Санкт-Петербургский государственный университет

**ТИХОНОВА Ольга Александровна**

**Выпускная квалификационная работа**

**«ОЦЕНКА МИКРОБИОЦЕНОЗА ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ КАРДИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ»**

Уровень образования:

Направление 31.05.03 «Стоматология»

Основная образовательная программа СМ.5059.2015 «Стоматология»

**Научный руководитель:**

к.м.н., доцент Туманова Светлана Адольфовна

**Внешний рецензент:**

к.м.н., доцент, главный врач

главный врач ООО «Парадная парадонтология»

Леонова Елена Васильевна

Санкт-Петербург

2020

Оглавление

[Введение 4](#_Toc40031545)

[Актуальность 4](#_Toc40031546)

[Цель 6](#_Toc40031547)

[Задачи исследования 6](#_Toc40031548)

[Научная новизна 7](#_Toc40031549)

[Практическая значимость работы 7](#_Toc40031550)

[Глава 1. Обзор литературы 8](#_Toc40031551)

[1.1 Заболевания полости рта как фактор риска развития системных патологий 8](#_Toc40031552)

[1.2 Влияние микроорганизмов полости рта на развитие атеросклероза 16](#_Toc40031553)

[1.3 Атеросклероз как системное воспалительное заболевание 21](#_Toc40031554)

[1.4 Микробный состав атеросклеротических бляшек 26](#_Toc40031555)

[1.5 Методы идентификации бактерий в биологическом материале 30](#_Toc40031556)

[Глава 2. Материалы и методы 34](#_Toc40031557)

[2.1 Клиническая характеристика пациентов 34](#_Toc40031558)

[2.2 Оценка стоматологического статуса 35](#_Toc40031559)

[2.3 Забор микробиологического материала 35](#_Toc40031560)

[2.4 Полимеразная цепная реакция 36](#_Toc40031561)

[2.4.1 Выделение ДНК из биологического материала 36](#_Toc40031562)

[2.4.2 Праймеры и зонды 37](#_Toc40031563)

[2.4.3 Параметры ПЦР-реакции 37](#_Toc40031564)

[2.3 Статистическая обработка данных 38](#_Toc40031565)

[Глава 3. Результаты исследований 40](#_Toc40031566)

[3.1 Результаты клинических исследований 40](#_Toc40031567)

[3.2 Результаты стоматологического обследования 42](#_Toc40031568)

[3.3 Результаты ПЦР-диагностики 43](#_Toc40031569)

[3.4 Данные корреляционного анализа 47](#_Toc40031570)

[Глава 4. Заключение и выводы 48](#_Toc40031571)

[4.1 Заключение 48](#_Toc40031572)

[4.2 Выводы 50](#_Toc40031573)

[4.3 Значимость исследования и практические рекомендации 51](#_Toc40031574)

[Список использованной литературы 53](#_Toc40031575)

**Перечень используемых символов**

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИЛ – интерлейкин

ЛПНП – липопротеин низкой плотности

ЛПС – липополисахарид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

## Введение

### Актуальность

Идея возможного взаимного влияния заболеваний полости рта и общего здоровья человека не нова. Еще в литературе древних времен можно встретить упоминание о зубах, являвшихся причиной общих нарушений. Так в папирусах Древнего Египта сообщается об улучшении общего состояния здоровья человека после удаления пораженного зуба. Однако вплоть до начала XIX века это направление не изучалось активно. Во многом, потому что человечество сталкивалось с необходимостью бороться с высококонтагиозными заболеваниями, уносившими жизни большого числа людей и требовавшими скорейшего решения вопроса. Во многом и потому, что в эпоху Средневековья вся наука, в том числе и медицина, находилась в упадке[1].

На сегодняшний день наука и технологии шагнули далеко вперед, поэтому перед исследователями открываются широкие возможности развития узкоспециализированных областей и детального познания окружающего мира в целом и человеческого организма в частности.

Множество исследований убедительно доказывают тот факт, что заболевания полости рта не являются изолированными, а неизбежно оказывают влияние на общее здоровье человека. Связь эта двусторонняя, так как общесоматическая патология, в свою очередь, может проявляться в ротовой полости, а также определять характер местных заболеваний полости рта [2–4].

Целый ряд исследований посвящен проблеме возможного прямого и опосредованного влияния микроорганизмов полости рта, главным образом штаммов, вызывающих пародонтит, на развитие и течение сердечно-сосудистых заболеваний, в частности атеросклероза [5–7], заболеваний легочной системы [8], сахарного диабета [9]. Эти исследования подчеркивают важность профилактики, ранней диагностики и своевременного лечения болезней полости рта, в особенности пародонтита, в рамках предупреждения возникновения и прогрессирования системных заболеваний.

Стоит отметить, что сама современная стоматология неуклонно шагает вперед: активно совершенствуются методы лечения, появляются новые средства и предметы гигиены полости рта, усиливается санитарно-просветительная деятельность. Однако, несмотря на прогресс профилактической стоматологии и в целом доступность медицинской помощи, на сегодняшний день вопрос распространенности заболеваний тканей зуба и пародонта все еще стоит достаточно остро. Более того, за период с 1990 по 2015 год распространенность болезней полости рта снизить не удалось [10]. Статистические данные говорят о том, что около половины населения земного шара (3,56 миллиарда человек на 2017 год) страдают от заболеваний полости рта, в частности кариеса, а заболевания пародонта по распространенности занимают 11 место среди всех патологий в мире (750 миллионов человек) [11].

Современная концепция лечения многих заболеваний, в том числе и лечение стоматологических патологий, предусматривает комплексный подход. Его эффективность и обоснованность во многом обуславливается именно изучением взаимосвязи общего здоровья и здоровья полости рта. Так как состояние ротовой полости во многом определяется динамическим балансом микроорганизмов, то, прежде всего, стоит обратить внимание на биоценоз.

На настоящее время большая часть исследований фокусируется на проблеме влияния микроорганизмов, вызывающих пародонтит, на возникновение и прогрессирование атеросклероза, и лишь немного исследований посвящено проблеме изменения микробного состава полости рта при системных заболеваниях. Указывается возможное увеличение числа стафилококков и стрептококков у пациентов с гипертонической болезнью и носящих полные съемные протезы [12]; увеличение количества Грамотрицательных бактерий с преобладанием палочковидных форм у пациентов с ишемической болезнью сердца [13]. Такие данные свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований в этой области.

### Цель

 Определить различия титров представителей кардиоспецифических микроорганизмов полости рта у пациентов с диагнозом «атеросклероз коронарных артерий» и клинически значимым стенозом брахиоцефальных артерий и пациентов с диагнозом «атеросклероз коронарных артерий» без стеноза брахиоцефальных сосудов.

### Задачи исследования

 В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. По данным литературы изучить связь заболеваний полости рта с патологией сердечно-сосудистой системы, а именно атеросклерозом.
2. Изучить методы качественного и количественного определения микроорганизмов в биологическом материале.
3. Провести осмотр полости рта у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и микробиологическое исследование материала – мазка с поверхности слизистой оболочки полости рта по методике RT-ПЦР с определением количественных показателей трех кардиоспецифических пародонтопатогенов.
4. Выявить возможную корреляцию между клинически значимым стенозом брахиоцефальных артерий и титрами микроорганизмов полости рта.

### Научная новизна

Проведена оценка титров кардиоспецифических микроорганизмов полости рта у пациентов без клинических признаков пародонтита с установленным диагнозом «атеросклероз» без клинически значимого стеноза брахиоцефальных артерий и пациентов с установленным диагнозом «атеросклероз» и стенозом брахиоцефальных артерий. Проведена ПЦР диагностика в режиме реального времени с целью определения титров *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus.*

### Практическая значимость работы

 В настоящее время точно известно о способности пародонтопатогенов влиять на развитие и прогрессирование атеросклероза, поэтому на сегодняшний день существуют попытки разработать подходы комплексного лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, включающие в себя пародонтологическое лечение в том числе.

 К указанной проблеме существует и другой подход, направленный на изучение микробного состава полости рта, оценку титров антител против основных пародонтопатогенов при атеросклеротических поражениях сосудов с целью прогнозирования течения и оценки рисков развития осложнений [14]. В настоящее время также есть данные, что присутствие бактерий *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella nigrescens* в полости рта имеет сильно выраженную взаимосвязь с атеросклеротическими изменениями сонных артерий [15]. Однако это направление требует дальнейшего изучения.

 В данной работе рассматривалась возможная взаимосвязь между титрами ряда микроорганизмов полости рта и атеросклерозом брахиоцефальных артерий у лиц без клинических признаков пародонтита. Установление такой связи может лечь в основу прогнозирования и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Заболевания полости рта как фактор риска развития системных патологий

Влияние микроорганизмов полости рта на развитие общесоматической патологии изучается сейчас достаточно активно. Такой интерес обусловлен в том числе и значительным распространением среди населения всего мира стоматологических заболеваний: как уже отмечалось выше, около 3,5 миллиардов жителей земного шара страдают от болезней полости рта. Наиболее распространёнными стоматологическими диагнозами являются кариес и его осложнения (в настоящее время занимает 1 место среди всех патологий) и пародонтит (11 место) [11].

Несанированная полость рта выступает в качестве источника хронической инфекции и может способствовать возникновению целого ряда системных заболеваний: сахарного диабета [16], инфекционного эндокардита [17, 18], заболеваний почек [17, 19], дыхательной системы [8].

Активно изучается влияние состояния полости на развитие сердечно-сосудистых заболеваний, в особенности атеросклероза, осложнения которого в настоящее время занимают первое место в мире как причина смертности. В этой связи в литературе наибольшее внимание уделяется пародонтиту, который рассматривается как фактор риска развития атеросклероза.

Пародонтит представляет собой воспалительное заболевание тканей, окружающих зуб, характеризующееся деструкцией периодонтальной связки, резорбцией костной ткани альвеолярного отростка,­­­ как следствие, возникновением подвижности зуба, что может в дальнейшем привести к его потере.

Пародонтит развивается в результате воздействия смешанной микрофлоры полости рта, главным образом Грамотрицательных анаэробных палочковидных бактерий, на по­­­­ддерживающие ткани зуба. Воспаление же, как типовой патологический процесс, направлено на устранение и элиминацию возбудителя. Среди клинических проявлений пародонтита типично выделяют кровоточивость десен, увеличение глубины пародонтальных карманов, деструкцию костной ткани и подвижность зубов [6].

Воспалительные заболевания тканей пародонта связывают с воздействием бактерий зубного налета. Известно о существовании более 700 различных микроорганизмов, постоянно присутствующих в полости рта, многие из которых при определенных условиях способны вызывать целый ряд заболеваний. Микроорганизмы, приводящие к развитию пародонтита, определяются термином «пародонтопатогены». В настоящее время под этим термином объединяют более 20 известных штаммов микроорганизмов, среди которых наиболее важными возбудителями выступают *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Tanerella forsythia, Treponema denticola* [20]*.* Последние три микроорганизма рассматриваются как представители так называемого красного комплекса пародонтопатогенов. Данная концепция была предложена еще в 1992 S.S. Socransky, но до сих пор не утратила свою актуальность. Согласно этой концепции все микроорганизмы полости рта можно разделить на 5 групп в зависимости от их вирулентности, то есть способности вызывать заболевания. Каждой группе присвоена своя цветовая кодировка: «зеленые» и «желтые» микроорганизмы не способны приводить к пародонтиту. Бактериальные агенты «пурпурного» комплекса могут послужить причиной возникновения гингивита и часто рассматриваются как «предвестники» появлений микроорганизмов «оранжевого» и «красного» комплексов. Представители последнего кластера рассматриваются как наиболее вирулентные микроорганизмы, при этом характеризующиеся высокой устойчивостью к защитным механизмам хозяина.

В настоящее время пародонтит рассматривают как воспалительное заболевание, при котором наблюдается дисбактериоз и полимикробная синергия. Микроорганизмы постоянно взаимодействуют друг с другом, образуя сообщества, организованные в биопленку. Эксперименты на мышах показали, что патогенное воздействие микробных сообществ в отношении тканей пародонта инициируется колонизацией ключевыми пародонтопатогенами, прежде всего, *Porphyromonas gingivalis -* бактерией, которая даже в минимальных количествах существенно повышает вирулентность всего сообщества [21]. При этом наблюдается нарушение местного гемостаза и изменение иммунной реакции организма-хозяина.

На сегодняшний день нет сомнений в том, что роль *Porphyromonas gingivalis* в возникновении патологии тканей пародонта значительна. Но интересен тот факт, что о развитии заболевания можно говорить только в контексте полимикробных сообществ, так как присутствие только лишь бактерии *Porphyromonas gingivalis* не вызывает патологию, что было доказано в ходе исследования на стерильных мышах [21].

Взаимодействие микроорганизмов в биопленках может быть осуществлено при непосредственном физическом контакте (коадгезия и агреграция), через сигнальные молекулы – медиаторы, экспрессию генов или реализуется метаболически - через питательные вещества [22].

Для понимания патогенеза пародонтита требуется дальнейшее изучения взаимодействия отдельных микроорганизмов, однако в отношении некоторых бактериальных агентов уже можно сделать определенные выводы.

Так, в настоящее время известно, что бактерия *Porphyromonas gingivalis* ассоциирована с бактерией *Treponema denticola.* Еще в 1992 было описано их метаболическое взаимодействие, основанное на продуцировании взаимовыгодных питательных веществ [23]. Бактерия *Treponema denticola* продуцирует янтарную кислоту, усиливающую рост *Porphyromonas gingivalis*. В свою очередь *Porphyromonas gingivalis* является источником глицина и изобутановой кислоты, необходимых для бактерии *Treponema denticola*.

В настоящее время совершенно точно известно, что взаимоотношения указанных микроорганизмов выходят за рамки метаболического взаимодействия. Современные исследования также показывают, что присутствие в сообществе микроорганизма *Treponema denticola* повышает вирулентность *Porphyromonas gingivalis* за счет усиления экспрессии генов, кодирующих гингипаины и гемагглютинин А [22, 24]. Гемагглютинины представляют собой молекулы, обеспечивающие адгезию бактерии к эпителию слизистой оболочки, прикрепление к эритроцитам и лизис указанных клеток с целью получения ионов железа как необходимого компонента питания. Термином «гингипаины» обозначают специфические цистеиновые протеазы и выделяют аргинин- и лизин-гингипаины (Rgp и Kgp соответственно). Указанные протеазы необходимы для адгезии и инвазии, а также они способны влиять на иммунный ответ организма-хозяина путем расщепления IgG и ряда интерлейкинов [25].

Кроме того, присутствие бактерии *Treponema denticola* способствует усилению адгезии микроорганизма *Porphyromonas gingivalis* к эпителиальным клеткам и первичным колонизаторам, главным образом к *Streptococcus gordonii* [33].

В свою очередь в присутствии *Porphyromonas gingivalis* отмечается повышение продукции дентилизина, основного фактора вирулентности *Treponema denticola*, обеспечивающего инвазию в эпителиальные клетки в результате расщепления белков межклеточного матрикса и влияние на иммунный ответ хозяина [26].

Бактерия *Porphyromonas gingivalis* при заболеваниях пародонта также часто выделяется совместно с бактерией *Tannerella forsythia*. Механизмы их синергии в настоящее время точно не известны, однако исследования показывают, что бактериальные агенты способны к коагрегации за счет белок-белковых взаимодействий. Кроме того, имеются данные о повышении вирулентности сообщества в присутствии указанных микроорганизмов [27].

*Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* определяются как патобионты, то есть микроорганизмы, которые оказывают патологическое действие на ткани организма-хозяина при определенных условиях [28].

 Бактерия *Fusobacterium nucleatum* играет большую роль в формировании микробной бляшки, выступая в виде своеобразного мостика, так как позволяет поздним колонизаторам, в том числе *Porphyromonas gingivalis,* связываться с ранними – стрептококками, нейсериями, актиномицетами [29].

Стоит отметить, что в настоящее время взаимодействие между бактериями *Porphyromonas gingivalis* и *Streptococcus gordonii* также изучается достаточно активно. Известно, что микроорганизмы прикрепляются друг к другу посредством связывания длинных (FimA) и коротких (Mfa1) фимбрий *Porphyromonas gingivalis* с поверхностными белками GAPDH и SspA/B *Streptococcus gordonii* соответственно [22]. Для стабильности указанных связей необходим медиатор AI-2 (Autoinducer-2), который образуется при участии фермента LuxS. Интересно, что в настоящее время AI-2 оценивают как общую сигнальную молекулу, так как фермент LuxS встречается у многих грамположительных и грамотрицательных бактерий [30].

При начальном взаимодействии указанных ранее микроорганизмов отмечается активация тирозинкиназы Ptk1, которая в свою очередь обеспечивает ограничение образования транскрипционного фактора CdhR [31]. Активный фактор CdhR оказывает угнетающее воздействие на Mfa1 и LuxS [32]. Однако взаимодействие микроорганизмов не такое простое. С течением времени увеличивается продукция тирозинфосфотазы Ltp1, которая дефосфорилирует Ptk1, а, следовательно, активируется транскрипционный фактор CdhR, что ограничивает дальнейший рост сообщества.

Фосфорилирование и дефосфорилирование также оказывают влияние на патогенный потенциал *Porphyromonas gingivalis*, изменяя экспрессию протеаз. Исследования на мышах показывают, что убыль костной ткани в большей степени выражена при заражении одновременно как *Porphyromonas gingivalis*, так и *Streptococcus gordonii* [22].

Более того, есть данные, что парааминобензойная кислота (ПАБК), продуцируемая *Streptococcus gordonii*, способствует колонизации *Porphyromonas gingivalis* в результате увеличения экспрессии адгезинов, но при этом наблюдается снижение вирулентности микроорганизма, так как блокируется продукция внеклеточных полисахаридов [33]. Таким образом, совершенно очевидно, что взаимодействие микроорганизмов имеет в основе сложные, многокомпонентные механизмы, требующие длительного и тщательного изучения.

Синергетическое взаимодействие *Porphyromonas gingivalis* описано также для *Acinetobacter baumannii*, грамотрицательного микроорганизма, возбудителя множества внутрибольничных инфекций. Для указанных бактериальных агентов характерен так называемый кооперативный метаболизм, а также совместное влияние на нейтрофилы, что приводит к выраженному угнетению иммунной системы [34].

Не остаются в стороне и грибы. У пациентов с пародонтитом в пародонтальных карманах часто обнаруживаются представители рода *Candida*, главным образом *Candida albicans*. При этом отмечается связь между тяжестью заболевания и наличием грибов. Грибы способны быстро поглощать и использовать кислород, который является губительным для облигатных анаэробов, в частности *Porphyromonas gingivalis* [35, 36]. Более того, есть предположение, что белки *Candida albicans* облегчают инвазию *Porphyromonas gingivalis* в эпителиальные клетки, однако механизм такого взаимодействия все ещё остается не ясен.

Очевидно, что помимо синергетических взаимодействий, для микроорганизмов характерно также антагонистическое влияние друг на друга. Ряд исследований направлен на изучение влияния стрептококков на ключевые пародонтопатогены, главным образом, на *Porphyromonas gingivalis*.

Еще в 1985 Socransky и соавторы опубликовали данные, согласно которым представители нетаксономической группы *Streptococcus viridans (Streptococcus sanguinis, Streptococcus uberis, Streptococcus intermedius)* ингибируют рост ряда пародонтопатогенов *(Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia)* за счет образования пероксида водорода [37].

В дальнейшем антагонистические взаимоотношения между *Porphyromonas gingivalis* и представителями рода *Streptococcus* определялись неоднократно [38–40]. Исследование Herrero и соавторов, в котором рассматривалось влияние 13 видов бактериальных агентов на *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* позволило выявить 6 антагонистов указанных пародонтопатогенов. Интересно, что все они относятся к роду *Streptoccocus,* однако не все стрептококки обладают способностью угнетать рост пародонтопатогенов [39].

 Как уже отмечалось выше, антагонистическое влияние представителей рода *Streptococcus* в основном связывают со способностью бактерий образовывать пероксид водорода. Однако есть данные, что наличие в полимикробных сообществах бактерий, продуцирующих каталазу, например, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans,* позволяет увеличить колонизацию ключевыми пародонтопатогенами [41].

Современные исследования позволяют более детально изучить механизмы взаимодействия микроорганизмов. Становится очевидным, что высвобождение пероксида водорода не единственный путь угнетения роста патогенных бактерий. Высказывается предположение, что бактерия *Streptococcus aureus* может оказывать ингибирующее влияние на рост *Porphyromonas gingivalis* за счет продукции бактериоцин-подобного вещества [40]. Кроме этого, есть данные, что бактерии *Streptococcus cristatus* [42, 43] и *Streptococcus intermedius* [44, 45] способны ограничивать рост бактерий *Porphyromonas gingivalis*, нарушать их прикрепление и инвазию за счет фермента аргининдеиминазы (ArcA), который подавляет экспрессию генов вирулентности указанного микроорганизма (FimA, Mfa1 и ряда других).

Более того, высказывается предположение, что *Streptococcus sanguinis* ингибирует рост *Porphyromonas gingivalis* за счет наличия внутриклеточных белков, однако все ещё неизвестны точные механизмы такого взаимодействия и остается неясной локализация указанных белков [46].

Появляются также данные о том, что представители рода *Veillonella* могут выступать в качестве пародонтопротекторов, так как присутствуют в значительном количестве у лиц без патологии тканей пародонта [47].

В настоящее время также достаточно активно изучается влияние пробиотиков на пародонтопатогены [48, 49]. Стоит отметить, что механизмы такого взаимодействия остаются загадкой. Возможно, угнетающее действие на возбудителей заболеваний тканей пародонта обусловлено продукцией молочной и уксусной кислот представителями рода *Lactobacillus,* но указанный вопрос должен быть изучен более пристально*.*

Изучение взаимоотношений микроорганизмов, понимание патогенеза пародонтита позволит эффективнее подойти к вопросу лечения. Воспалительные заболевания пародонта, широко распространенные среди населения земного шара, часто требующие длительного лечения в течение нескольких лет, в особенности в случае тяжелых состояний, служат в качестве очага хронической инфекции и, соответственно, оказывают влияние на общее состояние макроорганизма.

### 1.2 Влияние микроорганизмов полости рта на развитие атеросклероза

На сегодняшний день связь пародонтита и атеросклероза изучается достаточно активно, хотя первые предположения о возможном влиянии бактериальных агентов полости рта, в частности пародонтопатогенов, на развитие и прогрессирование сердечно-сосудистых заболеваний были высказаны около века назад [50].

Стоит отметить, что атеросклеротические поражения также могут приводить к изменению микробного состава полости рта, в частности к увеличению представителей рода *Anaeroglobus* [51]*.*

В настоящее же время существует несколько гипотез относительно механизмов этого взаимодействия.

Одна из теорий говорит о непосредственном воздействии микроорганизмов полости рта на стенку артериальных сосудов и определяется как бактериальная теор­­­­ия. Доказательством данной гипотезы предложено рассматривать микробный состав атеросклеротической бляшки: по разным данным от 30 до 90% представителями микробных ассоциаций бляшки в стенках сосудов являются микроорганизмы полости рта [52–55]. Высказано также предположение, что микробный состав атеросклеротической бляшки может даже зависеть от формы пародонтита [56, 57].

Кроме того, в этом аспекте стоит учитывать транзиторную бактериемию, которая наблюдается постоянно в течение дня: при чистке зубов, в особенности при использовании зубной нити, при жевании, а также во время стоматологических процедур, будь то зондирование, профессиональная гигиена, реставрация или удаление зуба [50, 58, 59]. Бактериемия сохраняется в течение часа [50]. К тому же у лиц с заболеваниями тканей пародонта отмечается более высокий уровень бактериемии вследствие повышения проницаемости сосудистой стенки [60].

Другой предполагаемый механизм бактериемии заключается в трансклеточном переходе бактериальных агентов из пародонтальных карманов в сосуды микроциркуляторного русла [61]. Он включает в себя несколько этапов: прикрепление к поверхности клетки хозяина, проникновение внутрь посредством эндоцитоза при сохранении жизнеспособности бактерии, выход ее из клетки. Однако в настоящее время требуется более детальное изучение данного механизма распространения бактерий, в частности исследование путей выхода из клетки хозяина.

Третий механизм бактериемии в англоязычной литературе обозначается как «метод Троянского коня» (the Trojan horse approach): бактериальные агенты захватываются иммунокомпетентными клетками, однако остаются жизнеспособными и могут достигать отдаленных от первичного очага участков макроорганизма в составе макрофагов или дендритных клеток.

Таким образом, бактериальные агенты полости рта периодически оказываются в системном кровотоке. Считается, что они способны повреждать сосудистую стенку, вызывать локальный воспалительный процесс и, следовательно, индуцировать развитие атеросклероза. Для того, чтобы достичь различных участков сосудистой стенки, микроорганизмам необходимо избежать воздействия иммунокомпетентных клеток. Как отмечалось выше, в настоящее время есть теория о том, что бактериальный агент *Porphyromonas gingivalis* способен не только проникать в дендритные и макрофагальные клетки, но и нарушать процесс фагоцитоза [60]. Данная теория требует более детального изучения.

Однако наличие микроорганизмов в атеросклеротической бляшке не обязательно указывает на участие бактерии в развитии и прогрессировании атеросклероза [54], поэтому больше внимания в настоящее время уделяется тому, какими путями бактериальный агент способен влиять на сосудистую стенку.

Что касается прямого влияния на сосудистую стенку, наибольшее количество исследований в указанном аспекте проведено также относительно возможного влияния *Porphyromonas gingivalis*, как одного из самых агрессивных и вирулентных возбудителей. В отношении *Porphyromonas gingivalis* описана инвазия в эндотелиальные и мышечные клетки. Кроме того, данный микроорганизм способен взаимодействовать с Толл-подобными рецепторами эндотелиальных клеток, вызывать экспрессию молекул адгезии, запуская, таким образом, реакцию клеточного иммунитета, приводить к апоптозу указанных клеток, что в свою очередь определяется как дисфункция эндотелия и является важным этапом патогенеза атеросклероза [62, 63].

Также исследования показывают, что *A. Actinomycetemcomitans* обладает инвазивной способностью и может активировать трансформацию макрофагальных клеток в пенистые [64].

При этом инвазия микроорганизмов в клетки организма хозяина играет очень большую роль в патогенезе атеросклероза, так как неинвазивные штаммы *Porphyromonas gingivalis* обладают слабовыраженной проатерогенной активностью [64].

Ряд исследований указывает на возможность проявлять проатерогенную активность не только пародонтопатогенов. Так инвазивные штаммы *S.mutans* могут участвовать в патогенезе атеросклероза путем связывания с коллагеном 1 типа, проникновения в эндотелиальные клетки и индуцирования продукции ИЛ-1, ИЛ-6, моноцитарного хемоатрактантного протеина-1, что в свою очередь приводит к увеличению количества пенистых клеток [53].

Другие теории говорят о возможном опосредованном (непрямом) влиянии микроорганизмов полости рта через образование эндотоксинов и воспалительных медиаторов.

Есть свидетельства об увеличении активности секреторной фосфолипазы А2 (секФЛА2) – энзима, относящегося к классу гидролаз. Указанный фермент экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток сосудистой стенки и ферментирует отщепления жирных кислот от глицерофосфолипидов с образованием провоспалительных соединений, в частности арахидоновой кислоты (предшественника простогландинов) [65]. Также семейство ферментов ФЛА2 гидролизует фосфолипиды, ЛПНП (липопротеины низкой плотности), в результате образуются более плотные частицы, которые способны длительное время удерживаться во внеклеточном матриксе сосудистой стенки [66, 67], что дополнительно способствует прогрессированию атеросклероза.

Ряд исследований обращает внимание на возможное влияние липополисахаридов (ЛПС) на возникновение и прогрессирование атеросклероза у пациентов с пародонтитом [68, 69]. ЛПС представляет собой компонент клеточной стенки большинства грамотрицательных бактерий и состоит из гидрофобного липида А и связанной с ним полисахаридной части. В настоящее время липополисахарид рассматривается как эндотоксин, а циркулирующие в крови ЛПС, соответственно, как эндотоксинемия.

ЛПС попадает в кровь в физиологических условиях в незначительных количествах не только из полости рта, но и из кишечника, однако в виду наличия гуморальных и клеточных факторов, связывающих этот эндотоксин, влияния на организм он не оказывает. При стрессе, заболеваниях тканей пародонта наблюдается увеличение уровня ЛПС в крови и снижение активности анти-эндотосиновых факторов. В таком случае при попадании в кровоток указанная структура может связываться с Толл-подобными рецепторами клеток; воздействовать на макрофаги, нейтрофилы, тромбоциты, Т-лимфоциты, эндотелиальные клетки; стимулировать высвобождение большого количества медиаторов воспаления, тем самым запуская выраженную воспалительную реакцию, что может влиять на развитие атеросклероза [70].

У пациентов с заболеваниями тканей пародонта, отмечается повышение количества ЛПС как в слюне, так и в крови, а также повышение активности указанной структуры [68].

Воспалительные медиаторы, такие как ФНО-альфа (фактор некроза опухоли), ИЛ-1, простогландины могут также попадать в сосудистое русло непосредственно из очага первичной реакции – из тканей пародонтального комплекса, где произошла инвазия возбудителя, способствуя возникновению и прогрессированию атеросклероза [6]: указанные соединения могут активировать эндотелий, стимулировать экспрессию молекул адгезии [50, 63].

Не последнюю роль могут играть белки теплового шока (Heat Shock Proteins) бактерий и организма хозяина. Белки теплового шока изучаются уже на протяжении 30 лет, однако их функции все еще известны не до конца. Концентрации указанных белков значительно повышаются в клетках при воздействии любых стрессогенных факторов. Наличие белков теплового шока бактерий приводит к образованию соответствующих антител, присутствие которых связывают с прогрессированием атеросклероза [64, 71]. Однако, стоит упомянуть, что отмечается гомология между белками теплового шока бактерий и человека, что приводит к перекрёстным реакциям: воздействию антител на собственные белки организма-хозяина [72].

Кроме того, у пациентов с заболеванием тканей пародонта отмечается дислипидемия: более высокие уровни ЛПНП и триглицеридов (ТГ) на фоне сниженного уровня ЛПВП (липопротеинов высокой плотности) [64, 73]. В настоящее время известно, что бактерия *Porphyromonas gingivalis* способна окислять ЛПНП, а окисленные формы в свою очередь могут взаимодействовать с ЛПС клеточной стенки указанного микроорганизма. В результате в крови образуются формы ЛПНП-ЛПС, которые повреждают сосудистую стенку и откладываются в интиме [64].

Таким образом, на сегодняшний день нет сомнений, что бактерии тем или иным способом могут оказывать влияние на возникновение и развитие атеросклероза и что указанное взаимодействие является многогранным. Пародонтит принято рассматривать как фактор риска развития сердечно-сосудистой патологии [50]. Поэтому с целью снижения риска возникновения и развития атеросклероза предлагается проводить лечение заболеваний тканей пародонта [64].

### 1.3 Атеросклероз как системное воспалительное заболевание

В настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы занимают первое место в мире по причине смертности населения земного шара и составляют 45% от общего числа смертей жителей Европы в год [European Cardiovascular Disease Statistics, 2017]. Примечателен тот факт, что отмечается тенденция к увеличению абсолютного количества смертей в год от этой группы заболеваний, что, главным образом, связано с ростом населения и продолжительности жизни людей, хотя показатели смертности в возрастных группах за счет активных профилактических и лечебных мероприятий удалось снизить на 39% в период с 1990 по 2013 года [74].

В свою очередь атеросклероз – чрезвычайно распространённая патология сердечно-сосудистой системы, являющаяся одной из самых частых причин развития ишемической болезни сердца и инсульта. Ранее считалось, что данная патология неизбежно сопровождает старение организма, так как клинические проявления наблюдались в пожилом возрасте. Однако сейчас достаточно часто определяются летальные исходы от осложнений атеросклероза у лиц в возрасте 20-40 лет [75].

Атеросклероз как патологический процесс представляет собой хроническое системное воспаление, характеризующееся утолщением комплекса интима-медиа сосудов за счет образования атеросклеротических бляшек - скоплений липидов под эндотелием, в результате чего происходит реактивная перестройка сосудистой стенки и изменение ее функциональной активности.

Атеросклероз рассматривается как сложный, многофакторный процесс. Согласно современным представлениям о патогенезе данного заболевания, инициирующим моментом является повреждение внутренней оболочки сосудов - интимы. Этому состоянию могут способствовать большое количество факторов, определяемых как риски развития атеросклероза: артериальная гипертензия, курение, гормональные нарушения, в частности развитие сахарного диабета, ожирение, бактериальная, вирусная инфекции [76]. Пародонтит также рассматривается как фактор риска атеросклероза [77]. В результате повреждения проявляется эндотелиальная дисфункция, включающая в том числе и нарушение секреции вазодилатирующих и вазоконстрикторных веществ, что ещё больше способствует повышению проницаемости интимы и отложению в стенке сосуда липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), а также приводит к возникновению динамического стеноза [78]. Последние в свою очередь подвергаются окислению, агрегации или ферментативной модификации. Кроме того, сами окисленные липопротеины изменяют реакцию сосудистой стенки на действия ангиотензина II – олигопептидного гормона, способствующего расширению просвета сосудистой стенки, что приводит к активации тромбоцитов [79].

Таким образом, вследствие собственно повреждения эндотелия и отложения липопротеинов активируется врождённый и приобретенный иммунитет.

Врожденный иммунитет реализуется за счет действия макрофагов. Пораженный эндотелий активируется под действием окисленных липопротеинов и эскпрессирует молекулы адгезии (молекулы межклеточной адгезии-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия-1, E-селектин), что позволяет циркулирующим моноцитам фиксироваться к поверхности клеток в данном участке, мигрировать в субэндотелиальные слои и под действием макрофагального колониестимулирущего фактора дифференцироваться в макрофаги [80–82] . Также эндотелиальные клетки продуцируют хемокины, которые позволяют дополнительно привлечь в данный участок иммунокомпетентные клетки. В свою очередь макрофаги за счет экспрессии скавенджер рецепторов (или рецепторов-«мусорщиков») к окисленным и изменённым липопротеинам захватывают их и накапливают липиды. Макрофагальные клетки в конечном итоге теряют способность утилизировать липиды, насыщаются ими и определяются как пенистые клетки из-за своего внешнего вида (под микроскопом представляют собой скопление пузырьков). Поглощенные липиды воздействуют на инфламмасому – сложный белковый комплекс, который способствует образованию цитокинов, таких как интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12), запускающих воспалительный процесс путем активации T-лимфоцитов и привлечения в данный участок макрофагов [79, 83].

В прогрессировании атеросклеротического процесса играют роль также нейтрофилы, которые выделяют гранулярные белки, способствующие привлечению в участок поражения моноцитов и усиливающие активность макрофагов. В настоящее время имеются данные о провоспалительной роли Т-лимфоцитов в атеросклеротической бляшке за счет высвобождения цитокинов (в частности ИЛ-5, ИЛ-10). Влияние В-лимфоцитов на атеросклеротический процесс неоднородно: B1-лимфоциты за счет образования иммуноглобулинов класса M (IgM) тормозят развитие патологии, а B2-лимфоциты, наоборот, ускоряют данный процесс [84].

Таким образом, нет сомнений в важности роли воспаления в патогенезе атеросклероза. Стоит отметить, что о воспалении в данном аспекте говорил еще Рудольф Вирхов в 1858 году в своей книге «Клеточная патология, основанная на физиологической и патологической гистологии», однако в настоящее время достаточно точно изучены механизмы развития этого типового патологического процесса, что позволяет успешно проводить противовоспалительную терапию в рамках лечения данного заболевания[85].

Воспалительный процесс сопровождается перестройкой сосудистой стенки. На гладкомышечные клетки медии воздействуют липопротеины, цитокины и факторы роста, что приводит к «активации» гладкомышечных клеток: они мигрируют через внутреннюю эластическую мембрану в интиму сосуда, полностью или частично теряют способность сокращаться, но приобретают свойства фибробластов – способность высвобождать коллаген и эластин [79, 86, 87] Таким образом, происходит реактивное разрастание соединительной ткани и изменение межклеточного матрикса, формируется соединительнотканная «покрышка», отграничивающая липидное ядро от сосудистого русла, что обозначается как формирование фиброзной бляшки. Истончение фиброзной покрышки, например, в результате прогрессирования воспалительного процесса, может приводить к дестабилизации бляшки и формированию тромба.

Интересен тот факт, что современные данные убедительно доказывают, что гладкомышечные клетки могут приобретать способность поглощать окисленные липопротеины, накапливать их и переходить на так называемый «макрофагальный фенотип» [79, 87]. Лишь 50% обнаруженных в атеросклеротических бляшках пенистых клеток представляют собой макрофаги. Однако гладкомышечные клетки справляются с задачей утилизации липидов несколько хуже макрофагов [88].

В конечном итоге клетки, накапливающие липиды, подвергаются апоптозу, что приводит к скоплению липидов во внеклеточном пространстве. Таким образом, формируется ядро атеросклеротической бляшки, представляющей собой липидно-белковый детрит, окруженный соединительной тканью. Сам термин «атеросклероз», предложенный еще в 1904 году патологом Маршаном (F. Marchand), удачно отражает происходящие в стенке сосудов изменения. Термин образован от сочетания греческих слов athere (кашица) и sclerosis (уплотнение).

Атеросклероз не имеет своей особой клинической картины и проявляется осложнениями, резвившимися вследствие уменьшения просвета сосуда и недостаточного кровоснабжения, то есть ишемии, какого-либо органа, поэтому может длительное время оставаться незамеченным.

Атеросклеротический процесс достаточно часто определяется в брахицефальных артериях. Данная локализация процесса приводит к гемодинамическим нарушениям в головном мозге, что обуславливает развитие дисциркуляторных энцефалопатий, инсульта [89]. Так как кровоснабжение полости рта главным образом осуществляется посредством ветвей наружной сонной артерии, то стеноз приводит к гипоксии тканей полости рта в том числе. На этом фоне возможно развитие воспалительных заболеваний пародонта и повышения титров анаэробных микроорганизмов [90].

### 1.4 Микробный состав атеросклеротических бляшек

 Исследование микробного состава атеросклеротических бляшек проводилось уже неоднократно, при этом полученные результаты весьма неоднородны, а иногда очень сильно разнятся. Указанные различия в данных можно объяснить выбранными методами, использованными при анализе. Так, авторы могут применять высокоспецифичные методы исследования, что позволяет обнаружить только определенные виды микроорганизмов [60, 63].

При изучении микробного состава необходимо учитывать тот факт, что в полости рта в принципе присутствует большое количество видов бактериальных агентов. Часть из них может существовать в некультивируемом состоянии, то есть в форме, которая при воздействии неблагоприятных условий снижает свою метаболическую активность и прекращает свой рост на питательных средах, но сохраняет свою жизнеспособность. Посев на лабораторных средах в таком случае не дает полной информации о микробном составе изучаемого материала и требует иных методов диагностики, например, полимеразной цепной реакции - ПЦР.

В отношении микробного состава атеросклеротических бляшек более информативные данные представлены при изучении непосредственно образцов, полученных в результате эндартерэктомии по сравнению с данными, полученными при заборе материала с помощью стерильных бумажных штифтов, так как в настоящее время известно, что ряд пародонтопатогенов способен к инвазии в клетки организма хозяина.

Кроме того, высказывается предположение о том, что обнаружение микроорганизмов может зависеть от конкретной э­тиологии атеросклеротического поражения [60]. Не исключено, что на присутствие микроорганизмов в атероматозных бляшках влияет иммунный ответ хозяина.

 Множество исследований направлено на выявление в составе атеросклеротических бляшек пародонтоп­атогев, так как заболевания пародонта встречаются достаточно часто. Хотя стоит отметить, что полость рта не единственный источник микроорганизмов. Так, в атеросклеротических бляшках могут быть обнаружены:

1. *Helicobacter pylori* [91–94] – Грамотрицательная спиралевидная бактерия, инфицирующая желудок и двенадцатиперстную кишку. В настоящее время указанный микроорганизм ассоциирован с рядом заболеваний верхнего отдела желудочно-кишечного тракта.
2. *Chlamydia pneumonia* [62, 93, 95] – респираторный патоген, вызывающий пневмонию. Обнаружение указанного микроорганизма может представлять определенные трудности в связи с тем, что он является облигатным внутриклеточный паразитом.
3. Представители рода *Enterobacter* [63], которые являются нормальной флорой желудочно-кишечного тракта, однако могут вызывать заболевания дыхательной системы, мочевыводящих путей.
4. Представители рода *Moraxella*, в частности *Moraxella osloensis* [63]. Представители данного рода являются нормальной микрофлорой носоглотки и в меньшей степени половых органов. При определенных условиях могут вызывать респираторные заболевания, а также отиты, синуситы, конъюнктивиты.

Также стоит отметить, что в атеросклеротических бляшках, как правило, обнаруживают несколько видов бактерий.

Различия в результатах обнаружения пародонтопатогенов могут быть также объяснены популяцией, относительно которой проводилось исследование: например, при анализе атеросклеротических бляшек японцев главным образом выявлялся вид *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (в 20% наблюдаемых образцах) [Ohki et al, 2012]. В исследовании, проведенном в Бразилии, микроорганизмы были выделены уже из 34% полученных образцов (исследовалось 35 атеросклеротических бляшек, полученных в результате эндартерэктомии), где вновь наиболее распространенным видом стал *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [54]. Интересно, что авторы в данном исследовании также сравнивали частоту встречаемости типов бактерий: протеобактерии обнаруживаются в подавляющем большинстве случаев (78,3% протеобактерий против 21,7% фирмикутов) [54]. В иных исследованиях бактерия *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* была обнаружена в 0% [96], 14% [52], 17,39% [97], 19,7% [98], 66,7% [99] образцах сосудистой стенки.

 Другим микроорганизмом, чья ДНК наиболее часто определяется в атеросклеротических бляшках, является *Porphyromonas gingivalis.* В этом случае также нет однородных результатов: присутствие ДНК указанного микроорганизма было обнаружено в 3,4% [98], 13,04% [97], 38% [52], 45,1%

[96], 50% [100], 52% [101], 78,57% [99] образцах атеросклеротических бляшек.

Ряд исследований выявил наличие ДНК других микроорганизмов полости рта в образцах сосудистой стенки:

1. ДНК *Campylobacter rectus* идентифицировано в 8,69% [97], 9,52% [99], 21,6% [96];
2. *Tanerella forsythia* - в 31,4% [96], 53% [52], 61.9% [99] исследуемых образцов.
3. *Treponema denticola* в 2,3% [98], 6% [52], 51% [96].
4. *Prevotella intermedia* в 23,5% [96], 31% [52].

Интересно, что микроорганизмы *Campylobacter rectus, Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens* являются специфичными для атеросклеротических бляшек, так как не обнаруживаются в других тканях организма [72].

Помимо пародонтопатогенов в атеросклеротических бляшках может быть обнаружен *Streptoccocus mutans* [53]. В указанном исследовании было изучено 14 образцов атеросклеротических бляшек, *S. mutans* был выделен в 100% образцах.

Интересно, что ДНК бактерий, вызывающих заболевания полости рта, определяется не только в сонных и коронарных артериях, но также и в грудных, абдоминальных, бедренных сосудах. При этом отмечается тенденция: чем ближе пораженный атеросклерозом сосуд к полости рта, тем больше вероятность обнаружения в нем ДНК микроорганизмов полости рта [52], поэтому чаще всего бактериальные агенты определяются в сонных артериях.

Кроме того, в настоящее время нет сомнений в том, что микроорганизмы, обнаруживаемые в атеросклеротических бляшках, сохраняют свою жизнеспособность. Kozarov и другие авторы ещё в 2005 году впервые доказали это утверждение. В ходе исследования в атеросклеротических бляшках были обнаружены *Porphyromonas gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Попытки культивировать бактериальные агенты на кровяном агаре результатов не дали. Однако после инкубации гомогената атеросклеротической бляшки и человеческих эндотелиальных клеток сонной артерии (HCAEC) указанные микроорганизмы были обнаружены в эндотелиальных клетках. Нахождение бактериальных агентов в клетках, не способных к фагоцитозу, свидетельствует об активной инвазии и рассматривается как убедительное доказательство жизнеспособности бактерий [102].

Вопрос обнаружения микроорганизмов в атеросклеротических бляшках требует дальнейшего изучения. Хотя в литературе достаточно много свидетельств присутствия микроорганизмов полости рта в атероматозных бляшках, существуют исследования, в ходе которых бактерий в них не было обнаружено. Исследования направлены на изучения состояния тканей в определённый момент времени, но и пародонтит, и атеросклероз являются динамическими процессами, поэтому авторы отмечают необходимость разработки нового подхода к решению поставленного вопроса.

### 1.5 Методы идентификации бактерий в биологическом материале

В настоящее время идентификация микроорганизмов может быть основана на использовании фенотипических методов, которые оценивают морфологию, рост бактерий, их биохимическую активность. Такие методы позволяют определить семейство и вид изучаемого микроорганизма. Стоит отметить, что многие изучаемые параметры могут сильно зависеть от условий культивирования и используемых питательных сред. Морфологические свойства определяют с помощью микроскопии, культуральные – посредством бактериологического посева на плотные, жидкие и полужидкие питательные среды.

Кроме того, традиционный метод идентификации бактерий, который включает в себя посев на питательные среды с последующим выделением чистых культур и установлением таксономических характеристик микроорганизма, занимает достаточно долгое время. Также метод может быть весьма затруднительным ввиду особых требований к условиям проведения.

Шагом вперед стало появление метода масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). В основе метода лежит использование короткоимпульсного азотного лазера, который в присутствии матрицы ионизирует молекулы бактериальной клетки (например, ДНК, белки, липополисахариды). Образовавшиеся ионы представляют собой газовую фазу, которая движется в электрическом поле по направлению к детектору. Такой метод позволяет дать качественную и количественную характеристику биомолекул в изучаемом материале. Определение видовой принадлежности микроорганизма основано на сравнении полученного масс-спектра и масс-спектра базы данных. Стоит отметить, что для проведения указанного метода необходимо выделение чистой культуры [103, 104].

Также возможно использование генотипических методов, которые основаны на изучении ДНК и позволяют установить даже конкретный штамм бактериального агента. Появление указанных методов позволило значительно расширить представления о микроорганизмах. Например, метод ДНК-ДНК гибридизации позволяет определить степень родства изучаемых микроорганизмов.

В настоящее время одним из наиболее часто используемых генетических методов является полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод молекулярный биологии, заключающийся в амплификации in vitro - увеличении количества копий специфической последовательности нуклеотидов (определённых фрагментов) в молекуле ДНК или РНК [105].

Открытие молекулы ДНК – дезоксирибонуклеиновой кислоты – произошло в 1869 И. Мишером. Однако ученый не придал значения своей находке. Также важным шагом стало открытие правила Чаргаффа: количество пуриновых оснований равно количеству пиримидиновых. Правило Чаргаффа, рентгеноструктурный анализ позволили в 1953 году открыть структуру молекулы ДНК и обосновать принцип комплементарности.

Однако возможность проведения ПЦР для диагностики появилась лишь в 1970-х гг: в 1976 году из бактерии *Thermus aquaticus* была выделен фермент Taq-полимераза. В отличие от применявшейся ранее ДНК-полимеразы, указанный фермент обладал термостабильностью, а значит, не было необходимости добавлять его в реакционную смесь после каждого цикла нагревания [106].

Наиболее частой мишенью для ПЦР-реакции в настоящее время является ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК (рРНК) – компонент малой 30S субъединицы прокариотических рибосом. Выбор обусловлен тем фактом, что указанный ген имеет чрезвычайно консервативные участки, общие для всех прокариот, а также вариабельные участки, которые позволяют определить род или вид бактериального агента.

ПЦР-реакция инициируется специальными праймерами (короткими последовательностями нуклеотидов), которые за счет принципа комплементарности способны «узнавать» определенные участки искомой ДНК. Для многократного увеличения копий исходной молекулы необходима серия повторяющихся циклов. Цикл состоит из нескольких этапов:

1. Денатурация – переход двухцепочечной молекулы ДНК в одноцепочечную под действием высокой температуры.
2. Отжиг - присоединение праймеров к однонитевой ДНК-мишени
3. Элонгация (синтез), осуществляемый посредством фермента Taq-полимераза.

Выявление специфического гена производится посредством электрофореза в специальном геле (агарозном/полиакриламидном). Количественная оценка стала возможной после внедрения специальных флуоресцентных ДНК-зондов [107].

В настоящее время разработано несколько вариантов проведения ПЦР-реакции. Например, выделяют:

1. ПЦР с отложенным/«горячим» стартом (hot-start PCR): суть реакции заключается в предотвращении возможности ДНК-полимеразы проявлять свою ферментативную активность при низких температурах (до начала отжига), что приводит к снижению образования неспецифических продуктов [108].
2. ПЦР с обратной транскрипцией для определения известной последовательности молекулы РНК [109].
3. ПЦР с анализом «по конечной точке» (End-point PCR) – оценка результатов, не открывая пробирок, по наличию флюоресценции.
4. ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR) – позволяет провести количественную оценку исходной молекулы ДНК [110].
5. Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР – в одной пробирке возможен анализ двух и более молекул ДНК.

В настоящее время ПЦР-диагностика занимает значимую нишу в определении видовой принадлежности микроорганизма. И сейчас отмечается тенденция к увеличению количества исследований, проводимых с помощью данного метода.

# Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Клиническая характеристика пациентов

Для достижения поставленных задач было проведено обследование полости рта и забор микробиологического материала у 20 пациентов (5 женщин и 15 мужчин) в возрасте от 47 до 79 лет (M±m = 64,20± 1,93). Испытуемые были разделены на две группы: основная группа пациентов включала в себя 10 человек с установленным диагнозом атеросклероза брахиоцефальных артерий и стеноза сонных артерий.

Вторая группа, группа контроля, также состояла из 10 пациентов, но включала в себя лиц с атеросклеротическими поражениями коронарных сосудов без значимых признаков стеноза брахиоцефальных артерий (сужение просвета сосуда менее 70%).

Наличие или отсутствие указанных изменений брахиоцефальных артерий было определено с помощью ультразвуковой допплерографии (УЗГД) при поступлении в кардиологическое отделение «КВМТ им. Н.И. Пирогова СПбГУ» и отмечено в медицинской карте.

Кроме того, критерием включения служило наличие информированного согласия пациентов на участие в исследовании.

Критериями исключения из исследования были:

1. Наличие заболеваний тканей пародонта или терапии по этому случаю в течение последних 6 месяцев, а также воспалительных изменений слизистой оболочки полости рта.
2. Наличие тяжелой сопутствующей патологии внутренних органов (не кардиологического профиля) в стадии субкомпенсации и декомпенсации
3. Злокачественных и доброкачественных новообразований
4. Системных заболеваний крови
5. Сахарного диабета 1-го и 2-го типов
6. Вредной привычки - курения
7. Приём антибактериальных препаратов, глюкокортикостероидов
8. Отказ от участия в обследовании.

Всем пациентам в рамках исследования было проведено обследование, включавшее в себя осмотр полости рта с записью зубной формулы, а также забор микробиологического материала с поверхности слизистой оболочки полости рта в области дорсальной поверхности языка, твердого неба, слизистой оболочки щеки, вестибулярной поверхности альвеолярного отростка в области первых и вторых моляров верхней челюсти (при их отсутствии – в проекции указанных зубов).

### 2.2 Оценка стоматологического статуса

Стоматологическое обследование включало в себя:

1. Опрос: сбор жалоб, анамнеза жизни (возраст, пол, перенесенные и сопутствующие заболевания, наличие вредных привычек) и заболевания (давность развития заболевания, проводимое лечение)
2. Внешний осмотр
3. Осмотр полости рта: оценка состояния слизистой оболочки, состояния зубных рядов с заполнением зубной формулы, а также определением индекса КПУ.

Индекс КПУ, предложенный еще в 1938 Klein, заключается в подсчете зубов, пораженных кариесом (К), запломбированных (П), удаленных (У) по случаю кариеса или его осложнения.

В ходе исследования не представлялось возможным провести рентгенологическую оценку состояния твердых тканей, а оценка воспалительных изменений со стороны пародонтального комплекса основывалась на визуальном осмотре.

### 2.3 Забор микробиологического материала

Забор микробиологического материала у пациентов производился путем мазка со слизистой оболочки полости рта в области дорсальной поверхности языка, твердого неба, слизистой оболочки щеки, вестибулярной поверхности альвеолярного отростка в области первых и вторых моляров верхней челюсти (при их отсутствии – в проекции указанных зубов) с помощью стерильных бумажных абсорбирующих штифтов PetroPoint фирмы Petrodent (размер №35 по ISO). После забора абсорбенты были сразу помещены в герметичные стерильные пробирки типа Eppendorf с бесцветной транспортной средой, помещены в термоконтейнеры с хладогеном и направлены в лабораторию.

### 2.4 Полимеразная цепная реакция

Для достижения поставленных задач был использован метод ПЦР в режиме реального времени (Real Time PCR), который позволяет определить не только качественную составляющую, то есть наличие в исследуемом образце микроорганизма, но еще и установить количество искомой специфической последовательности молекулы ДНК или РНК.

## 2.4.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение молекулы ДНК из полученных мазков – биологического материала - производилось с помощью системы «ДНК-экспресс» (научно-производственная фирма Литех, Россия) в порядке, обозначенном инструкцией.

В пробирку Eppendorf, содержащую исходный биологический материал, был добавлен реагент (120 мкл), затем производилось центрифугирование в течение 10 секунд. Далее были удалены бумажные абсорбирующие штифты, пробирки помещены в термостат (температура t=98oC, время 20 минут). После инкубации произведено центрифугирование (13000 оборотов в минуту при температуре 25оC в течение 15 секунд) с целью получения надосадочного компонента.

## 2.4.2 Праймеры и зонды

 Стоит отметить, что для трех из указанных ранее пяти пародонтопатогенов, специфических для атеросклеротических бляшек (*Campylobacter rectus, Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens),* а именно для *Campylobacter rectus* и *Porphyromonas endodontalis,* существует необходимость индивидуального синтеза праймеров, что осложняет проведение исследования.

 Данные об использованных праймерах представлены в таблице 1.

*Таблица 1.*

*Праймеры для Campylobacter rectus, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia*

|  |  |
| --- | --- |
| Микроорганизм | Праймеры (5’→3’) |
| *Porphyromonas gingivalis* | Прямой | AGGCAGCTTGCCATACTGC |
| Обратный | ACTCTTAGCAACTACCGATGT |
| *Prevotella intermedia* | Прямой | AATACAGCCTTCGAGGGTTT |
| Обратный | TTCGGTCAAGACAGTAGGGA |
| *Campylobacter rectus* | Прямой  | TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC |
| Обратный | TTTCTGCAAGCAGACACTCTT |

## 2.4.3 Параметры ПЦР-реакции

 Полученная смесь для амплификации включала в себя 0,5 мкл исследуемой ДНК, по 0,3 мМ специфических праймеров, по 0,2 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP), 0,4 мкл термостабильной ДНК-полимеразы, буферный раствор хлорида магния, а также вода с целью получения 25 мкл смеси.

ПЦР-диагностика была произведена с помощью амплификатора «Терцик» (Россия). Программа реакции представляла собой:

* предварительная денатурация молекулы ДНК при температуре 94°С в течение 3 минут;
* цикл денатурации молекулы ДНК при температуре 94°С в течение 15 секунд (35 циклов),
* отжиг праймеров при температуре 60°С в течение 30 секунд,
* синтез комплементарной цепи при температуре 72° С в течение 40 секунд,
* финальная элонгация при температуре 72° С в течение 5 минут.

После амплификации продукты ПЦР-реакции были подвергнуты электрофорезу в 1,0% агарозном геле с использованием TAE-буфера (Трис- ацетатный ЭДТА буфер, ThermoScientific, Германия) и добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия (для визуализации молекул ДНК в ультрафиолетовых лучах). Исследование проводилось с помощью аппарата «Hoefer HE 33» (Pharmacia, Швеция).

### 2.3 Статистическая обработка данных

 Полученные результаты исследования были подвергнуты статистической обработке. В рамках описательной статистики производился расчет среднего арифметического (М) по формуле M = $\frac{\sum\_{}^{}V\*p}{N}$, где V- значение вариационного признака, p – частота встречаемости данного признака, n –общее число наблюдений.

 Для определения среднеквадратичного отклонения использовалась формула $σ= \sqrt{\frac{\sum\_{}^{}p\*d^{2}}{n-1}}$, где d – отклонение значения вариационного признака от средней арифметической, определяемое по формуле d =M-V; p –частота встречаемости данного признака, n – общее количество наблюдений.

 Для оценки достоверности средней арифметической также рассчитан показатель средней ошибки средней арифметической, который определяется по формуле: m = $\pm \frac{σ}{\sqrt{n}}$ , где $σ$ – среднеквадратичное отклонение, n – общее количество наблюдений.

# Глава 3. Результаты исследований

### 3.1 Результаты клинических исследований

 В исследовании приняло участие 20 человек: 10 испытуемых были определены в основную группу, 10 – в контрольную. Данные о возрастном составе исследуемых групп представлены в таблице 2. Основными участниками исследования были лица старшего и пожилого возраста.

***Таблица 2***

*Данные по возрасту испытуемых основной и контрольной группы на момент исследования*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Признак | M ± m  | Min | Max |
| Возраст испытуемых основной группы | 61,20 ± 2,88 | 47 | 73 |
| Возраст испытуемых контрольной группы | 67,20 ± 2,32 | 56 | 79 |
| Общий показатель | 64,20 ± 1,93 | 47 | 79 |

В исследовании, главным образом, приняли участие лица мужского пола. Данные распределения обследованных по полу, представлены в таблице 3.

***Таблица 3***

*Данные по полу испытуемых основной и контрольной группы на момент исследования*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Обозначение группы | Мужчины, N | Женщины, N | Мужчины, % | Женщины, % |
| Основная группа | 7 | 3 | 70% | 30% |
| Контрольная группа | 8 | 2 | 80% | 20% |
| Общее значение | 15 | 5 | 75% | 25% |

В качестве основного диагноза у пациентов обеих групп наиболее часто значилась ишемическая болезнь сердца (ИБС), стенокардия 2 функционального класса (ФК). Указанный диагноз был поставлен 90% испытуемым. Среди иных кардиологических диагнозов определялись: фибрилляция предсердий, сердечная недостаточность, гипертоническая болезнь, перенесенный инфаркт миокарда (в период 2015-2018 гг.). Частота встречаемости указанных кардиологических диагнозов обозначена на рисунке 1. У одного пациента возможно несколько кардиологических диагнозов.

***Рис. 1***

*Кардиологические диагнозы у пациентов основной и контрольной групп*

 К основной группе были отнесены пациенты с клинически значимым стенозом брахиоцефальных артерий и/или стенозом сонных артерий. Диагноз «атеросклероз брахиоцефальных артерий» был поставлен всем пациентам основной группы (100%). Стеноз сонных артерий (справа/слева) наблюдался у 50% испытуемых.

### 3.2 Результаты стоматологического обследования

 В результате стоматологического обследования 85% наблюдаемым испытуемым был поставлен диагноз «частичная вторичная адентия», 15% - «полная вторичная адентия». Несмотря на необходимость проведения санации полости рта перед госпитализацией, у ряда пациентов было отмечены кариозные поражения, в том числе у лиц основной группы. Данные о санации полости рта участников исследования представлены в таблице 4.

***Таблица 4***

*Данные о санации полости рта пациентов основной и контрольной групп*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Обозначение группы | Санировано, N | Не санировано,N | Санировано, % | Не санировано, % |
| Основная группа | 8 | 2 | 80% | 20% |
| Контрольная группа | 8 | 2 | 80% | 20% |
| Общее значение | 16 | 4 | 80% | 20% |

В рамках исследования также оценивался индекс КПУ. Распространённость кариеса в наблюдаемых группах составила 100%. Среднее значение индекса КПУ всех испытуемых составил 20,95 ± 1,17, пациентов основной группы: 22,4 ± 1,87. Индекс КПУ контрольной группы был меньше и составлял 19,5 ± 1,44. Подробные данные индекса указаны в таблице 5.

Кариозные поражения, как отмечалось выше, были обнаружены у 20% пациентов (у 10% представителей основной группы, 10% - контрольной). Практически у всех испытуемых отмечен признак П – запломбированные зубы (стоит учитывать, что у 15% обследуемых был поставлен диагноз «полная вторичная адентия»). Также у 100% пациентов обнаружены отсутствующие зубы.

В основной группе у 70% пациентов в структуре индекса КПУ преобладали удаленные зубы. В контрольной группе – преобладание удаленных зубов в структуре индекса наблюдалось лишь у 40% испытуемых. Однако и в группе контроля, также как и в основной группе, больший вклад в конечное значение индекса вносил признак У – удаленные зубы.

***Таблица 5***

*Значения индекса КПУ у пациентов основной и контрольной групп*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Обозначение группы | К (кариозное поражение) | П (запломбировано) | У (удалено) | КПУ |
| Основная группа | 1,20 ± 0,80 | 4,20 ± 1,47 | 17,00 ± 3,91 | 22,4 ± 1,87 |
| Контрольная группа | 0,80 ± 0,70 | 7,6 ±1,37 | 11,10 ± 3,43 | 19,5 ± 1,44 |
| Общее значение | 1 ± 0,69 | 5,9 ± 1,05 | 14,05 ± 2,62 | 20,95 ± 1,17 |

###

### 3.3 Результаты ПЦР-диагностики

 В таблице 6 представлены результаты RT-ПЦР для бактериальных агентов *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus* для испытуемых основной группы. Знаком «-» отмечен отрицательный результат.

***Таблица 6***

*Данные RT-ПЦР для испытуемых основной группы*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Шифр пациента | *Porphyromonas gingivalis* | *Prevotella intermedia* | *Campylobacter rectus* |
| 1 | 9,26\*$10^{5}$ | - | - |
| 2 | 4,75\*$10^{6}$ | 9,48\*$10^{3}$ | - |
| 3 | 9,21\*$10^{5}$ | 1,91\*$10^{4}$ | - |
| 4 | 3,91\*$10^{6}$ | 2,3\*$10^{4}$ | - |
| 5 | - | - | - |
| 6 | 8,85\*$10^{3}$ | - | - |
| 7 | 3,46\*$10^{5}$ | 6,27\*$10^{3}$ | - |
| 8 | 2,75\*$10^{5}$ | - | - |
| 9 | 4,75\*$10^{6}$ | - | - |
| 10 | 3,91\*$10^{6}$ | 4,31\*$10^{5}$ | - |

 Из результатов ПЦР-диагностики видно, что присутствие бактерии *Campylobacter rectus* не наблюдалось ни в одном случае. Наиболее часто у пациентов определялся кардиоспецифический пародонтопатоген *Porphyromonas gingivalis* – в 90% наблюдаемых случаях.

 Бактерия *Prevotella intermedia* была выделена у 50% испытуемых.

 Данные RT-ПЦР-диагностики в отношении *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus* для участников контрольной группы представлены в таблице 7. Знаком «-» отмечен отрицательный результат.

***Таблица 7***

*Данные RT-ПЦР для контрольной группы*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Шифр пациента | *Porphyromonas gingivalis* | *Prevotella intermedia* | *Campylobacter rectus*  |
| 11 | 1,75\*$10^{4}$ | - | - |
| 12 | 2,75\*$10^{3}$ | - | - |
| 13 | 3,16\*$10^{5}$ | 2,75\*$10^{4}$ | - |
| 14 | 2,45\*$10^{6}$ | 3,56\*$10^{4}$ | - |
| 15 | 1,65\*$10^{4}$ | - | - |
| 16 | - | - | - |
| 17 | 4,45\*$10^{3}$ | 2,85\*$10^{3}$ | - |
| 18 | 3,45\*$10^{5}$ | - | - |
| 19 | 2,45\*$10^{4}$ | - | - |
| 20 | 1,50\*$10^{6}$ | - | - |

 В контрольной группе бактерия *Campylobacter rectus* не определялась ни у одного из участников (также как и у пациентов основной группы). Данный факт обуславливает необходимость инвазивных методов забора материала.

 Пародонтопатоген *Porphyromonas gingivalis* был обнаружен у 90% испытуемых (также как у лиц основной группы). Однако бактерия *Prevotella intermedia* наблюдалась лишь у 30% пациентов.

На рисунке 2 представлены объединенные данные частоты встречаемости изучаемых бактериальных агентов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*) у пациентов основной и контрольной группы.

***Рис. 2***

*Данные частоты идентификации трех изучаемых бактериальных агента у лиц основной и контрольной группы*

***Рис. 3***

*Количественные данные трех изучаемых пародонтопатогенов у пациентов основной и контрольной группы*

 Также на рисунке 3 графически отображены количественные данные обнаружения изучаемых кардиоспецифических пародонтопатогенов: *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus.*

На рисунке 4 приведена количественная характеристика микроорганизма *Porphyromonas gingivalis* у представителей основной и контрольной групп.

***Рис. 4***

*Титры бактерии Porphyromonas gingivalis у пациентов основной и контрольной групп*

### 3.4 Данные корреляционного анализа

 В результате проведенного исследования была предположена взаимосвязь между титрами микроорганизмов и наличием клинически значимого стеноза брахиоцефальных артерий.

# Глава 4. Заключение и выводы

### 4.1 Заключение

 В рамках исследования у 20 пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов был проведен осмотр полости рта и забор микробиологического материала с поверхности слизистой оболочки полости рта с последующим его анализом посредством ПЦР-реакции в режиме реального времени. При этом основная группа испытуемых включала в себя 10 человек, у которых наряду с диагнозом «атеросклероз коронарных артерий» был установлен диагноз «атеросклероз брахиоцефальных артерий». Группа контроля также включала в себя 10 человек, однако у пациентов отсутствовали признаки стеноза брахиоцефальных сосудов. Полученные данные были подвергнуты обработке и статистическому анализу.

 Среди пациентов насчитывалось 75% мужчин, 25% женщин. Преобладание мужчин объяснимо тем фактом, что мужской пол определяется как немодифицируемый фактор риска развития атеросклероза.

Средний возраст испытуемых составил 64,20 ± 1,93 года. Стоит отметить, что в настоящее время диагноз «атеросклероз» устанавливается после обращения в лечебно-профилактическое учреждения по поводу осложнений, которые, как правило, проявляются в старшем и пожилом возрасте, а в случае бессимптомного течения исследования для определения изменений в сосудистом русле не проводятся.

 У 90% наблюдаемых пациентов из обеих групп в качестве основного диагноза было поставлено «ИБС, стенокардия 2 функционального класса». Среди других определяемых кардиологических диагнозов были установлены: сердечная недостаточность 2 степени (у 30% пациентов), инфаркт миокарда в период с 2015 по 2018 гг. (у 25% пациентов), гипертоническая болезнь (у 15% испытуемых), фибрилляция предсердий (у 30%).

У 100% пациентов основной группы отмечался клинически значимый стеноз брахиоцефальных артерий.

 В ходе настоящего исследования у пациентов основной и контрольной группы определялся индекс КПУ. Для плановой госпитализации необходима санация полости рта, однако у 20% лиц, поступивших в кардиологическое отделение отмечались кариозные поражения, что обусловлено острым жизнеугрожающим состоянием на момент госпитализации и невозможностью проведения санации.

Среднее значение индекса КПУ для обеих групп составило 20,95 ± 1,17. Высокие значения рассматриваемого индекса можно объяснить тем фактом, что в ходе исследования наблюдались лица старшего и пожилого возраста, так как в настоящее время установлена прямая корреляция между возрастом человека и значением индекса КПУ [111]. Кроме того, значения индекса КПУ также взаимосвязаны со степенью стеноза каротидных артерий и могут способствовать определению тяжести атеросклеротических изменений [112]. В обеих группах наибольший вклад в конечное значение индекса привносил показатель «У» - удаленные зубы: в основной группе он был определён как 17,00 ± 3,91, в контрольной: 11,10 ± 3,43. Полученные результаты согласуются с современными данными литературы, в которых определяется сильная корреляция между числом отсутствующих зубов и развитием сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ишемической болезни сердца [113].

В ходе исследования определялись титры микроорганизмов – *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus.* Данные бактерии, так же как и *Porphyromonas endodontalis, Prevotella nigrescens,* рассматриваются как кардиоспецифические, так как не присутствуют нигде, за исключением полости рта и сердечно-сосудистой системы (в составе атеросклеротических бляшек).

 У двоих испытуемых (один – представитель основной группы, второй – контрольной) не было обнаружено ни одного из искомых микроорганизмов. При этом указанным пациентам был поставлен диагноз «полная вторичная адентия», что может определять полученные результаты. Данные научной литературы убедительно говорят о снижении титров, а также частоты обнаружения бактерий *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* у пациентов с полным отсутствием зубов [114].

 В ходе исследования ни у одного пациента не была выявлена бактерия *Campylobacter rectus*. Полученные результаты могут быть объяснены тем фактом, что указанный микроорганизм обнаруживается в над- и поддесневом зубном налёте, который в настоящем исследовании не изучался. Стоит также учитывать, что микроорганизмы могут проникать внутрь клеток эпителия слизистой оболочки, что обуславливает необходимость использования инвазивных методов забора материала в дальнейшем.

Несмотря на тот факт, что изучаемая выборка небольшая, сравнение титров наблюдаемых бактерий показало большие значения микроорганизма *Porphyromonas gingivalis* у пациентов основной группы, то есть у лиц с клинически значимым стенозом брахиоцефальных артерий, однако необходимы дальнейшие исследования.

### 4.2 Выводы

1. Изучение современной литературы показало, что на сегодняшний день представлено достаточное количество научных работ, посвященных проблематике влияния здоровья полости рта на развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Высокие титры патогенной микрофлоры являются риском развития атеросклероза, поэтому подход к прогнозированию его развития через стоматологические показатели является обоснованным и требует дальнейшего изучения.
2. Одним из наиболее часто используемых методов идентификации микроорганизмов является полимеразная цепная реакция, в частности ПЦР в «режиме реального времени», которая позволяет определить не только присутствие искомой последовательности ДНК в исследуемом образце, но и количественную её составляющую.
3. Осмотр полости рта у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и ПЦР-диагностика в режиме реального времени, направленная на идентификацию бактерий *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus,* определила отсутствие микроорганизма *Campylobacter rectus* как у пациентов, имеющих стеноз брахиоцефальных артерий, так и у пациентов без стеноза. В обеих группах бактерия *Porphyromonas gingivalis* определялась у 90% пациентов. *Prevotella intermedia* в основной группе была определена у 50% пациентов, в контрольной – у 30% испытуемых. У двоих пациентов (10%) не было обнаружено ни одного из искомых микроорганизмов.
4. Сравнение титров микроорганизмов показали наличие взаимосвязи между количеством пародонтопатогена *Porphyromonas gingivalis* и наличием клинически значимого стеноза брахиоцефальных артерий. Однако необходимы дальнейшие исследования с целью определения титров иных специфических бактерий: *Porphyromonas endodontalis, Prevotella nigrescens* а также применение инвазивных методик забора материала из полости рта.

### 4.3 Значимость исследования и практические рекомендации

 В настоящее время представлены убедительные доказательства того, что бактериальные агенты полости рта тесно связаны с развитием атеросклеротических изменений сосудистой стенки. Справедливо отмечено, что чем больше титр пародонтопатогенов, тем больше риск проникновения микроорганизмов в сосудистое русло и больше их влияние (прямое или опосредованное) на развитие сердечно-сосудистой патологии и возникновение осложнений.

 Так, в современной литературе отмечается повышенный риск возникновения острого инфаркта миокарда в случае присутствия в полости рта бактерий *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*.

Таким образом, определение титров кардиоспецифических микроорганизмов может быть использовано с целью прогнозирования возникновения сердечно-сосудистой патологии, оценки рисков развития осложнений. Однако в данной области требуются дальнейшие исследования, в частности с применением инвазивных методов диагностики.

Кроме того, при лечении пациентов с заболеваниями тканей пародонта стоит учитывать высокий риск наличия сопутствующей сердечно-сосудистой патологии (атеросклероза) и повышенного риска развития осложнений.

## Список использованной литературы

1. Vieira C.L.Z. The history of dentistry and medicine relationship: Could the mouth finally return to the body? / Vieira C.L.Z., Caramelli B. // Oral Diseases – 2009. – Т. 15 – № 8 – С.538–546.

2. Porter S.R. Oral manifestations of systemic disease / Porter S.R., Mercadante V., Fedele S. // Nature Publishing Group – 2017. – Т. 223 – № 9 – С.683–691.

3. Elad S. Oral mucosal changes associated with primary diseases in other body systems / Elad S., Zadik Y., Caton J.G., Epstein J.B. // Periodontology 2000 – 2019. – Т. 80 – № 1 – С.28–48.

4. Urse G.N. Systemic Disease Manifestations in the Oral Cavity / Urse G.N. // Osteopathic Family Physician – 2014. – Т. 6 – № 3 – С.16–21.

5. Pietiäinen M. Mediators between oral dysbiosis and cardiovascular diseases / Pietiäinen M., Liljestrand J.M., Kopra E., Pussinen P.J. // European Journal of Oral Sciences – 2018. – Т. 126 – № 9 – С.26–36.

6. Thasleema S.A. Association between atherosclerosis and periodontitis / Thasleema S.A., Don K.R. // Drug Invention Today – 2011. – Т. 11 – № 1 – С.717–724.

7. Катола В.М. Роль орального микробиома в развитии воспаления и соматической патологии / Катола В.М., Комогорцева В.Е. // Бюллетень физиологии и патологии дыхания – 2018. – Т. 68 – С.117–122.

8. Barrionuevo M.P.A. Periodontal health status and lung function in two Norwegian cohorts / Barrionuevo M.P.A., Real F.G., Igland J. et al. // PLoS ONE – 2018. – Т. 13 – № 1 – С.1–15.

9. Demmer R.T. Periodontal Bacteria and Prediabetes Prevalence in ORIGINS: The Oral Infections, Glucose Intolerance, and Insulin Resistance Study / Demmer R.T., Jacobs D.R., Singh R. et al. // Journal of Dental Research – 2015. – Т. 94 – № 6 – С.2015.

10. Kassebaum N.J. Global , Regional , and National Prevalence , Incidence , and Disability- Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries , 1990 – 2015 : A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases , Injuries , and Risk Factors / Kassebaum N.J., Smith A.G.C., Bernabé E. et al. // Journal of Dental Research – 2017. – Т. 96 – № 4 – С.380–387.

11. 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 / // The Lancet Global Health – 2017. – Т. 390 – С.1211–1259.

12. Marchi-Alves L.M. Characterization of Oral Microbiota in Removable Dental Prosthesis Users: Influence of Arterial Hypertension / Marchi-Alves L.M., Freitas D., Andrade D. de et al. // BioMed Research International – 2017. – Т. 2017 – С.1–7.

13. Елькова Н.Л. Результаты микробиологического исследования зубодесневых карманов у пациентов кардиологического профила / Елькова Н.Л., Зубкова А.А., Милова Е.В., Зубков В.В. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований – 2014. – Т. 6 – С.15–16.

14. Schulz S. Periodontal pathogens and their role in cardiovascular outcome / Schulz S., Reichert S., Schlitt A. et al. // Journal of Oral Microbiology – 2020. – Т. 9 – № 1 – С.173–181.

15. Yakob M. Prevotella nigrescens and Porphyromonas gingivalis are associated with signs of carotid atherosclerosis in subjects with and without periodontitis / Yakob M., Meurman J.H., Jogestrand T., Nowak J. // Journal of Periodontal research – 2011. – Т. 46 – № 6 – С.749–755.

16. Borgnakke W.S. IDF Diabetes Atlas : Diabetes and oral health – A two-way relationship of clinical importance / Borgnakke W.S. // Diabetes Research and Clinical Practice – 2019. – Т. 157 – С.1–19.

17. Yumoto H. The Pathogenic Factors from Oral Streptococci for Systemic Diseases / Yumoto H., Hirota K., Hirao K. et al. // International Journal of Molecular Science – 2019. – Т. 20 – № 45 – С.1–18.

18. Błochowiak K.J. Dental treatment and recommended management in patients at risk of infective endocarditis / Błochowiak K.J. // Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska – 2019. – Т. 16 – № 1 – С.37–41.

19. Misaki T. Presence of Streptococcus mutans strains harbouring the cnm gene correlates with dental caries status and IgA nephropathy conditions / Misaki T., Naka S., Hatakeyama R. et al. // Nature Publishing Group – 2016. – Т. 6 – С.1–9.

20. Костригина Е.Д. Современный взгляд на этиопатогенез пародонтита / Костригина Е.Д., Зюлькина Л.А., Иванов П.В. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион – 2017. – Т. 3 – № 43 – С.118–128.

21. Hajishengallis G. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement / Hajishengallis G., Liang S., Payne M.A. et al. // Cell Host and Microbe – 2011. – Т. 10 – № 5 – С.497–506.

22. Lamont R.J. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease / Lamont R.J., Hajishengallis G. // Trends in Molecular Medicine – 2015. – Т. 21 – № 3 – С.172–183.

23. Grenier D. Nutritional Interactions between Two Suspected Periodontopathogens , Treponema denticola bonllg Pi / Grenier D. // Infection and Immunity – 1992. – Т. 60 – № 12 – С.5298–5301.

24. Meuric V. Treponema denticola improves adhesive capacities of Porphyromonas gingivalis / Meuric V., Martin B., Guyodo H., Rouillon A. // Molecular Oral Microbiology – 2013. – Т. 28 – № 1 – С.40–53.

25. Li N. The modular structure of haemagglutinin/adhesin regions in gingipains of Porphyromonas gingivalis / Li N., Yun P., Jeffries C.M. et al. // Molecular Microbiology – 2011. – Т. 81 – № 5 – С.1358–1373.

26. Zhu Y. Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola Synergistic Polymicrobial Biofilm Development / Zhu Y., Dashper S.G., Chen Y. et al. // PLoS ONE – 2013. – Т. 8 – № 8 – С.1–8.

27. Zhu W. Surface interactions between two of the main periodontal pathogens: Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia / Zhu W., Lee S. // Journal of Periodontal and Implant Science – 2016. – Т. 46 – № 1 – С.2–9.

28. Lamont R.J. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions / Lamont R.J., Koo H., Hajishengallis G. // Nature Reviews Microbiology – 2018. – Т. 16 – № 12 – С.745–759.

29. Park J. Characterization of Fusobacterium nucleatum ATCC 23726 adhesins involved in strain-specific attachment to Porphyromonas gingivalis / Park J., Shokeen B., Haake S.K., Lux R. // International Journal of Oral Science – 2016. – Т. 8 – № 3 – С.138–144.

30. Li Y.-H. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms / Li Y.-H., Tian X. // Sensors – 2012. – Т. 12 – № 3 – С.2519–2538.

31. Wright C.J. Characterization of a bacterial tyrosine kinase in Porphyromonas gingivalis involved in polymicrobial synergy / Wright C.J., Xue P., Hirano T. et al. // MicrobiologyOpen – 2014. – Т. 3 – № 3 – С.383–394.

32. Chawla A. Community signalling between Streptococcus gordonii and Porphyromonas gingivalis is controlled by the transcriptional regulator CdhR / Chawla A., Hirano T., Bainbridge B.W. et al. // Molecular Microbiology – 2010. – Т. 78 – № 6 – С.1510–1522.

33. Kuboniwa M. Metabolic crosstalk regulates Porphyromonas gingivalis colonization and virulence during oral polymicrobial infection / Kuboniwa M., Houser J.R., Miller D.P. et al. // Nature Microbiology – 2017. – Т. 2 – № 11 – С.1493–1499.

34. Miller D.P. Transcriptome analysis of Porphyromonas gingivalis and Acinetobacter baumannii in polymicrobial communities / Miller D.P., Wang Q., Weinberg A. et al. // Molecular Oral Microbiology – 2018. – Т. 33 – № 5 – С.364–377.

35. Delaney C. Fungi at the Scene of the Crime : Innocent Bystanders or Accomplices in Oral Infections ? / Delaney C., Kean R., Short B. et al. // Current Cliinical Microbiology Reports – 2018. – Т. 5 – № 3 – С.190–200.

36. Bartnicka D. Adhesive protein-mediated cross- talk between Candida albicans and Porphyromonas gingivalis in dual species biofilm protects the anaerobic bacterium in unfavorable oxic environment / Bartnicka D., Karkowska-kuleta J., Zawrotniak M. et al. // Scientific Reports – 2019. – Т. 9 – № 1 – С.1–13.

37. Hillman J.D. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque / Hillman J.D., Socransky S.S., Shivers M. // Archives of Oral Biology – 1985. – Т. 30 – № 11–12 – С.791–795.

38. Hoogmoed G.. Van Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains / Hoogmoed G.. Van, Geertsema-doornbusch G.I., Teughels W. et al. // Oral Microbioligy and Immunology – 2008. – Т. 23 – С.43–48.

39. Herrero E.R. Antimicrobial effects of commensal oral species are regulated by environmental factors / Herrero E.R., Slomka V., Bernaerts K. et al. // Journal of Dentistry – 2016. – Т. 47 – С.23–33.

40. Suzuki N. Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis / Suzuki N., Yoneda M., Hirofuji T. // International Journal of Dentistry – 2013. – Т. 2013 – С.1–6.

41. Zhu B. Aggregatibacter actinomycetemcomitans mediates protection of Porphyromonas gingivalis from Streptococcus sanguinis hydrogen peroxide production in multi-species biofilms / Zhu B., Macleod L.C., Newsome E. et al. // Scientific Reports – 2019. – Т. 9 – № 1 – С.1–10.

42. Wu J. Role of Arginine Deiminase of Streptococcus cristatus in Porphyromonas gingivalis Colonization ᰔ / Wu J., Xie H. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy – 2010. – Т. 54 – № 11 – С.4694–4698.

43. Ho M.-H. Identification of Streptococcus cristatus peptides that repress expression of virulence genes in Porphyromonas gingivalis / Ho M.-H., Lamont R.J., Xie H. // Scientific Reports – 2017. – Т. 7 – № 1 – С.1–11.

44. Christopher A.B. A streptococcal effector protein that inhibits Porphyromonas gingivalis biofilm development Printed in Great Britain / Christopher A.B., Arndt A., Cugini C. et al. // Microbiology – 2010. – Т. 156 – № 11 – С.3469–3477.

45. Cugini C. Arginine deiminase inhibits Porphyromonas gingivalis surface attachment / Cugini C., Stephens D.N., Nguyen D. et al. // Microbiology – 2013. – Т. 159 – № 2 – С.275–285.

46. Ma S. Antagonistic effect of protein extracts from Streptococcus sanguinis on pathogenic bacteria and fungi of the oral cavity / Ma S., Li H.U.I., Yan C. et al. // Expeerimental and Therapeutic Medicine – 2014. – Т. 7 – № 6 – С.1486–1494.

47. Зорина О.А. Изучение влияния пародонтопротекторов на состояния пародонта в норме и при хроническом пародонтите / Зорина О.А., Венедиктова В.А., Прокопьев В.В., Амхадова М.А. // Стоматология для всех – 2016. – Т. 3 – С.34–39.

48. Zhao J. Antagonistic effects of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium adolescents on periodontalpathogens in vitro / Zhao J., LE, Feng X. et al. // Shanghai journal of stomatology – 2011. – Т. 20 – № 4 – С.364–367.

49. Wallace E.Periodontal disease: Diagnosis, management options and clinical features / E. Wallace – New York: Nova Science Publishers, 2016.– 1–126c.

50. Bartova J. Periodontitis as a Risk Factor of Atherosclerosis / Bartova J., Sommerova P., Lyuya-mi Y. et al. // Journal of Immunology Reserch – 2014. – Т. 2014 – С.1–9.

51. Tremaroli V. Oral microbiota in patients with atherosclerosis / Tremaroli V. // Atherosclerosis – 2015. – Т. 243 – № 2 – С.573–578.

52. Kannosh I. The presence of periopathogenic bacteria in subgingival and atherosclerotic plaques– An age related comparative analysis / Kannosh I., Staletovic D., Toljic B. et al. // Journal of Infection in Developing Countries – 2018. – Т. 12 – № 12 – С.1088–1095.

53. Fernandes C.P. Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease / Fernandes C.P., Oliveira F.A.F., Silva P.G.D.B. et al. // International Journal of Cardiology – 2014. – Т. 174 – № 3 – С.710–712.

54. Calandrini C.A. Microbial composition of atherosclerotic plaques / Calandrini C.A., Ribeiro A.C., Gonnelli A.C. et al. // Oral Diseases – 2014. – Т. 20 – № 3 – С.128–134.

55. Мережко О.Е. Микрофлора ротовой полости – один из этиологических факторов в патогенезе развития сердечно-сосудистой патологии / Мережко О.Е., Станишевская Н.Б. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета – 2016. – Т. 2 – № 58 – С.190–193.

56. Desvarieux M. Changes in clinical and microbiological periodontal profiles relate to progression of carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology study / Desvarieux M., Demmer R.T., Jacobs D.R. et al. // Journal of the American Heart Association – 2013. – Т. 2 – № 6 – С.1–10.

57. Ketabi M. The association between periodontal disease parameters and severity of atherosclerosis. / Ketabi M., Meybodi F.R., Asgari M.R. // Dental research journal – 2016. – Т. 13 – № 3 – С.250–5.

58. Olsen I. Update on bacteraemia related to dental procedures / Olsen I. // Transfusion and Apheresis Science – 2008. – Т. 39 – № 2 – С.173–178.

59. Beutler J. Bacteremia after professional mechanical plaque removal in patients with chronic periodontitis / Beutler J., Jentsch H.F.R., Rodloff A.C., Stingu C.-S. // Oral Diseases – 2019. – Т. 25 – № 4 – С.1185–1194.

60. Reyes L. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology / Reyes L., Herrera D., Kozarov E. et al. // Journal of Clinical Periodontology – 2013. – Т. 84 – № 4 – С.30–50.

61. Takeuchi H. Exit of intracellular Porphyromonas gingivalis from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway / Takeuchi H., Furuta N., Morisaki I., Amano A. // Cellular Microbiology – 2011. – Т. 13 – № January – С.677–691.

62. Gualtero D.F. Two-dimensional and three-dimensional models for studying atherosclerosis pathogenesis induced by periodontopathogenic microorganisms / Gualtero D.F., Lafaurie G.I., Fontanilla M.R. // Molecular Oral Microbiology – 2018. – Т. 33 – № 1 – С.29–37.

63. Serra E Silva Filho W. Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients / Serra E Silva Filho W., Casarin R.C.V., Nicolela E.L. et al. // PLoS ONE – 2014. – Т. 9 – № 10 – С.1–7.

64. Mesa F. Periodontitis, blood lipids and lipoproteins / Mesa F., Marfil- R., Nibali L. // Clinical Lipidology – 2014. – Т. 9 – № 2 – С.261–276.

65. Boillot A. Periodontal microbiota and phospholipases: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST) / Boillot A., Demmer R.T., Mallat Z. et al. // Atherosclerosis – 2015. – Т. 242 – № 2 – С.418–423.

66. Каминный А.И. Роль секреторной фосфолипазы А2 в развитии атеросклероза / Каминный А.И., Павлунина Т.О., Шувалова Ю.А., Коротаева А.А. // Атеросклероз и дислипидемии – 2012. – Т. 16 – С.63–65.

67. Залова Т.Б. Роль липопротеин-ассоциированнной фосфолипазы А2 в развитии сосудистого ремоделирования и атеросклероза магистральных артерий / Залова Т.Б. // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета – 2016. – Т. 16 – № 7 – С.89–91.

68. Liljestrand J.M. Lipopolysaccharide, a possible molecular mediator between periodontitis and coronary artery disease / Liljestrand J.M., Paju S., Buhlin K. et al. // Journal of Clinical Periodontology – 2017. – Т. 44 – № 8 – С.784–792.

69. Конев Ю.В. Эндотоксин (ЛПС) в патогенезе атеросклероза / Конев Ю.В., Лазебник Л.Б. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология – 2011. – Т. 11 – С.15–26.

70. Munford R.S. Endotoxemia — menace , marker , or mistake ? / Munford R.S. // Journal of Leukocyte Biology – 2016. – Т. 100 – С.687–698.

71. Ганковская Л.В. Роль белка теплового шока 70 в патогенезе сердечно-сосудистой патологии / Ганковская Л.В., Понасенко О.А., Свитич О.А. // Медицинская иммунология – 2019. – Т. 21 – № 2 – С.201–208.

72. Aarabi G. Roles of Oral Infections in the Pathomechanism of Atherosclerosis / Aarabi G., Heydecke G., Seedorf U. // International Journal of Molecular Science – 2018. – Т. 19 – № 7 – С.1–12.

73. Han S. The association between periodontitis and dyslipidemia according to smoking and harmful alcohol use in a representative sample of Korean adults / Han S., Yi Y.J., Bae K. – 2019. – Т. 24 – № 2 – С.937–944.

74. Roth G.A. Demographic and Epidemiologic Drivers of Global Cardiovascular Mortality / Roth G.A., Forouzanfar, Mohammad H., Moran A.E. et al. // The new England journal o f medicine – 2015. – Т. 372 – № 14 – С.1333–1341.

75. Миненко И.А. Диагностика и лечение атросклероза / Миненко И.А., Хайруллин Р.Н. // Вестник новых медицинских технологий – 2010. – Т. 17 – № 1 – С.52–54.

76. Кожевникова О.В. Факторы риска сердечно-сосудистой патологии у детей: свойства сосудов и атеросклероз / Кожевникова О.В., Смирнов И.Е. // Российский педиатрический журнал – 2015. – Т. 18 – № 4 – С.36–42.

77. Крючков Д.Ю. Пародонтит, как вероятный фактор риска прогрессирования атеросклероза / Крючков Д.Ю., Романенко И.Г., Крючкова О.Н. // Крымский терапевтический журнал – 2017. – Т. 3 – С.58–60.

78. Аронов Д.М. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза / Аронов Д.М., Лупанов В.П. // Атеросклероз и дислипидемии – 2011. – Т. 1 – С.48–56.

79. Raggi P. Role of in fl ammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions / Raggi P., Genest J., Giles J.T. et al. // Atherosclerosis – 2018. – Т. 276 – С.98–108.

80. Shah P.K. Inflammation , infection and atherosclerosis / Shah P.K. // Trends in Cardiovascular Medicine – 2019. – Т. 29 – № 8 – С.468–472.

81. Цибулькин Н.А. Воспалительные механизмы в патогенезе атеросклероза / Цибулькин Н.А., Тухватуллина Г.В., Цибулькина В.Н., Абдрахманова А.И. // Практическая медицина – 2016. – Т. 4 – № 96 – С.165–168.

82. Карпов А.М. Современные представления об иммуновопалительных механизмах атеросклероза / Карпов А.М., Рвачева А.В., Шогенова М.Х. // Атеросклероз и дислипидемии – 2014. – Т. 1 – С.25–30.

83. Grebe A. NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis / Grebe A., Hoss F., Latz E. // Circulation Researh – 2018. – Т. 122 – № 12 – С.1722–1740.

84. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis / Moriya J. // Journal of Cardiology – 2019. – Т. 73 – № 1 – С.22–27.

85. Slocum C. Immune dysregulation mediated by the oral microbiome : potential link to chronic inflammation and atherosclerosis / Slocum C., Kramer C., Genco C.A. // Journal of Internal Medicine – 2016. – Т. 280 – № 1 – С.114–128.

86. Шогенова М.Х. Роль окисленных липопротеинов низкой плотности и антител к ним в иммунно-воспалительном процессе при атеросклерозе / Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Карпов А.М. // Атеросклероз и дислипидемии – 2015. – Т. 2 – С.17–21.

87. Луста К.А. Роль гладкомышечных клеток сосудистой стенки в атерогенезе / Луста К.А., Орехов А.Н. // Клиническая и экспериментальная морфология – 2015. – Т. 2 – № 14 – С.50–61.

88. Chistiakov D.A. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis / Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y. V // Acta Physiologiga – 2015. – Т. 214 – № 2 – С.33–50.

89. Diagnosis U. Атеросклероз брахиоцефальных сосудов: классфикация, ультразвуковая диагностика, стандарты лечения / Diagnosis U., Approaches T. // Дальневосточный медицинский журнал – 2013. – Т. 43 – С.118–123.

90. Takedachi M. Hypoxia-inducible factor-1 a inhibits interleukin-6 and -8 production in gingival epithelial cells during hypoxia / Takedachi M., Iyama M., Sawada K. et al. // Journal of Periodontal research – 2017. – Т. 52 – № 1 – С.127–134.

91. Karbasi-afshar R. Helicobacter pylori Infection and Atherosclerosis : a Systematic Review / Karbasi-afshar R., Khedmat H., Izadi M. // Acta Med Iran – 2015. – Т. 53 – № 2 – С.78–88.

92. He C. Helicobacter pylori — An Infectious Risk Factor for Atherosclerosis ? / He C., Yang Z., Lu N. // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis – 2014. – Т. 21 – № 12 – С.1229–1242.

93. Jonsson A.L. Role of gut microbiota in atherosclerosis / Jonsson A.L., Bäckhed F. // Nature Publishing Group – 2017. – Т. 14 – № 2 – С.79–87.

94. Шептулин А.А. Инфекция Helicobacter pylori: что еще, кроме заболеваний желудка? / Шептулин А.А. // Клиническая медицина – 2014. – Т. 29 – № 2 – С.33–39.

95. Карпунина Н.С. Chlamydophila pneumoniae и атерогенез: свидетель или главный подозреваемый? / Карпунина Н.С., Туев А.В. // Кардиология – 2010. – Т. 4 – № 13 – С.252–257.

96. Mahendra J. Prevalence of eight putative periodontal pathogens in atherosclerotic plaque of coronary artery disease patients and comparing them with noncardiac subjects: A case-control study / Mahendra J., Mahendra L., Nagarajan A., Mathew K. // Indian Journal of Dental Research – 2015. – Т. 26 – № 2 – С.189–195.

97. Atarbashi-moghadam F. Periopathogens in atherosclerotic plaques of patients with both cardiovascular disease and chronic periodontitis / Atarbashi-moghadam F., Havaei S.R., Havaei S.A. // ARYA Atherosclerosis – 2018. – Т. 14 – № 2 – С.53–57.

98. Ohki T. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction / Ohki T., Itabashi Y., Kohno T., Yoshizawa A. // American Heart Journal – 2012. – Т. 163 – № 2 – С.164–167.

99. Reaction P.C. Detection of Periodontal Bacteria in Atheromatous Plaque by Nested / Reaction P.C., Antonio J., Marı J. // Journal of Periodontology – 2011. – Т. 82 – № 10 – С.1469–1477.

100. Marcelino S.L. Presence of periodontopathic bacteria in coronary arteries from patients with chronic periodontitis / Marcelino S.L., Jr E.G., Nakano V. et al. // Anaerobe – 2010. – Т. 16 – № 6 – С.629–632.

101. Surgery A. Differential Detection Rate of Periodontopathic Bacteria / Surgery A., Medical T., Vascular O., Clinic V. // Surgery Today – 2011. – Т. 41 – № 10 – С.1395–1400.

102. Kozarov V. Human Atherosclerotic Plaque Contains Viable Invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas / Kozarov V., Dorn Brian R., Shelburne Charles E. // Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology – 2005. – Т. 25 – С.17–18.

103. Припутневич Т.В. Масс-спектрометрия - новое слово в клинической микробиологии / Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. // Клиническая лабораторная диагностика – 2016. – Т. 61 – № 12 – С.842–848.

104. Бочарова Ю.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы) / Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. // Клиническая лабораторная диагностика – 2016. – Т. 61 – № 4 – С.249–256.

105. Орадова А.Ш. Полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике / Орадова А.Ш. // Вестник КазНМУ – 2013. – Т. 4 – № 1 – С.306–310.

106. Гильмиярова Ф.Н. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития / Гильмиярова Ф.Н., Колотьева И.А., Гусякова О.А., Сидорова И.Ф. // Ремедиум – 2017. – Т. 4 – № 154 – С.17–21.

107. Третьяк А.Т. Роль и место ДНК-диагностики в инфекционной клинике / Третьяк А.Т., Востокова Л.П., Чухловин А.Б. // Педиатр – 2013. – Т. 4 – № 4 – С.84–92.

108. Чемерис Д.А. ПЦР с отложенным горячим или задержанным) стартом / Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И. // Биомика – 2011. – Т. 2 – № 1 – С.1–8.

109. Сизикова Т.Е. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции / Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Маношкин А.В. // Клиническая лабораторная диагностика – 2013. – Т. 3 – С.41–44.

110. Гарафутдинов Р.Р. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. // Вестник Башкирского университета – 2012. – Т. 5 – С.59–67.

111. Цимбалистов А.В. Особенности стоматологического и соматического статуса пациентов пожилого и старческого возраста / Цимбалистов А.В., Михайлова Е.С., Пихур О.Л., Гончаренко Е.Т. // Вестник Санкт-Петербургского университета – 2006. – Т. 11 – № 4 – С.1–9.

112. Yu H. Association of Carotid Intima – media Thickness and Atherosclerotic Plaque with Periodontal Status / Yu H., Qi L.T., Liu L.S. et al. // Journal of de – 2014. – Т. 93 – № 8 – С.744–751.

113. Angelis F. De Influence of the oral status on cardiovascular diseases in an older Italian population / Angelis F. De, Basili S., Giovanni F. et. al // International Journal of Immunopathology and Pharmacology – 2018. – Т. 31 – С.1–7.

114. Waal Y.C.M. De Changes in oral microflora after full-mouth tooth extraction : a prospective cohort study / Waal Y.C.M. De, Winkel E.G., Raangs G.C. et al. // Journal of Clinical Periodontology – 2014. – Т. 41 – № 10 – С.981–989.