities* к грамотрицательным строгим анаэробам;
3. Увеличение низкочисленных микроорганизмов, в том числе установленных пародонтопатогенов [199, 265, 320].

Известно, что относительная частота маркерных пародонтопатогенов может сильно отличаться от применяемых методов исследования, находиться в зависимости от различных условий [148].

Не имея четких доказательств этиотропности конкретного микроорганизма к определенной форме заболеваний пародонта, Y. Momi и соавт., A.C.R. Tanner и соавт. [331, 382] предлагают говорить лишь о «главных» микробных патогенах при определенных клинических проявлениях заболевания:

– *Actinobacillus actinomycetemcomitans* в 95% случаев высевается у пациентов с локализованным быстро прогрессирующим пародонтитом, блокируя 90% хемотаксиса. Было установлено, что она способна проникать в десневой эпителий, причем очень необычным образом, со специфической внутриклеточной локализацией [208, 358, 418].

– *Porphyromonas gingivalis* являются самыми частыми, после *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, возбудителями хронического генерализованного пародонтита [51, 61, 415]. Особенно много их можно обнаружить в свежих очагах поражения. *Porphyromonas gingivalis* подчиняют себе метаболизм клетки хозяина, в следствии чего происходит развитие заболевания [300, 370]. В создавшихся условиях макроорганизм лишается сигнала о присутствии бактерий. Он не направляет лейкоциты для их уничтожения, препятствуя миграции последних через эпителиальный барьер [213].

– *Fusobacterium nucleatum* считается мостом между ранними и поздними колонизаторами биопленки, является наиболее распространенным пародонтопатогеном, его количество увеличивается параллельно с тяжестью патологического процесса в тканях пародонта [199, 375]. Род *Fusobacterium*, в

который входят известные патогены, обладают способностью к внутриклеточному паразитизму [209] и также имеет существенное влияние на формирование заболеваний пародонта [380, 391].

– *Tannerella forsythensis* выявляется у пациентов с неподдающимся лечению пародонтитом [415]. Ее поверхностный слой способствует агрегации и инвазии в эпителиальные клетки, с последующей агглютинацией эритроцитов [186, 239]. При совместном культивировании с макрофагами микроорганизм вызывает выделение маркеров воспаления – цитокинов и простагландинов.

– *Prevotella intermedia* может проникать в эпителиальные клетки тканей пародонта [93, 116, 168] и резистентен к антибиотикам. Наличие его в организме также способствует повышенному выделению маркеров воспаления – матриксных металлопротеиназ.

– *Treponema denticola* способствует продукции металлопротеина, вызывая деструкцию межклеточного вещества соединительной ткани, может агглютинировать и лизировать эритроциты. Поверхностный белок микроорганизма может перемещаться в мембрану эпителиоцита, в результате чего нарушаются функции эпителиоцитов. При хроническом генерализованном пародонтите обнаруживается много трепонем [93]. На фоне нарушенной и нормальной функции нейтрофилов она способна вызывать сильные очаги поражения [370].

– Среди членов родов *Corynebacterium* и *Campylobacter* много известных патогенов, представители семейства *Dethiosulfovibrionaceae*, которые так же ассоциированы с периимплантными заболеваниями [250].

Следует отметить, что до настоящего времени не создано биологических маркеров, способных идентифицировать лиц, у которых в будущем наиболее вероятна деструкция пародонта [178]. Не выявлено какого-то одного микроорганизма, патогномоничного для трансформации гингивита в пародонтит у взрослых. Однако у лиц, уже больных пародонтитом, обнаруживаются различные комбинации определенных видов микроорганизмов (например, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella*

intermedia, *Eikenella corrodens*, *Veillonella recta*, *Treponema denticola* и *Carnocytophaga*) и др. [195], которым приписывается ведущая роль в возникновении воспалительных заболеваний пародонта [172]. Из бактерий, численность которых увеличивается при пародонтитах, несколько видов, включая *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* обладают способностью вторгаться в ткани десны через трансцеллюлярные и/или парацеллюлярные пути [292]. При этом присутствие бактерий, включая выше упомянутые виды, в тканях эпителия и соединительной ткани были выявлены посредством электронной микроскопии, иммунофлюоресценции, иммуногистохимии и гибридизации *in situ* [262, 301, 345, 360].

Porphyromonas gingivalis в синергизме с *Fusobacterium nucleatum* усиливает формирование биопленки [209, 249, 361]. При этом степень образования биопленки не связана с указанными бактериями. Показано, что взаимодействие *Fusobacterium nucleatum* и *Porphyromonas gingivalis* синергически усиливают свою патогенность, с усиленной потерей костной массы и разрушением мягких тканей пародонта [325, 348].

Современными исследователями выделено несколько групп микроорганизмов, ассоциированных с пародонтитом, многие из которых не поддаются культивации. Наиболее представленной группой бактерией по современным данным являются грамположительные *Peptostreptococcus* и *Filifactor*. Роды *Megasphaera* и *Desulfobulbus*, а также некоторые представители родов *Campylobacter*, *Selenomonas*, *Deferribacteres*, *Dialister*, *Catonella*, *Tannerella*, *Streptococcus*, *Atopobium*, *Eubacterium* и *Treponema*. Все они имели более высокое процентное содержание по отношению к общей бактериальной массе у пациентов с пародонтитом.

В ходе изучения групп бактерий, предположительно ассоциированных с пародонтитом, была обнаружена положительная взаимосвязь между степенью развития пародонтита и количеством метаногенов и сульфатредукторов [395].

Есть предположения, что причина пародонтита скрывается не в наличии определенных агентов, а лишь в определенной активности микробиоценоза.

Установление новых культивированных типов пародонтопатогенов продолжается, так недавно культивированы *Chloroflexi OT 439* [392], *Filifactoralocis* [209]. Имеются упоминания о присутствии членов семейства *Rs-045* в микрофлоре пародонта [237, 365]. Для штаммов *F4791/87* и *F4552/87* установлена продукция токсинов, опасных для человека [417].

Из недавно обнаруженных «кандидатов» в пародонтопатогены можно назвать представителей родов *Campylobacter*, *Abiotrophia*, *Gemella*, *Capnocytophaga* и *Neisseria*. Однако, не ясно, важны ли данные виды в развитии пародонтита [307]. У 90% пациентов высевается *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [230, 373]. По данным S.D. Benjamin и P.N. Baer (1967) указанное инфицирование может носить наследственную предрасположенность [217].

Извесно, что изучение влияния отдельных бактерий на развитие заболеваний – это первый шаг к пониманию роли микробиоты в патогенезе. Бактерии и вирусы существуют не изолированно друг от друга, они взаимодействуют между собой [83], формируют биопленки [209]. При этом, бактериальные агрегаты, имеющие структуру «кукурузного початка», могут проникать в межклеточные пространства эпителия пародонтального кармана [360].

По мнению А.С. Григорьяна и соавт. [46], можно говорить о существовании двух гипотез, трактующих проблему взаимоотношения конкретных микроорганизмов в запуске ВЗП:

1. Признается возможность участия в этиологии и патогенезе заболеваний еще не идентифицированных патогенных бактерий;

2. Ведущим фактором патогенеза ВЗП может являться внутривидовая сукцессия уже известных бактериальных форм, что, впрочем, не исключает

ведущей роли в этих процессах некультивируемой компоненты микробного сообщества рта.

Из вышеизложенного следует, что на сегодняшний день достигнуты значительные успехи в области выявления и лабораторной детекции маркеров пародонтального воспаления, продуктов разрушения тканей и бактериальных антигенов [49]. Однако до настоящего времени не определены биологические маркеры, способные прогнозировать риск прогрессирования воспалительного процесса в пародонте у лиц молодого возраста, не выявлены конкретные виды микроорганизмов, присутствие которых в тканях пародонта способствует прогрессированию заболеваний пародонта по мере взросления и предопределяет его тяжелое осложненное течение. Во многом это связано с отсутствием в арсенале врача-стоматолога современных методов микробиологической диагностики, что предопределяет необходимость поиска и внедрения в практику современной стоматологии инновационных методов и технологий лабораторного анализа, к числу которых в последние годы стали относить метагеномные исследования [72, 136, 312].

1.3. Метагеномика как современный метод определения маркеров микробного происхождения: состояние вопроса и перспективы применения в медицине, стоматологии и пародонтологии

Использование таких классических микробиологических подходов, как бактериальный посев или выделение чистых культур, для определения видового состава микроорганизмов, составляющих отдельный микробиом, сложно ввиду большого количества видов, и невозможности культивирования до 99% бактерий [144, 204]. Поэтому, широкое распространение микробиомных исследований стало возможным только с появлением высокотехнологичных методов, позволяющих секвенировать совокупный геном микроорганизмов (метагеном), полученный непосредственно из среды их обитания. Под видовым геномом понимают совокупность всех генов всех штаммов данного вида. При этом минимальный набор генов, по мнению ряда исследователей, необходимых для обеспечения жизни клетки, должен иметь не менее 200 базовых генов [144].

Впервые J. Handelsman предложила называть словом «метагеномика» науку об изучении совокупности генетического материала микроорганизмов, полученных непосредственно из среды. А термин «метагеномика» появился в 1998 году в статье этого же автора «Молекулярно-биологическое исследование неизвестных микроорганизмов почвы: новый рубеж» [282]. Первое исследование в области метагеномики было проведено при исследовании микробиома Саргассова моря, в ходе которого было секвенировано рекордное на тот момент количество ДНК – 1,045 миллиарда нуклеотидов [393].

Метагеномика это:

1. Современный молекулярный метод, способный выявлять огромное разнообразие микрофлоры, часть которой относится к некультивируемым формам [372];

2. Логическое продолжение геномики индивидуальных микроорганизмов, связанное с исследованием каждого генома в отдельности [88];

3. Один из самых развивающихся разделов, посвященный изучению генетического материала (метагенома) сообществ микроорганизмов в совокупности [269].

Стать объектами изучения метагеномики могут любые популяции микроорганизмов [240, 349, 393].

Цель метагеномики – получение и анализ всех геномов для установления видового состава и метаболических взаимосвязей в микробном сообществе [240, 369]. Однако в сборке полных геномов, как правило, нет необходимости [353]. В большинстве случаев информацию о видовом составе популяции можно получить из анализа отдельных генов [315, 406].

Основная особенность метагеномных исследований, по мнению специалистов [88], состоит в отсутствии необходимости в изоляции и культивировании микроорганизмов. Последнее является принципиальным отличием метагеномики, так как не все из микроорганизмов способны к росту на микробиологических средах.

Первичной информацией для метагеномных исследований являются нуклеотидные последовательности, получаемые *shotgun sequencing* (шотган-секвенирование) нуклеиновых кислот – РНК и ДНК, включая все гены и некодирующие участки [139].

Впервые С. Шустером было проведено выделение и секвенирование ДНК мамонта [347]. При этом секвенирование может отличаться по генному составу – секвенирование маркерных последовательностей (например, 16S РНК) или полногеномное секвенирование.

Полногеномное секвенирование (Whole Genome Sequencing, WGS) – более дорогостоящий и сложный с точки зрения эксперимента метод, при котором, из метагеномных образцов выделяется и секвенируется тотальная ДНК.

Секвенирование гена 16S рРНК – это популярный анализ метагенома, наиболее применяемый метод ввиду своей доступности, относительной

дешевизны и методической простоты. При этом используются данные о нуклеотидных последовательностях выделенных чистых культур.

Известно, что ген 16S рРНК входит в состав рибосомы в комплексе с белком и участвует в процессе трансляции. Ген 16S рРНК выбран как универсальный маркер для видовой идентификации: он имеется в геномах всех прокариот и отличается высокой степенью консервативности. Внутри одного вида сходство гена 16S рРНК достигает 98 – 99%.

Универсального протокола обработки метагеномных данных не существует, однако в целом алгоритм почти не меняется. Различна и производительность отдельных методов секвенирования – длинные (больше 400 п. н.) и короткие (35 – 100 п. н.) прочтения. Принципы секвенирования, могут значительно отличаться. Наиболее производительными приборами на текущий момент являются те, что позволяют за один запуск получить до 600 и 180 гигабайт данных.

На сегодняшний день используются различные технологии секвенирования гена 16S рРНК, этапность которых неизменна:

А) получение библиотеки ДНК–фрагментов

Б) амплификация участков гена 16S рРНК

В) определение нуклеотидных последовательностей [206, 207, 224, 316, 338, 344, 403, 404].

Секвенирование гена 16S рРНК является технологией нового поколения, которое позволяет охарактеризовать не только композицию и функцию человеческого микробиома, но также проанализировать изменения видового состава микроорганизмов в пределах отдельных органов, индивидуумов и временных промежутков [205].

Таким образом, был изучен видовой состав сообществ, определена филогенетическая принадлежность прокариот и эукариот [354], открыты сотни новых видов, десятки тысяч новых генов, реконструированы геномы и пути метаболизма многих некультивируемых видов, уточнены филогенетические связи

таксонов, изучены генные сети в различных сообществах, расшифрована природа ряда симбиотических систем, разработаны схемы мониторинга таксономического и генного составов природных сообществ [188, 281].

Возможным минусом использования праймеров на гены рРНК для таксономической идентификации может быть тот факт, что их консенсусные последовательности получены исходя из анализа уже известных бактериальных генов. Это потенциально может привести к сложностям выявления тех микроорганизмов, сиквенсы которых отличаются и еще не известны. Также необходимо понимать, что анализ 16S гена метагенома не позволяет говорить о наличии вирусов и бактериофагов, для которых подобные универсальные консервативные нуклеотидные последовательности отсутствуют [88].

Особое внимание уделено изучению микробиома человека, для этого организованы консорциумы – «Русский метагеномный проект», «Meta HIT» (Metagenome of Human Intestinal Tract, Европа), «BGI» (Beijing Genomics Institute, Китай), «HMP» (Human Microbiome Project, США), целью которых является изучение всего микробиома человека.

Для того, чтобы изучить микроорганизмы, населяющие организм человека, более подробно, потребовалось проведение метагеномных исследований множества выборок образцов. Образцы были получены от различных групп населения, проживающего в различных климато - географических регионах мира, в разное время, проведено их сравнение в контексте медико-социальных, этно - культурных и других различий [243, 334, 351, 388, 416].

Результаты пилотных метагеномных исследований вышеупомянутых консорциумов носили, в основном, эпидемиологический характер и заложили основу для дальнейших исследований [334, 351]. Сравнительный анализ данных, полученных по конкретным популяционным группам здорового населения, позволил представить эталон здорового микробиома [206, 391]. Помимо общих популяционных исследований микробиома здорового населения, изучались особенности состава микробиома человека [139, 206, 270, 308, 416] при

различных заболеваниях: рак [118, 211, 389, 396, 410], болезнь Крона [286], колит [254], метаболический синдром [264], атеросклероз [299], диабет [352, 411].

Метагеном сообществ микробиоты кишечника, полости рта, женских половых органов, кожных покровов может предоставить ценную информацию для решения вопросов диагностики, профилактики и лечения многих заболеваний пищеварительной системы, гинекологической и др. патологии [144]. Установлено, что желудочно–кишечный тракт, начальным отделом которого является полость рта, является наиболее разнообразным по видовому составу и количеству метаболических путей среди всех симбиотических систем организма человека. Согласно результатам ряда исследований, микробиота организма «среднестатистического» человека представлена 10 – 100 трлн. индивидуальных прокариотических клеток, относящихся к 150 – 800 видам из 1380 – 4 000 различных таксономических групп [313, 335, 352, 384, 387].

Важнейший объект изучения метагеномики – симбиотический микробиом человека. Он представляет собой не просто совокупность микроорганизмов, обитающих в теле человека и на его поверхности, а сложную и многокомпонентную систему с внутренней структурой и функциональной динамикой, активно взаимодействующую с макроорганизмом хозяина. Патогенез, а, соответственно, и патогенетически обоснованное лечение многих системных, в том числе стоматологических заболеваний прямо или опосредованно связаны с изменением ферментативной и биохимической активностью микрофлоры, активно влияющей на функционирование многих систем организма человека.

Работы, посвященные результатам и перспективам применения метагеномного анализа в стоматологии, крайне малочисленны. Так А.В. Шибяевой [189] изучен состав микробиома зубного налета у пациентов пародонтологического профиля для выявления пародонтопатогенов. С применением метода глубокого секвенирования банков 16S рДНК проведено комплексное исследование состава микробиома мягкого зубного налёта человека. Были выявлены роды бактерий характерные для здорового пародонта: *Streptococcus*, *Bergeyella*, *Granulicatella*, *Kingella*, *Corynebacterium* и роды,

ассоциированные с диагнозом «агрессивный пародонтит»: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Synergistes*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Ruminococcus*, *Parvimonas* и *Mycoplasma*. Впервые идентифицированы виды бактерий, ассоциированные со здоровым пародонтом: *V. parvula* и *S. sanguinis*. По результатам исследования было определено, что снижение доли кандидатных пародонтопротекторов в составе микробиома пародонта коррелирует с увеличением доли признанных пародонтопатогенов: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola* [189, 190].

На основе методов пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК Ф.А. Хафизовой и соавт. [170] определен бактериальный состав интактной слизистой оболочки десны и воспаленного периимплантантного тканевого комплекса у пациентов после установки дентальных имплантатов. В биотопах здоровых и воспаленных участков десны в повышенных количествах, но в разных пропорциях, были обнаружены различные представители фил *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Было продемонстрировано, что род *Fusobacterium* оказался единственной группой, в больших количествах присутствующей исключительно на поверхности воспаленной десны, тогда как род *Streptococcus* и неизвестные ранее *Gemellaceae* обнаруживались в достоверно более высоких пропорциях на неизменной слизистой десны.

Методы секвенирования нового поколения позволяют определять структуру различных микробных сообществ с высокой точностью [216, 422]. На сегодняшний день перечень микроорганизмов, ассоциированных с заболеваниями пародонта, продолжает уточняться [284], что и объясняет возрастающий интерес к метагеномным исследованиям [88].

Таким образом, метагеномика как перспективный инструмент для изучения взаимосвязи между составом микробиоты и стоматологическим/системным здоровьем человека, имеет очевидные перспективы, высокий диагностический и прогностический потенциал применения в фундаментальной и прикладной стоматологии.

1.4. Современные представления о нанообъектах (нанобактериях) как особой форме жизнедеятельности микроорганизмов, методах идентификации и их роли в развитии заболеваний организма человека

Обзор данных специальных медико-биологических исследований этого направления позволяет сформулировать предпосылки к углубленному изучению роли наномикроорганизмов (в дальнейшем «нанообъектов») в формировании различных стоматологических заболеваний (ВЗП), в генезе которых существенное значение придается патологической кальцификации.

Термин «нанобактерии» введен в научный оборот Р. Моритом в 1988 г. [332]. Ряд исследователей относят считать «нанобактериям» вещества химической природы, микрокристаллы апатита [234], наночастицы карбоната кальция [321] или комплексы минералов с фетуином [356]. Диапазон терминологической идентификации нанобактерий весьма широк – их нередко обозначают как «элементарные тела», «субъединицы», «фильтрующиеся формы», «миниклетки», «каменные бактерии», «кальцинирующие наночастицы», уникальные «каменные» бактерии, «кальций образующие наночастицы», «кальцифицирующие наночастицы» [35, 41, 43, 60, 66, 108, 138, 191, 296, 324], «нанобы», «живые везикулы» и др. [23].

В соответствии с рекомендациями Златоустовой О.Ю. и соавт. (2016), в настоящей работе использован термин «нанообъект/нанообъекты», рассматриваемые как сферические белковые (или белково-минеральные) образования сферической или овоидной формы сверхмалых (менее 100 нм) размеров от 20 до 100 нанометров, которые в 100 раз более мелкие, чем бактерии или некоторые вирусы [71, 106, 117]. Эти образования относят к роду *Nanobacter* – чистые культуры трех штаммов ультрамикробактерий, которые депонированы в немецкой коллекции микроорганизмов в качестве нового вида *Nanobacterium sanguineum* [256]. К числу главных признаков, по которым определяют нанообъекты, относят не только химический состав их оболочки и наличие в ней углублений или отверстий, но и сверхмалый (менее 100 нм) диаметр и овоидная форма [152]. В ряде работ [266] нанообъекты как на минерало–белковые

комплексы определяются как - биоморфные преципитаты с хлоридом бария и кремния.

«Нанобактерии» были впервые выделены и обозначены как уникальные наноразмерные микроорганизмы овоидной или призматической формы специалистами Техасского университета (Folk R., 1988) при исследовании горячих сернистых источников. Позднее финскими учеными-биологами [295] в фильтрате выращенной культуры были идентифицированы необычные формы микроорганизмов – бациллы размером от 0,2 – 0,5 до 2,0 мкм, заключённые в каменную скорлупу.

Обнаруженные формы микроорганизмов рассматривались как уникальные, что объяснялось их исключительно малыми размерами, сопоставимыми по размерам с мельчайшими вирусами. Предполагалось, что в клетках подобных размеров физически не смогли бы разместиться молекулы и иные структуры, ответственные за процессы обмена веществ и размножение клеток - молекулярные механизмы, способные обеспечить жизненные функции, реализуются в пространствах определенного объёма и диаметра не меньшего, чем 150 нм [138].

Результаты многочисленных и разнонаправленных исследований нанобактерий [256, 257, 258, 259, 260] указывают, что существуют, и, более того, активно размножаются в воде, горячих сернистых источниках, разлагающихся листьях, раковинах моллюсков, яичной скорлупе и др.

При изучении образцов песчаника, добытых с глубины в 3 – 5 км ниже уровня морского дна у западного побережья австралийского континента, были обнаружены миниатюрные узловатые нити длиной от 20 нанометров [390]. Фильтрующиеся бактерий были идентифицированы в ряде водоемов Швейцарии [400, 401], а также грунтовых водах урановой шахты [329] и торфе кислых сфагновых болот [104, 339]. Количественная оценка численности микроорганизмов, проникающих через «бактериальные» фильтры с порами диаметром 0,22 мкм, проводилась также в пресноводных экосистемах водосбора

Верхней Волги (малых кислотных озерах и сфагновом болоте) и водах Рыбинского водохранилища [86, 167].

Научный консенсус в части того, что нанобъекты – это форма жизни, полностью не достигнут. Экспериментальные исследования представляют косвенные доказательства, что «нанобактерии» способны воспроизводить себя и вырабатывать ДНК и РНК. Единичные работы последних лет [117] посвящены вопросам культивирования наночастиц с целью поиска присущего им уникального генетического кода. Они научно обосновывают факт, что «нанобактерии» представляют разновидность живых организмов. Гипотеза, предполагающая живую природу нанобъектов, подтверждена многочисленными фактами обнаружения у них специфических антигенов [232, 285, 289, 327, 367, 376, 386, 397, 421].

В соответствии с отдельными исследованиями [43], нанобъекты: имеют «клеточноподобную» структуру, являются хелатообразующими агентами, проявляют чувствительность к антибиотикам (тетрациклину, аминогликозидам), нуклеиновым кислотам и синтетическим ингибиторам, способны адаптироваться к физиологическим условиям и обладают инфицирующей способностью.

Предполагают, что велика вероятность попадания кальцинирующих наночастиц в организм человека с питьевой водой и через желудочно–кишечный тракт, хотя и не исключены другие пути. Показательно, что фильтрация, аэрация и хлорирование воды не приводят к эрадикации «нанобактерий» [41, 43].

Нанобъекты обнаружены не только в образцах различных природных геоматериалах, но и в биологических материалах человека (крови, волосах, фекалиях, желчных и почечных камнях и др.). Обсуждаются вопросы, отражающие патогенные характеристики тех или иных нанобъектов, идентифицируемых в организме человека при различных заболеваниях [201, 202, 212, 220, 290, 350, 402, 405].

Так, исследователями из Финляндии (фирма «Nanobac»), США (НАСА, Калифорнийский университет, Университет Райса, клиника Кливленда, клиника университета Джорджа Вашингтона), Великобритании (университет г. Кардифф),

Германии (университет г. Ульм), Австралии (центр микроскопии и микроанализа) широко обсуждалась причастность нанообъектов к процессам биоминерализации при атеросклерозе (а именно кальцификация атеросклеротической бляшки) [198, 232, 285, 327, 376, 397, 421].

Нанообъекты были выявлены в камнях у больных с желче- и почечнокаменной болезнью [276, 402], тканях щитовидной и поджелудочной железы у лиц с узловым зобом и сахарным диабетом, а также у больных ревматоидным артритом [386], железодефицитной анемией, болезнью Альцгеймера [36, 295].

Обсуждается значимая роль нанобактерий в инфекционной природе старения. В ряде работ нанобактерии рассматриваются как единственные представители класса хламидий, способные к оссификации органов и тканей [298], а также к образованию атероматозных бляшек [220, 350].

По мнению ряда ученых, мы живём в окружении нанобактерий, обладающих необычными свойствами и выполняющих прямую этиологическую роль в генезе многих заболеваний человека [234, 296, 297]. Другие авторы идентифицируют их как кофакторы развития той или иной патологии или рассматривают как сопутствующие образования. Однако факт наличия «нанообразований» не отрицается, что инициирует интерес к новым научным изысканиям в этой области.

По мнению E. Chabrière и соавт. [226], для верификации «nanons» необходимо подтверждение следующих свойств объекта: размер 200 нм в диаметре, обеспечивающий возможность их фильтрации через поры размером 0,2 нм, внешнее сходство с кальцификатами, способность к саморепликации, в отсутствие нуклеиновых кислот (ДНК или РНК). Результаты этих исследований показали, что эти частицы не способны саморепликации, из чего был сделан вывод о том, что «nanon» – это кальций–фосфатный преципитат, содержащий белок.

В работе И.С. Барскова [9] констатируется исключительно низкая скорость роста нанообъектов, примерно в 10000 раз меньшая, чем скорость созревания «нормальных» бактерий.

Предполагается, что метаболизм нанообъектов существенно отличается от метаболизма других микроорганизмов. Он так же тесно связан с процессами биоминерализации, когда активные формы могут переходить в «спящее» состояние и подолгу находиться в самостоятельно образуемой ими кальций - содержащей оболочке [9]. Принято считать, что рост нанообъектов не связан с биосинтезом, происходит при наличии в окружающей среде (организме) любых легкодоступных белков, способных связываться с кальцием и апатитом. В нанообъектах присутствует белки, а именно, фетуин – мощный ингибитор скелетного отверждения и формирования апатита, в ответ на который иммунная система организма отвечает выработкой антител (анти-фетуина). Представлены данные о возможности размножения нанообъектов в присутствии витаминов, и остановке их роста в отсутствии последних [226, 356].

В сравнении с вегетативными формами бактерий, нанообъекты более устойчивы к разрушению. Их нельзя дезактивировать конкретными антибактериальными средствами (пенициллин, цефалоспорины, макролиды) или иными бактериями/вирусами, тепловой обработкой 196 F⁰, замораживанием, обезвоживанием, гамма-излучением до 150 мрад, химическими средствами (алкоголем, перекисью, средствами на основе серебра, MGN3, лактоферрином), а также иммунными ускорителями, иммуноглобулинами т.д. Однако выявлено, что нанообъекты погибают под воздействием ЭДТА и антибиотиков группы тетрациклина [41, 43, 66, 296, 309, 318, 367]. Отмечена также их чувствительность к ампициллину, триметропиму, триметропим–сульфаметоксазолу, нитрофурантоину, 5–фторурацилу, цитозинаробинозиду, антимицину А, азиду натрия, цианистому калию, бифосфонатам, 6–аминокапроевой кислоте [328].

В современной литературе изложены основные методы обнаружения нанообъектов [77, 90]. Это серологический и бактериологический [90, 233, 414] с микроскопией после окрашивания (окраска Ноеchst 33258, пропидиум йодидом,

Pico Green после деминерализации; окраска по von Kossa, которая специфична к кальциевым компонентам; окрашивание 2% уранил ацетатом (с цитратом свинца) для выявления специфической слизи на гидроксиапатитной оболочке; окраска ализариновым красным S в минерализованном состоянии; окраска фосфорновольфрамовой кислотой), а также выявление нанообъектов с использованием трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

Так, в исследовании [34] при анализе электронных снимков легочной ткани, пораженной туберкулезом, обнаружены колонии нанообъектов в участках оссификации ткани легочной паренхимы, обезвествленной плевры, в местах присутствия бациллы Коха с видимой кристаллизацией вокруг нее сурфактанта и появлением биоминерализации, что, по мнению авторов, не исключает антагонизма *Mycobacterium tuberculosis* и нанообъектов, а также участия последних в процессе формирования петрификатов. На электроннограммах образцов стромы щитовидной железы, измененной вследствие узлового зоба, также определены колонии нанообъектов, окруженные плотной карбонат-апатитной оболочкой (данные дисперсного рентгеновского микроанализа) диаметром 0,8 – 1,6 мкм. Внутри минеральной оболочки определялась свернувшаяся «нанобактерия», а вокруг нее – дочерние формы, не имеющие оболочки. В образцах ткани щитовидной железы, пораженной фолликулярным раком, колонии нанообъектов были множественными [34].

Анализ электроннограмм желчных камней (смешанных/холестериновых) у больных калькулезным холециститом после обработки молибдат-аммония позволил выявить множественные колонии овоидной формы диаметром 0,6 – 0,9 мкм [37]. В других исследованиях [33] по данным иммунофлюоресцентной микроскопии подтверждено наличие сходных нанообъектов, возможно, участвующих в генезе сахарного диабета, с помощью аналогичных методов исследования выявлены нанообъекты в пораженных легочных тканях при бронхолите, бронхолитиазе, а также в зубных отложениях.

В работах, посвященных изучению закономерностей образования твердых зубных отложений [13, 16] установлено, что аминокислоты, белок (казеин) и ионы

магния ингибируют процесс образования гидроксилапатита, причем наибольшим ингибирующим действием обладает казеин; глюкоза потенцирует эти эффекты, тогда как мочевины в физиологических концентрациях способна замедляет процесс образования гидроксилапатита в зубных отложениях, а концентрированные растворы мочевины способствуют формированию стехиометрического гидроксилапатита. Среди компонентов слюны промоторами кристаллообразования при образовании твердых зубных отложений обладают глюкоза и мочевины [13, 16].

Исследования подобного направления в современной стоматологии немногочисленны, по мнению специалистов [212, 234, 251] нуждаются в дальнейшей разработке и конкретизации применительно к различным формам стоматологической патологии.

В этом контексте весьма показательны данные Brenda-Kirkland-George (1998), обнаруживших колонии «нанобактерий» в участках твердых тканей зубов (эмали и дентине), пораженных кариесом, а также в зубном камне [296]. Учитывая сходство естественного нанокристаллического апатита эмали и нанообъектов, J. Jing и соавт. (2009) выдвинули гипотезу о том, что «нанобактерии» могут действовать на поверхности эмали так же, как и синтетические нанокристаллические апатиты [293]. В работах [293, 303, 414] показано, что формирование дентиклов и петрификатов в пульпе зуба обусловлено массивной инвазией нанобактериями. Предполагается, что нанобактерии, изменяя нормальное функционирование клеток пульпы (одонтобластов), способны вызывать кальцификацию (кальциноз) пульпы [414]. Установлено также, что в клетках десневого эпителия под действием нанообъектов развиваются признаки вакуольной дистрофии эпителиоцитов и кальцификация эпителия и его субэпителиальных слоев [414, 419].

Гипотетически можно предположить, что процессы возникновения и созревания микробной биопленки на поверхности эмали зуба, т.е. формирования мягких и твердых зубных отложений, и, в первую очередь, минерализации мягкого зубного налета могут быть аналогичны эктопической кальцификации и

могут быть связаны с нанобъектами [232, 233]. Фундаментальные исследования, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, отсутствуют, однако весьма актуальны по своей теоретической и практической значимости. Учитывая сказанное, работы по исследованию нанобъектов в ротовой жидкости и в зубных отложениях в норме и при воспалительных заболеваниях пародонта (гингивите и пародонтите), в том числе у лиц молодого возраста, могут составить значимую фундаментальную проблему, требующую последовательного разрешения, что предопределили одно из направлений настоящего исследования. Полученные теоретические результаты могут расширить существующие представления об этиопатогенезе гингивита и пародонтита, послужить основой для создания индивидуальных и скрининговых программ лечения и реабилитации пациентов пародонтологического стоматологического профиля.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал клинического исследования

Согласно возрастной классификации ВОЗ, подростковый возраст охватывает период с 18 до 20 лет [68], соответственно чему в процессе исследования была сформирована группа лиц в возрасте от 18 до 19 лет. Критериями выбора данной возрастной группы явились с одной стороны – завершение формирования постоянных зубов, тканей пародонта и снижение влияния симпатической иннервации на рост челюстей (18 лет), с другой – окончание пубертатного периода (19 лет).

Клиническое обследование пациентов пародонтологического профиля было проведено на базе стоматологической клиники ООО «Камил-Дент» (гл. врач – А.К. Абдрахманов). Распространенность и клиническая инфраструктура воспалительных заболеваний пародонта пациентов изучена на примере совокупной выборки 533 студентов Вузов г.Казани, проходящих ежегодные профилактические медицинские осмотры с участием врача-стоматолога. Все пациенты находились на амбулаторном наблюдении в период с сентября 2013 года по октябрь 2018 года в стоматологической клинике ООО «Камил – Дент».

Основой для формирования групп на всех этапах исследования явилась оценка пародонтологического статуса с выделением следующих клинических состояний: интактный пародонт, хронический генерализованный катаральный гингивит и хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести.

Таблица 1 – Критерии включения и исключения пациентов в группы наблюдения

№	Критерии включения пациентов в группу наблюдения:	Критерии исключения из группы наблюдения:
1	Согласие на участие в исследовании	Отказ от участия в исследовании на любом этапе
2	Возраст 18-19 лет.	Возраст младше 18 лет и старше 20 лет
3	Находились на учете у пародонтолога.	Не посещали пародонтолога
4	Не имели вредных привычек (алкогольную, табачную и наркозависимость) исходя из данных анкетирования пациентов.	Наличие вредных привычек – алкоголь, табакокурение, наркомания.
5	На период исследования не были беременны и не использовали методы гормональной контрацепции.	Беременность и использование методов гормональной контрацепции.
6	Не принимали антибиотики и антисептики в течении 3 месяцев до проведения 2 и 3 этапа исследования.	Использовали антибиотики и антисептиков в течении 3 месяцев до проведения 2 и 3 этапа исследования.
7	Ткани пародонта соответствовали клиническим и рентгенологическим признакам интактного пародонта.	Ткани пародонта не соответствовали клиническим и рентгенологическим признакам интактного пародонта.
8	Наличие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный катаральный гингивит (К 05.1, в соответствии с классификацией МКБ -10)	Отсутствие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный катаральный гингивит (К 05.1, в соответствии с классификацией МКБ -10)
9	Наличие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (К 05.3, в соответствии с классификацией МКБ -10)	Отсутствие клинически и рентгенологически верифицированного диагноза хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (К 05.3, в соответствии с классификацией МКБ -10)
10	Присутствие письменного информированного согласия на участие в проведении исследований (Приложение 3).	Отсутствие письменного информированного согласия на участие в проведении исследований (Приложение 3).

Решение поставленных в работе задач потребовало выполнения трех этапов исследования. На подготовительном этапе проанализированы данные комплексного стоматологического обследования с расчетом пародонтальных индексов у 90 пациентов в возрасте 18-19 лет – жителей Республики Татарстан. Проведено одноцентровое рандомизированное проспективное клинико-микробиологическое контролируемое открытое исследование.

Методом рандомизации было сформировано 3-и группы наблюдения на подготовительном этапе:

1. Контрольная группа: с интактным пародонтом (34 человек -18 мужчин и 16 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
2. Группа наблюдения 1: с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (30 человек - 16 мужчин и 14 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
3. Группа наблюдения 2: с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (36 человек-16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

На первом этапе, в целях определения видовой принадлежности выделенных микроорганизмов, обследовано 90 пациентов (50 мужчин и 40 женщин в возрасте от 18 до 19 лет), рандомизированных по 3-м группам:

1. Контрольная группа: с интактным пародонтом (34 человека - 18 мужчин и 16 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
2. Группа наблюдения 1: с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (30 человек - 16 мужчин и 14 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
3. Группа наблюдения 2: с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (36 человек-16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

На втором этапе было проведено выделение ДНК гена 16s ррнк секвенирование и анализ данных 36 пациентов (16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 19 лет), сформировавших 3-и группы:

1. Контрольная группа: с интактным пародонтом (11 человек - 5 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
2. Группа наблюдения 1: с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (12 человек - 7 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
3. Группа наблюдения 2: с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (13 человек - 4 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

Третий этап включал оценку возможностей применения метода просвечивающей электронной микроскопии (негативное контрастирование) и оценку результатов анализа 17 пациентов (7 мужчин и 10 женщин в возрасте от 18 до 19 лет) Для этого методом рандомизации были сформированы две выборки:

1. Контрольная группа: – лица с интактным зубным рядом, интактным пародонтом и отсутствием склонности к минералообразованию (5 человек - 2 мужчин и 3 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)
2. Группа наблюдения: – пациенты с воспалительными заболеваниями, имеющих повышенную склонность к образованию зубных отложений (над- и поддесневого зубного камня) (12 человек - 3 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

В процессе оценки системного здоровья лиц молодого возраста установлено, что у 11,0% обследованных хронические заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, язвенная болезнь 12-перстной кишки, хронический холецистит), у 5,0% - патология ЛОР-органов (хронический тонзиллит, хронический фарингит, хронический гайморит), у 4,0 % - патология сердечно-сосудистой системы в компенсированной форме. У 1% пациентов с хронической системной патологией были выявлены признаки вторичного иммунодефицита. Принципиальных различий в тяжести системной патологии у пациентов групп наблюдения не выявлено.

Все клинико-диагностические мероприятия проводили на базе стоматологической клиники ООО «Камил-Дент» г. Казань, с письменного добровольного информированного согласия пациента. Результаты исследований заносились врачом - стоматологом в специально разработанные вкладыши к медицинской карте стоматологического больного, с определением градаций оценки критериев объективного исследования и пародонтологического статуса и общих факторов риска заболеваний пародонта. (Приложение 1, 2).

2.2. Методы клинического исследования

В процессе обследования проводили изучение частоты и клинико-рентгенологического состояния тканей пародонта молодых людей в возрасте 18 – 19 лет, полученные в результате стоматологического осмотра 533 обучающихся 1 – 2 курсов различных ВУЗов г. Казани. Из указанной выборки была проведена рандомизация пациентов по необходимым критериям.

При первичной консультации пациента выясняли паспортные данные, наличие или отсутствие жалоб и вредных привычек. Данную информацию выясняли в соответствии с общепринятыми этико-деонтологическими принципами качественной клинической практики GCP, акцентируя внимание на наиболее значимых признаках (Приложение 1).

Комплексное клиническое обследование пациентов начинали с расспроса – выяснения основных жалоб: кровоточивость, болезненные ощущения, зуд, чувство дискомфорта в области десен, изменение цвета, формы, рельефа десневого края неприятный запах изо рта и сбора анамнеза. При сборе анамнеза обращали внимание на характер питания, наличие профессиональных вредностей, сопутствующих и перенесенных заболеваний. Общий осмотр начинали с оценки внешнего вида пациента: состояние кожных покровов, выраженность носогубных складок, состояние поднижнечелюстных и шейных лимфатических узлов. При определении критериев объективного обследования нами учитывалось:

1. Состояние жевательных мышц (в расчет брали результаты пальпации и наличие специфических жалоб пациента);
2. Состояние уздечек верхней и нижней губы, языка с оценкой высоты, уровня прикрепления, формы и плотности уздечки, ограничения подвижности;
3. Глубина преддверия рта (в расчет брали величину наименьшего расстояния от десневого края к началу переходной складки);
4. Наличие тяжей, с учётом их характера;
5. Оклюзия, согласно классификации Л.С. Персина (1992) [134];
6. Наличие съемной или несъемной ортодонтической техники;

7. Наличие хронической механической травмы – нависающих краёв пломб; сильно разрушенных зубов; тяжёлых зубочелюстных аномалий, при которых отсутствовала естественная защита десны и происходила её травматизация при приёме пищи.

8. Наличие зафиксированных неправильно протекающих функций, с определением:

– нарушений жевания (чаще как результат зубочелюстных аномалий, кариеса и его осложнений);

– неправильности глотания;

– привычки давления языком на зубы (чаще как результат патологии прикуса в трансверзальной плоскости);

– типа дыхания (особо внимательно осматривались подростки с «аденоидным типом» лица, при котором определялись нарушения носового дыхания);

– неправильной речевой артикуляции.

9. Наличие катарального гингивита с определением его распространенности (локализованный, генерализованный), степени тяжести (легкая, средняя, тяжелая) и течения (острое, хроническое).

10. Наличие пародонтита с определением его распространенности (локализованный, генерализованный), степени тяжести (легкая, средняя, тяжелая) и течения (острое, хроническое, обострившееся (абсцедирующее), ремиссия).

В процессе клинической оценки оценивали пародонтологический статус (Приложение 2), при этом учитывали:

1. Состояние и цвет сосочков;

2. Степень кровоточивости [39];

3. Степень подвижности зубов по Miller [326];

4. Наличие экссудата;

5. Наличие зубодесневого соединения и его глубина (рассчитанная как расстояние от края десны до наиболее апикальной точки дна зубодесневой борозды;

6. Наличие и глубина пародонтального кармана, с определением его локализации по сегментам и по поверхностям зуба, сохранность зубодесневого прикрепления и его потеря;

7. Наличие костного кармана [271], с определением индекса деструкции Фукса [263];

8. Состояние костной ткани – убыль, сохранность, тип деструкции; трабекулярная структура, очаги остеопороза;

9. Степень снижения высоты межальвеолярных перегородок.

Диагностику патологических изменений в тканях пародонта при осмотре полости рта проводили согласно рекомендациям комитета экспертов ВОЗ о распространенности заболеваний краевого пародонта, с учетом индекса CPITN [407]. Гигиенические состояние определяли по индексу Грина–Вермильона (ОHI – S) [272].

Нуждаемость в лечении воспалительных заболеваний пародонта определяли по индексу CPITN. С помощью стандартного пародонтологического зонда (пуговчатый зонд, толщиной 3,5 мм и 5,5 мм) обследовали пародонт в области всех зубов, определяли самое тяжелое поражение в секстанте по следующим критериям:

0 – отсутствие симптомов заболевания

1 – возникновение кровоточивости при зондировании

2 – наличие над– и поддесневого зубного камня, нависающих краев пломб, глубина зондирования до 3 мм.

3 – глубина зондирования до 4–5 мм

4 – глубина зондирования более 6 мм

Каждый сектант зубочелюстной системы обследовали, если в нем присутствовали 2 и более зубов, не подлежащих удалению, а если в секстанте оставался 1 зуб, он включался в соседний сектант, а данный сектант не учитывался.

Планирование лечебных мероприятий планировалось исходя из следующих критериев:

0 – лечебные мероприятия не требуются

1 – улучшение уровня гигиены полости рта

2–3 – улучшение гигиены полости рта и проведение профессиональной гигиены полости рта

4 – улучшение гигиены полости рта, проведение профессиональной гигиены полости рта и комплексные мероприятия пародонтальной хирургии

При определении индекса ОНI-S обследовали вестибулярные поверхности зубов 1.6, 1.1, 2.6, 3.1 зубов и язычные поверхности 3.6 и 4.6 зубов после окрашивания их раствором Люголя. Определение зубного налета проводили визуально в режиме дневного света. Результат складывался из значений, полученных для каждого компонента индекса, с деление на количество обследованных поверхностей с последующим суммированием обоих значений.

$$\text{OHИ-S} = \frac{\text{Сумма значений налета (ЗН)}}{\text{Количество поверхностей}} + \frac{\text{Сумма значений камня (ЗК)}}{\text{Количество поверхностей}}$$

Все полученные результаты кодировали по баллам, представленными ниже:

Таблица 2 – Результаты определения индекса ОНI-S

Зубной налет		Зубной камень	
Признаки	Коды	Признаки	Коды
Зубной налет не обнаружен	0	Зубной камень не обнаружен	0
Мягкий зубной налет покрывает 1/3 поверхности зуба и/или плотный коричневый налет	1	Наддесневой зубной камень покрывает 1/3 поверхности зуба	1
Мягкий зубной налет покрывает 2/3 поверхности зуба	2	Наддесневой зубной камень покрывает 2/3 поверхности зуба и/или поддесневой зубной камень в виде отдельных конгломератов	2
Мягкий зубной налет покрывает >2/3 поверхности зуба	3	Наддесневой зубной камень покрывает 2/3 поверхности зуба и/или поддесневой зубной камень в виде отдельных конгломератов	3

Для оценки индекса гигиены использовали следующие критерии:

0 – 0,6 – хороший уровень гигиены полости рта;

0,7– 1,6 – удовлетворительный уровень гигиены полости рта;

1,7– 2,5 – неудовлетворительный уровень гигиены полости рта;

2,6 и более – плохой уровень гигиены полости рта.

Для оценки степени воспалительного процесса в тканях пародонта осуществляли пробу Писарева–Шиллера до, на этапах и после лечения; рассчитывали индекс РМА по Parma (в %) [341] по следующей формуле:

$$\text{РМА} = \frac{\text{Сумма баллов}}{3 \times \text{число зубов}} \times 100\%$$

Индекс РМА позволяет выявить наличие и распространенность воспаления в десне, и является индексом тяжести гингивита. Интенсивность окрашивания десны оценивали по следующим критериям: отсутствие воспаления – 0 баллов; воспаление только десневого сосочка (Р) – 1 балл; воспаление маргинальной десны (М) – 2 балла; воспаление альвеолярной десны (А) – 3 балла. При определении тяжести гингивита использовали следующие оценочные критерии: 30% и менее – легкая степень тяжести гингивита; 31–60% – средняя степень тяжести гингивита и $\geq 61\%$ – тяжелая степень гингивита.

Для оценки степени воспаления межзубных сосочков использовали индекс кровоточивости сосочков РВІ по Saxer и Muhleman (Saxer, Mühlemann, 1975). Оценивалась степень кровоточивости десны (0–4) через 5–10–15 сек после осторожного зондирования десневой борозды с помощью специального пародонтологического градуированного зонда с язычной поверхности первого и третьего квадрантов зубов и с вестибулярной поверхности второго и четвертого квадрантов зубов. Число зон кровоточивости и степень кровоточивости в каждой зоне определялось по следующим критериям:

- 0 – кровоточивость отсутствует
- 1 – появление отдельных точечных кровотечений
- 2 – наличие многочисленных точечных кровотечений или линейного кровотечения
- 3 – заполнение кровью межзубного десневого треугольника
- 4 – после зондирования появляется интенсивная кровоточивость, кровь течет по зубу или десне.

Рассчитывается показатель РВІ при суммировании показателей по всем зонам и соотношения их с количеством исследуемых зон.

Использование ортопантограммы позволило оценить состояние костных отделов пародонта, являясь независимым способом регистрации истинной высоты межальвеолярных перегородок и их формы в норме (остроконечная, округлая, трапецевидная) и при патологии [56]. Форма и высота межзубных перегородок могут варьировать в зависимости от формы зубов и расстояния между ними. Костная ткань верхней челюсти и фронтального участка нижней челюсти в период постоянного прикуса в норме имеют мелкопетлистое строение. А в боковых участках нижней челюсти – крупнопетлистое. На ортопантограмме определяли наличие/отсутствие зоны резорбции кортикальных замыкающих пластинок, участков остеопороза и разрушения костной ткани, что позволяло характеризовать выраженность поражения и активность костных изменений.

При проведении 2-го и 3-го этапов исследования пациентам групп наблюдения не проводилась антисептическая обработка растворами после проведения профессиональной гигиены рта; не проводились аппликации и повязки антисептическими растворами и гелям и в течение 5 – 7 дней после проведения профессиональной гигиены рта; и не назначались антибиотики и антисептики в течение 3-х месяцев.

2.3. Определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов

Известно, что из-за свойств возбудителей пародонтита, сложно проводить диагностику ВЗП, используя стандартные методы. Применение современных диагностических технологий позволяет прояснить этиологию и патогенез заболеваний пародонта, что помогает повышению эффективности лечения и улучшает качество жизни пациентов [130]. Для детекции субгингивальных микроорганизмов используются такие подходы как:

1. Фазово-контрастная микроскопия

2. Бактериальные посевы
3. Иммунологические тесты
4. Энзиматические тесты [314, 362, 363]
5. ПЦР [219]

Качество данных методов оценивается их точностью и специфичностью. Наиболее точным для микробиологической диагностики является метод бактериальных посевов [219]. В то же время, с развитием методов анализа ДНК, все чаще для детекции и количественной оценки пародонтопатогенной микрофлоры применяются иные подходы.

Комплекс используемых в работе диагностических мероприятий включал анализ микроорганизмов, выделенных из пародонтального пространства: зубодесневой борозды у условно здоровых молодых людей с интактным пародонтом (контроль) и пациентов с хроническим катаральным гингивитом; и из пародонтального кармана – у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести.

Забор материала проводили после проведения тщательной профессиональной гигиены рта. Удаляя наддесневые отложения стерильными кюретками, осушали с помощью стерильного ватного шарика. С помощью стерильных пинцетов вводили стерильную ватную турунду в исследуемый участок, не касаясь слизистой оболочки рта, поверхности эмали или коронки зуба на 10 – 20 секунд. Далее исследуемый материал помещался в стерильный пластиковый контейнер и хранился в морозильной камере при температуре -25°C .

Исследование одобрено и проведено в соответствии с требованиями Локального Этического Комитета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ МЗ РФ (выписка из протокола №9 от 22 ноября 2016 г.). Письменное информированное согласие было получено от всех исследованных пациентов (Приложение 3, 4).

В настоящем исследовании проведен анализ аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. С целью подсчета числа культивируемых микроорганизмов посев проводился на основные (мясо–пептонный агар) и специальные среды (Чапека, Гаузе, Сабуро и Эндо).

Состав питательных сред для определения был следующий:

- общей микробной обсемененности – среда МПА (мясо–пептонный агар);
- дрожжей – среда Сабуро (г/л): дистиллированная вода – 1 л; глюкоза – 40; пептон – 10;
- дрожжевой экстракт – 5;
- NaCl – 0,25; агар–агар 20,0;
- мицелиальных грибов – среда Чапека (г/л): дистиллированная вода – 1 л; NaNO₃ – 2,0; KH₂PO₄ – 1,0;
- MgSO₄ – 0,5 • 7H₂O;
- KCl – 0,5;
- FeSO₄ – 0,01 сахароза – 30,0;
- агар–агар – 20,0;
- для определения бактерий группы кишечной палочки – среда Эндо;
- желточный агар (г/л): протеозопептон – 20,00, гидролизат казеина – 5,00, дрожжевой экстракт – 5,00, натрия хлорид – 5,00, агар-агар – 20,00;
- кровяной агар (г/л): настой говяжьего сердца – 500,00, триптоза – 10,00, натрия хлорид – 5,00, агар – агар – 15,00.

Выделенные аэробные бактерии были идентифицированы с использованием прямого белкового профилирования MALDI–TOF масс-спектрометрии Bruker Daltonik MALDI Biotyper (Германия) (Рисунок 1).



Рисунок 1 – MALDI–TOF масс – спектрометр Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Масс – спектрометрия – это физический метод измерения массы ионов исследуемого вещества, позволяющий проводить масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки. Прямое белковое профилирование с помощью MALDI–TOF масс – спектрометрии – метод протеомной характеристики микроорганизмов, который можно использовать для быстрой идентификации и внутривидовой классификации патогенных микроорганизмов или определении их видовой принадлежности. В таблице 3 представлены значения логарифмических показателей при определении видовой принадлежности микроорганизмов.

Определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов было проведено в условиях междисциплинарного центра протеомных исследований ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии (заведующий кафедрой д.м.н., профессор Ильинская О.И.)

Таблица 3– Значение логарифмических показателей при определении видовой принадлежности микроорганизмов в масс-спектрометре

Значение биомассы(г/л)	Описание
1.300... 3.000	Высокая вероятность идентификации вида
2.000 ... 2.299	Гарантированная идентификация рода, возможная идентификация вида
1.700 ... 1.999	Возможная идентификация рода
0.000 ... 1.699	Отсутствие надежной идентификации

2.4. Выделение ДНК гена 16S рРНК секвенирование и анализ данных (метагеномный анализ)

Клинический материал на третьем этапе исследования сформирован из представительства основной группы наблюдения. Высокая стоимость метагеномного анализа ограничивает возможность исследования больших выборок пациентов. Поэтому было проведено выделение ДНК гена 16s ррнк секвенирование и анализ данных от 36 пациентов. (16 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 и до 19 лет). Были сформированы 3 выборки: 1 – с интактным пародонтом (11 человек - 5 мужчин и 6 женщин в возрасте от 18 и до 19 лет), 2 – хроническим генерализованным катаральным гингивитом (12 человек- 7 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 и до 19 лет) и 3 – с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (13 человек - 4 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 и до 19 лет).

У испытуемых с интактным пародонтом, а также от пациентов с хроническим генерализованным катаральным гингивитом, образцы были получены из десневой борозды пяти случайно выбранных зубов.

У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести, образцы были собраны из пяти пародонтальных карманов, на максимально возможной глубине зондирования.

Отбор проб проводили после профессиональной гигиены рта и удаления наддесневых отложений с использованием стерильных кюрет Грейси (Hu–Friedy). Стерильные ватные турунды с применением стерильного пинцета помещали в исследуемую область, не касаясь слизистой оболочки рта и шейки зуба. Затем собранные образцы были помещены в 2 мл микроцентрифужные пробирки и заморожены при -20°C до дальнейшего выделения ДНК и сравнительного анализа микробных сообществ.

Исследование проводили в соответствии с утвержденной инструкцией по экспериментам с участием человека в качестве субъекта. В соответствии с требованиями Локального Этического Комитета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ МЗ РФ (выписка из протокола №9 от 22 ноября 2016 г.). Письменное информированное согласие было получено от всех исследованных пациентов (Приложение 3, 4).

Экстракция геномной ДНК. Тотальную ДНК экстрагировали и очищали из отобранного образца с использованием QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Общее количество экстрагированной и очищенной ДНК далее измеряли с использованием спектрофотометра Nanodrop ND–2000 (Wilmington, США). Полученную тотальную ДНК хранили в морозильной камере при -20°C .

Секвенирование ампликоновых библиотек. Фрагменты генов бактериальной 16S рРНК были амплифицированы баркодированными праймерами Bakt_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and Bakt_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') используя Phusion High–Fidelity DNA полимеразу, в трех повторах для каждого образца. Полученные ампликоны для каждого образца были объединены и очищены с помощью Agencourt AMPure XPbeads (Beckman Coulter, USA). Количество ДНК определяли с помощью Quant–iTds DNAHS Assay Kit. Секвенирование осуществляли с использованием секвенатора ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, USA) (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Секвенатор ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, USA)

Биоинформатический анализ. Полученные последовательности были проанализированы с помощью QIIME, Version 1.9.1. Парные прочтения были объединены. Низкокачественные и химерные последовательности были удалены. Оставшиеся последовательности были сгруппированы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% сходства (минимум пять последовательностей для ОТЕ). ОТЕ назначались методом open reference. Для таксономической классификации последовательностей использовали RDP классификатор [250].

Статистический анализ. Тест Kruskal –Wallis использовался для определения относительного обилия флотипов между группами. Была использована версия R 3.4.1, значение было установлено на $P < 0,05$. Выделение ДНК гена 16S рРНК секвенирование было проведено в условиях в условиях ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ (руководитель протеогеномного направления, директор Междисциплинарного центра протеомных исследований Чернов В.М.)

2.5. Метод просвечивающей электронной микроскопии (метод негативного контрастирования)

Клинический материал на четвертом этапе исследования был сформирован из основной группы исследования. Методом рандомизации были сформированы 2 выборки:

1. Основная группа – пациенты с воспалительными заболеваниями пародонта, имеющие повышенную склонность к образованию зубных отложений (над- и поддесневого зубного камня) (12 человек - 3 мужчин и 9 женщин в возрасте от 18 и до 19 лет)
2. Группа сравнения – лица с интактным зубным рядом, интактным пародонтом и отсутствием склонности к минералообразованию (9 человек - 4 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 и до 19 лет)

При этом выборки, сформированные для исследования, не контролировались на репрезентативность.

У пациентов обеих групп были получены образцы проб ротовой жидкости. Отбор проб осуществляли в вечернее время суток (пациенты чистили зубы в утреннее время, с применением профилактических зубных паст и ополаскивателей), до профессиональной гигиены рта и удаления над- и поддесневых отложений.

К 2,4 мл отобранной ротовой жидкости был добавлен 0,1 мл 25% глутарового альдегида. Собранные образцы были помещены в микроцентрифужные пробирки, которые хранили в холодильнике при температуре -20°C от 1 до 3 суток. Осадок суспензии, полученный центрифугированием при 8 000 об/мин в течение 40 мин, трижды промывали 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4. Каплю осадка наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, контрастировали 2% водным раствором уранилацетата 1 минуту при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой и просушивали.

Просвечивающая электронная микроскопия (метод негативного контрастирования) проводилась с использованием электронного микроскопа JEM 100С («Jeol» Japan). Съемку проводили на фототехническую пленку AGFA ORTHOCHROMATIC. Для получения микрофотографий негативы сканировали на сканере EPSON PERFECTION 4990 PHOTO с разрешением 600 dpi. Микрофотографии обрабатывали с помощью программы Axio Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss).

Электронно–микроскопические изображения были получены в НИЛ ультраструктурной организации тканей кафедры зоологии и общей биологии КФУ под методическим руководством канд. биол. наук доцента Л.В. Малютиной.

2.6. Методы статистического исследования

Статистическая обработка результатов выполнена на персональном компьютере IBM с процессором Core 2 Duo с использованием стандартных статистических программ и включала расчет: средней арифметической величины (M), стандартной арифметической (m), парного t – критерия Стьюдента, критерий Kruskal–Wallis, критерий Уилкоксона – Манна – Уитни.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

3.1. Клиническая характеристика воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста

В ходе проведенного исследования была изучена частота и характер патологических изменений тканей пародонта у молодых людей в возрасте 18 – 19 лет. Полученные в ходе стоматологического осмотра 533 обучающихся 1-го – 2-го курсов различных ВУЗов г. Казани результаты обработаны методом вариационной статистики (таблица 4).

Таблица 4 – Частота выявления различных патологических изменений в тканях пародонта у молодых людей в возрасте 18 – 19 лет

Возраст	Юноши		Девушки		Оба пола	
	Кол-во обследованных	Распространенность (%)	Кол-во обследованных	Распространенность (%)	Кол-во обследованных	Распространенность (%)
18	97	56,0±2,6	174	55,2±2,8	271	55,6±1,9
19	116	51,2±2,8	146	50,6±2,6	262	50,9±2,8
Всего	213	53,6±1,9	320	52,9±2,6	533	53,25±1,9

Анализ результатов показал, что 47,0 % обследованных составили молодые люди с интактным пародонтом. В 53,0% случаев у обследованных пациентов были выявлены различные симптомы воспалительных заболеваний пародонта. (Рисунок 3)

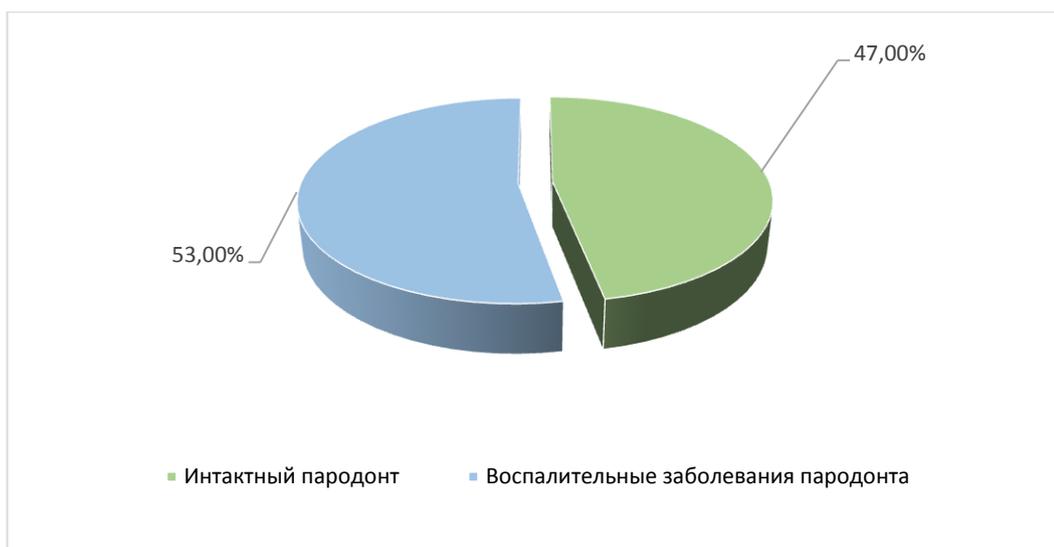


Рисунок 3 – Состояние пародонта у молодых пациентов в возрасте 18-19 лет

Показательно, что частота выявления различных заболеваний пародонта у лиц 19-летнего возраста была несколько выше (на 4,7 %), чем у молодых пациентов в возрасте 18 лет, что в числе многих причин, можно объяснить снижением влияния симпатической иннервации на сформированные ткани пародонта. Последнее подтверждает правильность выбора возрастных ограничений при определении критерий настоящего исследования.

Анализ полученных данных показал, что у юношей заболевания пародонта встречались в 56,0 % случаев, достоверно чаще ($p < 0,05$), чем у девушек (44%). Максимальные гендерные различия в частоте поражения пародонта выявлены (в пользу юношей) в 18-летнем возрасте.

Детальное изучение пародонтологического статуса обследованных лиц показало, что гингивит (K05.1 по МКБ–10) был диагностирован в 68,1% случаев, пародонтит (K05.3 по МКБ–10) – в 23,3% случаев, другие формы патологии пародонта – в 8,6% случаев (Рисунок 4).

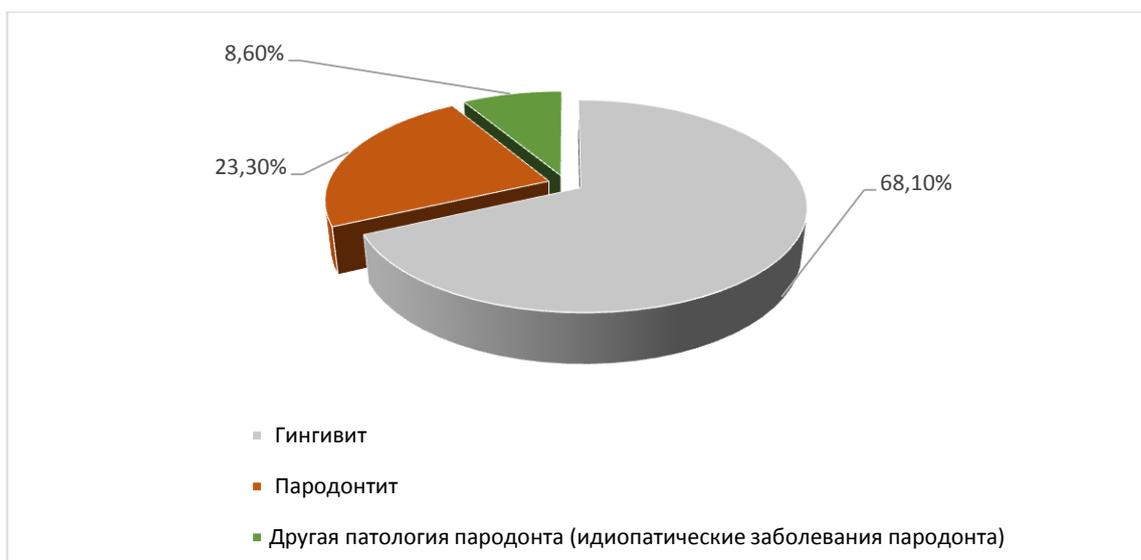


Рисунок 4 – Структура и частота выявления различных форм заболеваний пародонта у лиц основной группы наблюдения по классификации МКБ–10

В структуре заболеваемости пародонта, в частности гингивита, было выявлено, что катаральный гингивит встречался в 68,80% случаев, гипертрофический гингивит в 30,50%, а язвенный в 0,70% случаев. Острая форма гингивита встречалась в 30,70% случаев, а хроническая форма в 69,30% случаев. В 75,50% случаев встречался генерализованный гингивит, а в 24,50% - локализованный гингивит. Преимущественно у обследованных лиц диагностировали хронический генерализованный гингивит (Рисунок 5).

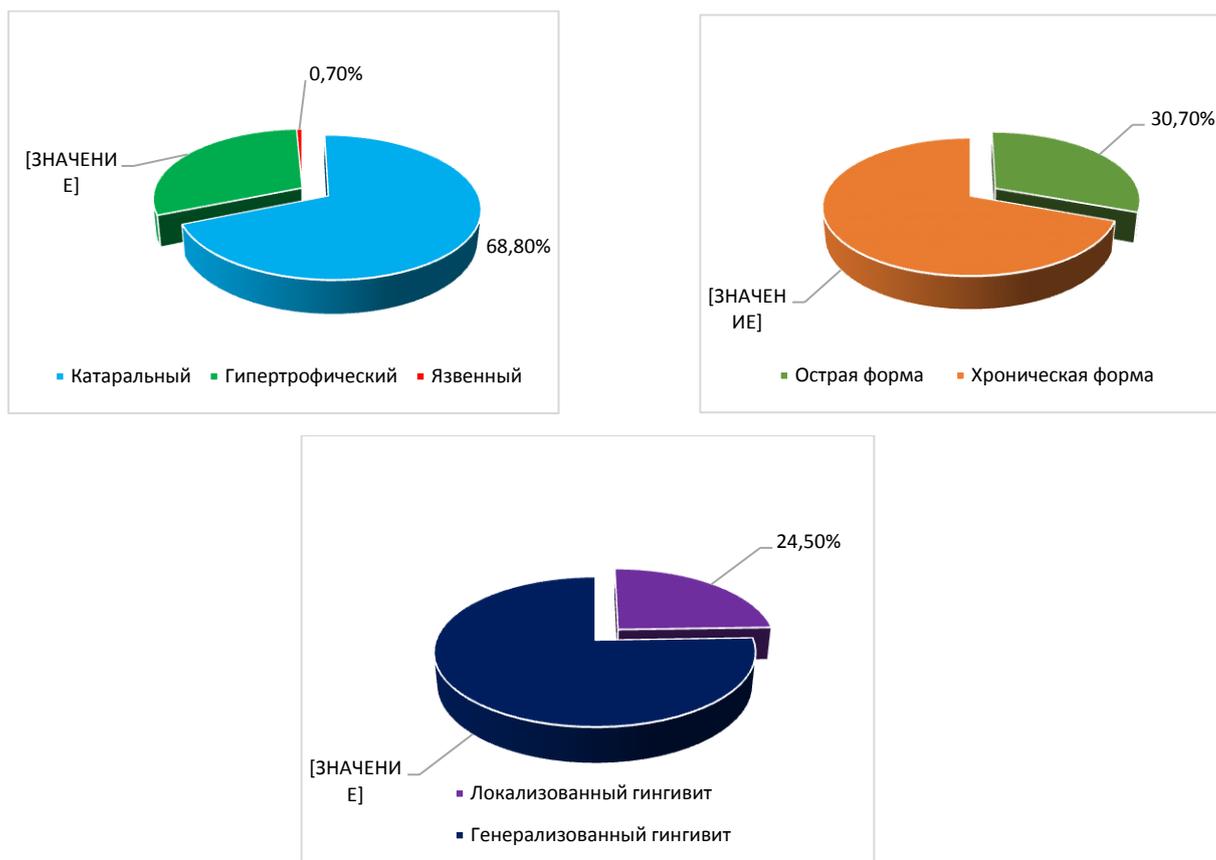


Рисунок 5 – Клиническая структура (частота выявления различных форм) гингивита у пациентов 18-19 лет

При анализе клинической структуры пародонтита было выявлено, что пародонтит легкой степени тяжести встречался в 62,30 % случаев, средняя степень тяжести пародонтита была выявлена в 36,70% случаев, и только в 1,00% случаев диагностировали пародонтит тяжелой степени. В 71,90% случаев выявлялась хроническая форма пародонтита, у 28,10% обследованных пародонтит протекал в острой форме. В 76,60% случаев выявляли генерализованный пародонтит, а в 23,4% - его локализованную форму. По характеру течения у обследованных преобладал хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (Рисунок 6).

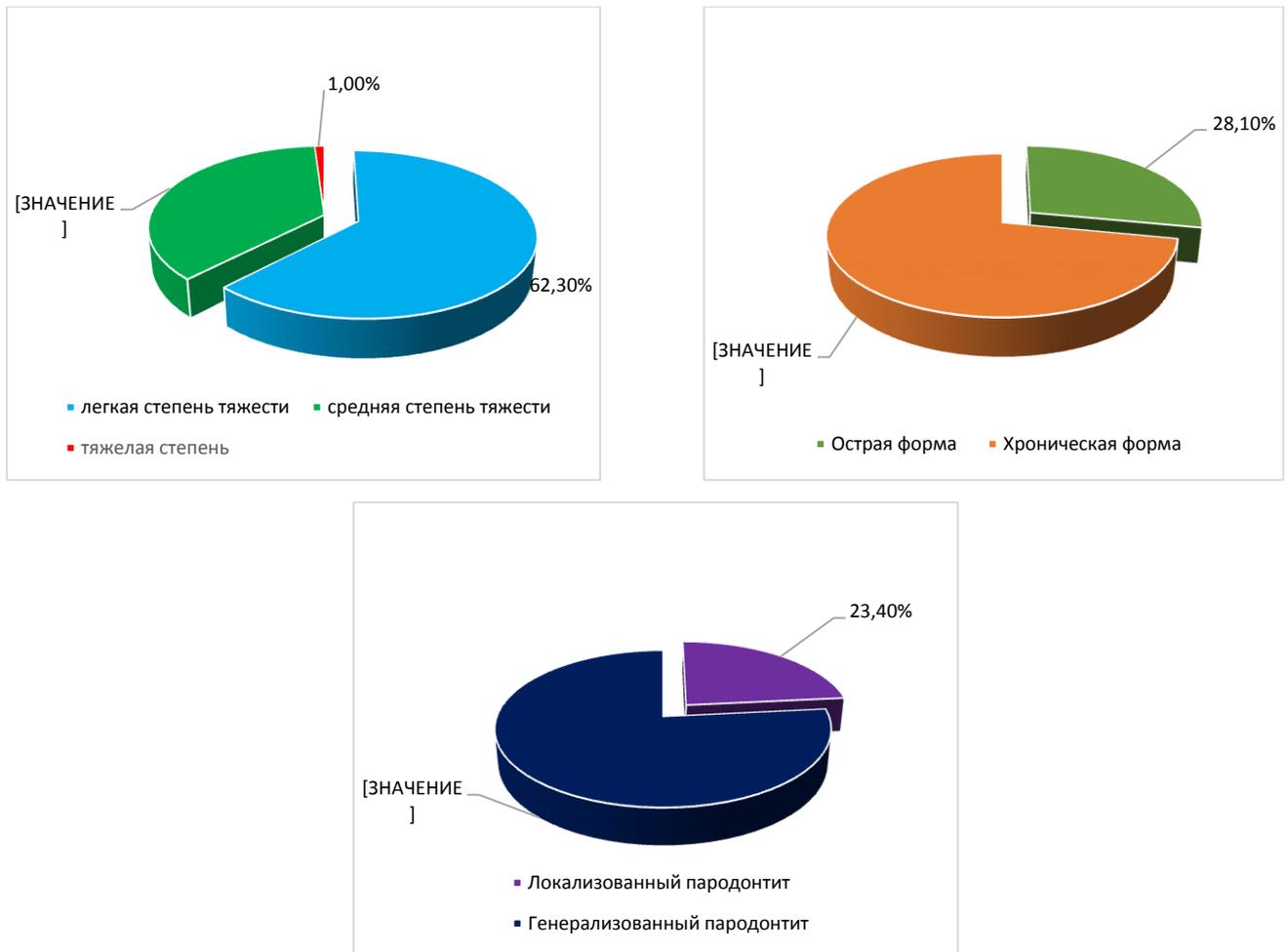


Рисунок 6 – Структура заболеваемости пародонта (пародонтит) у пациентов 18-19 лет

Нами были проанализированы основные показатели стоматологического статуса у 90 пациентов контрольной группы и 2 групп наблюдения. Показатели гигиенических и пародонтологических индексов у пациентов исследуемых групп отражены в таблице №5.

Таблица 5 – Показатели гигиенических и парадонтологических индексов

Пародонтологические и гигиенические индексы	Контрольная группа (34 пациента)	Группа наблюдения 1 (30 пациентов)	Группа наблюдения 2 (36 пациентов)
ОHI-S	0-1,6	1,82±0,17	2,51±0,18
PMA	-	29,30±5,3	49,3±6,9
PBI	-	1,46±0,16	2,26±0,18
CPITN	-	1,75±0,19	3,5±0,19

Показатели индекса ОHI-S в группе наблюдения №1 пациентов с хроническим генерализованным катаральным гингивитом составили – 1,82±0,17, а группе наблюдения №2 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести – 2,51±0,18, что свидетельствовало о неудовлетворительном уровне гигиены полости рта у пациентов двух групп наблюдения. Средняя величина папиллярно – маргинально – альвеолярного индекса PMA в группе наблюдения №1 у пациентов с хроническим катаральным гингивитом составила 29,30±5,3, а в группе наблюдения №2 у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом составила 49,3±6,9. Оценка степени кровоточивости десны по показателю индекса кровоточивости десневых сосочков PBI составила: в группе наблюдения №1 – 1,46±0,16, а в группе наблюдения №2 – 2,26±0,18, что вызывало микрогеморрагий при зондировании десневой борозды. Индекс нуждаемости в лечении болезней пародонта CPITN у пациентов группы наблюдения №1 составлял 1,75±0,19, а группе наблюдения №2 – 3,5±0,19, что указывало на необходимость проведения профессиональной

гигиены полости рта, коррекции индивидуальной гигиены полости рта и потребность в терапевтическом и хирургическом пародонтологическом лечении.

Таким образом, клинические показатели пародонтологического статуса у пациентов группы наблюдения №1 и группы наблюдения №2 достоверно отличались от показателей нормы и возрастали индексные величины изучаемых показателей у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

В хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта нуждалось 19,0% пациентов обеих групп наблюдения. Проведение ортодонтической коррекции было показано 29,0% пациентам из 2-ой групп наблюдения.

Все проведенные у пациентов молодого возраста лечебно-диагностические мероприятия были проведены в условиях клиники, с целью формирования групп наблюдения, с соблюдением обязательного критерия – отсутствие у пациентов на момент обследования ортодонтической и мукогингивальной патологии при оптимальном состоянии жевательной мускулатуры.

Так, по показаниям всем пациентам с сочетанной ортодонтической патологией проводили соответствующее лечение: френулопластика, пластика уздечки нижней губы и языка, коррекция преддверия рта, вестибулопластика.

При проведении вестибулопластики достигалось перемещение мимических мышц, прикрепляющихся к гребню альвеолярного отростка, вглубь преддверия, смещение, отодвигание переходной складки и увеличение ее площади [252].

При проведении вестибулопластики мы проводили разрез слизистой оболочки параллельно изгибу челюсти, отступив от слизисто – десневой границы на 7 – 10 мм (в области премоляров и моляров) (Рисунок 7).

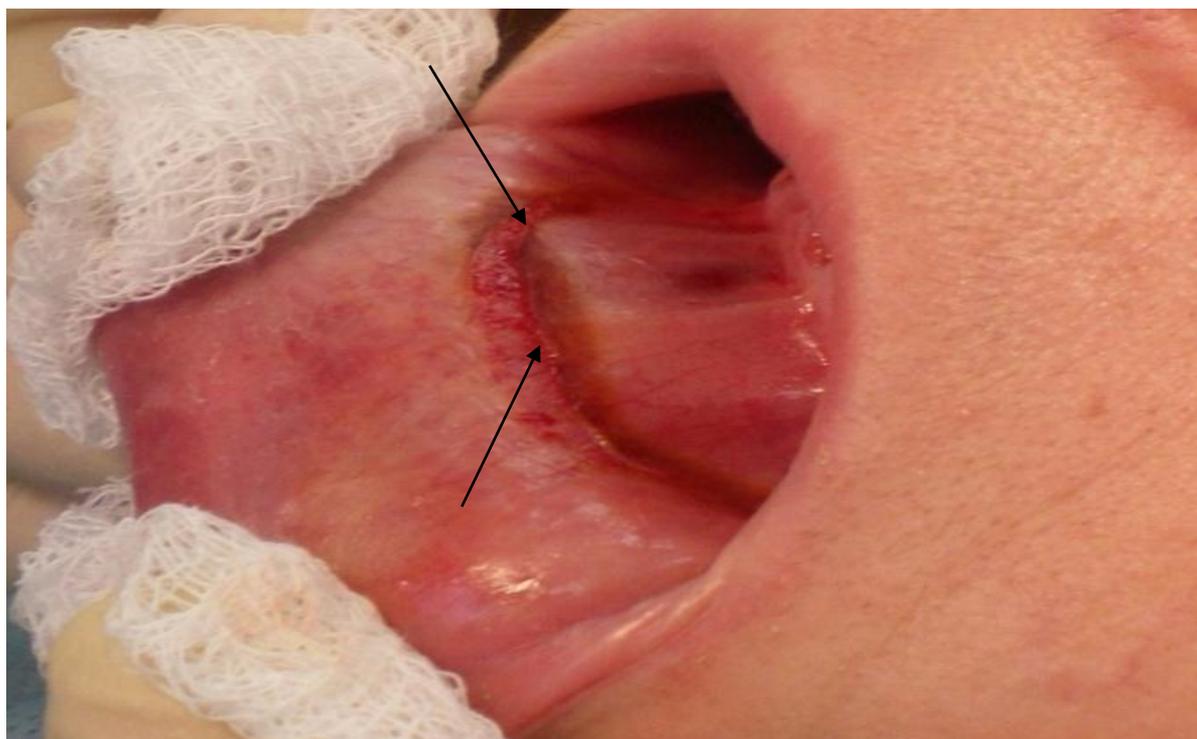


Рисунок 7 – Пациент Ю., 18 лет – разрез слизистой оболочки при проведении вестибулопластики по Edlan – Mejchar

Далее отслаивали слизистый лоскут от линии разреза к челюсти. Тупым путём, очень аккуратно, проводили отслаивание подслизистых тканей (мышц), перемещая их вдоль надкостницы на глубину 10 мм (во фронтальном отделе) и на 6–7 мм (в боковых отделах). Первоначальная площадь раневого дефекта составляла около 8 – 12 см² (Рисунок 8).

За 1 день до вмешательства назначали антибиотики тропные к костной ткани (Флексид 500, 1 табл. 1 раз в день, курс 7 дней) для профилактики осложнений, а также гипосенсибилизирующие препараты (Кларитин по 1 табл. 1 раз в день, курс 7 дней) для уменьшения отека лоскута. В первые дни после оперативного вмешательства назначали анальгетики (Кетанов по 1 табл. до 6 раз в день).

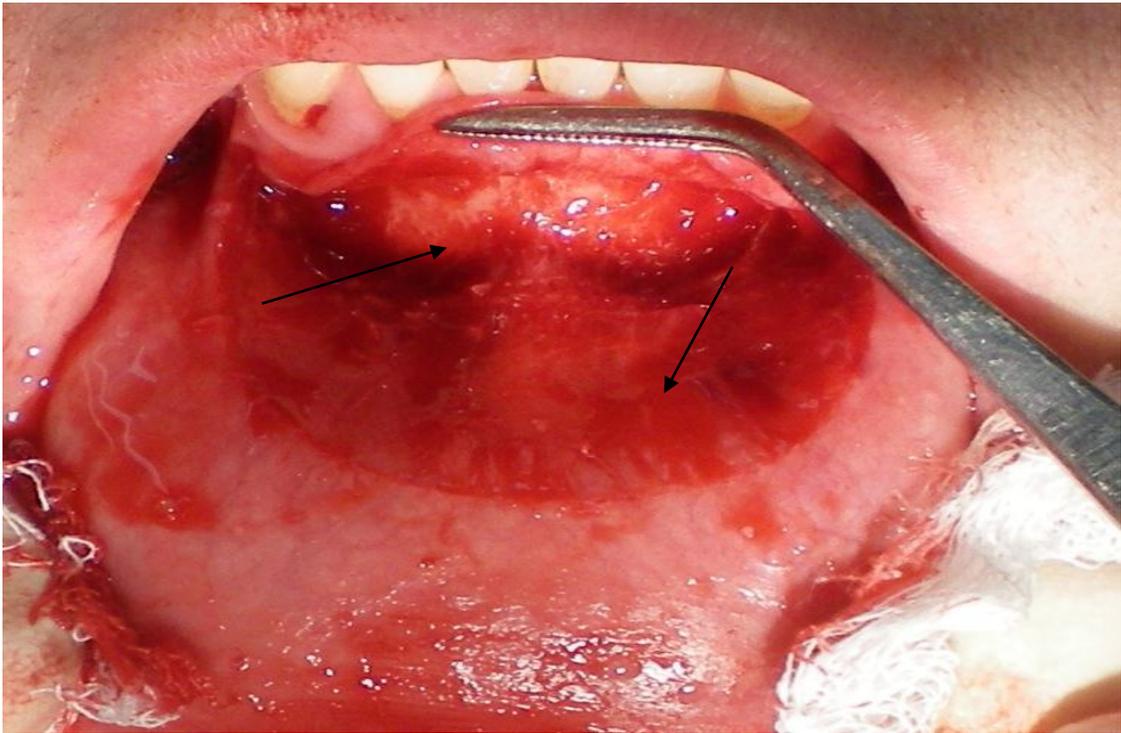


Рисунок 8– Пациент Ю., 18 лет – первоначальная площадь раневого дефекта

Выписка из истории болезни пациента Ю., 18 лет, проходившего плановый осмотр полости рта на базе стоматологической клиники ООО «Камил–Дент»:

15.10.2013. **Жалобы на момент обращения:** на кровоточивость десен при чистке зубов, чувство распирания и дискомфорта в деснах, неприятный запах изо рта. Жалобы на мелкое преддверие рта.

Анамнез заболевания: считает себя больным с 2011 года, связывает появление первых симптомов заболевания с началом курения. С 2012 года отмечает ухудшение состояния десен в виде усиления кровоточивости десен. За специализированной помощью не обращался.

Анамнез жизни: с 2009 года состоит на учете у гастроэнтеролога по поводу хронического гиперацидного гастрита.

Результаты объективного исследования: общее состояние удовлетворительное, кожные покровы лица и шеи физиологической окраски, чистые; регионарные подбородочные, поднижнечелюстные, околоушные и шейные лимфатические узлы не пальпируются.

Лицо симметрично, носогубные и подбородочная складка умеренно выражены, губы спокойно сомкнуты. Слизистая оболочка губ, щек – бледно розового цвета, отечна, с отпечатками зубов по линии смыкания челюстей. На корне языка имеется желтоватый налет. Преддверие рта – мелкое. Прикус ортогнатический, центральная линия смещена влево, скученное положение зубов во фронтальном отделе нижней челюсти.

Слизистая оболочка десны в боковых отделах верхней и нижней челюсти бледно-розового цвета, межзубные сосочки остроконечной формы, плотно прилежат к зубам. Во фронтальном отделе верхней и нижней челюсти папиллярная и маргинальная части десны рыхлые, отечны и гиперемированы, легко кровоточат при зондировании, болезненны при пальпации. Межзубные сосочки в этой области имеют платообразную форму, неплотно прилежат к зубам. С вестибулярной поверхности фронтальных зубов верхней челюсти и нижней челюсти имеются массивные отложения над- и поддесневого зубного камня, зубы с вестибулярной и оральной поверхности покрыты темно-коричневым налетом. В области 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 зубов зондируются пародонтальные карманы глубиной 2 мм. Зубы устойчивы.

Зубная формула:

о	п	к							к	п	о				
1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8
4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8

На **ортопантомограмме** от 15.10.2013 г. в области 3.4, 3.3, 3.2, 3.1, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 зубов определяется горизонтальная резорбция верхушек межзубных перегородок до 1/3 длины корней зубов.

Индексная оценка состояния тканей пародонта и органов полости рта: КПУ=6; ОНІ-S=2 балла; РМА=33,3%; РВІ=2,15 балла; СРІТN=1,98 балла.

Диагноз: хронический генерализованный пародонтит, легкой степени тяжести.

План дополнительного обследования и лечения:

1. Профессиональная гигиена полости рта, включающая снятие минерализованных зубных отложений, удаление зубного налета, полировка зубов чашечками и щетками с полировочной пастой.
2. Коррекция индивидуальной гигиены полости рта, подбор индивидуальной гигиенической программы.
3. Комбинированная терапия: введение хлоргексидина 0,05% в пародонтальные карманы при помощи ватных турунд. Затем фиксация полосок пленки «Диплен-Дента М» размером 1x3 мм на наружной стенке пародонтальных карманов.
4. Консультация и лечение у ортодонта.
5. Консультация и лечение у хирурга – пародонтолога.
6. Общее лечение: витаминотерапия - 5% р-р аскорбиновой кислоты в/м 1 р/сут.; тиамин 0,01 мг 3 р/сут. Курс 10-15 дней, а также физиолечение: КУФ на область десен №5.
7. Общий анализ крови и мочи.

Рекомендовано диспансерное наблюдение у врача-пародонтолога.

В первое посещение 15.10.2013 проведено: профессиональная гигиена полости рта, обучение техники чистки зубов и пользования зубной нитью, рекомендована зубная паста Blend-a-med 7 Кора дуба, зубная щетка Oral-B Expert средней жесткости, вошенная зубная нить. Комбинированная фаготерапия.

Дневник наблюдения:

18.10.2013. Жалобы: на фоне лечения пациент отмечает уменьшение кровоточивости десен и выделений из пародонтальных карманов. Неприятный запах изо рта сохраняется.

Объективно: уменьшилась отечность и гиперемия папиллярно-маргинальной части десны в области фронтальных нижних зубов. При зондировании десна слегка болезненна, точечно кровоточит. С вестибулярной

поверхности фронтальных зубов верхней и нижней челюсти отложения мягкого зубного налета. ОНI-S=1,6 балла.

Лечение: коррекция индивидуальной гигиены полости рта - рекомендована электрическая зубная щетка с маленькой рабочей частью; проведены: снятие мягкого зубного налета гигиенической щеткой с пастой «Детартрин» и лечение хлоргексидином.

20.10.2013. Сохраняется легкая индуцируемая кровоточивость десен. Объективно: слизистая оболочка маргинальной части десны слегка гиперемирована, при зондировании кровоточит точечно, безболезненна. Межзубные сосочки платообразной формы, неплотно прилежат к зубам.

Лечение: лечение препаратом хлоргексидин.

23.10.2013. Жалоб нет. Объективно: слизистая оболочка десневого края нижней челюсти бледно-розового цвета, безболезненная, при зондировании не кровоточит. Межзубные сосочки платообразной формы, плотно прилежат к зубам. Индексная оценка состояния тканей пародонта: ОНI-S=0,88 балла; РМА=5,3%; РВ1=0,9 балла; СРITN=0,8 балла.

28.10.2013. Жалоб нет. Объективно: слизистая оболочка десневого края нижней челюсти бледно-розового цвета, безболезненная, при зондировании не кровоточит. Межзубные сосочки платообразной формы, плотно прилежат к зубам. Индексная оценка состояния тканей пародонта: ОНI-S=0,88 балла; РМА=5,3%; РВ1=0,9 балла; СРITN=0,8 балла.

Лечение: Под инфильтрационной анестезией Sol. Ubistesini 4% 1.7 мл. произведена операция вестибулопластики открытым методом по Edlan-Mejchar разрезом от зуба 3.4 до зуба 4.4 по переходной складке слизистой оболочке и послойное отслаивание слизистого лоскута от линии разреза к челюсти. Медикаментозная обработка хлоргексидином 0,05%. Наложение давящей повязки.

Рекомендации: Полоскания антисептиками через каждые 2-3 часа и после каждого приема пищи. В течении первых 7 дней использование хлоргексидина, далее – полоскание кипяченой водой комнатной температуры. На 3 сутки и

последующие 3 недели рекомендовано проведение специальных миогимнастических упражнений. Явка через 2 дня.

30.10.2013. Жалоб нет. Объективно: Лицо симметричное, кожные покровы чистые, послеоперационная раневая поверхность без видимых осложнений.

Лечение: Проведен плановый послеоперационный осмотр пациента. Орошение раневой поверхности раствором хлоргексидина 0,05%. Явка через 7 дней.

6.11.2013. Жалоб нет. Объективно: Лицо симметричное, кожные покровы чистые, послеоперационная раневая поверхность без видимых осложнений.

Лечение: Проведен плановый послеоперационный осмотр пациента. Орошение раневой поверхности раствором хлоргексидина 0,05%. Явка через 3 недели.

30.11.2013 Жалоб нет. Объективно: Лицо симметричное, кожные покровы чистые, послеоперационная раневая поверхность без видимых осложнений.

Лечение: Проведен плановый послеоперационный осмотр пациента. Раневая поверхность затянута вторичным натяжением.

Пациент направлен для терапевтической санации полости рта и на ортодонтический этап лечения. Пациент взят под диспансерное наблюдение у врача-пародонтолога, контрольный осмотр назначен через 6 месяцев.

На первом этапе научного исследования нами были проведены 62 оперативных вмешательства по коррекции преддверия с использованием метода вестибулопластики по Edlan – Mejchar (2013 г. – 18 операций, 2014 г. – 22 операции, 2015 г. – 22 операции), с их дальнейшим динамичным наблюдением. Все оперативные вмешательства протекали без особенностей.

Таких осложнений как одонтогенные воспалительные процессы, абсцедирование, флегмоны не было зафиксировано ни у одного прооперированного пациента. А отдаленные результаты показали углубление преддверия рта и остановку воспалительных процессов в тканях пародонта, что наглядно продемонстрировано на рисунках 9, 10.

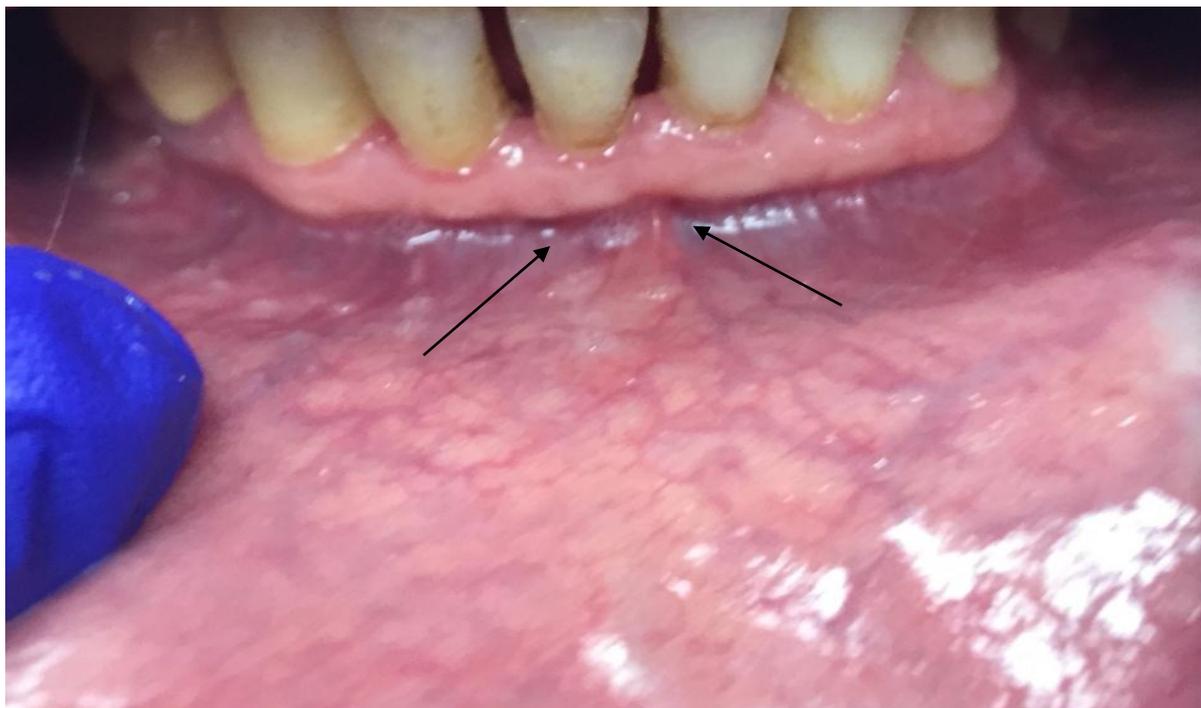


Рисунок 9 – Пациент Ю., 18 лет – диагноз мелкое преддверие рта, состояние до вестибулопластики по Edlan – Mejchar

Комплексная клинико-рентгенологическая оценка воспалительных заболеваний пародонта проводилась на основании объективного обследования, с определением клинических индексов и описания ортопантомограмм.

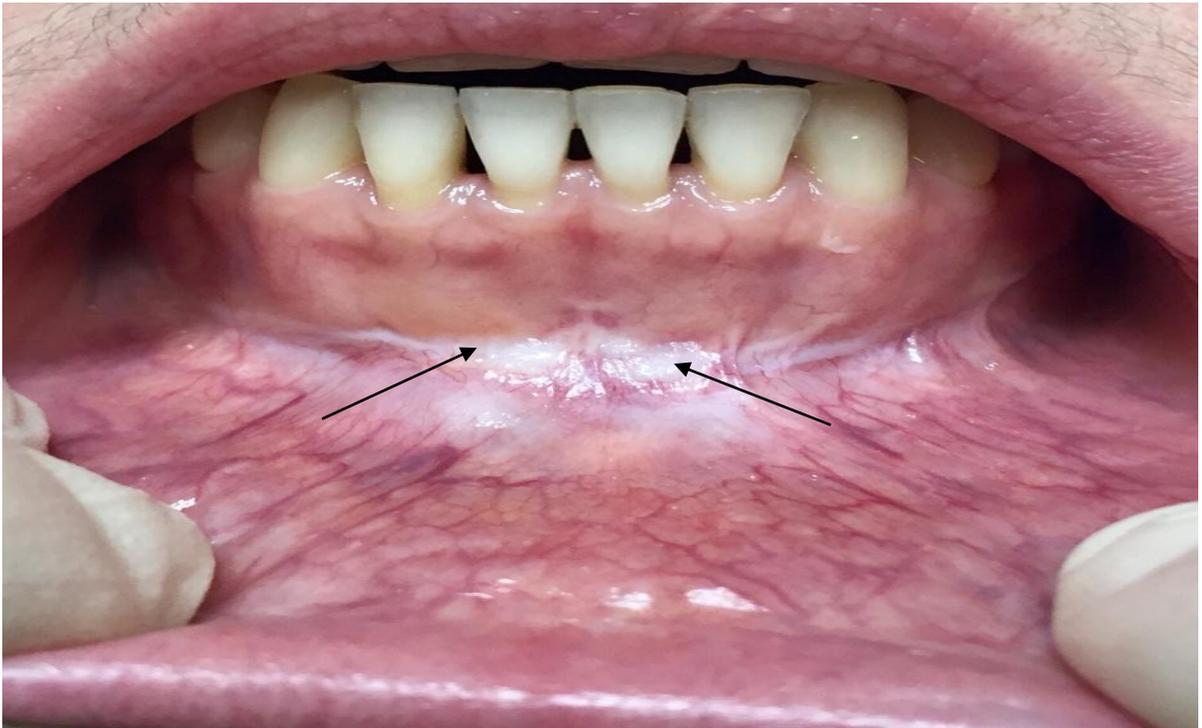


Рисунок 10 – Пациент Ю., 21 год – состояние через 3 года после вестибулопластики по Edlan – Mejchar и ортодонтического лечения (ортодонтический ретейнер)

Контрольную группу наблюдения сформировали пациенты 18–19 лет, имеющие интактный пародонт, ортогнатический прикус, а также в группу были включены ортодонтические пациенты, находящиеся в ретенционном периоде лечения.

При сборе анамнеза у всех пациентов жалобы отсутствовали.

При объективном обследовании выявлено, что состояние жевательных мышц было в норме; уздечки классифицировались как слабые, преддверие было средним (или глубоким), с отсутствием тяжей; хронической механической травмы или зафиксированных неправильно протекающих функций определено не было.

В процессе клинической оценки пародонтологического статуса нами определен десневой край бледно-розового цвета, плотный, кровоточивость при зондировании отсутствовала. Зубодесневое соединение нарушено не было.



Рисунок 11 – Пациент А., 19 лет – интактный пародонт

Status localis:

Пациент А., 19 лет.

Жалобы: нет

Результаты объективного исследования: общее состояние удовлетворительное, кожные покровы лица и шеи физиологической окраски, чистые; регионарные подбородочные, поднижнечелюстные, околоушные и шейные лимфатические узлы не пальпируются.

Лицо симметрично, носогубные и подбородочная складка умеренно выражены, губы спокойно сомкнуты. Слизистая оболочка губ, щек – бледно розового цвета. Прикус ортогнатический.

Слизистая оболочка десны на верхней и нижней челюсти бледно-розового цвета, межзубные сосочки остроконечной формы, плотно прилежат к зубам. Зубы устойчивы.

Зуб 4.6 имеется пломба на медиальной поверхности. В области зуба 3.5 имеется дентальный имплантат MIS C1 3.75 на 11 мм и металлокерамическая коронка на цементной фиксации. Находится после проведенного ортодонтического

лечения в ретенционном периоде (Рисунок 11). Ортодонтическое лечение закончилось 3 года назад на несъемной технике механического действия (Damon 3, производство США). Ортодонтические ретейнеры (Ortho Tehnology, США) на верхней и нижней челюсти в удовлетворительном состоянии (Рисунок 12). Преддверие рта глубокое. При анализе ортопантограммы деструктивных изменений не прослеживалось (Рисунок 13). Вершины межальвеолярных перегородок частично сохранены. Выявлено преобладание мелкопетлистого рисунка губчатой костной ткани, с отсутствием зон остеопороза и разрушения костной ткани.

Зубная формула:

1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8
4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8
		п											I		



Рисунок 12 – Пациент А., 19 лет – интактный пародонт (наличие ортодонтического ретейнера)

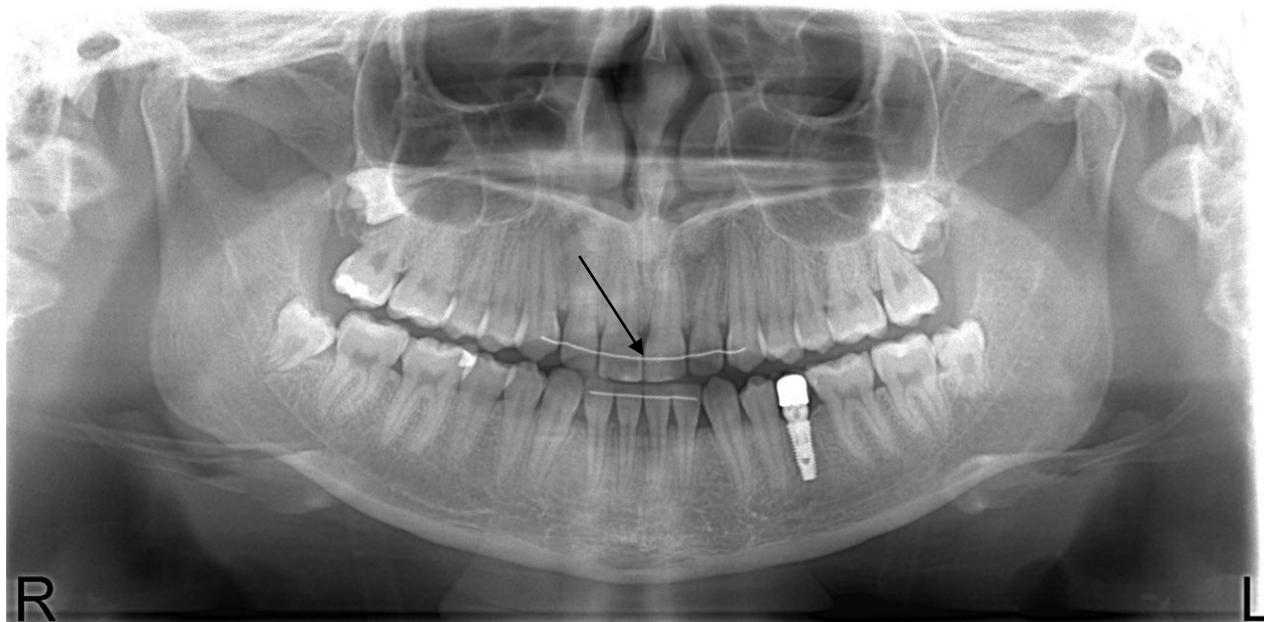


Рисунок 13 – Ортопантомограмма пациента А., 19 лет – интактный пародонт

В группу наблюдения №1 с хроническим генерализованным катаральным гингивитом отбирались пациенты 18 – 19 лет, имеющие ортогнатический прикус или это был ортодонтический пациент в ретенционном периоде. Ортодонтическое лечение проводилось на несъемной технике механического действия DamonQ (производитель ORMCO, США).

При сборе анамнеза пациенты жаловались на кровоточивость десен при чистке зубов, при приеме твердой пищи.

При определении критериев объективного обследования нами определено, что состояние жевательной мускулатуры находилось в норме; уздечки классифицировались как слабые. Хронической механической травмы или зафиксированных неправильно протекающих функций определено не было. Катаральный гингивит классифицировался как генерализованный, различной степени тяжести, с хроническим течением, что по классификации МКБ–10 соответствует коду K05.1.

В процессе клинической оценки пародонтологического статуса нами были выявлены: гиперемия десневых сосочков, незначительная кровоточивость при зондировании, отмечали наличие зубных отложений, преимущественно в

области фронтальных зубов нижней челюсти. Зубодесневое соединение нарушено не было и составляло 0,2 мм.

Пациент Я., 18 лет – хронический генерализованный катаральный гингивит, состояние после проведенного ортодонтического лечения (ретенционный период) (Рисунок 14).



Рисунок 14 – Пациент Я., 18 лет – хронический генерализованный катаральный
гингивит

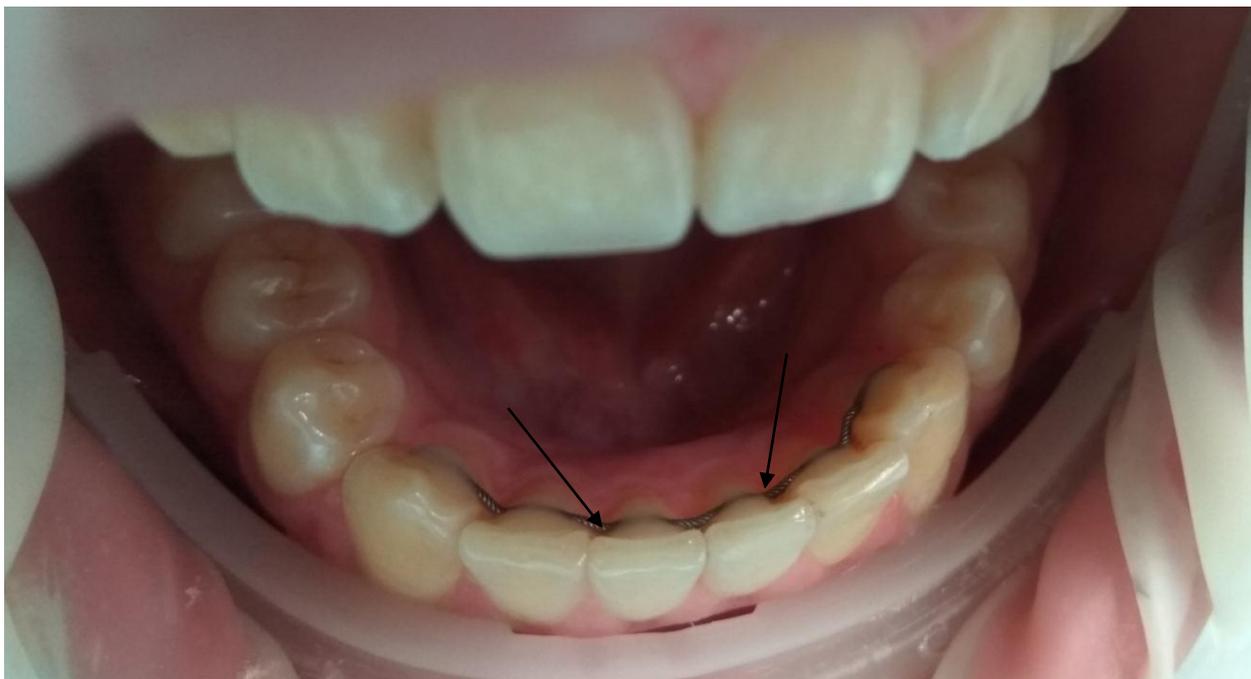


Рисунок 15 – Пациент Я., 18 лет – хронический генерализованный катаральный гингивит (наличие ортодонтического ретейнера)



Рисунок 16 – Ортопантомограмма пациента Я., 18 лет – хронический генерализованный катаральный гингивит

Status localis:

Пациент Я., 18 лет.

Жалобы: на кровоточивость десен в области зубов 1.3, 1.2, 1.1, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, 4.2, 4.3. Неприятный запах изо рта.

Анамнез заболевания: Около трех месяцев назад у пациента появилась кровоточивость десен при чистке зубов и при приеме пищи.

Результаты объективного исследования: общее состояние удовлетворительное, кожные покровы лица и шеи физиологической окраски, чистые; регионарные подбородочные, поднижнечелюстные, околоушные и шейные лимфатические узлы не пальпируются.

Лицо симметрично, носогубные и подбородочная складка умеренно выражены, губы спокойно сомкнуты. Слизистая оболочка губ, щек – бледно розового цвета. Прикус ортогнатический.

Слизистая оболочка десны в боковых отделах верхней и нижней челюсти бледно-розового цвета, межзубные сосочки остроконечной формы, плотно прилежат к зубам. Во фронтальном отделе верхней и нижней челюсти папиллярная десна отечна и гиперемирована, легко кровоточит при зондировании, безболезненная при пальпации. На зубах 4.6, 3.6 имеются пломбы на жевательной поверхности в удовлетворительном состоянии. На зубе 1.7 имеется кариозный процесс в пределах эмали. Пациент находился на ортодонтическом лечении с 2013 по 2015 год на несъемной технике механического действия (Damon 3, производство США) (Рисунок 14). Сейчас находится в ретенционном периоде на ретейнерах (Ortho Tehnology, США) на верхней и нижней челюсти (Рисунок 15). При анализе ортопантомограммы (Рисунок 16) деструктивные изменения в костной ткани межальвеолярных перегородок не определяются. Отмечается истончение замыкательной кортикальной пластинки челюстей и незначительное расширение периодонтальной щели, а также разрушение наружной и внутренней пластинки, она частично не прослеживается в боковых отделах (зона премоляров и моляров нижней и верхней челюсти). Данные изменения являются следствием активного перемещения зубов в процессе ортодонтического лечения.

Зубная формула:

С																	
1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1		2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	
4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1		3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	
		П													П		

Индексная оценка состояния тканей пародонта: ОНI-S=1,82 балла; РМА=29,3%; РВI=1,46 балла; СРITN=1,75 балла. КПУ – 3.

Диагноз: Хронический генерализованный катаральный гингивит K05.1.

В группу с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести отбирались пациенты 18–19 лет, имеющие ортогнатический прикус или это был ортодонтический пациент в ретенционном периоде. Ортодонтическое лечение проводилось на несъемной технике механического действия (брекет – система).

При сборе анамнеза пациенты предъявляли жалобы на боли в области десневого края, кровоточивость десны при чистке зубов и приеме твердой пищи, неприятный запах изо рта.

В данную группу отбирались пациенты с нормальным тонусом жевательной мускулатуры или использующие в ночное время индивидуальные силиконовые каппы. Преддверие рта классифицировалось как глубокое или среднее (как результат проведенной вестибулопластики по Edlan – Mejchar [252], при наличии мелкого преддверия в анамнезе). Пародонтит классифицировался как генерализованный, легкой степени тяжести, с хроническим течением, что по классификации МКБ–10 соответствует коду K05.3.

В процессе клинической оценки пародонтологического статуса определялось явления симптоматического хронического катарального гингивита (гиперемия десневых сосочков, значительная кровоточивость при зондировании), наличие над- и поддесневых отложений. Степень подвижности зубов по Miller составила 1 – 2 балла, наличие экссудата не определялось, зубодесневого

соединение было нарушено. Пародонтальные карманы чаще всего определялись в области резцов и первых моляров нижней челюсти, глубиной до 4 мм.

Гигиеническое состояние оценено как удовлетворительное или плохое.

Status localis:

Пациент К., 19 лет.

Жалобы: на кровоточивость десен при чистке зубов, чувство распирания и дискомфорта в деснах, неприятный запах изо рта.

Анамнез заболевания: считает себя больным с 2013 года, связывает появление первых симптомов заболевания с началом курения. С 2014 года отмечает ухудшение состояния десен в виде усиления кровоточивости десен. За специализированной помощью не обращался.

Анамнез жизни: С 2014 года находится на диспансерном учете у невролога.

Результаты объективного исследования: общее состояние удовлетворительное, кожные покровы лица и шеи физиологической окраски, чистые; регионарные подбородочные, поднижнечелюстные, околоушные и шейные лимфатические узлы не пальпируются.

Лицо симметрично, носогубные и подбородочная складка умеренно выражены, губы спокойно сомкнуты. Слизистая оболочка губ, щек – бледно-розового цвета, отечна, с отпечатками зубов по линии смыкания челюстей. На корне языка имеется желтоватый налет. Преддверие рта – мелкое. Прикус ортогнатический. Слизистая оболочка десны в боковых отделах верхней и нижней челюсти бледно-розового цвета, межзубные сосочки остроконечной формы, плотно прилежат к зубам. Во фронтальном отделе верхней и нижней челюсти папиллярная и маргинальная части десны рыхлые, отечны и гиперемированы, легко кровоточат при зондировании, болезненны при пальпации. Межзубные сосочки в этой области имеют платообразную форму, неплотно прилежат к зубам. С вестибулярной поверхности фронтальных зубов верхней челюсти и нижней челюсти имеются массивные отложения над- и поддесневого зубного камня, зубы с вестибулярной и оральной поверхности покрыты темно-коричневым налетом. В области 3.1, 3.2,

3.3, 3.4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 зубов зондируются пародонтальные карманы глубиной 2 мм. Зубы устойчивы. Ортодонтическое лечение закончилось 5 лет назад на несъемной технике механического действия (Damon 3 (производитель ORMCO, США). В ночное время пациент пользуется индивидуальной силиконовой каппой Soft EVA 060 (1,5 мм) (Нидерланды) (Рисунок 17). Ортодонтические ретейнеры (Ortho Tehnology, США) на верхней и нижней челюсти в удовлетворительном состоянии (Рисунок 18). Соотношение коронок к корням 3.2., 3.1., 4.1., 4.2. зубов 1 к 1, что трактуется как несовершенный дентиногенез и требует пожизненного использования ортодонтических ретейнеров.

Зубная формула:

1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8		
								с		с							
4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8		
		с		с										п			

На **ортопантограмме** в области 3.4, 3.3, 3.2, 3.1, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 зубов определяется горизонтальная резорбция верхушек межзубных перегородок до 1/3 длины корней зубов.

Индексная оценка состояния тканей пародонта и органов полости рта:
КПУ=4; ОНІ-S=2 балла; РМА=33,3%; РВІ=2,15 балла; СРІТN=1,98 балла.

Диагноз: хронический генерализованный пародонтит, легкой степени тяжести.

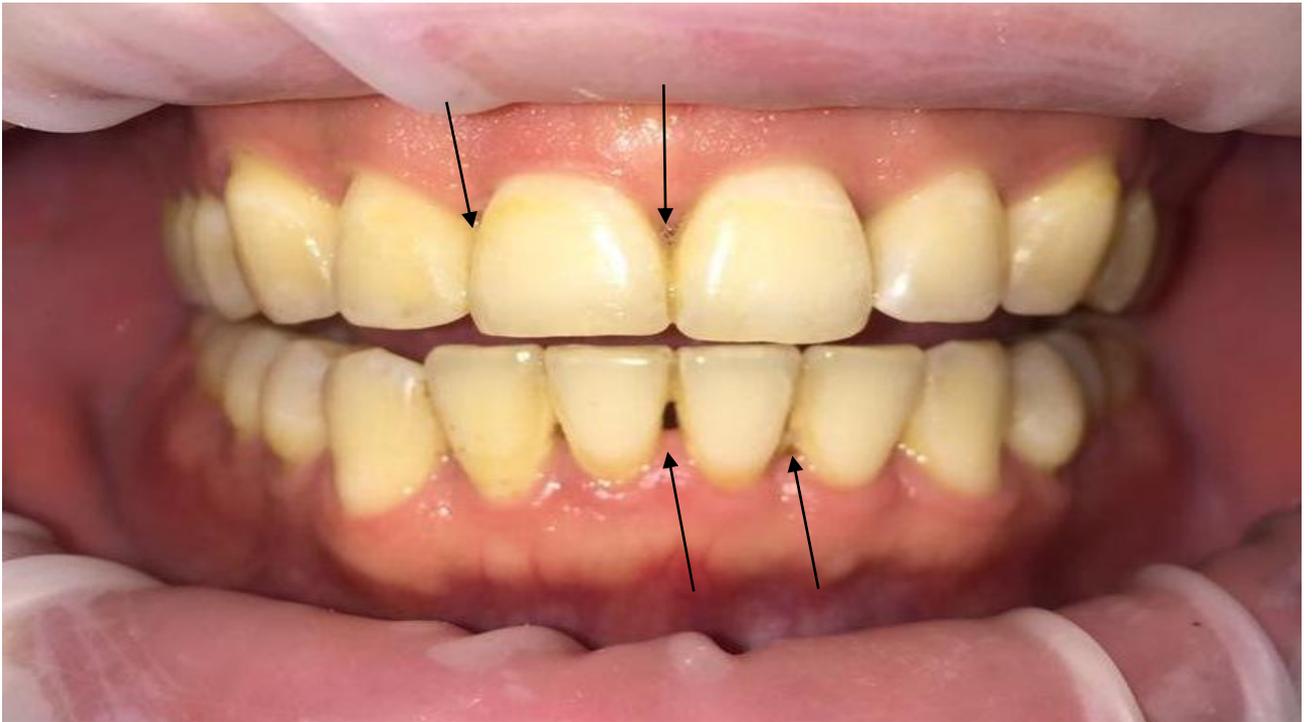


Рисунок 17 – Пациент К., 19 лет – хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести

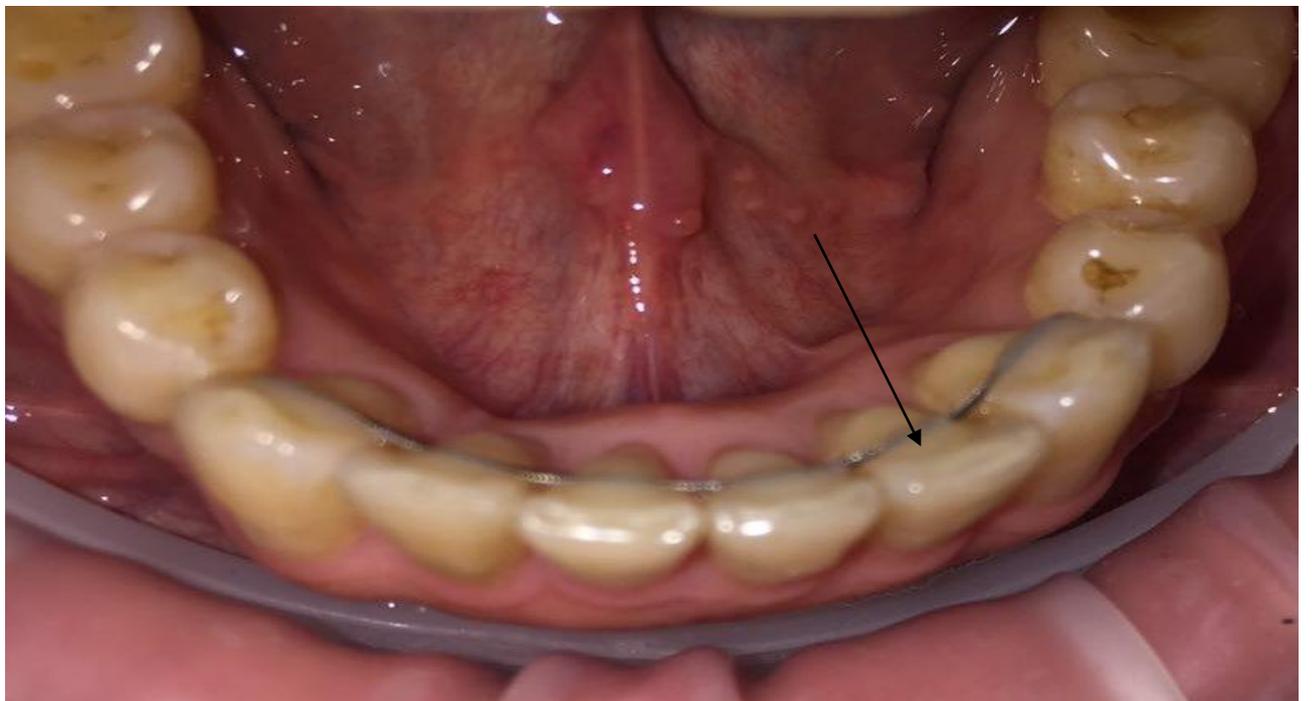


Рисунок 18 – Пациент К., 19 лет – хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (наличие ортодонтического ретейнера)



Рисунок 19 – Ортопантограмма пациента К., 19 лет – хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести

На ОПТГ (рисунок 19) заметно, что деструктивные изменения носили активный характер. При этом резорбированные участки имели неровные контуры или аркообразный характер, и были окружены участками очагового остеопороза, с преобладанием крупнопетлистого рисунка губчатой костной ткани.

Деструктивные изменения привели к разволокнению кортикальной пластинки, замыкающей межальвеолярные гребни, резорбции вершечек гребней, к снижению высоты межальвеолярных перегородок (к разрушению в пределах 1/3 их высоты), резорбции замыкающих пластинок. Также отмечалась разная степень активности костного процесса, которая определялась характером и четкостью контуров разрушенных отделов.

Вестибулопластика по Edlan A., Mejchar B. [252] проведена в 2014 г. в условиях стоматологической клиники ООО «Камил-Дент», послеоперационных осложнений не наблюдалось. На момент обследования (2016 г.) глубина преддверия составила 9 мм.

3.2 Результаты оценки видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных у лиц молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта

Результаты клинических исследований (гл. 3.1) показали, что проведение комплексного лечения как хронического катарального гингивита, так и локализованного пародонтита легкой степени тяжести согласно утвержденным протоколам лечения, не достаточно эффективны, что побудило нас к проведению микробиологического исследования. Их основной целью был поиск основных маркеров ВЗП с применением современных методов микробиологической диагностики. По результатам микробиологического анализа формулировали практические рекомендации, назначали лекарственные средства, обладающие направленной чувствительностью и, следовательно, более эффективные для лечения пациентов молодого возраста с ВЗП.

Второй этап исследования был проведен с определением видовой принадлежности выделенных микроорганизмов методом прямого белкового профилирования MALDI–TOF масс-спектрометрии. В таблице 6 представлена видовая принадлежность выделенных микроорганизмов.

Таблица 6 – Показатели достоверности видовой принадлежности микроорганизмов (биомасса, г/л), пародонтальных пространств у пациентов в группах наблюдения.

№	Микроорганизмы	Показатель достоверности вида
1	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> DSM 10T DSM	2.111
2	<i>Candida albicans</i> CBS 1905 NT CBS	2.06
3	<i>Candida albicans</i> CBS 1905 NT CBS	2.192
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	2.208
5	<i>Candida albicans</i> VA_17248_07 04 UKE	2.098
6	<i>Candida albicans</i> VA_17248_07 04 UKE	2.037
7	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 THL	1.988
8	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 20132T DSM	1.71
9	<i>Candida albicans</i> DSM 6659 DSM	1.779
10	<i>Candida albicans</i> CBS 1905 NT CBS	2.127
11	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 13835 DSM	2.053

*№ 1-2 – контрольная группа с интактным пародонтом;

*№ 3-11 – группа наблюдения с воспалительными заболеваниями пародонта

Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 10TDSM (№1) и *Candida albicans* CBS 1905 NTCBS (№2) с высокими показателями достоверности вида – 2.111 и 2.06, соответственно, были идентифицированы в пародонтальных пространствах как лиц с интактным пародонтом (контрольная группа), так и в пародонтальных пространствах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (опытная группа), что позволило отнести эти микроорганизмы к представителям основной фракции микробного сообщества (Таблица 6).

Учитывали данные Е.О. Кравцовой (1995) [83], С.В. Мелехова и соавт. [112], И.Н. Усмановой и соавт. [164], О.А. Чепурковой и соавт. [185] о том, что

концентрация *Candida* в составе микрофлоры полости рта увеличивается в сравнении с нормой при проживании в зонах экологического неблагополучия, которым в полной мере соответствовало постоянное местожительство пациентов (отдельные территории Республики Татарстан), включенных в настоящее исследование. Исходили также из того, что подобное изменение микробиоценоза полости рта (кандидоносительство) у выбранной декретированной группы лиц могло наблюдаться как реакция на стресс, столь характерный для студенческой молодежи, адаптирующейся к новым длительным умственным нагрузкам, измененному режиму питания на ранних этапах обучения и т.д. [164, 166].

Как свидетельствуют данные таблице 6, в пародонтальных карманах при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести, значительно возросло количество выделенных микроорганизмов.

Принимали во внимание данные, что дрожжеподобные грибы рода *Candida spp.* относятся к условно патогенным микробам эукариотам и в незначительных количествах (10² – 10³ КОЕ/мл) на слизистой рта и зева могут обнаруживаться у 14 – 50% здоровых людей [150].

Вместе с тем, по данным Ребровой Р.Н. [146] только у 5% здоровых людей на слизистой полости рта обнаруживаются грибы рода *Candida spp.*, причем хроническое носительство этих грибов для соматически здоровых людей не типично, возможно лишь кратковременное транзитное кандидоносительство. В клинически интактной зубодесневой борозде грибковая флора либо отсутствует, либо выявляется в незначительных количествах до 10² КОЕ/мл [17].

Все остальные микроорганизмы (№3 – №11) были выделены у пациентов с ранними стадиями воспалительных заболеваний пародонта (гингивит и пародонтит легкой степени тяжести). Подобное объединение групп «хронического катарального гингивита» и «хронического пародонтита легкой степени тяжести» представлялось логичным, так как различия в значениях сопоставляемый между группами логарифмических показателей при определении видовой принадлежности микроорганизмов были статистически недостоверны ($p > 0,05$). Результаты изучения видовой принадлежности микроорганизмов

пародонтальных пространств у лиц с гингивитом и пародонтитом легкой степени в сравнительном аспекте не позволили однозначно выделить микроорганизмы-маркеры конкретной стадии воспаления пародонта хронического пародонтита легкой степени тяжести или катарального гингивита.

В исследуемых пародонтальных пространствах у пациентов групп наблюдения №1 и №2 - лиц с воспалительными заболеваниями пародонта также выделялась *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2,192); VA_17248_07 04 UKE (2,098); VA_17248_07 04 UKE (2,037); ATCC 10231 THL (1,988); DSM 6659 DSM (1,779); CBS 1905 NT CBS (2,127). Причем представительство *Candida albicans* в пародонтальных пространствах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта количественно превышала *Candida albicans* в зубо - десневой борозде лиц с интактным пародонтом (контрольная группа).

Вариабельность видового состава и количественных характеристик бактериальной и грибковой флоры различных биотопов полости рта, включая основные пародонтальные биотопы в норме и при развитии заболеваний пародонта весьма велика и определяется комплексом разнообразных экзо- и эндогенных факторов. Так, по мнению многих исследователей, концентрация факультативно-анаэробных бактерий и грибов рода *Candida* в микробиоме полости рта увеличивается в сравнении с аналогичными показателями у лиц с интактным пародонтом, причем эти различия особенно выражены у лиц, проживающих в экологически неблагоприятных зонах, когда те или иные виды антропогенной нагрузки создают дополнительный риск развития заболеваний полости рта (пародонта), в том числе посредством неблагоприятного влияния на состав и свойства (метаболическая активность, адгезивные свойства, склонность к колонизации и т.д.) микрофлоры полости рта, в целом, и пародонтальных пространств, в частности.

По данным некоторых авторов [171], дрожжеподобные грибы рода *Candida* spp. выявляются в содержимом пародонтальных карманов у 23,3% пациентов с пародонтитом - в количествах от 103 до 108 КОЕ/мл, у 10,9% пациентов - в виде псевдомицелия, прорастающего в десневой эпителий.

Есть также сведения [120], что грибковая флора в пародонтальных карманах выявляется, в основном, у больных пародонтитом, рефрактерном к традиционной терапии. Предполагается также, что некоторые виды бактерий способны сдерживать колонизацию грибов рода *Candida*, а другие, напротив, коагрегируют с ними, усиливая их патогенность [214, 274, 275, 291]. Чепуркова О.А. и соавт. [185] выделяют особую форму кандид-ассоциированного пародонтита, требующего особых подходов к диагностике и лечению с учетом достаточно высокой распространенности и резистентности к традиционной противовоспалительной терапии.

В пародонтальных пространствах пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта также был выделен ряд микроорганизмов: *Staphylococcus epidermidis* 10547 СНВ (2,208), *Corynebacterium variabile* DSM 20132Т DSM (1,71), *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM (2,053).

Анализ логарифмических показателей (значение биомассы, г/л) позволил гарантированно охарактеризовать *Staphylococcus epidermidis* 10547 СНВ и *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM по показателям определения рода и вероятности видовой идентификации (соответственно, 2.208 и 2.053). Принимали во внимание, что концентрация *Staphylococcus epidermidis* в ряде биотопов организма нарастает при воспалении слизистых оболочек различной локализации, длительных хронических инфекциях, стрессе, переохлаждении, иммунодефицитных состояниях, что говорит о присоединении вторичной инфекции. Известны штаммы *Bacillus pumilus*, изолированные из клинического материала пациентов, перенесших пищевую токсикоинфекцию/сепсис.

Согласно полученным логарифмическим показателям (значение биомассы, г/л), *Corynebacterium variabile* DSM 20132Т DSM соответствовали параметру возможной (вероятной) видовой идентификации рода (1.71). Принимали во внимание данные, что непатогенные *Corynebacterium* способны вызывать отдельные кожные заболевания и отдельные формы системной патологии, в первую очередь, у пациентов с иммуносупрессией.

Постулировали, что применение диагностических тестов в современной пародонтологии основано на исследовании бактериальной флоры, детекции маркеров воспалительных процессов, продуктов разрушения тканей и бактериальных антигенов [49]. Используемые нами методы посева позволили выделить исключительно культивируемые формы микроорганизмов со стандартными для гетеротрофов пищевыми потребностями и предоставили важную информацию о структуре доминирующего аэробного микробиоценоза полости рта.

Использование прямого белкового профилирования MALDI–TOF масс-спектрометрии Bruker Daltonik MALDI Biotyper позволило нам провести идентификацию бактерий *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium variabile*, *Bacillus pumilus* и дрожжеподобных грибов рода *Candida albicans* и определить их видовую принадлежность, что научно обосновывает использование в протоколах лечения воспалительных заболеваний пародонта антимикотических препаратов, чувствительных к определенным дрожжеподобным грибам *Candida albicans*. Направленное действие антимикотиков и их использование в комплексе с другими антимикробными средствами позволит создать наилучшие условия для более качественного лечения воспалительных заболеваний пародонта и повысит его эффективность.

Считали, что на основании полученных нами данных сформулировать принципиальный вывод о качественных различиях в составе бактериальных сообществ пародонтальных пространств у пациентов с интактным пародонтом, хроническим катаральным гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести не обоснованно, тогда как использование метагеномного анализа для аналогичного сопоставления, окажется способным внести более существенный вклад в понимание роли определенных микроорганизмов в генезе ранних стадий воспалительных заболеваний пародонта (гингивита и пародонтита легкой степени тяжести) у лиц молодого возраста, представляющих особую медико-социальную группу студенческой молодежи, продивающей на территории Республики Татарстан.

Полагали, что с использованием самых современных методов – метагеномного анализа, позволяющего идентифицировать практически все известные, а также новые некультивируемые формы микроорганизмов, чей геном еще не внесен в базы данных, сможет предоставить панорамный взгляд на архитектуру микробного сообщества, ассоциированного с интактным пародонтом, и особенности ее реструктуризации на ранних стадиях развития воспаления в пародонтальных тканях.

3.3. Результаты метагеномного анализа у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта

В данной работе описаны универсальный алгоритм метагеномных исследований и результаты первого клинико–микробиологического исследования микробиома рта при воспалительных заболеваниях пародонта у пациентов 18–19. В исследовании анализировались результаты весьма репрезентативной выборки в размере 36 человек, что превышает уровень репрезентативности многих проанализированных в отечественных и зарубежных исследованиях этого направления выборок. В настоящем исследовании, используя секвенирование фрагментов генов бактериальной 16S рРНК (регионы V3 и V4), были проанализированы структуры микробных сообществ. После объединения парных прочтений средняя длина полученных последовательностей составила 460 н. п. (н. п. – это длина фрагментов ДНК в парах нуклеотидов. В среднем на каждый образец приходилось 34600 последовательностей.

Необходимо отметить, что во всех случаях определяли состав метагенома зубодесневого соединения и пародонтального кармана по результатам секвенирования ДНК из образцов, что примерно соответствует слепку микробиоты тканей пародонта в норме и патологии. Микрофлора зубодесневого соединения и пародонтального кармана тесно взаимодействуют друг с другом,

поэтому говоря о роли микробиоты правильно будет рассматривать полную ее совокупность.

Любое сообщество – не просто сумма образующих его видов, но и совокупность взаимодействий между ними. Одним из важных свойств сообщества, которое отражает его сложность и структурированность, принято считать его разнообразие. Видовое разнообразие отражает сложность строения и структуру сообщества.

На рисунке 20 представлены альфа-разнообразие образцов – разнообразие внутри сообществ, так называемое видовое обилие. Применение индексов альфа-разнообразия дало возможность косвенно определить их статус.

По результатам исследования, альфа разнообразие образцов интактного пародонта оказалось значительно ниже, чем разнообразие образцов при хроническом катаральном гингивите. Альфа-разнообразие образцов при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести варьировало в более широких пределах.

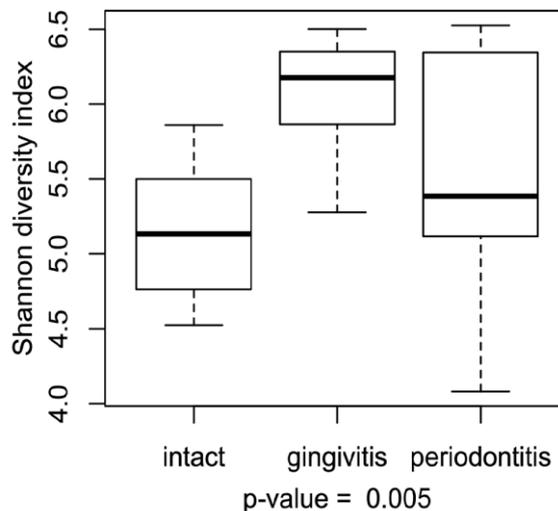


Рисунок 20 – Альфа-разнообразие микробных сообществ при интактном пародонте и воспалительных заболеваниях пародонта у молодых лиц в возрасте

18-19 лет

Было идентифицировано 183 филотипа на уровне родов, относящиеся к 17 филумам (Фил (*phylum*) - это синоним типа в таксономии (таксон между царством и классом)).

Для выявления различий в относительной численности филотипов на уровне родов и семейств между образцами применяли критерий Kruskal–Wallis, предназначенный для определения равенства медиан нескольких выборок (данный критерий является многомерным обобщением критерия Уилкоксона – Манна – Уитни).

Нами были найдены достоверно отличающиеся филотипы, чья медианная относительная численность превышала 0,5% хотя бы в одной группе. При этом определяли, что относительная численность 21 филотипа на уровне родов и семейств достоверно различалась между группами.

Большая часть микроорганизмов составили очень низкий уровень от общего количества, многие выявлялись не во всех образцах. Исходя из этого считали, что эти немногочисленные микроорганизмы, выявляемые в исследуемых биотопах, не вносили существенного вклада в развитие микрообо-опосредованного воспаления в пародонте.

Использованная статистическая программа насчитала около 47 филотипов, различие по которым были формально статистически значимы, однако половина этих филотипов присутствовала в очень маленьких количествах – около 0,001% (Таблица 6 – 10). В серии таблиц 5-9 представлено относительное обилие видов в каждой исследуемой группе, которые выражалось как медианное значение и разброс от максимального до минимального по группе (например, 0.00 (0.00 to 0.33)).

В большинстве образцов преобладали представители рода *Streptococcus*. В образцах микрофлоры молодых пациентов с интактным пародонтом доля стрептококков была достоверно больше (31.73 (6.11 to 50.30)), в сравнении с двумя другими группами, причем это различие было статистически значимо (17.51 (4.01 to 34.43) и 18.37 (1.66 to 50.40) соответственно)) (Таблица 6, Рисунок 21).

Таблица 6 – Относительное обилие видов / филотипов *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia*, распределенных между образцами

	Интактный пародонт	ХГКГ	ХГП
<i>Streptococcus</i>	31.73 (6.11 to 50.30)	17.51 (4.01 to 34.43)	18.37 (1.66 to 50.40)
<i>Neisseria</i>	8.50 (0.03 to 18.18)	0.65 (0.015 to 10.08)	1.84 (0.00 to 24.46)
<i>Rothia</i>	5.35 (0.13 to 13.30)	0.76 (0.03 to 4.06)	0.57 (0.02 to 15.28)
<i>Actinomyces</i>	2.46 (0.27 to 16.13)	1.50 (0.39 to 3.91)	1.49 (0.32 to 6.11)

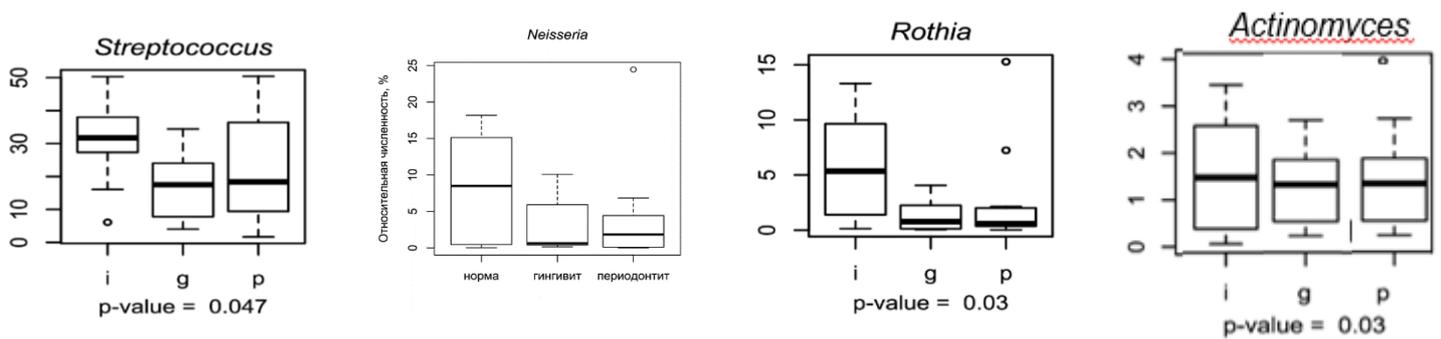


Рисунок 21 – Относительная численность видов / филотипов *Streptococcus*, *Neisseria*, *Rothia* и *Actinomyces*

Вторым из преобладающих представителей микрофлоры у лиц с интактным пародонтитом явился род *Neisseria* (8.50 (0.03 to 18.18)), в сравнении с двумя другими группами, причем это различие также было статистически значимо (0.65 (0.015 to 10.08) и 1.84 (0.00 to 24.46) соответственно).

Кроме того, интактный пародонт был ассоциирован с членами семейства *Micrococcaceae* и рода *Rothia* – 5.35 (0.13 to 13.30). Показательно, что количество классических бактерий, традиционно выделяемых при кариесе, - род *Rothia* (*Stomatococcus mucilaginosus* и *Micrococcus mucilaginosus*), в контроле было в 2 раза более высоким.

Интересно, что если род *Actinomyces* преобладал у лиц с интактным пародонтом 2.46 (0.27 to 16.13), то при ВЗП (гингивит, пародонтит) эти присутствовали примерно в одинаковых соотношениях 1.50 (0.39 to 3.91) против 1.49 (0.32 to 6.11).

При патологии пародонта отмечали количество неидентифицированных бактерий. Микроорганизмы рода *Rothia* при ВЗП были замещены антагонистическими патогенными бактериями.

В числе преобладающей микрофлоры оказался род *Fusobacterium* (Таблица 7, Рисунок 22). У лиц с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (10.19 (3.36 to 21.73)) преобладал род *Fusobacterium*. В сравнении с данными лиц с интактным пародонтом (5.16 (0.39 to 14.97)) и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (5.04 (1.19 to 30.09)), различия были статистически значимы.

Таблица 7 – Относительное обилие видов / флотипов *Fusobacterium*, *Veillonella* распределенных между образцами

	Интактный пародонт	ХГКГ	ХГП
<i>Fusobacterium</i>	5.16 (0.39 to 14.97)	10.19 (3.36 to 21.73)	5.04 (1.19 to 30.09)
<i>Veillonella</i>	3.65 (0.36 to 10.19)	4.66 (0.47 to 11.89)	3.65 (0.36 to 10.19)

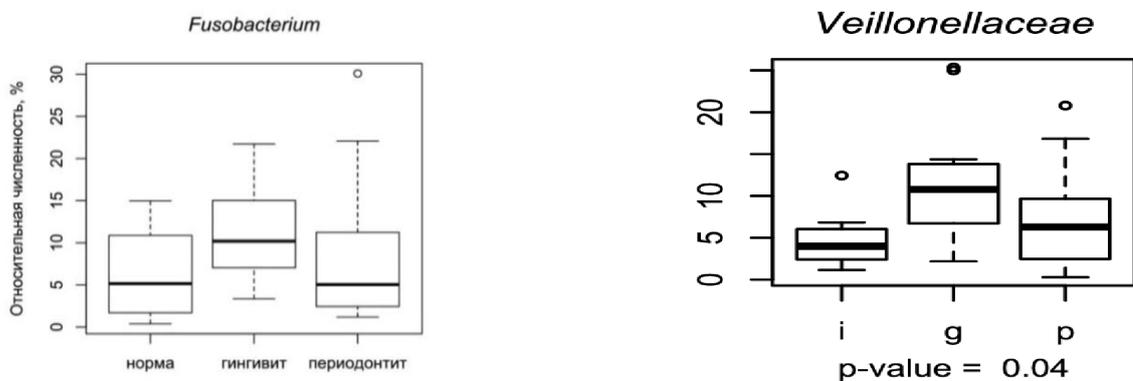


Рисунок 22 – Относительная численность видов / флотипов *Fusobacterium*, *Veillonella*

Выявляли преобладание семейств *Veillonella* у лиц с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (4.66 (0.47 to 11.89)), в сравнении с двумя другими группами – с интактным пародонтом (3.65 (0.36 to 10.19)) и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (3.65 (0.36 to 10.19)).

Аналогичная закономерность выявлена в отношении родов *Selenomonas*, *Corynebacterium* и *Campylobacter* (Таблица 8, Рисунок 23), присутствующих в достоверно больших количествах в образцах пациентов, страдающих хроническим генерализованным катаральным гингивитом, чем с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести, что может указывать на смену преобладающих видов при прогрессировании воспаления в пародонтальном комплексе (4.45 (0.10 to 12.78); 2.42 (0.29 to 6.00); 1.04 (0.53 to 2.96), соответственно).

Кроме того, были идентифицированы микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах – некультивируемые представители семейств Rs-045, *Dethiosulfovibrionaceae*, которые также преобладали у лиц с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (0.44 (0.00 to 3.31) и 0.58 (0.00 to 4.04), соответственно) в сравнении с двумя данными у лиц с интактным пародонтом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (различия статистически значимы).

Таблица 8 – Относительное обилие видов / филоотипов *Selenomonas*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, *Dethiosulfovibrionaceae*, Rs–045

	Интактный пародонт	ХГКГ	ХГП
<i>Selenomonas</i>	0.10 (0.00 to 1.85)	4.45 (0.10 to 12.78)	0.49 (0.00 to 9.59)
<i>Corynebacterium</i>	0.21 (0.02 to 1.22)	2.42 (0.29 to 6.00)	0.47 (0.01 to 5.17)
<i>Campylobacter</i>	0.15 (0.08 to 5.76)	1.04 (0.53 to 2.96)	0.21 (0.05 to 1.63)
<i>unclassified Dethiosulfovibrionaceae</i>	0.01 (0.00 to 0.58)	0.44 (0.00 to 3.31)	0.16 (0.00 to 1.82)
<i>unclassified Rs-045</i>	0.00 (0.00 to 0.01)	0.58 (0.00 to 4.04)	0.05 (0.00 to 2.67)

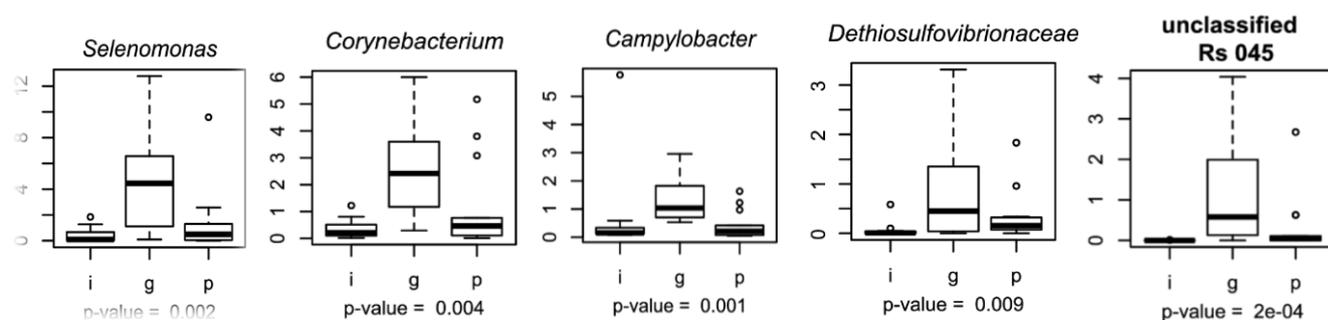


Рисунок 23 – Относительное обилие видов / филоотипов *Selenomonas*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, Rs–045, *Dethiosulfovibrionaceae*

На основании полученных данных, у лиц, страдающих пародонтитом, не удалось выделить филоотипы, присутствующие в достоверно более высоких, чем при хроническом катаральном гингивите количествах. Таким образом, результаты метагеномного анализа подтвердили результаты предшествующих

микробиологических исследований (гл. 3.3), подтверждающих отсутствие какого – либо одного (специфического) или нескольких микробиологических агентов – маркеров микробного происхождения, способных инициировать прогрессирование гингивита с развитием хронического пародонтита легкой степени тяжести.

Установлено, что по отношению к показателям интактного пародонта у пациентов двух других групп наблюдали статистически значимое увеличение доли семейств *Porphyromonadaceae*, *Peptostreptococcaceae* и доли родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema* (Таблица 9).

Таблица 9 – Относительное обилие видов / филотипов *Porphyromonadaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*

	Интактный пародонт	ХГКГ	ХГП
<i>Porphyromonas</i>	0.68 (0.02 to 9.74)	4.09 (0.29 to 12.36)	2.92 (0.53 to 32. 2)
<i>Peptostreptococcus</i>	0.01 (0.00 to 0.65)	0.28 (0.00 to 1.31)	0.28 (0.00 to 5.47)
<i>Dialister</i>	0.03 (0.01 to 0.74)	0.65 (0.12 to 2.85)	0.51 (0.00 to 5.58)
<i>Filifactor</i>	0.00 (0.00 to 0.32)	0.57 (0.00 to 6.68)	0.79 (0.00 to 4.07)
<i>Parvimonas</i>	0.12 (0.00 to 0.60)	0.92 (0.05 to 2.45)	1.15 (0.09 to 3.07)
<i>Tannerella</i>	0.07 (0.00 to 1.23)	0.69 (0.16 to 2.70)	0.59 (0.00 to 4.66)
<i>Treponema</i>	0.04 (0.00 to 0.54)	1.13 (0.13 to 4.76)	0.47 (0.00 to 9.57)

Кроме того, по отношению к интактному пародонту в двух других группах были найдены микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах – некультивируемые представители неопределенных филотипов на уровне рода *Mogibacteriaceae*, *TM7 3* (Таблица 10, Рисунок 24).

Таблица 10 – Относительное обилие неопределенных видов / филотипов *TM7 3*, *Mogibacteriaceae*, *Tissierellaceae* и распределенных между образцами

	Интактный пародонт	ХГКГ	ХГП
--	--------------------	------	-----

unclassified TM7-3	0.41 (0.08 to 21.51)	5.75 (0.75 to 12.09)	3.28 (0.06 to 14.11)
unclassified <i>Mogibacteriaceae</i>	0.06 (0.00 to 0.76)	1.02 (0.04 to 2.62)	0.90 (0.02 to 3.14)
unclassified <i>Tissierellaceae</i>	0.00 (0.00 to 0.33)	0.09 (0.00 to 3.82)	0.01 (0.00 to 1.22)

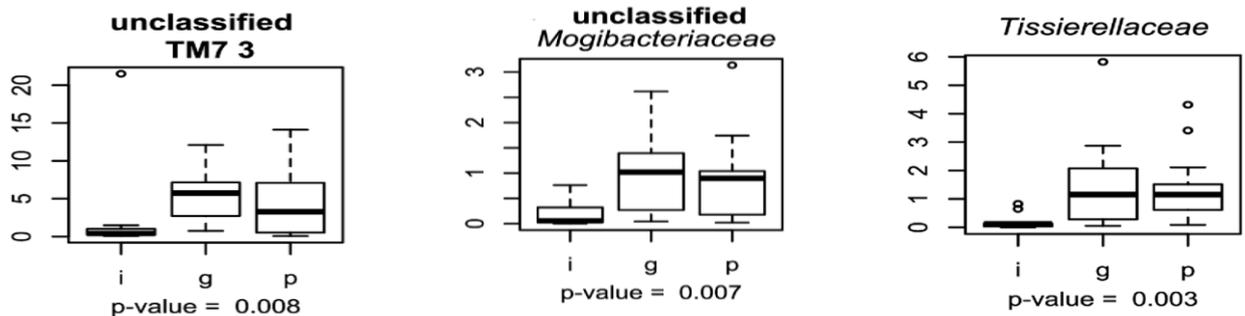


Рисунок 24 – Относительная численность неопределенных видов / филотипов *TM7 3*, *Mogibacteriaceae*, *Tissierellaceae*

Таким образом, нами был проведен сравнительный анализ бактериальных сообществ пародонта при хроническом генерализованном катаральном гингивите, хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести и у здоровых индивидуумов.

В выборке метагеномных образцов были найдены уникальные микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах. Разнообразие бактерий при изучаемых патологических состояниях оказалось достоверно выше, чем при интактном пародонте. Показано, что относительная численность 21 филотипа (чья медианная численность превышает 0,5% как минимум в одной группе) на уровне родов и семейств достоверно различалась между группами. При этом такая характеристика, как число генов в метагеноме, можно в перспективе рассматривать в качестве диагностического инструмента для детекции ВЗП, тогда как выявление образцов с аномально высоким содержанием ДНК может рассматриваться как косвенный признак наличия воспаления/повышенной десквамации эпителия десны. Помимо оценки качества

экспериментальных процедур, результат этой фильтрации может служить первичным маркером потенциальной патологии.

3.4. Результаты определения кальцинированных наночастиц в ротовой жидкости пациентов молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта

По результатам клинического обследования пациентов групп наблюдения, участвовавших в данном исследовании, у лиц с интактным пародонтом индекс ОНІ–S составил $1,1 \pm 0,4$ баллов, при диагнозе хронический генерализованный катаральный гингивит – $1,82 \pm 0,17$ баллов, при диагнозе хронический пародонтит легкой степени тяжести – $2,69 \pm 0,18$ баллов (Рисунок 27). У пациентов с хроническим генерализованным катаральным гингивитом и хроническим пародонтитом легкой степени тяжести выявлены обильные над- и поддесневые зубные отложения.

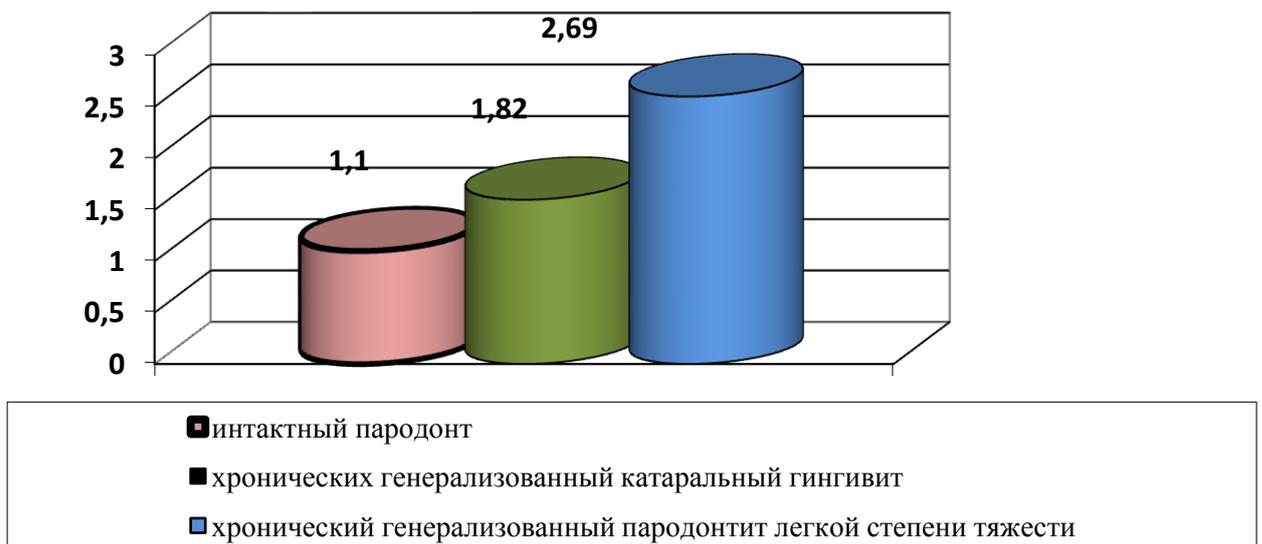


Рисунок 25 – Состояние гигиены полости рта (индекс ОНІ–S) у пациентов групп наблюдения

Выявленные факты нашли подтверждение в доступной нам литературе о неудовлетворительной гигиене рта – как важного фактора риска развития ВЗП у лиц молодого возраста, а следовательно, и необходимости поиска новых

технологических решений по определению их этиологии и патогенеза, созданию индивидуальных и скрининговых программ лечения и реабилитации пациентов [58, 65, 112, 130]. Реализация обозначенных задач достигается при использовании современных методов диагностики, к которым следует отнести и электронную микроскопию.

В связи с вышесказанным проведен третий этап исследования, который заключался в оценке возможностей просвечивающей электронной микроскопии (метод негативного контрастирования). Для этого методом рандомизации были сформированы две выборки:

1. Группа наблюдения - пациенты с ВЗП и повышенной склонностью к образованию зубных отложений (над- и поддесневого зубного камня) (12 пациентов – 4 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

2. Контрольная группа - лица с интактным зубным рядом, интактным пародонтом (зубные отложения практически отсутствуют) (5 пациентов – 2 мужчин и 3 женщин в возрасте от 18 до 19 лет)

По результатам электронной микроскопии, в смешанной слюне пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта при повышенной склонности к образованию зубных отложений были выявлены нанообъекты округлой формы размером от 20 до 200 нм (рис.26, 27, 28).

Выявленные формы были представлены не только одиночными (Рисунок 26), но и делящимися нанообъектами (Рисунок 27), многие из которых образовывали конгломераты (Рисунок 28), что с большой долей вероятности позволяет их отнести к нанобактериям. Конгломераты, как и единичные нанообъекты, имели светлую оболочку из биополимеров, предположительно белков или полисахаридов. Также были зафиксированы и мелкие частицы неправильной формы, по-видимому, представляющие собой продукты разрушения.

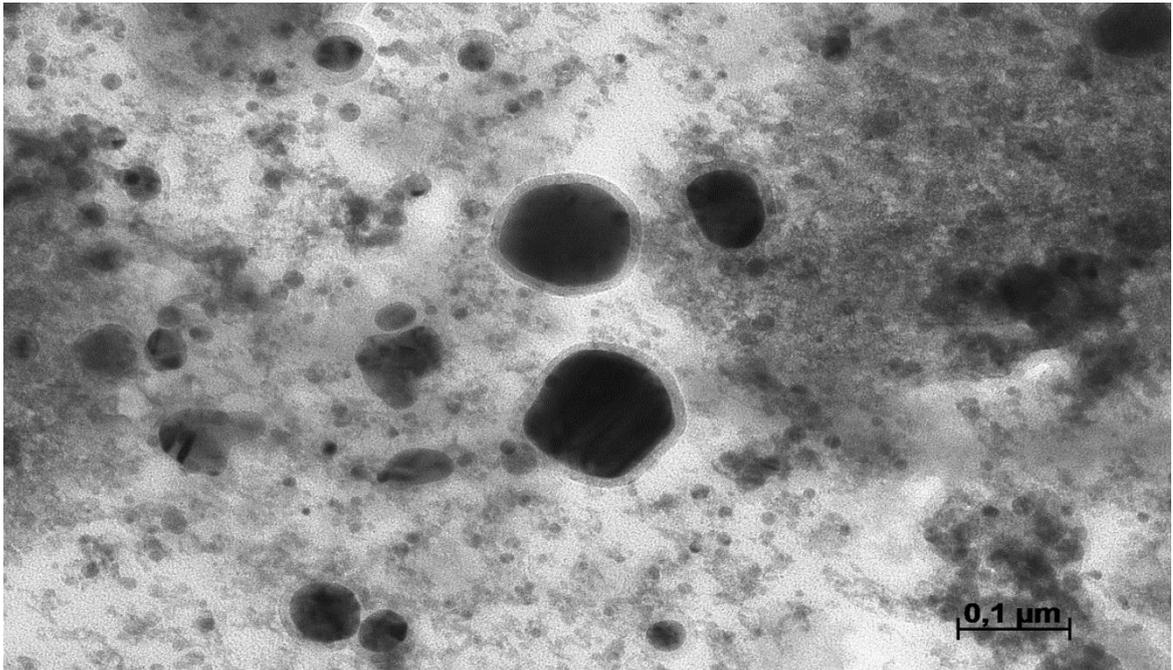


Рисунок 26 – Электроннограмма– единичные нанобъекты округлой формы, со светлой оболочкой в ротовой жидкости

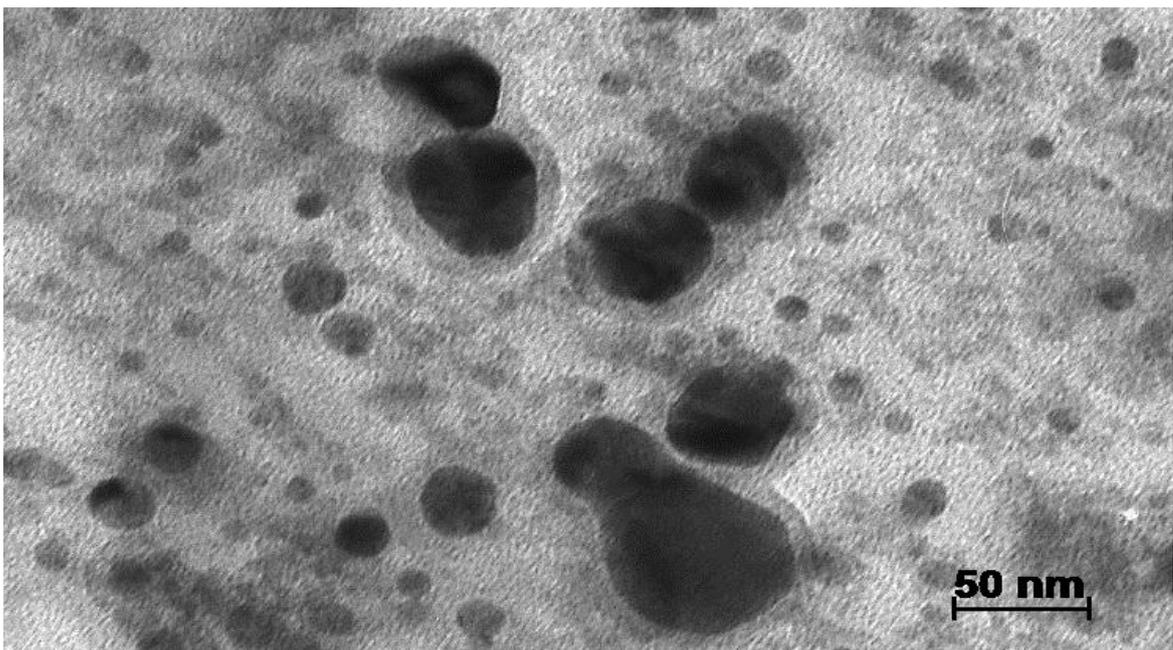


Рисунок 27 – Электроннограмма – делящиеся нанобъекты, имеющие единую оболочку, в ротовой жидкости

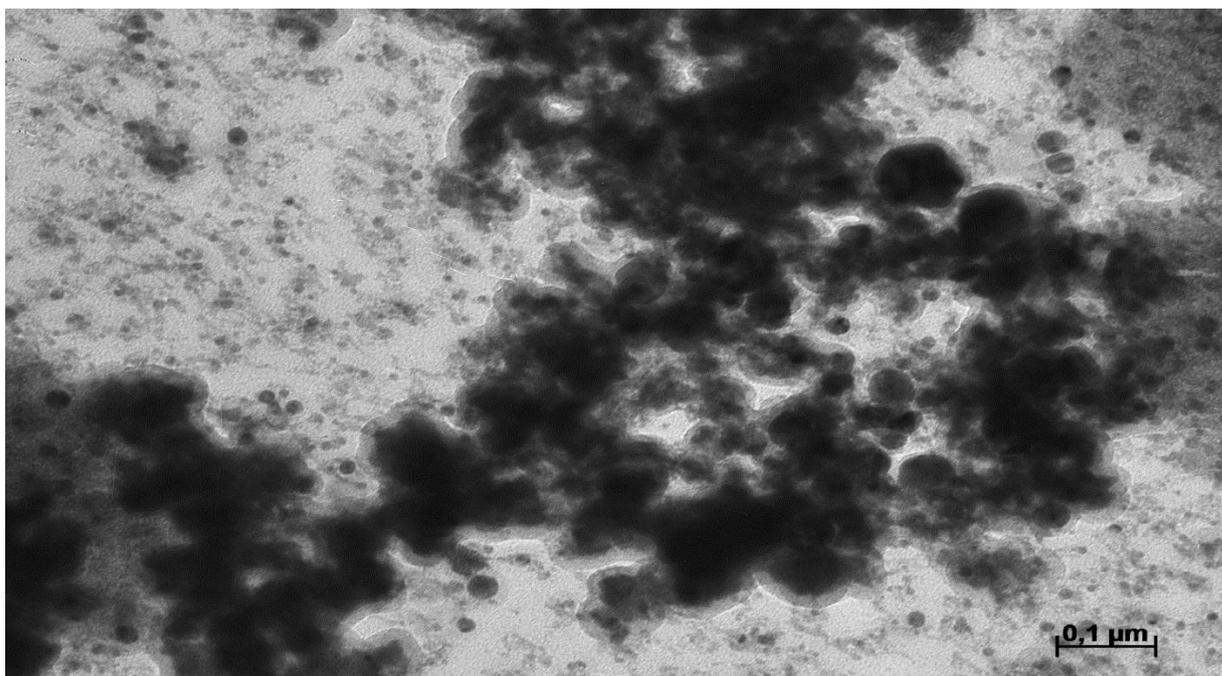


Рисунок 28 – Электроннограмма – группы нанообъектов, образующие конгломераты, в ротовой жидкости

По данным электронной микроскопии (метод негативного контрастирования), не представляется возможным сделать конкретные выводы о биохимическом составе наноклеток и их оболочек, однако, установлено присутствие кальция и определенных белков – альбумина, фетуина – для нанобатерий [9, 35, 77, 117, 356]. Обнаружение этих соединений в наноформах может послужить материалом для перспективных углубленных исследований.

В ротовой жидкости пациентов с интактным зубным рядом, здоровым пародонтом при отсутствии склонности к образованию минерализованных зубных отложений конгломераты, не имеющие выраженной светлой оболочки, выявлялись в единичных случаях, тогда как наличия отдельных нанообъектов со светлой оболочкой не наблюдали (Рисунок 29).

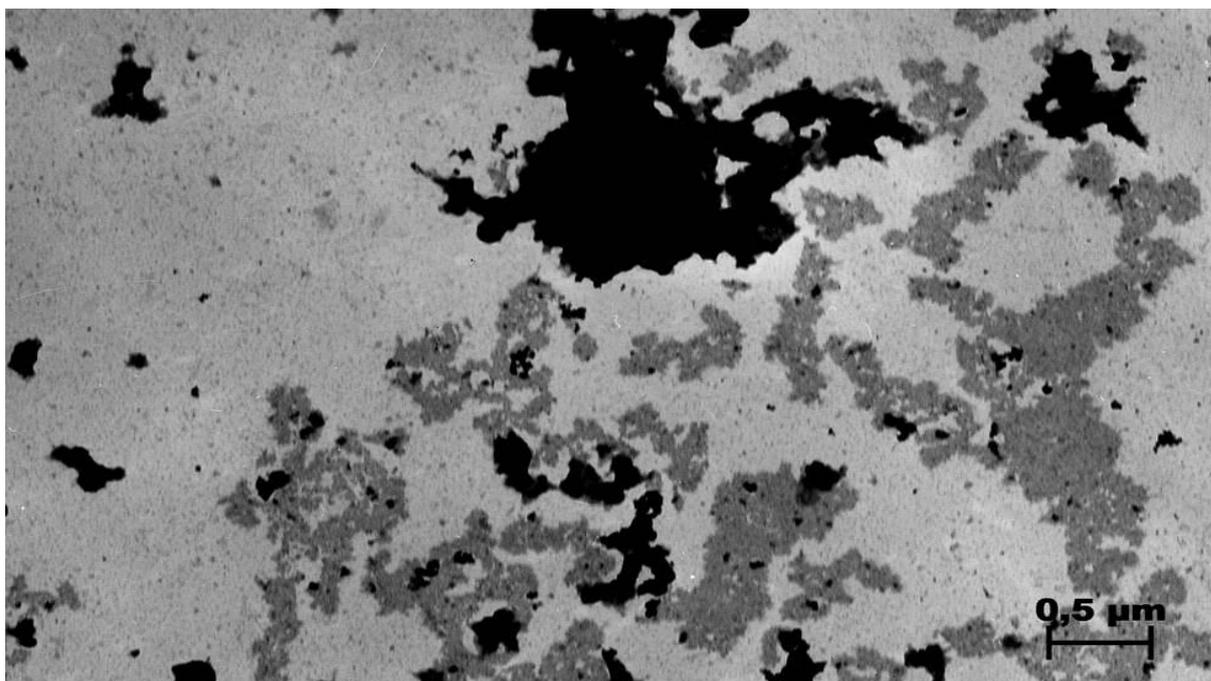


Рисунок 29 – Электронограмма – редко встречающиеся конгломераты, не имеющие выраженной светлой оболочки

При интерпретации результатов исходили из того, что существует две теории природы нанообъектов. Одна из них – нанообъекты рассматриваются как неживые объекты и являются связующим звеном в образовании минералов, вторая – нанообъекты - это живые объекты, имеющие свою ДНК. По результатам нашего исследования обнаружено, что нанообъекты способны к делению и образованию конгломератов. По данным доступной литературы, нанообъекты рассматриваются как этиологические факторы той или иной патологии, как кофакторы ее развития или просто сопутствующие образования. Процессы минералообразования в полости рта возможно аналогичны эктопической кальцификации и также могут быть связаны с нанообъектами. На сегодняшний день данные о природе и характеристика нанообъектов в слюне и в зубном налете в доступной нам литературе отсутствуют.

Вероятно, нанообъекты являются следствием естественного процесса минералообразования. Однако зафиксированные нами различия в количестве и морфологии наноформ в различных группах пациентов позволяют выявить визуальные маркерные характеристики обнаруженных наноформ. Так, у

пациентов с интактным зубным рядом, здоровым пародонтом и отсутствием склонности к минералообразованию наноформы встречаются реже, имеют тенденцию к образованию конгломератов и характеризуются отсутствием светлой оболочки вокруг объектов. У пациентов с повышенной склонностью к минерализации нанообъекты преимущественно одиночные, визуально зафиксированные как условно делящиеся, окружены светлой оболочкой, проницаемой для электронного пучка. Таким образом, структура и морфологические особенности обнаруживаемых нанообъектов могут служить дополнительными маркерными показателями для выявления повышенной степени насыщенности слюны ионами кальция и фосфатами, которые в зависимости от pH слюны будут участвовать в естественной минерализации и реминерализации зубной эмали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика и лечение заболеваний пародонта воспалительно – деструктивного характера составляют одну из актуальных проблем современной стоматологии, что обусловлено их значительной распространенностью в различных популяционных группах, в различные возрастные периоды жизни человека, а также отсутствием единой неприменимой теории этиологии и патогенеза ВЗП [176]. В литературе большое внимание уделяется местным факторам риска, усугубляющим течение пародонтита, при этом вопрос о роли факторов микробного обсеменения до сих пор является предметом дискуссии. Профиль представленности представителей микробиоценоза зубодесневого соединения и пародонтального кармана в норме и при воспалительных заболеваниях пародонта до сих пор остается слабоизученным [49, 178]. Хотя изменения в тканевых комплексах, связанные с инициацией и прогрессирующим воспалением в пародонте хорошо охарактеризованы, специфичность бактерий, повреждающих ткани на разных этапах формирования ВЗП у лиц молодого возраста, окончательно не определена [209]. Не выявлено какого-либо одного микроорганизма, патогномоничного для разных стадий развития заболеваний пародонта [178].

По мнению А.С. Григорьяна и соавт. [46], сегодня можно говорить о существовании двух гипотез, трактующих проблему взаимоотношения конкретных микроорганизмов в запуске и развития воспалительных заболеваний пародонта:

1. Признается возможность участия в этиологии и патогенезе стоматологических заболеваний еще не идентифицированных патогенных бактерий;

2. Ведущим фактором патогенеза воспалительных заболеваний пародонта может являться внутривидовая сукцессия уже известных бактериальных форм, что, впрочем, не исключает ведущей роли в этих процессах некультивируемой компоненты микробного сообщества рта.

До настоящего времени не создано биологических маркеров, способных идентифицировать лиц, у которых с возрастом наиболее вероятно развитие деструктивных процессов в пародонте в будущем. Не выявлено какого-то одного микроорганизма, патогномоничного для трансформации гингивита в пародонтит у взрослых [178]. Вышесказанное не позволяет до конца решить задачи, поставленные клиницистами, что создаёт необходимость поиска наиболее рациональных, эффективных и обоснованных методов пародонтологической диагностики.

Для определения видового состава микроорганизмов такие классические биологические подходы, как бактериальный посев, использовать сложно в силу большого количества видов, составляющих отдельный микробиом, и невозможности культивировать до 99% бактерий [144, 204]. Поэтому широкое распространение микробиомных исследований стало возможным только с появлением высокотехнологичных методов – определение видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и секвенирование совокупного гена микробиомов – метагенома. Однако работы, посвященные использованию данных микробиологических методов в пародонтологии, на сегодняшний день единичны, так же как и исследований, посвященных проблеме - выявления нанообъектов в жидких средах полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта.

В процессе обследования планировали изучить частоту и особенности клинического состояния тканей пародонта у молодых лиц в возрасте 18 – 19 лет, полученные в процессе стоматологического осмотра 533 студентов 1-го – 2-го курсов ВУЗов г. Казани.

Анализ результатов показал, что лишь 46,75% обследованных студентов имели интактный пародонт. Больше половины обследованных лиц молодого возраста (53,25%) имели ту или иную форму пародонтальной патологии, причем распространенность ВЗП была выше у лиц в возрасте 18 лет. Данный факт можно объяснить снижением влияния симпатической иннервации на сформированные

ткани пародонта, что подтверждает правильность выбора возрастных ограничений при определении критериев настоящего исследования.

На долю молодых пациентов с хроническим пародонтитом приходилось 23,3%, в три раза ниже числа лиц с хроническим гингивитом. При этом частота выявляемости хронического пародонтита легкой степени тяжести у лиц молодого возраста была значительно выше и составила 62,3%.

Из указанной выборки (533 чел.) была проведена рандомизация пациентов в группы наблюдения, соответствующие конкретным критериям в соответствии с целью исследования.

На первом этапе исследования в период с 2013 по 2016 гг. было проведено комплексное стоматологическое (с акцентом на оценку пародонтологического статуса) обследование 90 молодых людей в возрасте 18 – 19 лет – представителей особой медико-социальной группы населения – студенческой молодежи.

Все по показаниям исходно проведенные лечебно-диагностические мероприятия обеспечили формирование групп наблюдения, с обязательным критерием – отсутствием у пациентов на момент обследования ортодонтической и мукогингивальной патологии, а также нормального состояния жевательной мускулатуры по завершению консервативной санации полости рта (лечения кариеса зубов и его осложнений).

Так, при проведении вестибулопластики достигалось перемещение мимических мышц, прикрепляющихся к гребню альвеолярного отростка, вглубь преддверия, смещение, отодвигание переходной складки и увеличение ее площади [252]. За период 2013 – 2016 годы нами было проведено 62 оперативных вмешательства по коррекции преддверия с использованием метода вестибулопластики по Edlan – Mejchar (2013 г. – 18 операций, 2014 г. – 22 операции, 2015 г. – 22 операции), с их дальнейшим динамичным наблюдением. Все оперативные вмешательства протекали без особенностей. Таких осложнений как одонтогенные воспалительные процессы, абсцедирование, флегмоны не были зафиксированы ни у одного прооперированного пациента. А отдаленные

результаты показали углубление преддверия рта и остановку воспалительных процессов в тканях пародонта.

Клиническая характеристика воспалительных заболеваний пародонта проводилась на основании комплексного объективного клинико-рентгенологического обследования с определением пародонтальных/гигиенических индексов и описанием ортопантомограмм. Все пациенты в зависимости от наличия или отсутствия воспалительных заболеваний пародонта были ранжированы на 3 группы: 1 – с интактным пародонтом (34 человек), 2 – с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (30 человек), 3 – хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (36 человек).

При идентификации грибов *Candida albicans* с использованием прямого белкового профилирования MALDI–TOF масс-спектрометрии Bruker Daltonik MALDI Biotyper нами выявлено, что высокая вероятность идентификации вида *Candida albicans* (от 3.000 до 3.300 усл. ед.) нами не определялась ни в одном случае, как и отсутствие надежной идентификации (0.000 до 1.699 усл. ед.). Во всех группах наблюдения *Candida albicans* имела гарантированную идентификацию рода (возможная идентификация вида) (2.000 до 2.299 усл. ед.) или возможную идентификацию рода (1.700 до 1.999 усл. ед.).

Гарантированную идентификацию рода (возможная идентификация вида) имела *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS, значения ее логарифмического показателя были максимальны у молодых людей с интактным пародонтом и составили 2.06 усл. единиц. Важно, что *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS с различными показателями идентификации встречалась как в контрольной (интактный пародонт), так и в обеих группах наблюдения (хронический генерализованный катаральный гингивит, хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести), что характеризовало *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS как представителя основной фракции микробного сообщества.

При определении видовой принадлежности *Candida albicans* и ее идентификации у пациентов с хроническим катаральным гингивитом и

хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести были определены статистически не значимые ($p < 0,05$) различия значений логарифмических показателей вероятности идентификации. Поэтому, группы пациентов с «хроническим генерализованным катаральным гингивитом» и «хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести» считали возможным объединить объединили в единую – с «воспалительными заболеваниями пародонта».

У пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта выделялась *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS, с гарантированной идентификацией рода (возможная идентификация вида). Ее значения логарифмических показателей были несколько выше, чем при интактном пародонте и имели два различных варианта идентификации 2.192 усл. ед. или 2.127 усл. ед. (соответственно). Полученные результаты исследования показали, что микроорганизм *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS присутствовал в микрофлоре полости рта у всех обследованных как при интактном пародонте, так и при воспалительных заболеваниях.

Грибы *Candida albicans* VA_17248_07 04 UKE, ATCC 10231 THL и DSM 6659 DSM выделялась только у лиц с воспалительными заболеваниями пародонта (хроническом катаральном гингивите и хроническом генерализованном пародонтите легкой степени). При этом *Candida albicans* VA_17248_07 04 UKE имела гарантированную идентификацию рода (возможную идентификацию вида). Ее значения логарифмических показателей имели два различных варианта идентификации 2.098 усл. ед. или 2.037 усл. ед. (соответственно). Два других представителя дрожжеподобных грибов – *Candida albicans* ATCC 10231 THL и *Candida albicans* DSM 6659 DSM имели лишь возможную идентификацию рода, их значения логарифмических показателей составили 1.988 усл. ед. и 1.779 усл. ед. Различия значений логарифмических показателей вероятности идентификации были статистически недостоверны ($p > 0,05$).

Таким образом, дрожжеподобные грибы рода *Candida albicans* VA_17248_07 04 UKE, ATCC 10231 THL и DSM 6659 DSM можно считать

маркерами микробного происхождения хронического катарального гингивита и хронического генерализованного пародонтита легкой степени тяжести у лиц молодого возраста. При этом они либо находятся в ассоциации с ВЗП, либо инициируют развитие кандидоза слизистой оболочки полости рта, оотягощающего течение воспаления в тканях пародонта, с формированием более тяжелых кандидо-ассоциированных клинических форм гингивита и пародонтита. К числу подобных маркерных форм можно отнести ряд микроорганизмов, не относящихся к микромицетам: *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB, *Corynebacterium variabile* DSM 20132T DSM, *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM. Причем *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB и *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM характеризовались надежным определением рода и вероятной видовой идентификацией, а *Corynebacterium variabile* DSM 20132T DSM – лишь их вероятной идентификацией.

Использованные методы посева позволили нам выделить исключительно культивируемые формы микроорганизмов со стандартными для гетеротрофов пищевыми потребностями и дали важную информацию о структуре доминирующего аэробного микробиоценоза рта при различном состоянии пародонта у лиц молодого возраста.

Учитывая, что на основании полученных данных сделать принципиальный вывод о качественном различии бактериальных сообществ пациентов с интактным пародонтом, хроническим катаральным гингивитом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести было не обоснованно, считали, что использование метагеномного анализа для аналогичных сопоставлений, могло привнести свой вклад в понимание роли определенных микроорганизмов в развитии ВЗП у лиц молодого возраста. Вышесказанное было основано на том, что метагеномный анализ может дать более полную картину и позволяет идентифицировать практически все известные, а также новые формы микроорганизмов, чей геном еще не внесен в базы данных.

Известно, что полость рта человека населена одним из наиболее разнообразных микробных сообществ человека, включающим около 700 видов

бактерий, многие из которых не растут на простых питательных средах [248]. По данным M.W. Hall et al. (2017), состав микрофлоры у людей различных популяционных групп значительно варьирует вследствие различий в диете, привычках и образе жизни. Вышеперечисленное затрудняет определение перечня видов микроорганизмов, вовлеченных в патологический процесс в пародонте [279].

Методы секвенирования нового поколения позволяют определять структуру различных микробных сообществ с высокой точностью [216, 422]. Их применение позволяет уточнить известный на сегодняшний день перечень микроорганизмов, ассоциированных с заболеваниями пародонта [284].

В работе описаны универсальный алгоритм метагеномных исследований и результаты клинико–микробиологического исследования микробиома пародонтальных пространств при воспалительных заболеваниях пародонта у пациентов 18–19 с сохранным (или восстановленным в процессе предшествующего лечения) ортодонтическим статусом. С использованием комплекса этих современных методов исследован пародонтологический статус пациентов, сформировавших репрезентативную выборку из числа 37 человек, что превышает по размеру все ранее описанные в литературе выборки для исследовавшихся этим методом. В настоящем исследовании, используя секвенирование фрагментов генов бактериальной 16S рРНК (регионы V3 и V4), были проанализированы структуры микробных сообществ. После объединения парных прочтений средняя длина полученных последовательностей составила 460 н. п. (н. п. – это длина фрагментов ДНК в парах нуклеотидов). В среднем, на каждый образец приходилось 34600 последовательностей.

Необходимо отметить, что во всех случаях речь шла об определении состава метагенома зубодесневой борозды и пародонтального кармана по результатам секвенирования ДНК из образцов, что примерно соответствует «слепку» микробиоты тканей пародонта в норме и патологии. Микроорганизмы зубодесневой борозды и пародонтального кармана достаточно тесно

взаимодействуют друг с другом, поэтому, говоря о роли микробиоты, правильно будет рассматривать полную ее совокупность.

Любое микробное сообщество – не просто сумма образующих его видов микроорганизмов, но и совокупность их активных взаимодействий. Одним из важных свойств микробного сообщества, которое отражает его сложность и структурированность, принято считать его разнообразие. Видовое разнообразие отражает сложность строения и структуру сообщества.

Представленное альфа–разнообразие образцов – разнообразие внутри сообществ, так называемое видовое обилие. Применение индексов альфа–разнообразия дало возможность косвенно определить их статус.

В настоящем исследовании альфа разнообразие образцов интактного пародонта оказалось значительно ниже, чем разнообразие образцов при хроническом катаральном гингивите. Альфа–разнообразие образцов при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести варьировало в более широких пределах.

Было идентифицировано 183 филотипа на уровне родов, относящиеся к 17 филумам (Фил (*phylum*) это синоним типа в таксономии (таксон между царством и классом), которые представлены 47 наиболее многочисленных филотипов на уровне родов.

Для выявления различий в относительной численности филотипов на уровне родов и семейств между образцами применяли критерий Kruskal–Wallis, предназначенный для определения равенства медиан нескольких выборок (данный критерий является многомерным обобщением критерия Уилкоксона – Манна – Уитни).

Показаны распределения достоверно отличающихся филотипов, чья медианная относительная численность превышала 0,5% хотя бы в одной группе. При этом нами определено, что относительная численность 21 филотипа на уровне родов и семейств достоверно различалась между группами.

Большая часть обнаруживаемых микроорганизмов составили очень низкий уровень от общего количества, многие присутствовали не во всех образцах.

Полагали, что эти минорные микроорганизмы, не вносящие существенного вклада в процессы жизнедеятельности в исследуемых биотопах, и не учитывали их активности.

Если говорить о статистической значимости, то использованная статистическая программа насчитала около 47 флотипов, различие по которым формально статистически значимые, однако половина этих флотипов присутствуют в очень маленьких количествах – порядка 0,001%, где показано относительное обилие видов в каждой исследуемой группе, которое выразилось как медианное значение и разброс от максимального до минимального по группе (например, 0.00 (0.00 to 0.33)).

В большинстве тестируемых образцов преобладали представители рода *Streptococcus*. В образцах микрофлоры пациентов с интактным пародонтом доля стрептококков была существенно больше (31.73 (6.11 to 50.30)), в сравнении с двумя другими группами, причем это различие было статистически значимо (17.51 (4.01 to 34.43) и 18.37 (1.66 to 50.40) соответственно).

Второй из преобладающих групп при интактном пародонте явился род *Neisseria* (8.50 (0.03 to 18.18)), в сравнении с двумя другими группами, причем это различие также было статистически значимо (0.65 (0.015 to 10.08) и 1.84 (0.00 to 24.46) соответственно).

Кроме того, у пациентов с интактным пародонтом были ассоциированы члены семейства *Micrococcaceae* и рода *Rothia* – 5.35 (0.13 to 13.30). Интересно то, что классические бактерии, выделяющиеся обычно при кариесе род *Rothia* (*Stomatococcus mucilaginosus* и *Micrococcus mucilaginosus*) в контроле присутствовали в 2 раза большем количестве.

Интересно, что род *Actinomyces* преобладал в группе с интактным пародонтом 2.46 (0.27 to 16.13), при воспалительных заболеваниях он присутствовал примерно в одинаковых соотношениях 1.50 (0.39 to 3.91) против 1.49 (0.32 to 6.11).

При патологии возрастало количество не идентифицированных бактерий. Место *Rothia* при патологии заняли антагонистические патогенные бактерии.

Одной из преобладающих групп оказался род *Fusobacterium*. При этом очень интересен факт преобладания рода *Fusobacterium* в группе с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (10.19 (3.36 to 21.73)), в сравнении с двумя другими группами – с интактным пародонтом (5.16 (0.39 to 14.97)) и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (5.04 (1.19 to 30.09)), причем это различие было статистически значимо.

Также установлено преобладание семейств *Veillonella* в группе с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (4.66 (0.47 to 11.89)), в сравнении с двумя другими группами – с интактным пародонтом (3.65 (0.36 to 10.19)) и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести (3.65 (0.36 to 10.19)).

Данные по представительству родов *Selenomonas*, *Corynebacterium* и *Campylobacter* были аналогичными. Они присутствовали в существенно большем количестве в образцах пациентов, страдающих хроническим генерализованным катаральным гингивитом, нежели хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести, что может указывать на смену преобладающих видов с переходом воспалительного процесса из одной нозологии в другую (4.45 (0.10 to 12.78); 2.42 (0.29 to 6.00); 1.04 (0.53 to 2.96), соответственно).

Кроме того, были найдены микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах – некультивируемые представители семейств Rs-045, *Dethiosulfobrivionaceae*, которые также преобладали в группе с хроническим генерализованным катаральным гингивитом (0.44 (0.00 to 3.31) и 0.58 (0.00 to 4.04), соответственно) в сравнении с двумя другими группами – с интактным пародонтом и хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести, причем это различие было статистически значимо.

Примечательно, что на основании имеющихся данных не удалось достоверно выделить флотипы, присутствующие в повышенном количестве при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести по отношению к хроническому катаральному гингивиту. Очень интересным был тот факт, что по отношению к интактному пародонту в двух других группах

наблюдалось статистически значимое увеличение доли семейств *Porphyromonadaceae*, *Peptostreptococcaceae* и доли родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.

Кроме того, по отношению к интактному пародонту в двух других группах были найдены микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах – некультивируемые представители неопределенных филогенов на уровне рода *Mogibacteriaceae*, *TM7-3*, *Tissierellaceae*.

Таким образом, в результате исследования нами был произведен сравнительный анализ бактериальных сообществ пародонтальных пространств (зубодесневой борозды, пародонтального кармана) при хроническом генерализованном катаральном гингивите, хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести и у здоровых индивидуумов. В выборке метагеномных образцов были найдены уникальные микробные сообщества, не встречающиеся в ранее изученных метагеномах. Разнообразие бактерий при ВЗП оказалось достоверно более значимым, чем при интактном пародонте. При этом такая характеристика, как число генов в метагеноме, может рассматриваться как перспективный диагностический инструмент детекции воспалительных заболеваний пародонта у пациентов различного возраста, а наличие образцов с аномально высоким содержанием ДНК может служить косвенным признаком воспаления или интенсивной десквамации эпителия десны.

По результатам клинического обследования пациентов на четвертом этапе исследования, у пациентов с интактным пародонтом индекс ОНІ-S составил $1,1 \pm 0,4$ баллов, при диагнозе хронический генерализованный катаральный гингивит – $1,6 \pm 0,2$ баллов, при диагнозе хронический пародонтит легкой степени тяжести – $2,6 \pm 0,08$ баллов.

Данные факты подтвердили мнение многих авторов о неудовлетворительной гигиене полости рта – как важного фактора риска развития воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста, а следовательно, и о необходимости поиска новых, более совершенных методов

диагностики, в том числе с использованием просвечивающей электронной микроскопии (метод негативного контрастирования).

Методом рандомизации были сформированы две выборки пациентов:

1. Группа наблюдения: пациенты молодого возраста с воспалительными заболеваниями пародонта со склонностью к образованию над- и поддесневого зубного камня (12 человек);

2. Контрольная группа: лица с интактным зубным рядом, сохранным пародонтом и отсутствием склонности к минералообразованию (5 человек).

В ротовой жидкости лиц с повышенной склонностью к образованию зубных отложений были выявлены как одиночные нанобъекты размером от 20 до 200 нм, так и их группы, в которых определялись поделившиеся, но не разошедшиеся наноформы, способные к образованию конгломератов. Предполагали, что обнаруженные в ротовой жидкости нанобъекты могут оказывать влияние на активность минерализации зубных отложений. У пациентов с интактным зубным рядом, здоровым пародонтом и отсутствием склонности к минералообразованию выявлялись лишь редко встречающиеся конгломераты, не имеющие выраженной светлой оболочки, а отдельные нанобъекты со светлой оболочкой не выявлялись. Таким образом, электронная микроскопия ротовой жидкости позволила нам идентифицировать нанобъекты с возможным использованием их в диагностических целях в качестве дополнительных маркерных показателей.

Полученные результаты исследования, представленные в главах 3.1., 3.2., 3.3. и 3.4., свидетельствовали о необходимости использования современных методов диагностики для определения роли маркеров воспалительных заболеваний пародонта. При этом выявленная патология прикрепления мягких тканей, приводящая к гемодинамическим и метаболическим изменениям в пародонтальном комплексе, требует своевременного проведения хирургического лечения (френуло- и вестибулопластик, а наличие зубочелюстных аномалий у обследуемых пациентов, обуславливающих неравномерную нагрузку на ткани пародонта, диктовало необходимость использования современных методов

ортодонтического лечения как в период активного лечения, так и в период ретенции.

Опираясь на принципы определения тактики ведения пациентов, необходимо составление плана лечения, который зависел бы от клиники, этиологии и прогноза воспалительных заболеваний пародонта у каждого исследуемого. Кроме того, планирование указанных мероприятий должно напрямую зависеть от активного участия пациента в лечебном процессе. При этом тактика врачей – пародонтологов, ведущих прием пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта, должна включать в себя следующие мероприятия:

1. Комплексное обследование:

- 1.1. Объективное обследование;
- 1.2. Определение пародонтологического статуса;
- 1.3. Определение архитектуры микробного сообщества;

2. Постановка диагноза.

3. Комплексное лечение:

- 3.1. Обучение индивидуальной гигиене рта;
- 3.2. Комплексное пародонтологическое лечение, основанное на рациональном выборе средств и методов, оказывающих непосредственное действие на всю архитектуру микробного сообщества конкретного пациента с учетом особенностей функционирования организма в молодом возрасте.

Таким образом, последовательное выполнение заявленных клинико-диагностических задач исследования обеспечило выполнение поставленной в работе цели – совершенствование методических подходов к диагностике воспалительных заболеваний пародонта на основе протеомного и метагеномного анализа микробиоты пародонтальных пространств и выявления нанообъектов в ротовой жидкости пациентов молодого возраста.

ВЫВОДЫ

1. Пациентов молодого возраста (18 – 19 лет) отличает высокая распространенность воспалительных заболеваний пародонта (53,25%) при неудовлетворительном/низком уровне гигиены полости рта; в структуре воспалительных заболеваний пародонта доминируют: хронический катаральный гингивит (68,1%) и хронический генерализованный пародонтит (23,3%) преимущественно (62,30%; $p < 0,05$) легкой степени тяжести.

2. Методом протеомного анализа установлено, что у пациентов молодого возраста, вне зависимости от состояния тканей пародонта (интактный пародонт, ранние стадии воспаления – гингивит, пародонтит легкой степени), в микробиоме пародонтальных пространств выделены *Bacillus subtilis ssp subtilis* DSM 10T DSM (2.111) и *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2.06), что позволяет охарактеризовать их как представителей аутохтонной микрофлоры полости рта.

3. Ранние стадии воспаления пародонта у лиц в возрасте 18 - 19 лет с высокой степенью надежности ассоциированы с присутствием в десневой борозде и пародонтальном кармане: *Staphylococcus epidermidis* 10547 CHB (2.208), *Candida albicans* CBS 1905 NT CBS (2,127), *Candida albicans* VA 17248 07 04 UKE (2.098), *Bacillus pumilus* DSM 13835 DSM (2.053), *Corynebacterium variabile* DSM 20132T DSM (1.71).

4. По данным метагеномного анализа, в микробиоте пародонтальных пространств у пациентов молодого возраста идентифицировано 183 фило типа на уровне родов, относящиеся к 17 филам. В сравнительном аспекте в образцах лиц с интактным пародонтом преобладали фило типы *Streptococcus* - 31.73 (6.11 - 50.30), *Neisseria* - 8.50 (0.03 - 18.18), *Rothia* - 5.35 (0.13 - 13.30), *Actinomyces* - 2.46 (0.27 - 16.13). При развитии катарального гингивита наблюдается тенденция к формированию ассоциации фило типов *Fusobacterium* - 10.19 (3.36 - 21.73), *Veillonella* - 4.66 (0.47 - 11.89).

5. Микробиота пародонтальных карманов при хроническом генерализованном пародонтите легкой степени тяжести характеризуется наиболее широким диапазоном видового многообразия (индекс альфа-разнообразия 5.2 –

6.3), включая два неопределенных фило типа на уровне рода *Mogibacteriaceae*, TM7
3. С диагнозом хронический генерализованный пародонтит ассоциировано статистически значимое увеличение доли семейств *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Tissierellaceae*, *Veillonellaceae*, родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.

6. Обнаруженные в ротовой жидкости пациентов группы наблюдения нанообъекты диаметром от 20 до 200 нм, окруженные оболочкой с видимой кристаллизацией, а также наличие кальцинированных нанообъектов, визуализируемых как одиночные, делящиеся и агрегированные формы, позволяет предположить их участие в процессе супра- и субгингивального денталитиаза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При составлении индивидуальных программ стоматологического обследования лиц молодого (18 – 19 лет) возраста с признаками воспалительных заболеваний пародонта рекомендовано проводить оценку критериев объективного обследования, пародонтологического статуса и видовой принадлежности выделенных микроорганизмов.
2. В протокол ведения пациентов с хроническим генерализованным катаральным гингивитом врачам - пародонтологам рекомендовано введение антимикотических средств, способных воздействовать на *Candida albicans* и антибактериальных средств широкого спектра действия, способных воздействовать на *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Tissierellaceae*, *Veillonellaceae*, родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.
3. В протокол лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести врачам – пародонтологам рекомендовано включение антимикотических препаратов, способных воздействовать на *Candida albicans* и антибактериальных препаратов широкого спектра действия, способных воздействовать на *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium variabile*, *Bacillus pumilus*, *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Tissierellaceae*, *Veillonellaceae*, родов *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота;

K05.1 – диагноз хронический генерализованный катаральный гингивит (в соответствии с классификацией МКБ–10);

K05.3 – диагноз хронический генерализованный пародонтит (в соответствии с классификацией МКБ–10);

МКБ-10 – Международная классификация болезней 10-го пересмотра;

НАСА – Национальное управление по авиации и исследованию космического пространства;

ОТЕ – операционные таксономические единицы;

п. н. – нуклеотидные последовательности;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

pH – показатель кислотно–щелочного равновесия;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

16S рРНК – одна из трёх основных типов РНК, входит в состав рибосомы в комплексе с белком и участвует в процессе трансляции;

'5-ССТАСGGGNGGCWGCAG-3'– баркодированный праймер Bakt_341F;

'5-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'– баркодированный праймер Bakt_341F;

АТСС – Среды для идентификации из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection);

СВS – Среды для идентификации из Центрального бюро культур грибов – секция формирования коллекции карантинных грибов и их родственных видов Института биоразнообразия грибов;

СНВ – Среды для идентификации *Bacillus* spp. и родственных микроорганизмов, а также *Enterobacteriaceae* spp. и *Vibrionaceae* spp. на стрипе API 50 СН. Идентификаторы на стрипах API;

CPITN – пародонтальный индекс ВОЗ, определяет потребность в лечении заболеваний пародонта;

DSM – Среды для идентификации «Бактериальные культуры из национальной коллекции микроорганизмов»;

DSMZ – Среды для идентификации «Бактериальные культуры из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур»;

FeSO₄ – сульфат железа;

GI – индекс определяющий степень воспаления десны;

KCl – хлорид калия;

KH₂PO₄ – дигидроортофосфат калия;

MGN 3 – арабиноксилан из рисовых отрубей;

MgSO₄ – сульфат магния;

NaCl – хлорид натрия;

NaNO₃ – нитрат натрия;

OHI – S – индекс Грина–Вермильона;

PBI – индекс кровоточивости сосочков;

PMA – палилля–маргинально–альвеолярный индекс;

RDP – классификатор таксономический классификации последовательностей;

UKE – Среды для идентификации из Университетский Медицинский Центр им. Эппендорфа (Гамбург, Германия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулмеджидова, Д.М. Факторы риска развития заболеваний пародонта у взрослого населения / Д.М. Абдулмеджидова // Российский стоматологический журнал. — 2017. — 21 (2) — С. 72-75. DOI 10.18821/1728-2802 2017.
2. Аболмасов, Н.Н. Концепция семейной диспансеризации как основа профилактики и реабилитации при заболеваниях пародонта с позиций теории функциональной системы / Н.Н. Аболмасов // Институт стоматологии.— 2003.—№2.—С.59—60.
3. Агаджанян, Н.А. Интегративная медицина и экология человека / Н.А. Агаджанян, И.Н. Полуниин. – Москва-Астрахань: Изд-во АГМА, 1998. – 355 с.
4. Артюшкевич, А.С. Заболевания пародонта / А.С. Артюшкевич // М.: Медицина, 2006. – 328 с.
5. Ашуров, К.И. Структура заболеваний пародонта, выявляемых на терапевтическом стоматологическом приеме / К.И. Ашуров, В.М. Гринин, Р.Т. Буляков [и др.] // Российский стоматологический журнал.—2012.—№ 2.— С.46—47.
6. Байбакова, О.В. Интеллектуализация управления процессом лечения генерализованного пародонтита на основе статистического моделирования / О.В. Байбакова, Е.Н. Коровин, А.В. Сущенко //Системный анализ и управление в биомедицинских системах.—2009.—Т. 8, № 2.—С.371-373.
7. Балашов, А.Н. Микробный статус пародонтального кармана / А.Н. Балашов, В.В. Хазанова, Н.А. Дмитриева, В.Ф. Загнат // Стоматология. — 1992. — № 1.—С. 22-24.
8. Барер, Г.М. Неоперативные методы лечения пародонтита / Г.М. Барер, И.А. Овчинникова, С.В. Холодов и др. // Клиническая стоматология. —2001. —№2. — С. 60-62.
9. Барсков, И.С. Нанобактерии – новый экологический фактор и глобальный вызов / И.С. Барсков, Р.Г. Джамалов, Е.А. Овчинникова // Международный

- университет природы общества и человека «Дубна». Режим доступа:
<http://hge.spbu.ru/downloadnonob.pdf>.
10. Безрукова, И.В. Агрессивные формы пародонтита / И.В. Безрукова, А.И. Грудянов – М.: МИА, 2002. – 127 с.
 11. Безрукова, И.В. Быстро прогрессирующий пародонтит. Этиология. Клиника. Лечение: дис. ... д-ра мед. наук / И.В. Безрукова // М., 2001. – 180 с.
 12. Белокопытова, В.А. Критерии оценки степени микроциркуляторных нарушений при заболеваниях пародонта: автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.А. Белокопытова – Москва, 2002. – 26 с.
 13. Бельская, Л.В. Зубные и слюнные камни – химический состав, генетические особенности: автореф. дис. канд. хим. наук / Л.В. Бельская – Москва, 2009. – 24 с.
 14. Бехало, В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок / В.А. Бехало, В.М. Бондаренко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – №4. – С. 97-105.
 15. Большедворская, Н.Е. Этиопатогенетические особенности воспалительных заболеваний пародонта / Н.Е. Большедворская, Е.М. Казанкова // Безопасность здоровья человека – 2017. – № 3. – С.26-35.
 16. Борисова, О.Н. Значение кристаллизации биологических жидкостей для повседневной практики и перспективы / О.Н. Борисова // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – №1. – С. 150.
 17. Боровский, Е.В. Биология полости рта / Е.В. Боровский, В.К. Леонтьев // М.: Медицина, 1991. – С. 304.
 18. Брагин, А.В. Онтогенетическая оценка общих механизмов устойчивости организма к патологии зубочелюстной системы / А.В. Брагин [и др.] // Российский стоматологический журнал – 2008. – № 5. – С. 23–26.
 19. Булгакова, А.И. Клинико-иммунологические аспекты лечения хронического генерализованного пародонтита / А.И. Булгакова, Ю.А. Медведев. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России, 2010. – С.116.

20. Булкина, Н.В. К вопросу об этиологии и патогенезе быстро прогрессирующего пародонтита / Н.В. Булкина, А.П. Ведяева // Российский стоматологический журнал. – 2012. – №5. – С.50-52.
21. Булкина, Н.В. Современные аспекты этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта. Особенности клинических проявлений рефрактерного пародонтита / Н.В. Булкина, В.М. Моргунова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2 (часть 2). – С.415-420.
22. Буляков, Р.Т. Клиническая оценка состояния тканей пародонта после консервативного лечения хронического генерализованного пародонтита тяжелой степени с применением методов разрушения биопленки / Р.Т. Буляков, Р.И. Сабитова, О.А. Гуляева // Пародонтология. – 2015. – №1. – С.68-76.
23. Вайнштейн, М.Б. О нанобактериях (обзор) / М.Б. Вайнштейн, Е.Б. Кудряшова // Микробиология. – 2000. – №2. – С. 163-174.
24. Васильева, Н.А. Клиническая характеристика местных факторов риска у больных хроническим катаральным гингивитом / Н.А. Васильева, А.И. Булгакова, И.В. Валеев // Медицинский вестник Башкортостана. – Т. 10, № 5. – 2015. – С.23-27.
25. Вечеркина, Ж.В. Синтропия общесоматической патологии с воспалительными заболеваниями пародонта у детей. Современное состояние вопроса (обзор литературы) / Ж.В. Вечеркина, А.А. Смолина, Н.В. Чиркова, Т.В. Чубаров, Е.Э. Воронина // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. — 2019. — №2. — С.83-89.
26. Вечерковская, М.Ф. Микрофлора ротовой полости детей с онкогематологическими заболеваниями / М.Ф. Вечерковская, Г.В. Тец, Б.В. Афанасьев, В.В. Тец // Онкогематология. — 2015. — №10. — С. 51-57.
27. Виноградова, Т.Ф. Атлас по стоматологическим заболеваниям у детей / Т.Ф. Виноградова // М.: МЕДпресс-информ, 2007. – 164 с.

- 28.Виноградова, Т.Ф. Болезни пародонта. Стоматология детского возраста (Руководство для врачей) // Т.Ф. Виноградова, О.П. Максимова, В.В. Рогинский и др.; под ред. Т.Ф. Виноградовой. – М.: Медицина, 1987. – С. 384.
- 29.Виноградова, Т.Ф. Кариес зубов у детей / Т.Ф. Виноградова // Клиническая стоматология. – 2008. – №3 – С. 7-10.
- 30.Вишняк, Г.Н. Генерализованные заболевания пародонта / Г.Н. Вишняк. – М.: Киев, 1999. – с. 5, 41-58, 216.
- 31.Водолацкий, М.П. Клинико-морфологическая характеристика воспалительного процесса в тканях пародонта у детей / М.П. Водолацкий, В.С. Боташева, А.А. Павлов, А.А. Некрасова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2012. – №1. – С.9.
- 32.Вознесенский, Н.А. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях // Пульмонология и аллергология. – 2008. – №3. – С. 43-44.
- 33.Волков, В.Т. «Нанобактерия» (перспективы исследований). Научный обзор. / В.Т. Волков, Г.В. Смирнов, Н.Н. Волкова // Сибирский медицинский журнал. – 2002. – №5. – с. 5-12.
- 34.Волков, В.Т. Нанобактерия — космическая гостья и проблемы современной экологии и медицины. / Волков В.Т., Смирнов Г.В., Волкова Н.Н., Смирнов Д.Г. // Медико-биологические науки. Доклады ТУСУРа. – 2005. – № 3. –С.123-128.
- 35.Волков, В.Т. Нанобактерия в питьевой воде – новейший биоминерализационный геоэкологический фактор / В.Т. Волков, Л.П. Рихванов, Н.Н. Волкова // III Международный симпозиум «Биокостные взаимодействия: жизнь и камень». – СПб., 2007. – С. 102-105.
- 36.Волков, В.Т. Нанобактерия. / В.Т. Волков, Г.В. Смирнов, Н.Н. Волкова, Ю.И. Сухих – Томск: Изд-во «Твердыня», 2003. –359 с.
- 37.Волков, В.Т. Проблемы холелитиаза и нанобактерии / В.Т. Волков, Г.В. Смирнов, Н.Н. Волкова, М.А. Медведев, Л.П. Рихванов, Ю.И. Сухих // Сибирский медицинский журнал. – 2005. – №2. – С. 26-31.

38. Волошина, А.А. К вопросу заболевания пародонта / А.А. Волошина, О.В. Давидян // Молодой ученый. — 2010. — №12. Т.2. — С. 148-149. — URL <https://moluch.ru/archive/23/2459>.
39. Вольф, Г.Ф. Пародонтология / Г.Ф. Вольф, Э.М. Ратейцхак, К. Ратейцхак; пер. с нем.; под ред. проф. Г.М. Барера // Москва: МЕДпресс-информ, 2008. — 548 с.
40. Вольф, Г.Ф. Пародонтология. Гигиенические аспекты / Г.Ф. Вольф, Т.М. Хэссел; пер. с англ.; под ред. проф. Г.И. Ронь. // М. МЕДпрессинформ, 2014. — 360 с.
41. Вошула, В.И. Морфологические изменения в почке при мочекаменной болезни / В.И. Вошула, Т.Э. Владимирская, Н.К. Сугак // Медицина (Минск). — 2007. — №3. — С. 66-70.
42. Гализина, О.А. Особенности лечения и профилактики начального кариеса и хронического катарального гингивита / О.А. Гализина // Российский мед.-биол. вестник им. Павлова. — 2013. — № 2. — С. 142—147.
43. Гарасько, Е.В. Кальцинирующие наночастицы в питьевой воде / Е.В. Гарасько, Р.Р. Шияев, А.П. Пономарев // Вестник ИМА. — 2011. — №2 (16). — С.15.
44. Гилева, О.С. Консервативно-профилактическая стоматология: современные тренды развития / О.С. Гилева // Пермский медицинский журнал. — 2018. — Том XXXV. №6. — С.61-72.
45. Горбачева, И.А. Связь заболеваний внутренних органов с воспалительными поражениями полости рта / И.А. Горбачева, Л.Ю. Орехова, Л.А. Шестакова, О.В. Михайлова // Пародонтология. — 2009. — №3 (52). — С. 3-7.
46. Григорьян, А.С. Микроорганизмы в заболеваниях пародонта: экология, патогенез, диагностика / А.С. Григорьян, С.Ю. Рахметова, Н.В. Зырянова // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 56 с.
47. Григорьян, А.С. Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение / А.С. Григорьян, А.И. Грудянов, Н.А. Рабухина, О.А. Фролова — М.: МИА, 2004. — С. 320.
48. Грудянов, А.И. Инструментальная обработка поверхности корней зубов / А.И. Грудянов, К.Е. Москалев — М.: ООО «МИА», 2005. — 72 с.

- 49.Грудянов, А.И. Количественная оценка микробиоценозов полости рта при заболеваниях пародонта / А.И. Грудянов [и др.] // Пародонтология. – 2011. – Т.16. – №2. – С. 18-21.
- 50.Грудянов, А.И. Состав пародонтопатогенной микрофлоры при пародонтите разных степеней тяжести по данным полимеразной цепной реакции / А.И. Грудянов, В.В. Овчинникова // Стоматология. – 2008. – №3. – С. 20-23.
- 51.Губайдуллин, А.Г. Особенности патогенеза заболеваний пародонта, вызванных *Porphyromonas gingivalis*. / А.Г. Губайдуллин, М.М. Туйгунов, А.К. Булгаков, Т.А. Савченко // Медицинский вестник Башкортостана. – 2015. – Том 10, № 5. – С. 108-110.
- 52.Гуляева, О.А. Применение метода Regio-Flow в комплексном лечении пародонтита средней степени тяжести / О.А. Гуляева, Р.Т. Буляков, Т.С. Чемикосова, Д.Н. Тухватулина //Проблемы стоматологии. –2012. –№ 2. – С. 14-18.
- 53.Гуляева, О.А. Современные методы в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта: монография / О.А. Гуляева, Р.Т. Буляков, Л.П. Герасимова, Т.С. Чемикосова // Уфа: Изд-во «УралПолиграфСнаб», 2016. – 190 с.
- 54.Данилевский, Н.Ф. Заболевания слизистой оболочки полости рта / Н.Ф.Данилевский [и др.] // М.: ОАО «Стоматология», 2001. – 271 с.
- 55.Деменко, Т.В. Роль микробного фактора в патогенезе свободнорадикальных повреждений пародонта / Т.В. Деменко [и др.]//Матер. межвуз. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы стоматологии». – Рязань: РГМУ. – 1998. – С.158-160.
- 56.Денисова, Е.Г. Заболевания пародонта у детей: Учебное пособие для врачей - интернов стоматологического профиля / Е.Г. Денисова // Харьков, 2008. С. 55-56, 70-71, 113.
- 57.Дмитриева, Л. А. Пародонтит / Л. А. Дмитриева // М., 2007. С. 504.

58. Дмитриева, Л.А. Современные представления о роли микрофлоры в патогенезе заболеваний пародонта / Л.А. Дмитриева, А.Г. Крайнова // Пародонтология. – 2004. – №1 (30). – С. 8-15.
59. Дмитриева, Н.А. Особенности возбудителей различных воспалительных процессов в челюстно-лицевой области / Н.А. Дмитриева, В.В. Хазанова // Стоматология. – 1987. – №1. – С. 29-31.
60. Друзьяк, Н.Г. Вода здоровья и долголетия / Н.Г. Друзьяк // СПб.: Издательство «Крылов», 2007. – С. 256.
61. Елисеева, А.Ф. Сочетанное поражение пародонта и сердечно-сосудистой системы, клинико-морфологическое и микробиологическое исследование: дис. на соискание ученой степени к.м.н. / А.Ф. Елисеева. – Санкт-Петербург, 2014. – 149 с.
62. Ермольев, С.Н. Роль сосудистых нарушений в развитии заболеваний пародонта у подростков в регионах Забайкалья и их фармакологическая коррекция: дис. канд. мед. наук / С.Н. Ермольев. – М., 1994. – 136 с.
63. Ефимова, О.В. Проблема патологических процессов тканей пародонта воспалительно-деструктивного характера на современном этапе / О.В. Ефимова, И.Г. Созонов, И.Д. Ушницкий // Якутский медицинский журнал. — 2008.—№ 4.—С.77—81.
64. Ефимович, О.А. Клинико-лабораторное обоснование терапии дисбактериоза слизистой оболочки полости рта: автореф. дисс. канд. мед. наук/ М., 2002. – С. 32.
65. Желудева, И.В. Определение микроорганизмов в клинических образцах при гингивите и пародонтите / И.В. Желудева [и др.] // Пародонтология. – 2004. – № 4. – С.52-54.
66. Живаева, Е.В. Нанобактерии как новый этиологический агент / Е.В. Живаева, О.А. Крылова, Л.П. Быкова // Успехи современного естествознания. – 2011. – №8. – С.103.
67. Зайцева, Е.М. Клинико-микробиологические параллели и цитокиновый профиль у больных пародонтитом на фоне комплексного лечения с

- использованием линимента циклоферона: автореф. дис. ... канд. мед. наук // Саратов, 2007. – 24 с.
68. Здоровье подростков. Информационный бюллетень. Февраль 2014 // Документационный центр ВОЗ. Режим доступа: <http://whodc.mednet.ru/en/component/attachments/download/105.html>.
69. Зеленова, Е.Г. Нормальная микрофлора полости рта: роль в возникновении кариеса и болезней пародонта / Е.Г. Зеленова // Нижегородский медицинский журнал. – 2003. – Приложение «Стоматология». – С. 40-47.
70. Зеленова, Е.Г. Микрофлора полости рта: норма и патология. Лекции для студентов стоматологического факультета. Учебное пособие / Е.Г. Зеленова, М.И. Заславская, Е.В. Салина, С.П. Рассанов // Н.Новгород: издательство НГМА, 2004. – 157 с.
71. Златоустова, О.Ю. Клинико-морфологические особенности патологической дентальной минерализации / О.Ю. Златоустова, С.В. Васильев, А.С. Рудый // Российский стоматологический журнал. – 2016. – 20 (6) – С. 292-300. DOI 10.18821/1728—2802.
72. Зорина, О.А. Основные изменения нормальной микрофлоры пародонта при хроническом генерализованном пародонтите, выявленные с помощью метагеномного секвенирования / О.А. Зорина, Н.К. Аймадинова, О.А. Борискина, А.А. Басова, Д.В. Ребриков // Российская стоматология. – 2017. – №2. – С.41-48.
73. Зорина, О.А. Соотношение патогенных представителей микробиоценоза пародонтальных карманов при пародонтите разной степени тяжести / О.А. Зорина, А.А. Кулаков, О.А. Борискина, Д.В. Ребриков // Acta naturae. – 2011. – Т. 3, № 2. – С.103-106.
74. Иванов, В.С. Заболевания пародонта / В.С. Иванов. – М., 2001. – С. 300.
75. Иорданишвили, А.К. «Возрастная» эпидемиология заболеваний пародонта / А.К. Иорданишвили, А.В. Тихонов, А.Л. Арьев, С.В. Солдатов, // Пародонтология. – 2010. – №1. – С. 25-28.

- 76.Ипполитов, Е.В. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. / Е.В. Ипполитов, Л.В. Диденко, В.Н. Царев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – 60(12) – С. 59–64.
- 77.Кайдашев, И.П. Кальцифицирующие наночастицы: современное состояние проблемы (обзор литературы) / И.П. Кайдашев // Журнал НАМН України. – 2013. – Т. 19, № 3. – С. 277-285.
- 78.Катола, В.М. Роль орального микробиома в развитии воспаления и соматической патологии / В.М. Катола, В.Е. Комогорцева // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2018. – Выпуск 68. – С. 117-122.
- 79.Князева, Э.Б. Эпидемиология и этиология воспалительных заболеваний пародонта у работников железнодорожного транспорта / Э.Б. Князева, В.Б. Туркутюков // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – №3. С. 29–31.
- 80.Ковалевский, А.М. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта (обзор литературы) (Часть I) / А.М. Ковалевский, В.А. Ковалевский //Обзор литературы в стоматологии. – 2017. – №4. – С.88-90.
- 81.Коваль, Ю.Н. Опыт применения препарата «Имупрет» в детской пародонтологии при лечении хронического генерализованного катарального гингивита у детей на фоне воспалительных заболеваний глотки и гортани / Ю.Н. Коваль, Ж.А. Новикова //Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe. – 2018. – № 2-1 (30). – С. 44-49.
- 82.Косенко, К.Н. Микробные ассоциации пародонтального кармана у больных генерализованным пародонтитом / К.Н. Косенко [и др.] // Вестник стоматологии. – 2000. – №3. – С.10-13.
- 83.Кравцова, Е.О. Колонизация микроорганизмами слизистой оболочки полости рта людей, живущих в неблагоприятной экологической обстановке: дисс... канд. мед.наук. – Е.О.Кравцова // Волгоград, 1995. – 146 с.

84. Кренделев, М.С. Нормальная микрофлора ротовой полости человека / Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5.
URL:<http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21628>.
85. Кузнецова, Н.С. Анализ особенностей стоматологического статуса у лиц молодого возраста, находящихся в состоянии психоэмоционального напряжения / Н.С. Кузнецова, М.Ф. Кабирова, Н.И. Кузнецова // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2017. – Т. 39. – С. 796–800.
86. Куличевская, И.С. Анализ филогенетического состава бактериальных сообществ малых лесных озер и болот на водосборах Верхней Волги / И.С. Куличевская [и др.] // Микробиология. – 2011. – Т. 80, № 4. – С. 543-551.
87. Кулыгина, В.Н. Результаты исследования распространенности и структуры заболеваний пародонта у лиц молодого возраста / В.Н. Кулыгина, Мохаммад Аль Мохаммад, Л.Л. Козлова // Украинский стоматологический альманах. — 2013. — С.29-31.
88. Курильщикова, А.М. Методы и объекты метагеномных исследований / А.М. Курильщикова, Н.В. Тикунова, М.Р. Кабилов // Вестник НГУ. Серия: Биология, Клиническая медицина. – 2012. – Т.10, Вып. 1. – С.191-201.
89. Курякина, Н.В. Заболевания пародонта. – М.: Медицинская книга, Н. Новгород: издательство НГМА. 2007. – 292 с.
90. Кутихин, А.Г. К вопросу о значении нанобактерий в медицине и биологии / А.Г. Кутихин, Е.Б. Брусина, А.Е. Южалин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. №5 (72). – С. 47-53.
91. Куцевляк, В.И. Детская терапевтическая стоматология: учеб. пособие для студентов стоматол. фак-та и врачей-интернов /под. ред. В.И. Куцевляк // Балаклея: ИИК «Балаклеящина», 2002. – 420 с.
92. Кучумова, Е.Д. Применение новых противовоспалительных средств в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при заболеваниях пародонта / Е.Д. Кучумова, А.А. Леонтьев, О.В. Калинина, Л.Ю. Орехова, С.Б. Улитовский // Пародонтология. – 2008. – №1 (46). – С. 83-86.

93. Ламонт, Дж. Р. Микробиология и иммунология для стоматологов / Р. Дж. Ламонт, М.С. Лантц, Р. А. Берне, Лебланк Д. Дж.; пер. с англ. – М.: Практическая медицина, 2010. – С. 180, 504.
94. Ландинова, В.Д. Мотивация подростков при выборе средств гигиены полости рта / В.Д. Ландинова, Е.С. Таболина, Е.И. Фукс // Институт стоматологии. – 2010. – № 1. – С. 22-23.
95. Латышева, С.В. Клиническая оценка использования флоссинга при проведении профессиональной гигиены / С.В. Латышева, О.И. Абаимова // Стоматолог. – 2013. – №2 (9). – С. 23–25.
96. Леонтьев, В.К. Структурные свойства смешанной слюны у лиц с кариесом при разных значениях индексов КПУ / В.К. Леонтьев [и др.] // Стоматология. – 2002. – №4. – С. 29-30.
97. Лепехина, О.А. Гигиенические аспекты в этиологии заболевания пародонта у детей г. Воронежа / О.А. Лепехина, Л.И. Лепехина // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2011. – № 1, Т. 10. – С. 77-81.
98. Лепехина, О.А. Распространённость и особенности клинического течения гингивитов у школьников города Воронежа в различные возрастные периоды: автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.А. Лепехина // Воронеж, 2011. – 24 с.
99. Лобода, Е.С. Заболевания пародонта у лиц молодого возраста с деформирующими дорсопатиями // Пародонтология. — 2010. — №2. — С.21-24.
100. Лукиных, Л.М. Профилактика кариеса зубов и болезней пародонта. – М.: Медицинская книга, 2003. – 196 с.
101. Лукиных, Л.М. Хронический генерализованный пародонтит: современный взгляд на этиологию и патогенез (Часть 1) / Л.М. Лукиных, Н.В. Круглова // Современные технологии в медицине. — 2011. — №1. — С. 123–125.
102. Лукичев, М.М. Современные представления о роли микрофлоры в патогенезе заболеваний пародонта / М.М. Лукичев, Л.А. Ермолаева // Институт стоматологии. – 2018. – № 1. – С. 92-94.

103. Луцкая, И.К. Болезни пародонта. — М.: Медицинская литература, 2010. — С.256.
104. Лысак, Л.В. Численность и таксономический состав ультрамикробактерий в почвах /Л.В.Лысак [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т.79, №3. – С. 428-432.
105. Мамаева, Е.В. Клиника, диагностика и лечение заболеваний пародонта в детском возрасте / Е.В. Мамаева и др. – Казань: Медлитература, 2009. – 192 с.
106. Мамаева, Е.В. Нанобактерии – взгляд на проблему / Е.В. Мамаева, Ю.Р. Мухутдинова // В кн.: Сборник научных статей VI-й Российской научно-практической конференции «Профилактика и лечение стоматологических заболеваний. Медицинские изделия и материалы». – Казань, 2013. – С.53–60.
107. Мандра, Ю.В. Оценка распространенности заболеваний пародонта среди спортсменов Уральского региона / Ю.В. Мандра, В.В. Базарный, А.Ю. Котикова, Е.Н. Светлакова, Л.Г. Полушина // Уральский медицинский журнал. —2018. — №06. — С.24-26.
108. Мартел, Я. Дж. Нанобактерии: взлет и падение /Мартел Я. Дж. //В мире науки. – 2010. – №3. – С.47-55.
109. Мартиросян, В.Г. Клинико-микробиологические особенности диагностики хронического генерализованного пародонтита / В.Г. Мартиросян, Н.В. Плескановская, Л.Н. Николаева, Е.В. Ипполитов, В.Н. Царев, М.П. Пименова, С.Д. Арутюнов // Российский стоматологический журнал. – №4. – 2012. – С.29-34.
110. Матисова, Е.В. Колонизация условно-патогенными микроорганизмами слизистой оболочки полости рта при хроническом пародонтите: Автореф. дис. канд.мед.наук / Е.В. Матисова. – Волгоград, 2010. –24 с.
111. Медведева, Л.С. Методы микробиологической диагностики при заболеваниях пародонто- и периодонта / Л.С. Медведева, М.Г. Суворова // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 6.
URL: <http://www.eduherald.ru/ru/article/view?id=19262>.
112. Мелехов, С.В. Состояние местного иммунитета и микробиоценоза полости рта у больных хроническим генерализованным пародонтитом / С.В.Мелехов,

- Н.В. Колесникова, Е.С.Овчаренко //Пародонтология. – 2013. –№1 (73), Т. 18. – С. 3-9.
113. Михальченко, В.Ф. Стоматологический статус лиц молодого возраста с различным уровнем мотивации к стоматологическим лечебно-профилактическим мероприятиям. Сб. трудов конференции: Актуальные вопросы экспериментальной, клинической и профилактической стоматологии/ В.Ф. Михальченко, И.В. Фирсова. – Волгоград, 2006. –№1. – С.158–162.
114. Модина, Т.Н. Клиника, диагностика патологии тканей пародонта и особенности функционального состояния организма с учетом их взаимовлияния у детей в подростковом периоде (обзор литературы) / Т.Н. Модина, Е.В. Мамаева // Пародонтология. – 2006.– №4 (41) – С.6-10.
115. Модина, Т.Н. Патогенетические критерии диагностики и лечения различных форм быстро прогрессирующего пародонтита: дис. ... д-ра мед. наук. -М., 2002. – 298 с.
116. Мюллер, Х.П. Пародонтология / Х.П. Мюллер; пер. с немецк. - Львов: Гаг Дент, 2004. – 256 с.
117. Наночастицы почечных камней – нанобактерии или нет? Коммерческая биотехнология //http: www.cbio.ru.
118. Нгуен, Т.Н. Характеристика сообщества микроорганизмов эпителия кишечника человека при колоректальном раке: автореферат дис. ...канд.биол.наук. / Нгуен Тхи Нга // Казань, 2015. – 27 с.
119. Носик, А.С. Разработка методов лабораторной диагностики и лечения кандиды ассоциированного пародонтита: автореф.дис. ...канд. мед. наук / А.С. Носик. – М.:Москов. гос. мед.-стомат. ун-т, 2004. – 25 с.;
120. Ньюман, М. Антимикробные препараты в стоматологической практике / М. Ньюман, А.Д. Винкельхоф // М.: Азбука, 2004. – 304 с.
121. Олейник, О. И. Оценка эффективности применения вектор-системы в комплексном лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени / О.И. Олейник, М.А. Сорокина, С.В. Ерина,

- К.П. Кубышкина // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. XX. №2. – С. 138–143.
122. Олесов, Е.Е. Профилактические и экономические аспекты профессиональной гигиены рта у молодых работников предприятий / Е.Е. Олесов, П.В. Кащенко, В.С. Печенихина и др. // Медицина экстремальных ситуаций. – 2013. – №4 (46). – С. 6–10.
123. Орехова, Л. Ю. Клинический опыт применения озонотерапии в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / Л.Ю. Орехова, Е.С. Лобода // Пародонтология. – 2013. – Т. 18, №3 (68). – С. 41-45.
124. Орехова, Л.Ю. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта/ Л.Ю. Орехова, Е.С. Лобода, М.Л. Обоева // Пародонтология. – 2015. – Т. 20, №1 (74). – С. 44–49.
125. Орехова, Л.Ю. Антибактериальный и противовоспалительный эффекты пародонтальной терапии с помощью аппарата Vector / Л.Ю. Орехова, Е.С. Лобода, Д.С. Щербакова //Пародонтология. – 2011. – №3. – С. 31-37.
126. Орехова, Л.Ю. Заболевания пародонта / Орехова Л.Ю., Трезубов В.Н., Улитовский С.Б. и др. — М., 2004. — С. 163-165, 432.
127. Орехова, Л.Ю. Здоровье молодежи – приоритетный национальный проект / Л.Ю. Орехова, Т.В. Кудрявцева, И.Н. Никифорова, Е.С. Лобода // Пародонтология. — 2009. — №1. — с. 13-16.
128. Орехова, Л.Ю. Иммунологические механизмы в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта: дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 1997. – 226 с.
129. Орехова, Л.Ю. Проблемы стоматологического здоровья у лиц молодого возраста (обзор литературы) / Л.Ю. Орехова, Т.В. Кудрявцева, Н.Р. Чеминава, В.В. Тачалов, Е.С. Лобода // Пародонтология. – 2014. – №2. –С. 3-5.
130. Орехова, Л.Ю. Современные технологии бактериологического исследования пародонтальных пространств / Л.Ю. Орехова, М.Д. Жаворонкова, Т.Н. Суборова //Пародонтология. – 2013. – №2, Т. 18. – С. 9-13.
131. Орехова, Л.Ю. Стоматология профилактическая. Учебник / Л.Ю. Орехова, С.Б. Улитовский [и др.]. – М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005. – 272 с.

132. Панков, Д.Д. Диагностика пограничных состояний у детей и подростков / Д.Д. Панков, А.Г. Румянцева // Российский педиатрический журнал. —2002.— № 3.—С.4-7.
133. Парунова, С.Н. Влияние микрофлоры полости рта на регенерацию тканей пародонта у больных сахарным диабетом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / С.Н. Парунова // М., 2004. – 21 с.
134. Персин, Л.С. Ортодонтия. Диагностика. Виды зубочелюстных аномалий / Л.С.Персин // М.: ООО «Ортодент-инфо», 1999. – 271 с.
135. Персин, Л.С. Стоматология детского возраста / Л.С. Персин, В.М. Елизарова, С.В. Дьякова // М.: Медицина, 2006. – 640 с.
136. Петрухина, Н.Б. Изучение взаимосвязи состава микробиома пародонта и кишечника в норме и при патологии методами глубокого секвенирования / Н.Б. Петрухина, О.А. Зорина, Е.В. Ших, А.В. Шиббаева, А.Б. Шевелев //Стоматология. – 2016. – №2. – С.8-13.
137. Поворознюк, В.В. Остеопороз и заболевания пародонта / В.В. Поворознюк, И.П. Мазур // Пародонтология. – 2005. – №3 (36). – С. 14-19.
138. Пономарев, А.П. Морфология и свойства некоторых микроорганизмов, представителей нано – и микромира / Пономарев А.П., Белик Е.В., Шиляев Р.Р. // Вестник ИМА. – 2008. – № 3 (13). – С.23-29.
139. Попенко, А.С. Биоинформационное исследование таксономического состава микробиоты кишечника человека: автореферат дис...канд.биол. наук / А.С. Попенко // Москва, 2014. – 22 с.
140. Поповеч, З.Б. Рентгендіагностека ғажворьявань ғубів та тканен пародонту у детёчому та підлітковому віці / З.Б. Поповеч, М.М. Роґко, Е.В. Беґвушко— 2001. — 214 с.
141. Рабинович, И.М. Изучение микробиоценоза при хронических заболеваниях слизистой оболочки полости рта / И.М.Рабинович, В.В.Хазанова, Н.А. Дмитриева // Стоматология. – 1996. – №2. – С.26-27.
142. Рабинович, И.М. Коррекция микробиологических изменений у больных с дисбактериозами полости рта / И.М.Рабинович, Н.А.Дмитриева, О.И.

- Ефимович // Труды VI съезда Стоматологической Ассоциации России. – М., 2000. – С. 281-283.
143. Рабинович, И.М. Отдаленные результаты лечения воспалительных заболеваний пародонта с использованием системы Vector // Клиническая стоматология. — 2011. — № 4. — С. 38-39.
144. Равин, Н.В. Геном прокариот / Н.В. Равин, С.В. Шестаков // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4(2). – С. 972-984.
145. Разина, И.Н. Лазерные технологии при лечении хронического генерализованного пародонтита, ассоциированного с *Candida spp.* Опыт клинического применения / И.Н. Разина, О.А. Чепуркова, М.Г. Чеснокова, В.Б. Недосеко // Пародонтология. —2013. — № 1 (66) — С. 24-30.
146. Реброва, Р.Н. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии / Р.Н. Реброва // М.: Медицина, 1989. – 128 с.
147. Саакян, Т.Ш. Состояние тканей пародонта у 12-летних детей / Т.Ш. Саакян // Сборник трудов III Всерос. науч.-практ. конф. «Образование, наука и практика в стоматологии, по объединенной тематике «Пародонтология». – М., 2006. – С. 120-129.
148. Садовский, В. В. Молекулярно-генетические методы диагностики и анализ полученных данных с использованием компьютерных программ / В. В. Садовский, Д. З. Чониашвили, Д.А. Дё, С.Н. Щербо // Маэстро стоматологии. – 2008. – №29. – С. 58.
149. Самохина, В.И. Современные тенденции в лечении хронического катарального гингивита у подростков с использованием физических методов воздействия / В.И. Самохина, О.В. Мацкиева, Ю.В. Свертокина // Пародонтология. – 2014. – №1 (70). – С. 31-34.
150. Сергеев, А.Ю. Кандидоз / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев // М.: «Триада - X», 2001. – 472 с.
151. Слободина, Е.В. Ранняя диагностика воспалительных заболеваний пародонта у подростков и лиц молодого возраста: автореф. дис. ... канд. мед.наук / Е.В. Слободина—М., 2008. — 22 с.

152. Смирнов, Д.Г. Нанобактерии – как биоиндикатор экологического неблагополучия среды или заболевания человека / Д.Г.Смирнов, Н.Н. Волкова // Известия Томского политехнического университета. – 2006. – №8(309). – С.179.
153. Соболев, А.В. Микогенная аллергия (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика) / А.В. Соболев, Н.В. Васильева // Аллергология. Частная аллергология. Т. 2. Под ред. Г.Б. Федосеева. – СПб.: Нордмедиздат, 2001. – С. 200-211.
154. Суетенков, Д.Е. Качественная и количественная оценка пародонтопатогенной микрофлоры полости рта при помощи BANA-теста / Д.Е. Суетенков, А.В. Акулович, Е.А. Гриценко // Пародонтология. —2012. —№ 2 (63) — С. 66-70.
155. Такиметбекова, Б.Ж. Воспалительные заболевания тканей пародонта у детей // Вестник КазНМУ. — 2014. — №1 — С. 156-158.
156. Тарасова, Ю.Г. Эффективность проведения профессиональной гигиены полости рта при первичном приеме пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом в учреждениях разного уровня / Ю.Г. Тарасова, Г.Б. Любомирский // Стоматология для всех. — 2012. — №1. — С. 50–53.
157. Тец, В.В. Микробы, не известные как представители нормальной микрофлоры ротовой полости человека / В.В. Тец, М.Ф. Вечерковская, А.А. Доморад, Д.С. Викина, Д.В. Михайлова, Е.И. Онищенко, Г.В. Тец, Ю.А. Трофимова, В.В. Харламова // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. — 2012. — Т. XIX. №3. — С. 113-115.
158. Трезубов, В.Н. Ортопедическая стоматология. Пропедевтика и основы частного курса [Текст]: учебник для студентов мед. вузов, обуч. по спец. стоматология / В. Н. Трезубов, А. С. Щербаков, Л. М. Мишнёв. - 3-е изд., испр. и доп. - М. : МЕДпресс-информ, 2008. – 404 с.

159. Улитовский, С.Б. Гигиена полости рта в пародонтологии / С.Б. Улитовский. — М., 2006. — 267 с.
160. Улитовский, С.Б. Индивидуальная гигиена полости рта / С.Б. Улитовский. — М., 2005. — 192 с.
161. Улитовский, С.Б. Основы профилактики заболеваний пародонта // Медицинский совет. — 2014. — №7. — С.68-71.
162. Улитовский, С.Б. Проблемы пародонтологии и современные проблемы их решения / С.Б. Улитовский, Е.С. Алексеева, А.А. Васянина // Пародонтология. — 2015. — №3 (76), Т. 20 . — С. 33-36.
163. Усманова, И.Н. Клинико-микробиологическая эффективность применения фотодинамической терапии хронического гингивита и пародонтита у лиц молодого возраста / И.Н. Усманова, Л.П. Герасимова, М.Ф. Кабирова, М.М. Туйгунов, И.Р. Усманов // Пародонтология. — 2015. — №2. — С. 67-72.
164. Усманова, И.Н. Клинико-морфологические изменения тканей пародонта, обусловленные наличием дрожжеподобных грибов рода *Candida* у лиц молодого возраста / И.Н. Усманова [и др.] // Пародонтология. — 2015. — Т. 20 . — №3 (76). — С. 62-66.
165. Усманова, И.Н. Особенности микробиоценоза полости рта у лиц молодого возраста, проживающих в регионе с неблагоприятными факторами окружающей среды /И.Н. Усманова // Клинич. стоматология. —2011. — № 3. — С. 94–96.
166. Усманова, И.Н. Роль условно-патогенной микрофлоры полости рта в развитии воспалительных заболеваний пародонта и слизистой полости рта (обзор литературы) / И.Н. Усманова, М.М. Туйгунов, Л.П. Герасимова, М.Ф. Кабирова, А.Г. Губайдуллин, А.А. Герасимова, Р.Ф. Хуснаризанова // Вестник ЮУрГУ. Серия «Образование, здравоохранение, физическая культура». — 2015. —Т. 15, № 2. — С. 37–44.
167. Федотова, А.В. Молекулярная идентификация фильтрующихся форм бактерий и архей ультрапресных вод: дис. ...канд. биол. наук. / А.В. Федотова // М., 2013. — 118 с.

168. Хазанова, В.В. Морфология микроорганизмов содержимого зубодесневого кармана в зависимости от тяжести пародонтита / В.В. Хазанова, А.Н. Балашов, В.Ф. Загнат, Н.А. Дмитриева // *Стоматология*. – 1993. – № 3. – С. 16-18.
169. Хайбуллина, Р.Р. Применение программы медицинской реабилитации пациентам с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести / Р.Р. Хайбуллина, Л.Т. Гильмутдинова, Л.П. Герасимова, З.Р. Хайбуллина // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2016. – №2. – С. 242-246.
170. Хафизова, Ф.А. Изучение состава и сравнительный анализ бактериальных сообществ образцы слизистой оболочки десен в норме и при воспалении в зонах дентальной имплантации / Ф.А. Хафизова [и др.] // *Сборник статей международной научно-практической конференции «Качество оказания медицинской стоматологической помощи: способы достижения, критерии и методы оценки»*. – Казань, 2016. – С. 9-17.
171. Царев, В.Н. Антимикробная терапия в стоматологии / В.Н. Царев, Р.В. Ушаков // *Руководство*, 2-е изд. – М.: ООО «МИА», 2006. – 144 с.
172. Царев, В.Н. Лекции по клинической микробиологии для студентов стоматологических факультетов / В.Н. Царев, Р.В. Ушаков, М.М. Давыдова – Иркутск: ИГМК. КЦ «Журналист», 1996. – 84 с.
173. Царев, В.Н. Современные методы микробиологической диагностики заболеваний тканей пародонта / В.Н. Царев, Е.Н. Николаева, А.С. Носик, С.Н. Щербо / *Медицинский алфавит. Стоматология*. – 2005. – № 2 – С. 26–29.
174. Цепов, Л.М. «Пограничные состояния» в диагностике и лечении воспалительных заболеваний пародонта / Л.М. Цепов, А.И. Николаев, М.М. Нестерова, Т.Е. Щербакова // *Пародонтология*. – 2012. – №4. (65) – С.8-12.
175. Цепов, Л.М. Микробные биопленки и хронические воспалительные заболевания пародонта (обзор литературы) / Л.М. Цепов, А.И. Николаев, Д.А. Наконечный, М.М. Нестерова // *Пародонтология*. — 2015. — № 3 — С.3-6.
176. Цепов, Л.М. Микрофлора полости рта и ее роль в развитии воспалительных генерализованных заболеваний пародонта / Л.М. Цепов // *Пародонтология*. – 2007. – №4. – С. 3-8.

177. Цепов, Л.М. Некоторые аспекты этиологии и патогенеза хронических воспалительных генерализованных заболеваний пародонта (обзор литературы). Ч. I / Л.М. Цепов [и др.] // Пародонтология. – 2005. – № 2. – С. 3-6.
178. Цепов, Л.М. Роль микрофлоры в возникновении воспалительных заболеваний пародонта / Л.М. Цепов, Н.А. Голева // Пародонтология. – 2009. – №1. – С. 7-12.
179. Цепов, Л.М. Современные подходы к лечению воспалительных генерализованных заболеваний пародонта (обзор литературы)/ Л.М. Цепов, А.И. Николаев, Д.А. Наконечный, М.М. Нестерова // Пародонтология. –2015. – №2 (75). – С. 3-9.
180. Цепов, Л.М. Способы финишной обработки поверхностей зубов и рецидивное камнеобразование у больных хроническим генерализованным пародонтитом/ Л.М. Цепов, М.М. Нестерова, Н.А. Голева //Пародонтология. – 2011. – №2. – С. 62-64.
181. Цепов, Л.М. Факторы, определяющие сопротивляемость пародонта патогенным воздействиям / Л.М. Цепов, Н.А. Голева, А.И. Николаев // Пародонтология. – 2008. – №2 (47) – С. 3-9.
182. Цепов, Л.М. Хронический генерализованный катаральный гингивит и хронический генерализованный пародонтит: общие истоки, последовательный переход? (дискуссия) / Л.М. Цепов, А.И. Николаев, М.М. Нестерова, Е.В. Петрова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – Т. 17, № 3. – С.198-205.
183. Цепов, Л.М. Хронический генерализованный пародонтит: ремарки к современным представлениям / Л.М. Цепов, Е.А. Михеева, Н.А. Голева, М.М. Нестерова // Пародонтология. – 2010. – №1 (54) – С. 3-7.
184. Цимбалистов, А.В. Инструментальное обеспечение профессиональной гигиены полости рта / А.В. Цимбалистов, Г.В. Шторина, Е.С. Михайлова – Санкт-Петербург, 2003. – 80 с.
185. Чепуркова, О.А. Распространенность грибковой флоры и особенности микробиоценоза у лиц с интактным пародонтом и с хроническими

- воспалительными заболеваниями пародонта / О.А.Чепуркова [и др.] // Пародонтология. – 2009. – №1. – С. 60-65.
186. Чухловин, А.Б. Метод ПЦР-детекции пародонтопатогенных бактерий и *Streptococcus mutans* в биологических образцах из ротовой полости / А.Б. Чухловин, С.К. Матело, А.М. Соловьева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 4. – С. 35-38.
187. Шевченко, Е.А. Оценка вирусного компонента при диагностике и терапии воспалений ротовой полости / Е.А. Шевченко, О.А. Успенская, И.М. Кондюров, В.В. Курылев, В.Ф. Россохин // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 3. – С. 96-99.
188. Шестаков, С.В. Вклад метагеномики в развитие биотехнологии / С.В. Шестаков // Биотехнология. – 2011. – №6. – С. 8-22.
189. Шибаева, А.В. NGS в стоматологии: бактериальные консорциумы пародонта в норме и при агрессивном пародонтите / А.В. Шибаева, А.Б. Шевелев, О.А. Зорина // Геномное секвенирование NGS. – 2014. – С. 23.
190. Шибаева, А.В. Исследование бактериальных консорциумов в качестве этиологического фактора развития болезней пародонта: автореф. дисс. ... канд. мед.наук / А.В. Шибаева. Москва, 2017. — С.6, 137-148.
191. Шиляев, Р.Р. Современная трансфузиология и применение нанотехнологий для биологической безопасности / Р.Р. Шиляев, Е.В. Гарасько, Н.А. Урусова // Вестник ИМА. – 2009. – №3 (14). – С.68.
192. Ширшова, Н.Е. Медико-социальные аспекты и профилактика заболеваний пародонта у студенческой молодежи: дис. ... канд. мед. наук / Н.Е. Ширшова. — Челябинск, 2007. — 185 с.
193. Ширшова, Н.Е. Методические аспекты оценки состояния гигиены полости рта у лиц молодого возраста / Н.Е. Ширшова, В.Р. Тесленко, О.С. Гилева // Пермский медицинский журнал. — 2006. — Том XXIII № 6. — С.107-113.
194. Шишелёва, А.Ю. Все мы родом из детства, или эссе на тему: важные аспекты возрастной физиологии зубочелюстной системы / А.Ю. Шишелёва // Профилактика Today. – 2009. – №9. – С. 7-8.

195. Шишкина, И.М. Роль микробиологического статуса в патогенезе хронического катарального гингивита с обоснованием лечения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2007. – 24 с.
196. Юдина, Н.А. Диагностика болезней пародонта / Н.А. Юдина // Современная стоматология. – 2011. – № 1. – С. 26-32.
197. Янушевич, О.О. Стоматологическая заболеваемость населения России. Состояние пародонта и слизистой оболочки полости рта / О.О. Янушевич // М. – 2008. – 228 с.
198. Яруллина, Д.Р. Инфекционная природа атеросклероза: факты и гипотезы /Д.Р. Яруллина [и др.] // Ученые записки Казанского университета, серия Естественные науки. – 2010. – Т. 152, кн 1. – С. 136-154.
199. Abusleme, L. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation / L. Abusleme [et al.] // ISME J. – 2013. – Vol. 7 (5). – P. 1016-1025.
200. Addy, M. Chemical plaque control in prevention of gingivitis and periodontitis / M. Addy, J. Moran, W. Wade // Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. – 1994. – P. 244-257.
201. Agabobav, R.M. Link between the early calcium deposition in placenta and nanobacteria-like infection / Agabobav R.M. [et al.] // J. Biosci.–2007. – № 6 (32).– P.1163–1168.
202. Akerman, K.K. Radiolabeling and in vivo distribution of nanobacteria in rabbit / K.K. Akerman, J.T. Kuikka, N. Ciftcioglu // Proc.SPIE Int. Soc. Opt. Eng. – 1997. – Vol. 3111. – P.436-442.
203. Allais, G. Биопленка полости рта // Новое в стоматологии. – 2006. – № 4 (136). – С. 4-15.
204. Amann, R.I. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R.I. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer // Microbiol Rev. – 1995. – Vol. 59. – P. 143-169.
205. Arai, H. Host defensive functions in a family manifesting early-onset periodontitis / Arai H. [et al.] // J. Periodontol. – 1996. – № 67 (4). – P. 433-442.

206. Arumugam, M. Enterotypes of the human gut microbiome / Arumugam M. [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 473, № 7346. – P. 174-180.
207. Arumugam, M. Smash Community: A metagenomic annotation and analysis tool / Arumugam M. [et al.] // *Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 26. – P. 2977-2978.
208. Ashley, F.P. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and spirochaetes in the subgingival microflora of adolescents and their relationship with the amount of supragingival plaque and gingivitis / F.P. Ashley, J. Gallagher, R.F. Wilson // *Oral Microbiol. Immunol.* – 1988. – Vol. 3, № 2. – P. 77-82.
209. Baek, K. Complex Intratissue Microbiota Forms Biofilms in Periodontal Lesions / Baek K. [et al.] // *J. Dent Res.* [Epub ahead of print]. – 2017. – Vol.96, № 12. – P. 1451-1458.
210. Baek, K.J. The proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* is critical in a murine model of periodontitis / Baek K.J. [et al.] // *J. Periodontol.* – 2017. – Vol. 88 (2). – P. 218-224.
211. Balamurugan, R. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. / Balamurugan R. [et al.] // *J. Gastroenterol Hepatol.* – 2008. – Vol. 23, № 8. – P. 1298-1303.
212. Barr, S.C. Detection of biofilm formation and nanobacteria under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats and dogs / S.C.Barr, R.A.Linke, Janssen D. // *Am. J. Vet. Res.* – 2003. – Vol. 64. – P. 176-182.
213. Bartold, P.M. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis / P.M. Bartold [et al.] // *J. Clin Periodontol.* – 2010. – Vol. 37, № 5. – P. 405-411.
214. Basson, N.J. Growth interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius*: in vitro and in vivo studies / Basson N. J., C.W.M. van Wyk, C.M. de Miranda // *JADA*. 2002. – Vol. 47, № 6. – P. 253-256.

215. Belibasakis, G.N. Applications of the oral microbiome in personalized dentistry / G.N. Belibasakis, N. Bostanci, P.D. Marsh, E. Zaura; K.Krishnan // *Arch Oral Biol.* – 2019. – P. 7-12. – doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.023.
216. Belstrøm, D. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. / Belstrøm D. [et al.]//*NPJ Biofilms and Microbiomes.* – 2017. – Vol. 3 – P.23.
217. Benjamin, S.D. Familial patterns of advanced alveolar bone loss in adolescence (periodontosis) / Benjamin SD, Baer P.N. //*Periodontics.* – 1967. – № 5(2). – P. 82–88.
218. Bimstein, E. Growth and development considerations in the diagnosis of gingivitis and periodontitis in children / Bimstein E., Matsson L. // *Pediatr Dent.* – 1999. – Vol. 21, № 3. – P.186-191.
219. Boutaga, K. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples / Boutaga K. [et al.] // *J. Clin Microbiology.* – 2003. – Vol. 41, № 11 – P. 4950-4954.
220. Bratos-Rezez, M.A. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification/Bratos-Rezez M.A. [et al.] // *Eur. Heart J.* – 2008. – № 3(29). – P. 371-376.
221. Braun, A. Efficiency of subgingival Calculus removal with the Vector-system compared to ultrasonic sealing and handinstrumentation in vitro / Braun A., Krause F., Frentzen M., Jespen S. // *Periodontal Research.* – 2005. – Vol.40, № 1. – P. 48-52.
222. Brook, I. Microbiology and management of periodontal infections. / Brook I. // *Gen Dent.* – 2003. – Vol. 51, № 5. – P. 424-8.
223. Burmeister, J.A. Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings / Burmeister J.A. [et al.] // *J. Clin Periodontol.* – 1984 (Mar). – № 11(3). – P. 181-192.
224. Caporaso, J.G. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data / Caporaso J.G. [et al.] // *Nature Methods.* – 2010. – Vol. 7, № 5. – P. 335-336.

225. Cekici, A. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease / Cekici A.[et al.]// *Periodontol2000*. – 2014. –Vol. 64 (1). – P. 57-80.
226. Chabrière, E. Fetuin is the key for nanon self-propagation /E. Chabrière [http://Chabrière E. \[et al.\] //Microbial Pathogenesis– 2014. – Vol. 73. – P. 25-30](http://Chabrière E. [et al.] //Microbial Pathogenesis– 2014. – Vol. 73. – P. 25-30).
227. Chaitra, T.R. Mandibular talons cusp /T.R.Chaitra [et al.] //*BMJ Case Rep*. – 2012. Vol.6(4).– P. 408-413.
228. Choi, Y.S. Increased bacterial invasion and differential expression of tight-junction proteins, growth factors, and growth factor receptors in periodontal lesions /Choi Y.S. [et al.] // *J. Periodontol*. – 2014. –Vol. 85 (8). – P. 313-322.
229. Choi, Y.S. Porphyromonas gingivalis and dextran sulfate sodium induce periodontitis through the disruption of physical barriers in mice. /Choi Y.S. [et al.] // *Eur J. Inflamm*. – 2013. – Vol. 1 1(2). – P. 419-431.
230. Christersson, L.A. Suppression of subgingival Actinobacillus actinomycetemcomitans in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline /Christersson L.A., Zambon J.J. // *J. Clin. Periodontol*. – 1993. – Vol. 20. – P. 395-401.
231. Christoffers, A.B. Effects of estradiol and progesterone on the proliferation of human gingival fibroblasts / Christoffers A.B. [et al.] // *Eur J. Med. Res*. – 2003. – Vol. 8, № 12. – P.535–542.
232. Ciftcioglu, N. Nanobacteria: an infectious caused for kidney stone formation /Ciftcioglu N. [et al.] // *Kidney Int*. – 1999. – Vol. 56. – P. 1893-1898.
233. Ciftcioglu, N. Association between nanobacteria and periodontal disease /Ciftcioglu N., McKay D.S., Kajander O. // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108, № 8. – P. 58-59.
234. Cisar, J.O. An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization /J.O. Cisar [et al.] // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97, № 21 – P. 11511-11515.
235. Cochran, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease // *J. Periodontology*. – 2008. –Vol. 79 (8). – P. 1569-1576.

236. Contreras, A. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens / Contreras A., Nowzari H., Slots J. // *Oral Microbiol Immunol* 2000. – Vol. 15(1). P. 15–18.
237. Dabdoub, S.M. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes // Dabdoub S.M. [et al.] // *J. Dent. Res.* – 2013. – Vol. 92. – P. 168-175.
238. Dahlen, G. Pulative periodontopathogens in «diseaded» and «non diseaded» persons exhibiting poor oral hygiene / Dahlen G., Manji G., Baelum V., Fejerscov O. // *J Clin Periodontol.* – 1992. – Vol. 19. – P. 35-41.
239. Daly, C.G. Bacterimia due to periodontal probing : a clinical and microbiological investigation / C.G. Daly, D.H. Mitchell, J.E. Highfield, D.E. Grossberg, D. Stewart // *J. Periodontol.* – 2001. – Vol. 72, № 2. – P. 210-214.
240. Daniel, R. The soil metagenome-a rich resource for the discovery of novel natural products / Daniel R. // *Curr Opin Biotechnol.* – 2004. – Vol. 15. – № 3. – P. 199-204.
241. Darveau, R.P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev* /Darveau R.P. [et al.] // *Microbiol.* – 2010. – Vol. 8 (7). – P. 481-490.
242. Davies, R.M. Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis / *Periodontology* 2000. – 2008. – Vol. 48. P. 23–30.
243. DeFilippo, C. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa / De Filippo C. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – Vol. 107, № 33. – P. 14691-14696.
244. DeGruttola, A.K. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models /DeGruttola A.K. [et al.] // *Inflamm Bowel Dis.* – 2016. – Vol. 22(5). – P.1137-1150.
245. Demir, T. The changes in the T-lymphocyte subsets in a population of Turkish children with puberty gingivitis /T. Demir [et al.] // *Int J. Paediatr Dent.* – 2009. – Vol. 19, № 3. – P. 206-212.
246. Demmer, R.T. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis/ R.T. Demmer, P.N. Papapanou // *Periodontol* 2000.—2010.—Vol. 53.—P.28-44.

247. Deo, P.N. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals / P.N. Deo, R. Deshmukh // *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. – Vol. 23(1). – P. 122–128. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18.
248. Dewhirst, F.E. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. / F.E. Dewhirst [et al.] // *Database (Oxford). J. Bacteriol.* – 2010. – Vol.192. – P. 5002–5017.
249. Diaz, P.I. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxidedepleted environments. / Diaz P.I. [et al.] // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 148(2). – P.467-472.
250. Dingsdag, S. Bacterial communities associated with apical periodontitis and dental implant failure / Dingsdag, S., Nelson, S., Coleman, N. V. // *Microb. Ecol. Health*. – 2016. – Vol. 8 (27). – P. 31307.
251. Drancourt, M. Attempted isolation of *Nanobacterium* sp. microorganisms from upper urinary tract stones /M.Drancourt [et al.] // *J. Clin Microbiol.* – 2003. – Vol.41. – P. 368–3724.
252. Edlan, A. Plastic surgery of the vestibulum in periodontal therapy / Edlan A., Mejchar B. // *Int. Dent. J.* – 1963. – Vol. 13. – P. 593-598.
253. Epstein, S. *Microbiology monographs* // Springer Berlin Heidelberg. — 2009. — Pp. 10, 131–159.
254. Fava, F. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? /Fava F., Danese S. // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 7, № 5. – P. 557-566.
255. Feng Z., Weinberg A. Role of bacteria in health and diasease of periodontal tissues // *Periodontology 2000*. – 2006. – Vol. 40, № 1. – P. 50–76.
256. Folk, R.L. Bacteria and nannobacteria revealed in hardgrounds, calcite cements, native sulfur, sulfidematerials, and travertines (abstract) / Folk R.L. // *Geological Societyof America Annual Meeting: Program Abstracts*. – 1992. – P.104.
257. Folk, R.L. In defense of nannobacteria // *Science*. 1996. V. 274. P. 1285-1289.
258. Folk, R.L. Nannobacterial alteration of pyroxenes in martian meteotite Allan Hills 84001 / Folk R.L., Taylor L.A. // *Meteor. Planet. Science*. – 2002. – V. 37. – P. 1057-1069.

259. Folk, R.L. Nanobacteria and the precipitation of carbonate in unusual environments // *Sediment. Geol.* – 1999. – V. 126. – P. 47-55.
260. Folk, R.L. The possible role of nannobacteria (dwarf bacteria) in clay-mineral diagenesis and the importance of careful sample preparation in high-magnification SEM study / Folk R.L., Lynch F.L. // *J. Sediment Res.* – 1997. – V. 67. – P. 583-589.
261. Frank, D.N. Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses/ Frank D.N. [et al.] // *Trends Microbiol.* – 2011. – Vol. 19 (9). – P. 427-434.
262. Frank, R.M. Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis / R.M.Frank // *J. Periodontal Res.* – 1980. – Vol.15(6). – P.563-573.
263. Fuchs, M. Periodontal index / Fuchs M. // *Czas. Stomatol.* – 1954. – Vol. 7, № 1. – P.1-5.
264. Furlow, B. Gut microbe composition and metabolic syndrome / Furlow B. // *Lancet Diabetes Endocrinol.* – 2013. – Vol. 1. – P. 4-5.
265. Galimanas, V. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators / V. Galimanas [et al.] // *Microbiome.* – 2014. – Vol. 32(2). – P. 2-32.
266. García-Ruiz, J.M. Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica /García-Ruiz J.M., Melero-García E., Hyde S.T. // *Science.* – 2009. – P.362–365.
267. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. // *Lancet.* – 2017. – 390(10100). P. 1211-1259.
268. Ghigo, J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development// *Nature.* – 2001. – Vol. 412. – P. 442-445.
269. Gilbert, J.A. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome / J.A. Gilbert, C.L. Dupont // *Annual Review of Marine Science.* — 2011. — Vol. 3, № 1. — P. 347–371.

270. Gill, S.R. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome / Gill S. R. [et al.] // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 1355–1359.
271. Goldman, H.M. Periodontal Therapy / Goldman H. Maurice, Cohen D. Walter // Published by Mosby. – 1990. – 729 p.
272. Green, J.C. The oral hygiene index: A method for classifying oral hygiene status /Green J.C., Vermillion J.R. // J. Am. Dent. Assoc. – 1960. – Vol. 61. – P. 172-175.
273. Griffen, A.L. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. // Griffen A.L.[et al.] //J. ISME – 2012. – Vol.6.–P. 1176-1185.
274. Grimaudo, N.J. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species / Grimaudo N. J. [et al.] //Oral Microbiol Immunol. – 1997. – Vol. 1, № 3. – P. 168-197.
275. Grimaudo, N.J. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species //Oral Microbiol Immunol. – 1996. – Vol. 1, № 1. – P. 59-61.
276. Guo, L. Nanoindentation study of interfaces between calcium phosphate and bone in an animal spinal fusion model /L. Guo [et al.] //J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – № 54(4). – P.554-559.
277. Haffajee, A.D. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesion. /Haffajee A.D., Teles R., Socransky S. //Oral Microbiol Immunol. – 2006. – № 21(5). – P.269-282.
278. Hajishengallis, G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis* / G.Hajishengallis //J Oral Biosci. – 2011. – Vol.53(3). – P.233-240.
279. Hall, M. W. Inter-personal diversity and temporal dynamics of dental, tongue, and salivary microbiota in the healthy oral cavity / Hall M. W. [et al.]. // NPJ Biofilms and Microbiomes. – 2017. – Vol. 3. – P.2.
280. Hamlet, S. Persistent colonisation with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents/ Hamlet S., Ellwood R., Cullinan M., Worthington H., Palmer J., Bird P., et al. // J Dent Res. – 2004. – Vol. 83. – P. 232–5.

281. Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms / Handelsman J. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2004. – Vol. 100, № 68. – P. 669–685.
282. Handelsman, Jo. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products / Jo Handelsman, Michelle R. Rondon, Sean F. Brady, Jon Clardy and Robert M. Goodman // *Chemistry & Biology.* – 1998. – Vol. 5 № 10. – P. 245–249.
283. Heikkinen, A.M. Cross-sectional analysis of risk factors for subclinical periodontitis; active matrix metalloproteinase-8 as a potential indicator in initial periodontitis in adolescents / Heikkinen A.M., Räisänen I.T., Tervahartiala T., Sorsa T. // *J Periodontol.* – 2019. – Vol. 90. – P. 484–492. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0450>.
284. Hiranmayi, K.V. Pathogens in Periodontal Microbiology / Hiranmayi K.V. [et al.] // *J. Pharm Bioallied.* – 2017. – Vol. 9. – P. 155–163.
285. Hjelle, J.T. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease / Hjelle J.T. [et al.] // *Kidney Int.* – 2000. – Vol. 57. – P. 2360–2374.
286. Hofer, U. Microbiome: bacterial imbalance in Crohn's disease / Hofer U. // *Nat Rev Microbiol.* – 2014. – Vol. 12, № 5. – P. 312.
287. Holt, S.C. Factors in Virulence Expression and Their Role in Periodontal Disease Pathogenesis. / Holt, S. C., & Bramanti, T. E. // *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* / Vol. 2(2). – 1991. – P. 177–281.
288. <http://www.homd.org> .
289. Hudelist, G. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization / Hudelist G. [et al.] // *Histopathology.* – 2004. – V. 45. – P. 633–637.
290. Jelic, T.M. Nanobacteria-associated calcific aortic valve stenosis / Jelic T.M. [et al.] // *J. Heart Valve Dis.* – 2007. – № 1 (16). – P. 101–105.
291. Jenkinson, H.F. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans* / Jenkinson H. F. [et al.] // *Infect Immun.* – 1990. – Vol. 58, № 5. – P. 1429–1461.

292. Ji, S. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? / S.Ji [et al.] // *J. Periodontal Res.* – 2015. – Vol.50(5). – P. 570-585.
293. Jing, J. Nanobacteria's potential involvement in enamel repair in caries /J. Jing [et al.] // *Medical Hypotheses.* – 2009 – Vol. 73, № 3. – P. 359–360.
294. Jünemann, S. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing / S. Jünemann, K. Prior, R. Szczepanowski, I. Harks, B. Ehmke, A. Goesmann, J. Stoye, D. Harmsen // *PloS one.* – 2012. – Vol. 7, №8. – Article ID e41606.
295. Kajander, D.A. Virus and virus-like agents in diseases /Kajander D.A., Liesi P., Ciftcioglu N. // *Second Karger Symposium.* – Basel. – 1993.– P.41-45.
296. Kajander, E.O. Nanobacteria – propagating calcifying nanoparticles /Kajander E.O. // *Lett Appl. Microbiol.* – 2006. – Vol. 42. – P. 549-552.
297. Kajander, E.O. Nanobacteria from blood, the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth /E.O. Kajander [et al.] // *Instruments, Methods and Missions for the Investigation of Extraterrestrial Microorganisms; San Diego, CA; United States.* – 1997. – Vol. 3111. – P. 420-428.
298. Kajander, O. Bovine serum: discovery of nanobacteria / O. Kajander [et al.] // *Molecular Biology of cell, Suppl.* – 1996. – Vol.7. – P. 517.
299. Karlsson, F.H. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome / Karlsson F.H. [et al.] // *Nat. comm.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1245.
300. Kawada, M. Prevalence of Porphyromonas gingivalis in relation to periodontal status assessed by real-time PCR / M. Kawada [et al.] // *Oral Microbiol. Immunol.* – 2004. – Vol. 19, № 5. – P. 289-292.
301. Kim, Y.C. Presence of Porphyromonas gingivalis and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis / Kim Y.C.[et al.] // *Oral Dis.* – 2010. – Vol.16(4). – P. 375-381.
302. Kirakodu, S.S. Optimizing qPCR for the quantification of periodontal pathogens in a complex plaque biofilm / Kirakodu S.S., Govindaswami M., Novak M.J., Ebersole J.L., Novak K.F. // *The Open Dentistry Journal.* – 2008. – №2. – P. 49-55.

303. Kolahi, J. Anti-Nanobacterial Therapy for Prevention and Control of Periodontal Diseases. / Dental Hypotheses. – 2010. – № 1. – P. 4-8.
304. Kreth, J. Bacterial and host interactions of oral streptococci / J. Kreth, J. Merritt, F. Qi // DNA and Cell Biology. – 2009. – Vol. 28, № 8. – P. 397–403.
305. Krishnan, K. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease / K.Krishnan, T. Chen, B.J. Paster // Oral Dis. – 2017. – Vol. 23, № 3. – P. 276–286; doi:10.1111/odi.12509.
306. Kukletova, M. Relationship between gingivitis severity, caries experience and orthodontic anomalies in 13–15 year-old adolescents in Brno, Czech Republic / M. Kukletova, H.L. Izakovicova, K. Musilova [et al.] // Community Dent. Health. — 2012.—Vol. 29, № 2.—P.179—183.
307. Kumar, P.S. Identification of Candidate Periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16s clonal analysis /Kumar P.S. [et al.] // J. Clin Microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 8. – P. 3944–3955.
308. Kurokawa, K. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes /Kurokawa K. [et al.]//DNA res. – 2007. – Vol. 14. – P. 169-181.
309. Kutikhin, A.G. The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine /Kutikhin A.G. [et al.] // Department of Epidemiology, Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian. Federation. – International Journal of Nanomedicine. – 2012. – Vol. 7. – P. 339-350.
310. Kutsyk, R. V. Investigation of quantitative and species composition and antifungal drug susceptibility of yeasts isolated from patients with generalized periodontitis complicated by candidosis / R.V. Kutsyk, T.D. Pavliuk //Microbiol. Z. – 2003. –Vol. 65. №5. – P. 26-29.
311. Lafaurie, G.I. Demographic clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study /G.I. Lafaurie [et al.] //J. Periodontol. – 2007. – Vol. 78, № 4. – P.629—739.
312. Lazarevica, V. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina highthroughput sequencing/ Lazarevica V., Whitesona K., Huseb S., Hernandez D.,

- Farinell L., Østeråsc M., Schrenzela J., François P. // *J Microbiol Methods*. — 2009 — Vol. 79(3). — P. 266–271; doi:10.1016/j.mimet.2009.09.012.
313. Ley, R.E. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine /Ley R.E, Peterson D.A., Gordon J.I. // *Cell*. – 2006. – Vol. 124. – P. 837–848.
314. Liljenberg, B. Juvenile periodontitis, some microbiological, histopathological and clinical characteristics /Liljenberg B., Lindhe J. // *J. Clin. Periodontol.* – 1980. – № 7. – P. 48.
315. Liu, B. MetaPath: Identifying Differentially Abundant Metabolic Pathways in Metagenomic Datasets / Liu B., Pop M. // *BMC Proc.* – 2011. – Vol. 5, Suppl 2. – P. 9.
316. Lozupone, C. UniFrac - An Online Tool for Comparing Microbial Community Diversity in a Phylogenetic Context /Lozupone C., Hamady M., Knight R. // *BMC Bioinformatics*. – 2006. – Vol. 7. – P. 371.
317. Maiden, M.F. Proposal to conserve the adjectival form of the specific epithet in the reclassification of *Bacteroides forsythus* /Maiden M.F., Cohee P., Tanner A.C. // *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – № 53. – P. 2111-2112.
318. Maniscalco, B.S. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline longterm chemotherapy / Maniscalco B.S., Taylor K.A. // *Pathophysiol.* – 2004. – Vol. 11, № 2. – P. 95-101.
319. Marchant, S. The predominant microflora of nursing caries Lesions/ Marchant S., Brailsford S.R., Twomey A.C. Roberts G.J.// *Caries Res.* – 2001. – V. 35 (6). – P. 397-406.
320. Marsh, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. / P.D. Marsh // *Adv Dent Res.* – 1994. – Vol. 8(2). – P. 263-271.
321. Martel, J. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles /Martel J., Young J.D. // *PNAS*. – 2008. – Vol. 105, № 14. – P. 5549-5554.

322. Masamatti, S.S. Periodontal diseases in children and adolescents: a clinician's perspective part / S.S. Masamatti, A. Kumar, M.S. Viridi // Dent Update.—2012.— Vol. 39 (8).—P.541—544, 547—548, 551—552.
323. Matsson, L. Gingival inflammatory reaction in children at different ages / L. Matsson, P. Goldberg // J Clin Periodontol. — 1985. — Vol. 12, № 2. — P. 98-103.
324. McKay, D.S. Search for past life on Mars: possible relie biogenic activity in Martian meteorite ALH84001 /McKay D.S. [et al.] //Science. — 1996. — Vol. 273. — P. 924-930.
325. Metzger, Z. Synergistic pathogenicity of Porphyromonas gingivalis and Fusobacteriumnucleatum in the mouse subcutaneous chamber model / Metzger Z.[et al.] // J. Endod. — 2009. — Vol. 35 (1). — P. 86-94.
326. Miller, P.D. A classification of marginal tissue recession / Miller P.D. // Int. J. Periodontics Restorative Dent. — 1985. — Vol. 5.(2). — P. 8-13.
327. Miller, V.M. Evidence of nanobacterial-like structures in calci-fied human arteries and cardiac valves /Miller V.M. [et al.] //Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2004. — V.287, № 3. — P. 1115-1124.
328. Miller-Hjelle, M.A. Inhibition of nanobacteria by antimicrobial drugs as measuredby a modified microdilution method / M.A.Miller-Hjelle [et al.]//Antimicrob. AgentsChemother. — 2002. —Vol. 46, № 7. — P. 2077-2086.
329. Miyoshi, T. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters /Miyoshi T., Iwatsuki T., Naganuma T. //Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — V. 71. — P. 1084-1088.
330. Moore, W.E. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans/ Moore W.E., Holdeman L.V., Smibert R.M., Hash D.E., Burmeister J.A., and. Ranney R.R.// Infect Immun. — 1982. — Vol. 38(3). —P. 1137—1148.
331. Mori, Y. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis / Mori Y. [et al.] // Oral Microbiol. Immunol. — 2003. — Vol. 18, № 1. — P. 54-58.

332. Morita, R.Y. Bioavailability of energy and starvation survival in nature // *Can. J. Microbiol.* – 1988. – V. 34. – P. 436-441.
333. Nakamura, S. Metagenomic diagnosis of bacterial infections / S. Nakamura, N. Maeda, I.M. Miron, M. Yoh, K. Izutsu, C. Kataoka, T. Honda, T. Yasunaga, T. Nakaya, J. Kawai, Y. Hayashizaki, T. Horii, T. Iida // *Emerg Infect Dis.* — 2008. — Vol. 14. — P.1784–1786.
334. Nelson, K.E. A catalog of reference genomes from the human microbiome /K.E. Nelson [et al.] // *Science.* – 2010. – Vol. 328, № 5981. – P. 994-999.
335. Newman, M. Genetic, environmental, and behavioral influences on periodontal infection. Special Issue Compedium / Newman M. //Periodontal aspects of system health. – 2000. – Vol. 13. – P. 25-31.
336. Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. / *Ann Periodontol.* –1996. – V. 1. – P. 821—878.
337. Ojima, M. Survival analysis for degree of compliance with supportive periodontal therapy /M. Ojima, T. Hanioka, S. Shizukuishi // *J. Clin. Periodontol.* – 2001. – № 28. – P.1091-1095.
338. Ôsterreicher, F. A new class of metric divergences on probability spaces and its statistical applications /Ôsterreicher F., Vajda I. // *Ann. Inst. Statist. Math.* – 2003. – Vol. 55. – № 3. – P. 639-653.
339. Panikov, N.S. Contribution of nanosized bacteria to the total biomass and activity of a soil microbial community /Panikov N.S. // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol.57. – P. 243-296.
340. Papaioannou, W. The microbiota on different oral surfaces in healthy children / W. Papaioannou, S. Gizani, A.D. Haffajee, M. Quirynen, E. Mamai-Homata, L. Papagiannoulis // *Oral Microbiol. Immunol.* – 2009. – № 24. – P. 183–189.
341. Parma, C. Parodontopathien / Parma C. – Leipzig, 1960.
342. Paster, B.J. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites / B.J. Paster, I. Olsen, J.A. Aas, F.E. Dewhirst // *Periodontoljgy2000.* – 2006. – Vol. 42. – P. 80 - 87.

343. Paster, B.J. Bacterial diversity in human subgingival plaque /B.J.Paster [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – №183. – P. 3770-3783.
344. Paulson, J.N. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys /Paulson J.N. [et al.]// Nature Methods. – 2013. – Vol. 10. – P. 1200–1202.
345. Pekovic, D.D. Identification of bacteria in immunopathological mechanisms of human periodontal diseases / Pekovic D. D., Fillery E. D. //J. Periodontal Res. – 1984. – Vol. 19(4). – P. 329-351.
346. Petersilka, G. Effect of glycine powder air polishing on the gingiva/ Petersilka G., Faggion Jr.C.M., Stratmann U., Gerss J., Ehmke B., Haeberlein I., Flemmig T.F. // J Clin Periodontol. — 2008. — Vol.35 (4). — P. 324-32.
347. Poinar, H.N. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. (АНГЛ.)/ Poinar H. N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., Macphée R. D., Buigues B., Tikhonov A., Huson D. H., Tomsho L. P., Auch A., Rampp M., Miller W., Schuster S. C. // Science (New York, N.Y.). — 2006. — Vol. 311, № 5759. — P. 392—394.
348. Polak, D. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. /Polak D.[et al.] //J. Clin. Periodontol. – 2009. – Vol.36(5). – P. 406-410.
349. Pride, D.T. Genome signature analysis of thermal virus metagenomes reveals Archaea and thermophilic signatures / Pride D.T., Schoenfeld T. //BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – P. 420.
350. Puskas, L.G. Detection of nanobacteria-like particle in human arterosclerotic plaques / Puskas L.G. [et al.] //ACTA BIOL HUNG.–2005. – V.56, № 3-4. – P.233-245.
351. Qin, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin [et al.] //Nature. – 2010. – Vol. 464. – № 7285. – P. 59-65.
352. Qin, J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin [et al.] //Nature. – 2012. – Vol. 490. – P. 55-60.
353. Raes, J. Prediction of EffectiveGenome Size in Metagenomic Samples /Raes J.[et al.]//Genome Biology. – 2007. – Vol. 8, № 1. – P. 10.

354. Rajendhran, J. Microbial Phylogeny and Diversity: Small Subunit Ribosomal RNA Sequence Analysis and Beyond /Rajendhran J., Gunasekaran P. // Microbiol. Res. – 2011. – Vol. 166, № 2. – P. 99-110.
355. Ramos, U.D. Antimicrobial photodynamic therapy as an alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled, clinical study on type 2 diabetics / Ramos U.D., Ayub L.G., Reino D.M. et al.// Journal of Clinical Periodontology. – 2016. – Vol. 43, №2. – P. 147–155.
356. Raoult, D. Nanobacteria Are Mineralo Fetuin Complexes / D. Raoult [et al.] // PLoS Pathog. – 2008. – Vol. 4 (2). – P.41.
357. Redanz, S. A Five-Species Transcriptome Array for Oral Mixed-Biofilm Studies / S. Redanz., K. Standar., A. Podbielski, B. Kreikemeyer // PLoSONE. – 2011. – Vol. 6, № 12. –P. 27-28.
358. Renvert, S. Effect of root debridgement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets / S. Renvert [et al.] // J. Clin. Periodontol. – 1990. – Vol. 17, № 3. – P. 345-350.
359. Robert, J.C. Bacterial periodontal plaque in childhood/ Robert, J.C., Gagnot G., Mouton C. // Literature review. J Parodontol. –1991. – Vol.10(1) –P.77-91.
360. Saglie, R. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans /R.Saglie [et al.] // J. Periodontol. – 1982. –Vol.53(4). – P. 217-222.
361. Saito, Y. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* / Saito Y.[et al.] // Oral Microbiol Immunol. – 2008. – Vol. 23(1). – P. 1-6.
362. Savitt, E.D. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples /Savitt E. D. [et al.] //J. Periodontol. – 1988. – № 59. – P. 431-438.
363. Savitt, E.D. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms /Savitt E.D., Keville M.W, Peros W.J. //Arch. Oral Biol. – 1990. – № 35. – P. 153-159.
364. Saxén, L. Heredity of juvenile periodontitis /Saxén L. //J. Clin Periodontol. – 1980. – Vol.7(4). –P. 276-288.

365. Schaumann, S. Pyrosequencing of supra- and subgingival biofilms from inflamed peri-implant and periodontal sites / Schaumann S. [et al.] // BMC Oral Health. – 2014. – Vol. 14. – P. 157.
366. Shishniashvili, T.E. Periodontal tissue pathology in pubertal children (pupils) / Shishniashvili T.E.[et al.] // Georgian Med. News. –2012. – Vol. 204. – P. 22-26
367. Shoskers, D.A. Anti-nanobacterial therapy in men with chronic prostatitis, chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience / Shoskers D.A., Thomas K.D., Gomez E. // J. Urol. – 2005. –V.172. – P.474-477.
368. Siddharth, M. Periodontal diseases in children and adolescents - a review/ Siddharth M, Singla A, Kaur S. // JOHR. – 2013 – Vol. 4(1). – P. 18-23.
369. Simon, C. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends / Simon C., Daniel R. // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77, № 4. – P. 1153-1161.
370. Simonson, L.G. Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis as prognostic markers following periodontal treatment / L.G. Simonson [et al.] // J. Periodontol. – 1992. – Vol. 63, № 4. – P. 270-273.
371. Simón-Soro, Á. Microbial geography of the oral cavity / Simón-Soro Á., Tomás I., Cabrera-Rubi R. et al. // Journal of Dental Research. –2013. –Vol. 92. №7. –P. 616–621.
372. Siraj, Y. Dysbiosis of Cultivable Aerobic Microbiota Tightly Associated with Colon Cancer Epithelial Cells / Siraj Y.[et al.] // RJPBCS. – 2015. – № 6 (5) – P. 1658-1663.
373. Slots, J. Actinobacillus actinomyces-temcomitans in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation / Slots J., Reynolds H.S., Genco R.J. // Infect. Immun. – 1980. – № 29. – P. 1013-1020.
374. Socransky, S.S. Associations between microbial species in subgingival plaque samples / Socransky S. S. [et al.] // Oral Microbiol Immunol. –1988. – № 3. –P. 1-7.
375. Socransky, S.S. Periodontal microbial ecology / Socransky S.S., Haffajee A.D. // Periodontol 2000. – 2005.–Vol. 38. – P. 135-187.

376. Sommer, A.P. Nanobacteria, HIV and magic bullets: update of perspectives /Sommer A.P., Milankovits M., Mester A.R. //Chemotherapy. –2006. – V.52 – P.95-97.
377. Soory, M. Hormonal factors in periodontal disease / Soory M. // Dent Update. – 2000. – V. 27. P. 380—383.
378. Soory, M. Inflammatory mechanisms and redox status in periodontal and cardiometabolic diseases: effects of adjunctive nutritional antioxidants and statins / Soory M. // Infect. Disord Drug Targets. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P.301-315.
379. Soory, M. The influence of prostaglandins on steroid conversions by human gingival fibroblasts /Soory M., Gower D.B. // J. Periodontal Res. – 1998. – Vol. 33, № 8. – P. 439-447.
380. Storrer, C.M. Periodontal disease induced by Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum in Wistar rats. / Storrer C. M. [et al.] //Arq Odontol. – 2010. – Vol. 46. – P. 185-189.
381. Szymn'ska, J. Dental bioaerosol as an occupational hazard in a dentist's workplace // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2007. – Vol. 14. №2. – P. 203–207.
382. Tanner, A.C. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis /Tanner A.C.R. [et al.] // J. Dent. Res. – 2006. – Vol. 85, № 4. – P. 318-323.
383. Tanner, A.C. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients /A.C. Tanner[et al.] //J. Dent Res – 2012. – Vol. 91, № 9. – P.853-858.
384. Tap, J. Towards the Human Intestinal Microbiota Phylogenetic Core /Tap J. [et al.] //Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 11. – P. 2574-2584.
385. Tsagareli, Z.G. The level of matrix metalloproteinases and type IV collagen in the gingival mucosa under different clinical forms of periodontitis in pre-and pubertal periods and their prognostic value / Z.G. Tsagareli [et al.] //Georgian Med News.– 2012.–Vol. 206. – P. 25-29.
386. Tsurumotot, T. Nanobacteria like particles in human arthritic synovial fluids /Tsurumotot T. [et al.] //J. Proteome. Res. – 2006. – V.5. – P.1276-1278.

387. Turnbaugh, P.J. Organismal, Genetic and Transcriptional Variation in the Deeply Sequenced Gut Microbiomes of Identical Twins /Turnbaugh P.J. [et al.]//Proc.Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107. – P. 7503-7508.
388. Tyakht, A. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia /Tyakht A. [et al.] //Nat. Commun. – 2013. – Vol. 4. – P. 2469.
389. Uronis, J.M. Modulation of the Intestinal Microbiota Alters Colitis-Associated Colorectal Cancer Susceptibility / Uronis J.M., Muhlbauer M., Herfarth H.H. et al. // PLoS ONE. –2009. –Vol. 4. Article ID: e6026.
390. Uwins, P.J.R. Novel nanoorganisms from Australian sanstones /Uwins P.J.R., Webb R. I., Taylor A.P. // Am. Mineral. – 1999. – Vol. 83. – P. 1541- 1550.
391. Vankov, P.Y. Comparative analysis of bacterial communities associated with healthy and inflamed peri-implant tissues / Vankov P.Y. [et al.] //BioNanoScience. – 2016. – Vol. 6. – P. 490-495.
392. Vartoukian, S.R. In vitro cultivation of “unculturable” oral bacteria, facilitated by community culture and media supplementation with siderophores / Vartoukian S.R.[et al.] //PLoS One. – 2016. – Vol. 11 (1). – P.0146926.
393. Venter, J.C. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea /Venter J.C. [et al.]//Science. – 2004. – Vol. 304. – № 5667. – P. 66-74.
394. Vescovi, P. Pathogenesis of cyclosporine induced gingival overgrowth / Vescovi P.[et al.] //Minerva Stomatol. – 2003. – Vol. 52, № 5. –P.219-229.
395. Vianna, M.E. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease /Vianna M.E.[et al.] // J. Bacteriology. – 2008. – Vol. 190, № 10. – P. 3779-3785.
396. Vipperla, K. The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk / Vipperla K., O'Keefe S.J. // NCP. – 2012. – Vol. 27. – P. 624-635.
397. Wang, L. An animal model of black pigment gallstones caused by nanobacteria / Wang L. [et al.] //Dig. Dis. So. – 2006. – V.51. – P.1126-1132.

398. Wang, M. Fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis* mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages / Wang M.[et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179(4). – P. 2349-2358.
399. Wang, P.L. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts / Wang P. L., Azuma Y., Shinohara M., Ohura K. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2000. – Vol. 273. №3. – P. 1161–1167.
400. Wang, Y. Influence of size, shape, and flexibility on Bacterial passage through micropore membrane filters /Wang Y.[et al.]// *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol.42. – P. 6749-6754.
401. Wang, Y. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria /Wang Y.[et al.] // *The ISME J.* – 2009. – Vol.3. – P. 889-902.
402. Wen, Y. Detection of nanobacteria in serum, bile and gallbladder mucosa of patients with cholecystolithiasis / Wen Y. [et al.] // *Chin. Med. J.* – 2005.– V.118, №5.–P.421-424.
403. Whittaker, R.H. Evolution and measurement of species diversity /Whittaker R.H. // *Taxon.* – 1972. – Vol. 2. – P. 213-251.
404. Whittaker, R.H. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome / Langmead B. [et al.] // *Genome Biology.* – 2009. – Vol. 10. – P. 25.
405. Wood, H.M. The role of nanobacteria in urologic disease /Wood H.M., Shoskes D.A. // *World J. Urol.* – 2006. – V.24, № 1. – P.51-54.
406. Wooley, J.C. A Primer on Metagenomics /Wooley J.C., Godzik A., Friedberg I. // *PLoS Computational Biology.* – 2010. – Vol. 6, N 2. – P.1000667.
407. World Health Organization. Application of the international classification of disease to dentistry and stomatology / Geneva, 1973.
408. World Health Organization. Global Oral Health Data Bank. Geneva: World Health Organization, 2002.
409. World Health Organization. The World Oral Health Report. Geneva. 2003. 46 p.

410. Wu, S. A Human Colonic Commensal Promotes Colon Tumorigenesis via Activation of T-helper Type 17 T-cell Responses/ Wu S., Rhee K.J., Albesiano E., Rabizadeh S., Wu X., Yen H.R., Huso D.L., Brancati F.L., Wick E., McAllister F., Housseau F., Pardoll D.M., Sears C.L. // *Nat. Med.* – 2009. – Vol. 15 – P. 1016–1022.
411. Wu, X. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes / Wu X. [et al.] // *Current microbiology.* – 2010. – Vol. 61. – P. 69–78.
412. Ximenez-Fyvie, L.A. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis / L.A. Ximenez-Fyvie, A.D. Haffajee, S.S. Socransky // *J. Clin. Periodontol.* – 2000. – Vol. 27, № 9. – P. 648–657.
413. Xu, P. Application of metagenomics in understanding oral health and disease / Xu P., Gunsolley J. // *Virulence.* – 2014. – Vol. 5(3). P. 424–432.
414. Yang, F. Evaluation of the interaction between calcifying nanoparticles and human dental pulp cell: a preliminary investigation / Yang F. [et al.] // *Int J. Nanomedicine.* – 2011. – Vol. 6. – P. 13-18.
415. Yang, H. W. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects / H. W. Yang, Y. F. Huang, M. Y. Chou // *J. Periodontol.* – 2004. – Vol. 75, № 8. – P. 1077-1083.
416. Yatsunenکو, T. Human gut microbiome viewed across age and geography / Yatsunenکو T. [et al.] // *Nature.* – 2012. – Vol. 486. – P. 222-227.
417. Yihui, Y. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy / Yihui Yuan, Meiying Gao // *Nature Scientific Reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 10259.
418. Zambon, J.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease / J.J. Zambon, J. Slots, R.J. Genco // *Infect. Immun.* – 1983. – Vol. 41, № 1. – P. 19-27.
419. Zhang, S.M. Evidence for calcifying nanoparticles in gingival crevicular fluid and dental calculus in periodontitis / Zhang S.M. [et al.] // *J. Periodontol.* – 2009 – Vol. 80, № 9. – P. 1462-1470.

420. Zhanga, Y. Human oral microbiota and its modulation for oral health / Zhanga Y., Wanga X., Houxuan L., Can N. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. –2018. –Vol. 99. – Pp. 883-893.
421. Zhou, H.D. Intracellular colocalization of Spelunky protein with nanobacteria in nasopharyngeal carcinoma epithelia HNEI cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain / Zhou H.D. [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2006. – Vol. 43. – P. 1864-1871.
422. Ziganshina, E.E. Bacterial communities inhabiting toxic industrial wastewater generated during nitrocellulose production / E.E.Ziganshina [et al.] // *Biologia (Poland)*. – 2016. – Vol.71. – P.70-78.

Приложение 1

Градации оценкикритериевообъективногообследования

№	Критерии	
1	Возраст (19, 20)	
2	Пол (м., ж.)	
3	Национальность	
4	группа здоровья (1, 2, 3)	
5	группа крови(1, 2, 3, 4)	
6	резус фактор (+, -)	
7	какой ребенок в семье	
8	тип вскармливания – 1-грудное, 2-смешанное, 3-искусственное	
9	занятия в спортивных секциях (1-да, 2-нет)	
10	наличие соматической патологии (1-да, 2-нет)	
11	частые ОРВИ (1-да, 2-нет)	
12	наличие стрессорных воздействий (1-да, 2-нет)	
13	наличие оперативных вмешательств (1-да, 2-нет)	
14	аллергия (1-да, 2-нет)	
15	вредные привычки (1-да, 2-нет)	
16	социальные условия (1-хорошие, 2-плохие)	
17	успеваемость (1-хорошая, 2-плохая)	
Анамнез стоматологического заболевания		
18	лечился ли ранее по поводу заболевания пародонта (1-да, 2-нет)	
19	было ли улучшение (1-да продолжительное, 2-непродолжительное, 3-не было)	
Объективное исследование		
20	состояние жевательных мышц (1-норма, 2-тонус повышен, 3-спазм, 4-бруксизм)	
21	уздечки - верхней и нижней губы, языка (1-средние, 2-сильные, 3-слабые)	
22	глубина преддверия (1-мелкое, 2-среднее, 3-глубокое)	
23	тяги (1 – нет, 2 – да)	
24	PVI (I, II, III, IV)	
25	GI (0, I, II, III)	
26	PMA (%)	
27	ОНИ – S (балл)	
28	SPITN (балл)	
29	степень кровоточивости (0,1,2,3)	
30	окклюзия (1 – ортогнатический прикус, 2 – дистальная окклюзия, 3 – мезиальная окклюзия, 4 – перекрёстная окклюзия, 5 – глубокая резцовая окклюзия, 6 – вертикальная резцовая дизокклюзия, 7 – тесное положение зубов, 8 – диастемы и тремы, 9 – аномалии положения отдельных зубов).	
31	съёмные ортодонтические аппараты (1 – нет, 2 – да)	
32	несъёмная ортодонтическая техника (1 – нет, 2 – да)	
33	хроническая механическая травма (1 – нет, 2 – да)	
34	зафиксированные неправильно протекающие функции (1 – нет, 2 – нарушение жевания, 3 – неправильное глотание и привычка давления языком на зубы, 4 – нарушение носового дыхания, 5 – неправильная речевая артикуляция)	
35	распространенность гингивита (1 –локализованный, 2 –генерализованный)	
36	степень тяжести гингивита (1 - легкая, 2 - средняя, 3 – тяжелая)	
37	течение гингивита (1 - острое, 2 - хроническое, 3 - обострившееся (абсцедирующее), 4 – ремиссия)	
38	распространенность пародонтита (1 –локализованный, 2 –генерализованный)	
39	степень тяжести пародонтита (1 - легкая, 2 - средняя, 3 – тяжелая)	
40	течение пародонтита (1 - острое, 2 - хроническое, 3 - обострившееся (абсцедирующее), 4 –	

	ремиссия)	
--	-----------	--

Информационный листок пациента

Название исследования: «Клинические особенности и структура микробиоты тканей пародонта у лиц молодого возраста»

Ответственный исполнитель исследования и контактная информация:

Абдрахманов Айрат Камилевич

Врач-стоматолог ООО «Камил-Дент», заочный аспирант кафедры стоматологии детского возраста ФГБОУ ВО КГМУ

моб. тел.: 8-9655844727; e-mail: abdurahman116@rambler.ru

Номер пациента _____ Инициалы пациента (ФИО) _____

Общая информация.

Пожалуйста, внимательно прочтите этот документ. Он содержит важную информацию о медицинском научном исследовании, в котором Вам предлагают принять участие. В этом документе рассказано о том, что Вас попросят сделать до, во время и по завершении исследования, а так же об исследуемом методе лечения. Вам следует принять решение о том, хотите ли Вы участвовать в этом исследовании, только после того, как Вы прочтете и поймете всю информацию, содержащуюся в этом документе. В описании исследования, возможно, Вам встретятся незнакомые слова или непонятные медицинские термины – в этом случае, пожалуйста, попросите лечащего врача или исследователя объяснить их Вам. Если Вы решите участвовать в этом исследовании, Вас попросят подписать этот документ. Экземпляр этого документа с Вашей подписью и подписью врача-исследователя будет выдан Вам на руки.

Цель исследования: Изучение микробиоценоза рта с выявлением маркеров микробного происхождения при развитии воспалительных заболеваний пародонта

Визиты и процедуры исследования.

Для участия в исследовании Вам будет необходимо:

1. Подписание данного информированного согласия на участие в исследовании.
2. Первичный прием врача-стоматолога, с заведением стандартной медицинской карты, или продолжение уже имеющейся мед.карты стоматологического больного, подразумевающий подробный опрос с детализацией истории и течения Вашего заболевания, Вашей жизни, склонностей, привычек с целью выявления индивидуальных особенностей Вашей личности, вся информация будет занесена во вкладыш к медицинской карте стоматологического больного. Длительность приема может составить от 15 минут до 30 минут.
3. В зависимости от наличия у Вас патологии пародонта или констатирования состояния полного здоровья, мы Вам предложим стать участником одной из групп (всего 90 человека): 1 группа контрольная - без патологии со стороны зубочелюстной системы; группа пациентов с воспалительными процессами пародонта (хронический генерализованный катаральный гингивит, хронический генерализованный пародонтит легкой и средней степени тяжести).

4. Далее Вам проведут несколько поэтапных обследований:

1. Осмотр рта
2. Проведение фотографирования.
3. Направление и сдача анализов, определение состояния микробиоценоза рта.

В ходе исследования от пациента не требуется никаких материальных затрат на обследование, только участие.

После проведения полного обследования пациентам будет предложено комплексное лечение в стенах ООО «Камил-Дент»(г.Казань), оставаться на дальнейшем наблюдении, в зависимости от выраженности патологии, согласно срокам диспансеризации.

Возможные нежелательные явления.

Нежелательных явлений в ходе осмотра, сбора анамнеза и обследования не обнаружено.

Возможная польза.

В ходе нашего обследования у Вас появляется возможность комплексного обследования пациента, с последующим лечением у врача-терапевта, врача-пародонтолога, врача-ортодонта и врача-хирурга. Очень важно, что часть пациентов, могли обнаружить ранние формы развития воспалительных заболеваний пародонта. То есть пользы от обследования несоизмеримо больше, чем потраченного времени, так как предотвратить всегда легче, чем лечить.

Участие в исследовании.

Вы должны будете на протяжении всего исследования регулярно (как Вам будет предписано) поддерживать связь с врачом-стоматологом, своевременно приходить на визиты текущего наблюдения и поэтапные итоговые визиты, следовать всем рекомендациям.

Вам необходимо будет своевременно сообщать врачу-исследователю обо всех изменениях, касающихся Вашего здоровья (острых заболеваниях, обострениях хронических заболеваний, травмах, и т.п.); согласовывать приём любых лекарственных препаратов и немедикаментозных методов лечения, не оговоренный заранее на первичном приеме.

На любом этапе исследования Ваше участие в нем может быть прекращено по медицинским показаниям, при несоблюдении рекомендаций врача и регламента исследования или по Вашему желанию.

Ваше участие в данном исследовании является добровольным.

Все данные, полученные о Вас исследователем, являются конфиденциальной информацией. Во всех отчетах и публикациях по результатам исследования инкогнито пациентов строго соблюдается. Первичная документация по исследованию, в том числе, идентификационные карты пациентов могут предоставляться для проверок только служащим государственных структур, имеющим соответствующие полномочия.

Затраты на участие в исследовании.

Консультации и лечение у врача-терапевта, врача-пародонтолога, врача-хирурга для пациента, участвующего в исследовании, являются бесплатными. Консультации врача-ортодонта также бесплатные. Проведение фотографирования и проведение анализов также не требуют затрат пациента.

Согласие на участие в исследовании.

Подписываясь ниже, Вы документально подтверждаете, что прочитали всю информацию, представленную в этом документе, поняли её и соглашаетесь принять участие в исследовании. Вы соглашаетесь следовать инструкциям, которые Вам будут давать в этом исследовании и взаимодействовать с врачом-исследователем. Вы подтверждаете, что у Вас было достаточно времени для того, чтобы задать вопросы по исследованию, и что Вы получили на них удовлетворившие Вас ответы. Вы понимаете, что это научное исследование, и что Ваше участие в нем добровольное.

Ф.И.О. пациента (печатными буквами)

подпись пациента

Дата _____

Подтверждающее заявление исследователя.

Я предоставил(а) участнику исследования информацию по исследованию, которая, по моему мнению, точна и достаточна для того, чтобы он мог понять суть, риски и возможную пользу от участия в исследовании и его/её права как участника исследования. Я был(а) свидетелем подписания данного документа участником исследования.

Ф.И.О. исследователя (печатными буквами)

подпись исследователя

Дата _____

ШИФР

--	--	--	--	--

Информированное согласие на исследование «Клинические особенности и структура микробиоты тканей пародонта у лиц молодого возраста»

Я, _____, согласен(а) принять участие в исследовании, проводимые

Мне была предоставлена информация о целях и методах исследования, о специалистах, проводящих исследование, о рисках и потенциальном дискомфорте. Я понимаю всю информацию, содержащуюся в данном документе, и подписываюсь под ней. Я имел возможность задать все интересующие меня вопросы и получил удовлетворившие меня ответы. У меня было достаточно времени для принятия решения.

Подписывая данный документ, я соглашаюсь:

- достоверно отвечать на заданные мне вопросы;
- пройти необходимые диагностические процедуры;
- предоставить материал для выделения маркеров микробного обсеменения;

Я понимаю и принимаю следующие положения:

- из предоставленного мной материала будет выделены маркеры микробного обсеменения;
- мои маркеры микробного обсеменения будут подвергнуты всестороннему изучению;
- полученная информация в анонимной форме может быть использована для научных исследований;
- результаты исследований могут быть опубликованы (с соблюдением личной анонимности).

Испытуемый

Фамилия Имя Отчество

Дата _____

Подпись

Свидетель

Фамилия Имя Отчество

Дата _____

Подпись

