

О.О. Янушевич, В.Н. Царев, Е.Н. Николаева,  
И.П. Балмасова, Е.В. Ипполитов, Т.В. Царева,  
М.С. Подпорин, А.Г. Пономарева



Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова,  
Москва, Российская Федерация

# Первый отечественный опыт выявления ассоциации анаэробных бактерий *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis* молекулярно-биологическими методами при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (сравнительное исследование)

**Обоснование.** Повсеместное глобальное увеличение заболеваемости пародонитом и роль его возбудителей в коморбидной патологии и системных осложнениях определяют необходимость создания новых молекулярно-генетических систем для диагностики и использования методов метагеномного и биоинформационного анализа. **Цель исследования** — применение методов микробиологической генодиагностики и биоинформационного анализа для доказательства этиологической и прогностической роли ключевых пародонтопатогенов *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis*, характеризующих степень прогрессирования хронического пародонита и его ассоциации с системным патологическим процессом (сахарным диабетом 2 типа). **Методы.** Сравнительная оценка выявления ключевых пародонтопатогенных видов *P. gingivalis* и *F. alocis* у пациентов с хроническим пародонитом в возрасте от 35 до 65 лет (84 человека) с использованием ранее патентованной системы олигонуклеотидных праймеров у пациентов в четырех группах сравнения, различающихся по степени прогрессирования. У 69 пациентов (в том числе у 38 — с сахарным диабетом 2 типа, гликированный гемоглобин — более 6,0%) проводили 16S секвенирование и биоинформационный анализ. **Результаты.** Установлена более высокая частота выявления пародонтопатогенов у пациентов с выраженной тенденцией к прогрессированию (93 и 100% соответственно). Одновременное наличие *P. gingivalis* и *F. alocis* при хроническом пародоните степени В было отмечено в 20% случаев, а у степени С — в 93% случаев. Однако у здоровых одновременное наличие обоих пародонтопатогенов не отмечено. **Заключение.** Предложенный метод может быть использован для эффективного определения степени прогрессирования пародонита на основе определения олигонуклеотидных праймеров *P. gingivalis* и *F. alocis*, включая коморбидную патологию — пародонит и сахарный диабет 2 типа.

437

**Ключевые слова:** пародонит, сахарный диабет 2 типа, ПЦР, *P. gingivalis*, *F. alocis*, 16S секвенирование, биоинформационный анализ

**Для цитирования:** Янушевич О.О., Царев В.Н., Николаева Е.Н., Балмасова И.П., Ипполитов Е.В., Царева Т.В., Подпорин М.С., Пономарева А.Г. Первый отечественный опыт выявления ассоциации анаэробных бактерий *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis* молекулярно-биологическими методами при заболеваниях пародонта и коморбидной патологии (сравнительное исследование). Вестник РАМН. 2022;77(6):437–446. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn2262>

## Обоснование

Воспалительные заболевания пародонта представляют собой наиболее часто встречающуюся патологию: генерализованный пародонит — тяжелое поражение десен и подлежащих тканей пародонта, которое является шестым по распространенности заболеванием во всем мире среди взрослого работоспособного населения и вторым — среди патологий рта и челюстно-лицевой области после кариеса зубов [1]. Болезни пародонта имеют сложный этиопатогенез и возникают в результате сочетания целого ряда факторов, приводящих к разрушению пародонта, необратимой резорбции костной ткани и потере зубов [2]. Социально-медицинское значение проблемы заболеваний пародонта в последние годы значительно возросло, в том числе из-за увеличившейся частоты локализованного агрессивного пародонита, развивающегося в молодом возрасте. Проблема пародонита активно обсуждается на различных конгрессах, проводимых под эгидой ВОЗ, в связи с признанием того факта, что микробное поражение пародонта тесно связано с рядом системных заболе-

ваний и, возможно, играет важную роль в возникновении коморбидной патологии через иммуно-опосредованные механизмы патогенеза [3–5].

Вопрос о роли отдельных видов, входящих в состав орального микробиома, в развитии патологии рта, системном воспалении и возникновении осложнений (сердечно-сосудистой системы, сахарного диабета 2 типа, ревматоидного артрита) активно обсуждается на протяжении последних десятилетий как в зарубежной [3, 4], так и отечественной литературе [5–7]. Возникающие дискуссии связаны в первую очередь с тем, что данная группа вероятных возбудителей относится к облигатно-анаэробным и труднокультивируемым видам, которые сложны для выявления традиционными методами, а также существующими подходами к классификации [7–9].

Первоначально S.S. Socransky et al. в 1998 г. была предложена классификация, основанная на изучении степени частоты определения представителей микрофлоры в очаге воспаления — выделены соответственно «красный», «оранжевый» (наиболее агрессивные) и другие комплексы (в большей степени представляющие нормальную

и транзиторную микрофлору — «желтый», «зеленый», «фиолетовый»). В частности, к «красному» комплексу отнесены *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (по старой номенклатуре — *Bacteroides forsythus*), а также *Treponema denticola* [9]. Однако в настоящее время эта классификация имеет больше историческое значение, поскольку некоторые возбудители агрессивного пародонтита, например токсигенный серотип *b* актинобациллы *A. actinomycetemcomitans*, были описаны несколько позже [10]. Представители *A. actinomycetemcomitans* по данной классификации вообще относились к «зеленому» комплексу как представители нормальной микрофлоры, не продуцирующей лейкотоксин (т.е. нетоксигенные серотипы).

В отечественной литературе после I Съезда пародонтологов России, состоявшегося в 2005 г., впервые было введено понятие пародонтопатогенных бактерий I порядка, которые обладают сочетанием трех ведущих признаков, таких как вертикальная и горизонтальная передача от человека к человеку, способность к внутриклеточному паразитизму, а также токсигенность (имеется в виду прежде всего продукция экзотоксинов), в отличие от пародонтопатогенов II порядка, которые не имеют полного набора этих признаков. К пародонтопатогенным видам I порядка соответственно были отнесены три возбудителя — *P. gingivalis*, *T. forsythia* и *A. actinomycetemcomitans*, токсигенный серотип *b* [5, 6].

В настоящее время, хотя и признается полимикробная природа пародонтита, а воспалительный ответ организма человека на пародонтопатогенные бактерии считается решающим фактором в развитии и прогрессировании заболевания, исследователями введено понятие «ключевой пародонтопатоген», роль которого по всеобщему признанию отводится бактериям вида *P. gingivalis* из-за их способности модифицировать нормальный состав ми-

кробиоты полости рта до более патогенного, что ускоряет потерю костной массы и развитие системных эффектов [5, 8, 11]. Этот пародонтопатоген характеризуется использованием тактик, позволяющих ему ослаблять или обманывать иммунную систему хозяина вследствие обладания очень широким спектром факторов вирулентности, включая протеолитические ферменты (гингипаины), капсулу, эндотоксины, фимбрии, нуклеозиддифосфаткиназу, церамиды [8, 11, 12].

С внедрением технологий метагеномного анализа, секвенирования, масс-спектрометрии появился еще один претендент на роль ключевого пародонтопатогена — *Filifactor alocis* — грамположительная облигатно-анаэробная бактерия, которая трудно культивируется на искусственных питательных средах и встречается, согласно современным литературным данным, почти исключительно при наличии воспаления тканей пародонта [12]. Вместе с тем этот возбудитель обладает достаточной устойчивостью к оксидативному стрессу [13] и уникальным набором свойств, которые обеспечивают выраженную способность *F. alocis* к формированию микробных ассоциаций с *P. gingivalis* и рядом других пародонтопатогенов [14, 15].

Методы, используемые сегодня в клинической практике для диагностики заболеваний пародонта, не позволяют выявить начало воспаления и выделить пациентов, которые предрасположены к прогрессированию заболевания в будущем, а современные диагностические подходы основываются почти исключительно на клинической оценке стоматологического статуса.

В соответствии с последней международной классификацией заболеваний пародонта (2018 г.), поддержанной ВОЗ, принято выделять три степени прогрессирования: *A* — медленное прогрессирование (нет потери прикрепления десны в течение 5 лет); *B* — средняя скорость прогрессирования (за 5 лет потеря прикрепления

O.O. Yanushevich, V.N. Tsarev, E.N. Nikolaeva, I.P. Balmasova, E.V. Ippolitov,  
T.V. Tsareva, M.S. Podporin, A.G. Ponomareva

A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

## The First Domestic Experience of Detecting the Association of Anaerobic Bacteria *Filifactor Alocis* and *Porphyromonas Gingivalis* by Molecular Biological Methods in Periodontal Diseases and Comorbid Pathology (Comparative Research)

**Background.** The widespread global increase in the incidence of periodontitis and the role of its pathogens in comorbid pathology and systemic complications determines the need to create new molecular genetic systems for diagnosis and the use of metagenomic and bioinformatic analysis methods. **Aims** — to use methods of microbiological genodiagnosics and bioinformatic analysis to prove the etiological role of the key periodontal pathogens *Filifactor alocis* and *Porphyromonas gingivalis*, characterizing the degree of progression of chronic periodontitis, and its association with a systemic pathological process (type 2 diabetes mellitus). **Methods.** A comparative assessment of the identification of key periodontopathogenic species *P. gingivalis* and *F. alocis* in different forms of periodontitis according to the degree of progression (84 people) using a previously patented system of primers in patients in 4 comparison groups, differing in the degree of progression. 16S sequencing and bioinformatic analysis were performed in 69 patients (including 38 with type 2 diabetes mellitus). All nondiabetic patients were required to have HbA1c level 6.0%. **Results.** A higher frequency of detection of periodontal pathogens was established in patients of group C with a pronounced tendency to progression (93 and 100% respectively). The simultaneous presence of *P. gingivalis* and *F. alocis* in chronic periodontitis of grade B was noted in 20% of cases, and in grade C — in 93% of cases. **Conclusions.** The proposed method can be used to effectively determine the degree of periodontitis progression based on the determination of oligonucleotide primers of *P. gingivalis* and *F. alocis*, including comorbid pathology — periodontitis and type 2 diabetes mellitus.

**Keywords:** periodontitis, type 2 diabetes mellitus, PCR, *P. gingivalis*, *F. alocis*, 16S sequencing, bioinformatic analysis

**For citation:** Yanushevich OO, Tsarev VN, Nikolaeva EN, Balmasova IP, Ippolitov EV, Tsareva TV, Podporin MS, Ponomareva AG. The First Domestic Experience of Detecting the Association of Anaerobic Bacteria *Filifactor Alocis* and *Porphyromonas Gingivalis* by Molecular Biological Methods in Periodontal Diseases and Comorbid Pathology (Comparative Research). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(6):437–446. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn2262>

менее 2 мм); *C* — быстрая скорость прогрессирования (потеря прикрепления более 2 мм за 5 лет) [16, 17]. Такой клинический подход позволяет констатировать степень прогрессирования заболеваний пародонта, но не прогнозировать ее.

В последние годы перспективным для прогноза развития патологии пародонта, как и других инфекционных заболеваний, стали считать исследование микробиома зубодесневой борозды с обнаружением в ее составе бактерий — ключевых пародонтопатогенов *P. gingivalis* и *F. alocis*, в том числе с использованием моделирования микробной биопленки оральных симбионтов *in vitro* [18, 20, 21].

Наиболее перспективен с этой точки зрения молекулярно-генетический метод, позволяющий выявить фрагменты геномов нескольких видов пародонтопатогенов с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Эти молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики стали применяться в различных странах мира на рубеже XXI в. [22–24]. В 2015 г. вышла работа А. Al-Alimi et al. [25], в которой в состав большой группы пародонтопатогенов, тестируемых методом моноплексной, но не мультиплексной ПЦР в реальном времени, входили *P. gingivalis* и *F. alocis*.

В связи с этим мы предложили использовать идентификацию одновременно ДНК двух ключевых пародонтопатогенных бактерий *F. alocis* и *P. gingivalis* с помощью мультиплексной ПЦР, олигонуклеотидные праймеры и зонды которых имеют отличную от прототипа структуру, что сокращает время исследований и снижает трудозатраты при идентификации бактерий [26]. Кроме того, нами сделана попытка не только идентифицировать указанные виды бактерий при заболеваниях пародонта, но и, используя 16S секвенирование с последующим биоинформационным анализом, установить этиологическую роль этих бактерий при хроническом пародонтите, сочетающемся и не сочетающемся с системным патологическим процессом. В качестве примера системной патологии мы избрали компенсированный сахарный диабет 2 типа.

**Цель исследования** — применение методов микробиологической генодиагностики и биоинформационного анализа для подтверждения этиологической роли ключевых пародонтопатогенов *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis*, характеризующих степень прогрессирования хронического пародонтита и его ассоциации с системным патологическим процессом (сахарным диабетом 2 типа).

## Методы

### Дизайн исследования

**Критерии включения:** пациенты в возрасте от 35 до 65 лет с подтвержденным диагнозом «хронический генерализованный пародонтит», в том числе ассоциированный с сахарным диабетом 2 типа в фазе компенсации.

**Критерии исключения:** курящие пациенты, пациенты с другими видами коморбидной соматической патологии.

**Критерии невключения:** возрастные группы младше 35 и старше 65 лет, отсутствие подписанного информированного согласия на участие в исследовании.

**Гипотеза:** определение генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis* позволяет подтвердить их этиологическое и прогностическое значение в патологии пародонта, в том

числе при его сочетании с коморбидной патологией — сахарным диабетом 2 типа.

### Условия проведения

Исследование проводилось на базе ФГБУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова (МГМСУ им. А.И. Евдокимова) Минздрава России. Пациенты наблюдались сотрудниками кафедры пародонтологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова (зав. кафедрой — академик РАН, профессор О.О. Янушевич) на протяжении не менее 5 лет. Контрольную группу с интактным (здоровым) пародонтом формировали из пациентов, обращавшихся к стоматологу для проведения профилактической санации полости рта. Пациенты четвертой группы проходили лечение на базе кафедры эндокринологии и диабетологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова (заведующий кафедрой — д.м.н., профессор А.М. Мкртумян) и получали соответствующую консультацию стоматолога. Исследование биоматериала от пациентов проводили на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии и в лаборатории молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института (НИМСИ) МГМСУ им. А.И. Евдокимова (директор НИИ, зав. кафедрой — д.м.н., профессор В.Н. Царев).

### Продолжительность исследования

Исследование продолжалось с 2019 по 2022 г.

### Описание медицинского вмешательства

После объяснения методики диагностического исследования, возможных рисков и преимуществ включения в группу исследования пациенты подписывали соответствующие информированные согласия, а также согласие на персональную обработку данных. Биообразцы материала, взятые у пациентов, исследовали молекулярно-биологическими методами (ПЦР и метагеномное исследование) с последующим проведением биоинформационного анализа. Все исследования предшествовали проведению лечения пациентов. Лечебных мероприятий, отличных от принятого протокола стоматологического лечения пациентов, не проводили.

В исследование были включены 84 человека, которые обследованы методом мультиплексной ПЦР, в том числе 69 человек — методом 16S секвенирования.

### Объекты (участники) исследования

Для исследования методом мультиплексной ПЦР были сформированы четыре группы исследования: первая включала 15 пациентов, у которых хронический пародонтит имел среднюю скорость прогрессирования (степень *B*); в состав второй группы исследования входили 15 человек с хроническим пародонтитом быстрой скорости прогрессирования (степень *C*); третья группа служила контролем и содержала 16 условно здоровых людей, не страдающих хроническим пародонтитом (без признаков воспалительных изменений в тканях десны); четвертая группа (38 пациентов) включала пациентов, у которых пародонтит был ассоциирован с коморбидной патологией — сахарным диабетом 2 типа. Из состава групп исследования были полностью исключены курящие пациенты, поскольку курение способствует включению *F. alocis* в состав микробиома слизистой оболочки полости рта даже у субъектов без признаков заболеваний пародонта [19].

Группы обследуемых пациентов включали примерно равное число мужчин и женщин в возрасте 35–65 лет.

Стоматологический статус пациентов с хроническим пародонтитом оценивали в соответствии с рекомендациями Международной классификации заболеваний пародонта 2018 г. [17]. В качестве критериев для разграничения средней и быстрой (*B* и *C*) степеней прогрессирования заболевания при генерализованном характере поражения служили: *B* — потеря прикрепления (индекс CAL) за 5 лет менее 2 мм; *C* — потеря прикрепления за 5 лет 2 мм и более [16, 17].

### Исходы исследования

**Основной исход исследования.** Забор образцов биологического материала проводили утром натошак, исключая использование зубной щетки, антисептических растворов и прочих индивидуальных гигиенических средств. Из четырех наиболее четко клинически выраженных пародонтальных карманов (или зубодесневой борозды моляров при интактном пародонте) стоматологическими аппликаторами № 30 отбирали образцы биопленок, которые помещали в пробирки с крышкой (Eppendorf), содержащие 0,5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. ДНК выделяли методом ускоренной пробоподготовки с помощью коммерческого набора реагентов «Реалекс» (НПФ «Генлаб», Москва) согласно инструкции.

440

Для сочетанной идентификации *F. alocis* и *P. gingivalis* методом мультиплексной ПЦР на основе последовательностей, находящихся в составе генов 16S рРНК соответствующих бактерий и входящих в базу данных генетических последовательностей GenBank [27], на предварительном этапе исследования были синтезированы олигонуклеотидные праймеры, получены флуоресцентно меченные зонды для обнаружения в биологическом материале бактерий видов *F. alocis* и *P. gingivalis* и сформирован набор реагентов для воспроизведения мультиплексной ПЦР [26].

Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора CFX 96 (BioRad, США). Детекцию осуществляли по каналам ROX, HEX и Cy5. По каналу ROX идентифицировали образцы, содержащие ДНК *P. gingivalis*, по каналу HEX — ДНК *F. alocis* при наличии положительной реакции по каналу Cy5 (внутренний положительный контроль забора биологического материала — ДНК человека).

Для выделения из образцов поддесневой биопленки чистых культур анаэробов пародонтопатогенной группы использовали анаэроостаты Himedia Labs (Индия) с вакуум-насосом, обеспечивающим замену атмосферного воздуха на стандартную газовую смесь, включающую азот (N<sub>2</sub>) — 80%, углекислый газ (CO<sub>2</sub>) — 10% и водород (H<sub>2</sub>) — 10%. Посевы проводили на кровяном агаре, приготовленном на основе сердечно-мозгового агара со стандартными питательными добавками — геминном и менадином (Himedia Labs, Индия). Для культивирования *F. alocis* добавляли набор необходимых аминокислот — L-цистеин, аргинин. Моделирование адгезии ассоциации оральной микробиоты осуществляли в чашках Петри с сердечно-мозговым бульоном (с теми же питательными добавками) на подложке из метаметилакрилата («ВладМиВа», Россия) в орбитальном шейкер-инкубаторе ES-20 (BioSan, Латвия), совершающем качательные движения. В соответствии с патентованной методикой срок инкубации составлял 7 сут при температуре 37 °С в анаэробных условиях (микроанаэроостат) [21]. Оценку адгезированных клеток возбудителей (клинических изолятов), в том числе на начальном этапе формирования биопленки, проводи-

ли при окраске генцианвиолетом на исследовательском микроскопе с системой цифровой видеорегистрации Eclipse (Nikon, Япония).

### Анализ в подгруппах

По результатам проведенной мультиплексной ПЦР с разработанными олигонуклеотидными праймерами для выявления в биологическом материале представителей пародонтопатогенных видов *F. alocis* и *P. gingivalis* проводили сравнительный анализ по частоте положительных реакций с последующим построением ROC-кривых. Кроме того, для выявления соответствия между частотой встречаемости *F. alocis* и *P. gingivalis* и развитием системных эффектов болезней пародонта выполнялось секвенирование методом дробовика в трех группах исследования — у клинически здоровых людей, у пациентов с хроническим пародонтитом степени *C* и у пациентов с хроническим пародонтитом степени *C*, ассоциированным с коморбидной патологией — компенсированным сахарным диабетом 2 типа. У всех пациентов без сахарного диабета уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) был менее 6,0%.

### Метод регистрации исходов

Для выполнения исследований из образцов биологического материала в рамках каждой группы исследования готовили смешанные пулы ДНК, включающие равные молярные количества геномной ДНК каждого пациента. Смешанные пулы ДНК подвергались обогащению с помощью системы Nebnext в соответствии с инструкциями производителя. Далее осуществлялось ультразвуковое фрагментирование микробной ДНК с использованием системы Covaris S220 (США) и последующим определением размера фрагментов на биоанализаторе Agilent 2100 (США) согласно инструкции производителя. Следующим этапом служило секвенирование полированных образцов на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina) по инструкциям производителя.

### Этическая экспертиза

Состав исследуемых групп и план их обследования утверждены межвузовским этическим комитетом г. Москвы (протокол № 13-20 от 2019 г.), все участники исследования подписали информированное согласие на обработку персональных данных.

### Статистический анализ

Таксономический анализ данных, полученных при секвенировании гена 16S рибосомальной РНК в составе пулированных образцов с определением родовой принадлежности бактерий, входящих в состав микробиома, выполнялся с использованием биоинформационных систем QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology) [28] и SILVA [29]. Статистическая обработка полученных данных включала тест PERMANOVA для микробных сообществ [30] в сочетании с эволюционной моделью PhiLR [31] и выявлением биомаркеров отдельных групп исследования на основе множественной логистической регрессии.

## Результаты

### Основные результаты исследования

Первым фрагментом исследования являлось формирование базы данных из числа обследованных пациентов

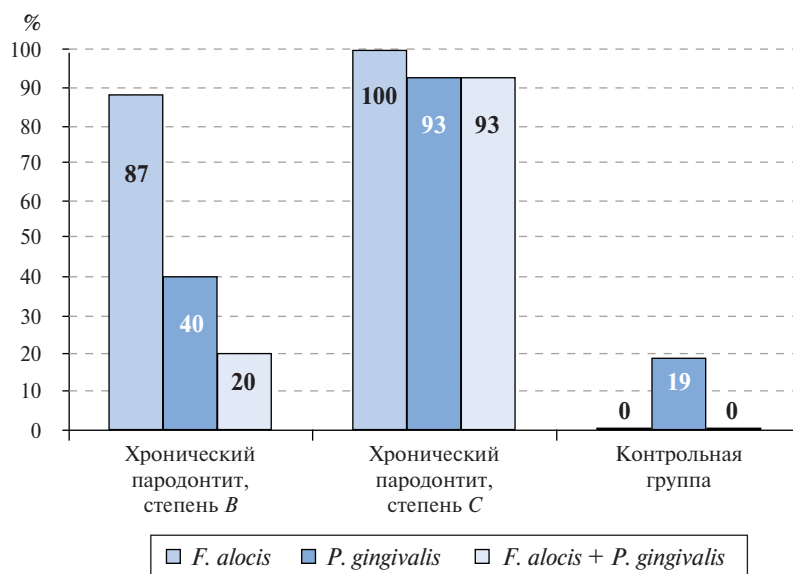


Рис. 1. Частота встречаемости *F. alocis*, *P. gingivalis* и ассоциации этих бактерий в группах больных хроническим пародонтитом и в контроле

групп сравнения по результатам проведения мультиплексной ПЦР. Частота встречаемости *F. alocis*, *P. gingivalis* и ассоциации этих бактерий в группах больных хроническим пародонтитом степеней B и C и в контроле представлены на рис. 1.

Частота обнаружения *F. alocis* при хроническом пародонтите степени B составила 87%, в то время как у здоровых людей эти бактерии не регистрировали. При хроническом пародонтите степени C наличие *F. alocis* было отмечено во всех случаях (100%). Частота встречаемости *P. gingivalis* при хроническом пародонтите степени B составляла 40% и была достоверно (в 2,2 раза) ниже, чем *F. alocis*. При хроническом пародонтите степени C частота регистрации *P. gingivalis* на уровне 93% статистически достоверно не отличалась от таковой для *F. alocis*. У здоровых людей *P. gingivalis* обнаруживались в 19% случаев, что было статистически достоверно ниже по сравнению с больными хроническим пародонтитом, в том числе сочетанным с сахарным диабетом 2 типа.

Особо следует подчеркнуть, что одновременное наличие *P. gingivalis* и *F. alocis* при хроническом пародонтите степени B было отмечено в 20% случаев, т.е. достоверно

реже (соответственно в 4,4 и в 2 раза), чем для каждого из тестируемых пародонтопатогенов в отдельности, хотя у больных хроническим пародонтитом степени C частота встречаемости обоих пародонтопатогенов при использовании мультиплексной ПЦР оставалась на том же высоком уровне — в 93% случаев. Не отмечено одновременного наличия обоих пародонтопатогенов у здоровых людей.

Таким образом, апробация оригинальных тест-систем для идентификации *P. gingivalis* и *F. alocis* методом мультиплексной ПЦР показала возможность их использования для дифференцированного подхода к диагностике хронического пародонтита степеней B и C.

Для подтверждения диагностического значения теста в каждом конкретном случае проводили построение ROC-кривых, характеризующих линейную регрессию между чувствительностью и специфичностью теста в первой и второй группах пациентов при сравнении с контролем. Результаты построения ROC-кривых с определением критерия их количественной оценки в виде площади под ROC-кривой (AUC) показаны на рис. 2.

Диагностическое значение определения *F. alocis* для оценки степени прогрессирования хронического па-

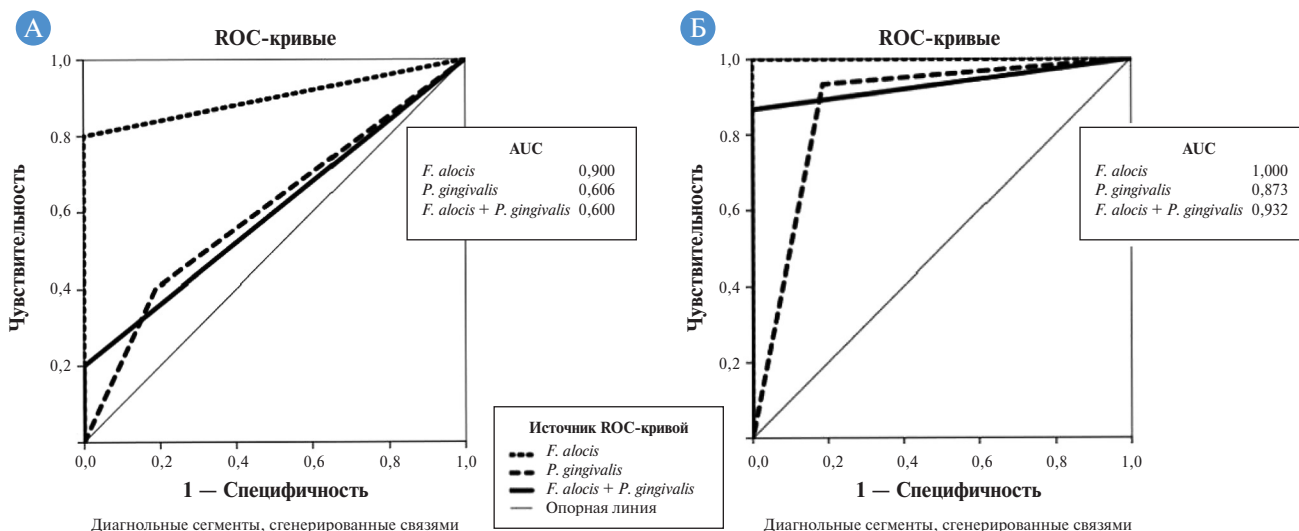


Рис. 2. ROC-кривые диагностической значимости результатов мультиплексной ПЦР при хроническом пародонтите степени B (А) и степени C (Б)

родонтита с помощью мультиплексной ПЦП по данным построения ROC-кривой, в отличие от *P. gingivalis*, было максимально высоким (AUC 0,9–1,0) независимо от быстроты прогрессирования хронического пародонтита.

Построение ROC-кривых для определения диагностической значимости обнаружения *P. gingivalis* в биологическом материале из зубодесневой борозды показало, что у больных хроническим пародонтитом степени В при сравнении с контролем величина AUC составляла 0,6, т.е. не соответствовала высокой диагностической значимости. При хроническом пародонтите степени С AUC в результате построения ROC-кривой по величине (0,873) соответствовала высокой диагностической значимости.

Наконец построение ROC-кривых для ассоциации *P. gingivalis* и *F. alocis* при хроническом пародонтите степени В в сравнении с контролем также не подтвердило высокой диагностической значимости (AUC = 0,6), а при хроническом пародонтите степени С AUC не только оценена как очень высокая (0,932), но и в условиях наших исследований была максимальной.

Учитывая практически неизученную способность *F. alocis* к развитию системных эффектов, сопутствующих заболеваниям пародонта, мы воспользовались данными 16S секвенирования. С использованием сочетания кластерного и регрессионного анализа в ходе биоинформационной обработки полученных данных выявлено шесть категорий дифференциальных межгрупповых признаков (балансов), позволяющих дифференцировать группы исследования, как это представлено в нижней части рис. 3. Наибольшую информативность проявляли баланс D, эффективно выявлявший различия между группой здоровых людей и пациентов с хроническим пародонтитом, и баланс F для сравнения групп пациентов с хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом 2 типа.

Подобный подход к биоинформационному анализу данных, полученных в ходе 16S секвенирования образцов микробной биопленки полости рта, позволил не только определить преобладающие виды пародонтопатогенов, но и установить степень их участия в формировании биопленки в разных клинических группах. Так, в группе здоровых лиц среди зарегистрированного набора пародонтопатогенов наиболее часто наблюдалось представительство бактерий рода *Fusobacterium*. В группе пациентов с хроническим пародонтитом эти бактерии в значительной степени вытеснялись представителями родов *Treponema*, *Mycoplasma* и особенно *Filifactor*. При ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом 2 типа опять происходило изменение в представительстве отдельных видов пародонтопатогенов и на первое место по уровню регистрации выходили бактерии родов *Porphyromonas* и *Prevotella*.

Представленная схема смены возбудителей по мере развития хронического генерализованного пародонтита и сопутствующих ему системных патологических процессов совершенно не исключает возможности вхождения бактерий других таксономических групп в состав микробиома при исследованных патологических состояниях. Тем не менее, поскольку в каждой клинической группе нами исследовалось от трех до четырех пулированных образцов материала из зубодесневой борозды и была отмечена повторяемость результатов, мы сочли вполне правомочным выдвижение гипотезы о возможности смены доминирующих представителей пародонтопатогенных бактерий, включающих представителей родов *Filifactor* и *Porphyromonas*, как при развитии, так и при изменении характера патологического процесса.

**Дополнительные результаты исследования**

Обсуждая таксономию нового пародонтопатогена, нужно отметить, что по старой номенклатуре *F. alocis*

442

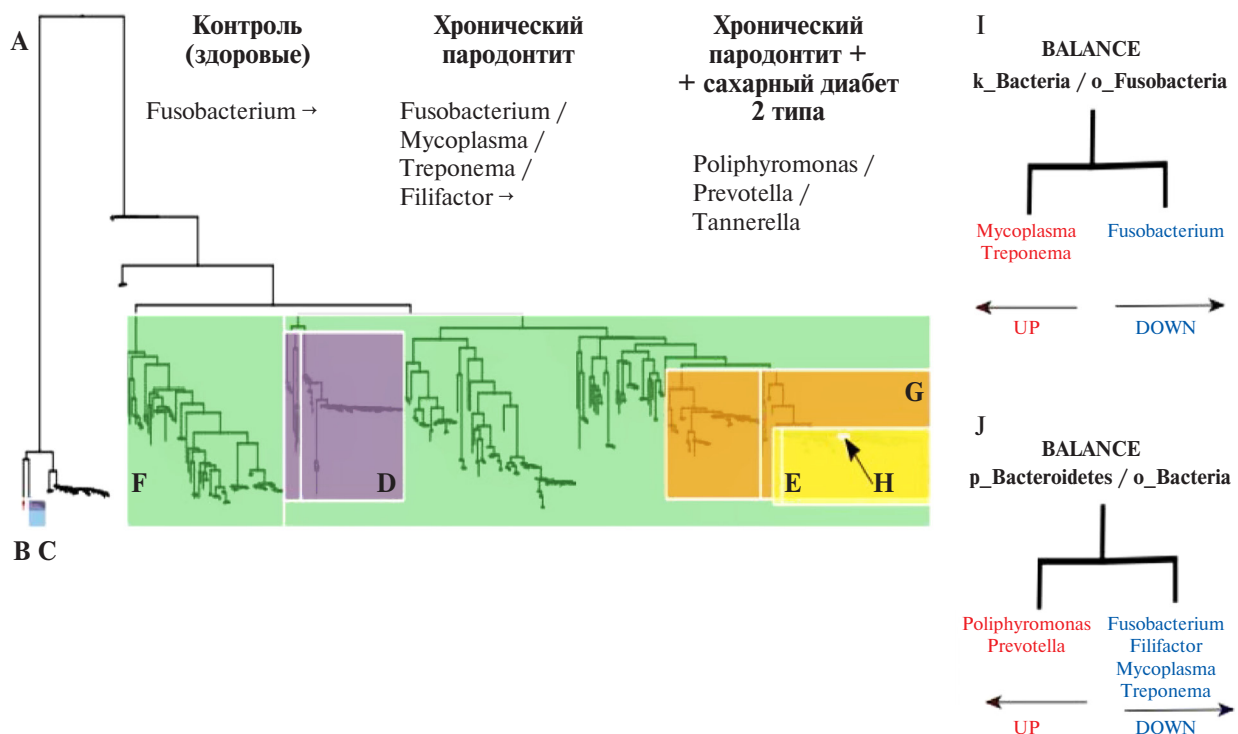


Рис. 3. Таксономические балансы микробиомов зубодесневой борозды при сравнении групп исследования



Рис. 4. *Filifactor alocis*. Мазок из чистой культуры. Увеличение  $\times 100$ , иммерсионный объектив. Окраска по Граму

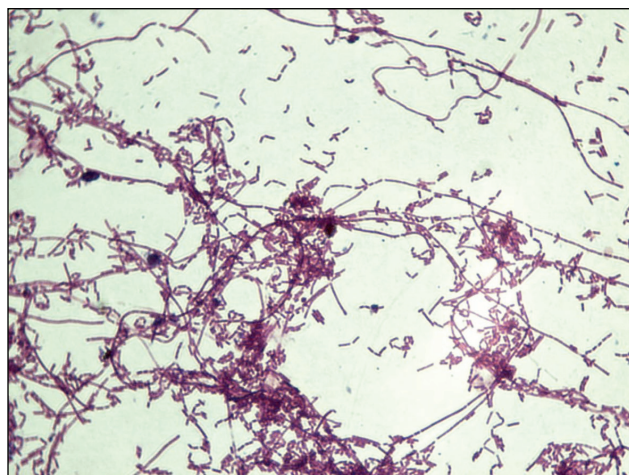


Рис. 5. *Filifactor alocis*. Моделирование биопленки (коагрегация с оральной микробиотой). Увеличение  $\times 100$ , иммерсионный объектив. Окраска — генцианвиолет

относили к роду фузобактерий (*Fusobacterium alocis*) [6], и, вероятно, поэтому он как филогенетически близкий симбионт подобно фузобактериям принимает активное участие в формировании каркаса поддесневой микробной биопленки, к которому далее прикрепляются другие виды пародонтопатогенных бактерий. Особого внимания заслуживает выявленная в некоторых первых исследованиях способность *F. alocis* формировать переплетающиеся нитевидные элементы, откуда и происходит его первоначальное название «производитель нитей десневой борозды» (лат.) [6, 13, 14].

В наших исследованиях при культивировании на 5%-м кровяном сердечно-мозговом агаре в анаэробных условиях с добавлением стимуляторов роста (L-цистеина, аргинина) *F. alocis* давал прозрачные, опалесцирующие, мелкие выпуклые колонии, микроскопически представленные нитевидными грамположительными формами (рис. 4). При моделировании трехвидовой микробной биопленки из представителей оральной микробиоты в биокультиваторе на метилметакрилатной подложке в сердечно-мозговом бульоне [21] мы наблюдали образование нитевидных структур, которые можно расценивать как основу формирования биопленки (рис. 5). При моделировании биопленки на стадии коагрегации при иммерсионном увеличении микроскопа определяются нити, образуемые *F. alocis*, и адгезированные элементы *Streptococcus sanguis*, *P. gingivalis*.

### Нежелательные явления

В процессе исследования нежелательных явлений в результате проводимых манипуляций, связанных со взятием биологического материала, у пациентов не отмечено.

### Обсуждение

Изучение микробиома организма человека и разработка современных методов исследования, в том числе молекулярно-биологических и биоинформационных, — актуальные проблемы современной медицинской науки [32, 33]. В условиях санкционного режима, проводимого США и странами Евросоюза, особую важность представляют разработка и внедрение в практику клинической лабораторной диагностики отечественных молекулярно-биологических диагностических систем [34].

В соответствии с целью настоящего исследования с использованием методов микробиологической генодиагностики мы проводили анализ возможной этиологической и прогностической роли генетических маркеров ключевых пародонтопатогенов *F. alocis* и *P. gingivalis* и оценку их взаимосвязи с системным патологическим процессом — сахарным диабетом 2 типа. Для идентификации в поддесневой биопленке указанных ключевых пародонтопатогенов, предположительно характеризующих степень прогрессирования пародонтита, особого обсуждения заслуживает как целесообразность выполнения этих исследований, так и возможность использования для этого предложенной авторами отечественной тест-системы для проведения мультиплексной ПЦР. Этиологическая роль *P. gingivalis* как ключевого пародонтопатогенного вида, способного модифицировать нормальный состав микробиоты полости рта до более агрессивного и участвовать в развитии системных эффектов заболеваний пародонта, в настоящее время сомнению не подвергается [2, 5, 7, 19].

Что касается патогенетического значения *F. alocis* как труднокультивируемого патогена, который относительно недавно был отнесен к пародонтопатогенным видам I порядка, то его значение в данном аспекте продолжает оставаться малоизученным. Вместе с тем в настоящее время известно, что обнаружение *F. alocis* в биоматериале поддесневой биопленки указывает на сильную корреляцию с заболеваниями пародонта и практически не регистрируется у здоровых людей [11, 35].

Вследствие выраженной протеазной активности и способности к участию в метаболизме аргинина *F. alocis* не только колонизирует пародонтальные ткани, но и непосредственно влияет на формирование сообщества пародонтопатогенных микроорганизмов [36]. При этом наиболее выраженный синергизм проявляется при взаимодействии *F. alocis* с ключевым пародонтопатогеном *P. gingivalis*, а сочетание этих возбудителей взаимно повышает инвазивные свойства и значительно усиливает процессы формирования биопленки в целом [18, 19], что и побудило нас к созданию праймеров и зондов для мультиплексной ПЦР на основе ассоциации названных пародонтопатогенов [26].

Кроме того, как подчеркивается в одной из публикаций последних лет Е. Аja et al. [37], *F. alocis* выступает новым важным компонентом микробиома пародонта,

и в авторы предлагают использовать его в качестве характерного маркера заболеваний пародонта. Однако из-за отсутствия генетических инструментов для изучения этого микроорганизма о его характеристиках вирулентности мало известно. Именно с этой точки зрения предлагаемая нами тест-система для генодиагностики заболеваний пародонта и подтверждение ее диагностической значимости открывают новые перспективы для исследования этой категории патологических состояний с выраженными системными эффектами.

Роль *P. gingivalis* в патогенезе широкого спектра системных патологических процессов изучена довольно хорошо [6, 7, 36], при этом как в клинике, так и в эксперименте подчеркивается роль этих бактерий в патогенезе сахарного диабета 2 типа и атеросклероза [38]. В то же время этиопатогенетическое значение *F. alocis*, особенно в развитии системных эффектов, в научной литературе описано весьма скудно [18, 37], в частности, на уровне образования внеклеточных везикул при ассоциации заболеваний пародонта и остеопороза [39]. Других указаний на роль *F. alocis* в развитии системных эффектов в настоящее время в доступной литературе мы не встретили.

В данном исследовании для определения взаимосвязи между изучаемыми ключевыми пародонтопатогенами и развитием системных эффектов было использовано 16S секвенирование с последующим биоинформационным анализом, который подтвердил, что развитие системной патологии в виде сахарного диабета 2 типа сопровождалось снижением значения бактерий рода *Filifactor* и возрастанием ключевой роли бактерий рода *Porphyromonas*.

#### Ограничения в исследовании

В настоящее время не вызывает сомнений, что существует взаимосвязь между заболеваниями пародонта и коморбидной патологией, в данном случае для пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом 2 типа. Однако возникает вопрос: насколько специфичны для системной патологии или, наоборот, универсальны эти мишени? Рабочая гипотеза состоит в том, что соответствие локальной и системной патологии несет в себе как общие закономерности, так и специфические признаки конкретной системной патологии, что в итоге определяет возможность прогнозирования развития основного заболевания. Проверка этой гипотезы на модели взаимосвязи пародонтопатогенных бактерий с сахарным диабетом 2 типа может быть детализирована для других пародонтопатогенных видов с применением использованных в нашем исследовании методик молекулярно-биологической диагностики.

#### Заключение

Одним из актуальных направлений пародонтологии и связанных с ней системных заболеваний является исследование этиологической роли ассоциации пародонтопатогенных бактерий *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis*. Полученные результаты позволяют обосновать

комплексный подход к использованию результатов микробиологических методов, включающих генодиагностику, 16S секвенирование и последующий биоинформационный анализ.

Расшифровка молекулярно-генетических механизмов взаимного влияния этих бактерий, оценка патогенетического и диагностического значения для формирования названной ассоциации требуют специального методического обеспечения. С этой целью нами предложена тест-система, предназначенная для идентификации *F. alocis* и *P. gingivalis* методом мультиплексной ПЦР, и показана ее диагностическая эффективность при хроническом пародонтите различной степени тяжести.

Параллельно методом 16S секвенирования с последующим биоинформационным анализом на модели хронического пародонтита, сочетанного с сахарным диабетом 2 типа, как системной коморбидной патологии показано, что представители рода *Filifactor* играют существенную этиологическую роль в развитии хронического пародонтита, но при ассоциации этого заболевания с системной патологией ведущая ключевая роль переходит к представителям рода *Porphyromonas*.

#### Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 056-00035-21-00 от 17 декабря 2020 г. Рукопись подготовлена и публикуется за счет финансирования по месту работы авторов. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк».

**Конфликт интересов.** Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

**Участие авторов.** О.О. Янушевич — дизайн исследования, организация групп пациентов и сбора биоматериала, прочтение и направление рукописи на публикацию (разделил ответственность за изложенные данные с коллективом авторов); В.Н. Царев — дизайн исследования, проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований биоматериала, анализ полученных данных, написание статьи; Е.Н. Николаева — проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований биоматериала, анализ полученных данных, написание статьи; И.П. Балмасова — проведение молекулярно-генетических исследований биоматериала, биоинформационный и статистический анализ, написание статьи; Е.В. Ипполитов — сбор биоматериала, пробоподготовка, анализ полученных данных; Т.В. Царева — сбор биоматериала, проведение молекулярно-генетических исследований биоматериала, биоинформационный анализ; М.С. Подпорин — сбор биоматериала, статистический анализ; А.Г. Пономарева — анализ результатов, прочтение и одобрение рукописи для публикации (разделила ответственность за изложенные данные с коллективом авторов). Все авторы внесли значимый вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию текста перед публикацией.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, et al. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: a call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456–462. doi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>
2. Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri K, et al. Prevalence of anaerobic bacteria (*P. gingivalis*) as major microbial agent in the incidence periodontal diseases by meta-analysis. *J Dent (Shiraz)*. 2018;19(3):232–242.



3. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30–44. doi: <https://doi.org/10.1038/nri3785>
4. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J*. 2019;42(1):27–35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
5. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии как основные факторы возникновения и развития пародонтита // *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии*. — 2017. — № 5. — С. 101–112. [Tsarev VN, Nikolaeva EN, Ippolitov EV. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *J microbiology, epidemiology, immunobiology*. 2017;5:101–112. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112>
6. Балмасова И.П., Царев В.Н., Янушевич О.О., и др. *Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов*. — М.: Практическая медицина, 2021. — 264 с. [Balmasova IP, Tsarev VN, Yanushevich OO, et al. *Microecology of periodontal disease. The relationship of local and systemic effects*. Moscow: Practical Medicine; 2021. 264 p. (In Russ.)]
7. Nikolaeva EN, Tsarev VN, Tsareva TV, et al. Interrelation of Cardiovascular Diseases with Anaerobic Bacteria of Subgingival Biofilm. *Contemp Clin Dent*. 2019;10(4):637–642. doi: [https://doi.org/10.4103/ccd.ccd\\_84\\_19](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_84_19)
8. Honda K. *Porphyromonas gingivalis* sinks teeth into the oral microbiota and periodontal disease. *Cell Host Microbe*. 2011;10(5):423–425. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.008>
9. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–144. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
10. Ahmed HJ, Svensson JA, Cope LD, et al. Prevalence of cdtABC genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Med Microbiol*. 2001;50(10):860–864. doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-10-860>
11. Hiranmayi KV, Sirisha K, Ramoji Rao MV, et al. Novel pathogens in periodontal microbiology. *J Pharm Bioallied Sci*. 2017;9(3):155–163. doi: [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_288\\_16](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_288_16)
12. Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci*. 2011;53(3):233–240. doi: <https://doi.org/10.2330/joralbiosci.53.233>
13. Moffatt CE, Whitmore SE, Griffen AL, et al. *Filifactor alocis* interactions with gingival epithelial cells. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(6):365–373. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2011.00624.x>
14. Aruni AW, Chioma O, Fletcher HM. *Filifactor alocis*: The newly discovered kid on the block with special talents. *J Dent Res*. 2014;93(8):725–732. doi: <https://doi.org/10.1177/0022034514538283>
15. Wang Q, Wright CJ, Dingming H, et al. Oral community interactions of *Filifactor alocis* in vitro. *PLoS One*. 2013;8(10):e76271. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076271>
16. Caton JG, Armitage G, Berglund T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions — Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018;89(Suppl 1):S1–S8. doi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
17. Graetz C, Mann L, Krois J, et al. Comparison of periodontitis patients' classification in the 2018 versus 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2019;46(9):908–917. doi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.13157>
18. Aruni AW, Mishra A, Dou Y, et al. *Filifactor alocis* — a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect*. 2015;17(7):517–530. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.03.011>
19. Aruni AW, Roy F, Fletcher HM. *Filifactor alocis* has virulence attributes that can enhance its persistence under oxidative stress conditions and mediate invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2011;79(10):3872–3886. doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.05631-11>
20. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57–80. doi: <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
21. Ипполитов Е.В., Царев В.Н., Арутюнов С.Д., и др. Способ формирования смешанной биопленки пародонтопатогенных анаэробных бактерий в условиях текучих сред *in vitro*. Патент С12N 1/20 (2006.01). Дата регистрации: 20.11.2015. Опубликовано: 12.05.2017. Бюл. № 14. [Ippolitov EV, Tsarev VN, Arutyunov SD, et al. Method for the formation of a mixed biofilm of periodontopathogenic anaerobic bacteria under fluid conditions *in vitro*. Patent C12N 1/20 (2006.01). Date of filing: 20.11.2015. Publ. 12.05.2017. Byull. No. 14. (In Russ.)]
22. Xiao S, Zhang T, Liu X, et al. Multiple PCR fast detecting method for oral cavity pathogen. Patent CN101270381A. Publ. 24.09.2008. Shuiqing Xiao, China.
23. Shin ES, Song KH. Primers and probes for detecting bacteria related to periodontal disease and method of detecting the same and use thereof. Patent KR20150129484A. Publ. 20.11.2015. Husteps Inc, Korea.
24. Gokyu M, Hamaide E, Ikeda Y, et al. Oligonucleotide set for detecting periodontal disease bacteria, and detection method of periodontal disease bacteria. Patent JP2016192950A. Publ. 17.11.2016. Dainippon Printing Co Ltd, Univ Tokyo Medical & Dental, Japan.
25. Al-Alimi A, Taiyeb-Ali T, Jaafar N, et al. Qat Chewing and Periodontal Pathogens in Health and Disease: Further Evidence for a Prebiotic-Like Effect. *Biomed Res Int*. 2015;2015:291305. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/291305>
26. Царев В.Н., Шеремет О.К., Николаева Е.Н., и др. Способ оценки прогрессирования хронического пародонтита и набор реагентов для его осуществления. Патент RU 2 777 783 C1. Опубликовано: 09.08.2022 [Tsarev VN, Sheremet OK, Nikolaeva EN, et al. Method for assessing the progression of chronic periodontitis and a set of reagents for its implementation. Patent RU 2 777 783 C1. Publ. 09.08.2022. (In Russ.)]
27. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):D36–D42. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
28. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–583. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
29. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D590–596. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
30. Tang ZZ, Chen G, Alekseyenko AV. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatics*. 2016;32(17):2618–2625. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw311>
31. Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods*. 2009;79(3):266–271. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.012>
32. Кузьмина Э.М., Янушевич О.О., Кузьмина И.Н. *Стоматологическая заболеваемость населения России. Эпидемиологическое стоматологическое обследование*. — М.: МГМСУ, 2019. — 304 с. [Kuzmina EM, Yanushevich OO, Kuzmina IN. *Dental morbidity of the Russian population. Epidemiological dental examination*. Moscow: MGMSU; 2019. 304 p. (In Russ.)].
33. Сухина М.А., Юдин С.М., Загайнова А.В., и др. Особенности микробиоты у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (проспективное исследование) // *Вестник РАМН*. — 2022. — Т. 77. — № 3. — С. 165–171. [Sukhina MA, Yudin SM, Zagainova AV, et al. Microbiota features in patients with inflammatory bowel diseases (prospective study). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(3):165–171. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1480>

34. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., и др. Состояние и тенденция развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения // *Клиническая лабораторная диагностика*. — 2015. — Т. 60. — № 8. — С. 61–65. [Dyatlov IA, Mironov AYU, Shepelin AP, et al. The state and trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015;60(8):61–65. (In Russ.)]
35. Schulz S, Porsch M, Grosse I, et al. Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects. *Arch Oral Biol*. 2019;99:169–176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.015>
36. Балмасова И.П., Царев В.Н., Арутюнов С.Д., и др. *Filifactor alocis* и его роль в этиологии хронического пародонтита // *Стоматология*. — 2020. — Т. 99. — № 3. — С. 78–82. [Balmasova IP, Tsarev VN, Arutyunov SD, et al. *Filifactor alocis* and its role in the etiology of chronic periodontitis. *Dentistry*. 2020;99(3):78–82. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.17116/stomat20209903178>
37. Aja E, Mishra A, Dou H, et al. Role of the Filifactor alocis hypothetical protein FA519 in oxidative stress resistance. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0121221. doi: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01212-21>
38. Soffientini U, Caridis AM, Dolan S, et al. Intracellular cholesterol transporters and modulation of hepatic lipid metabolism: Implications for diabetic dyslipidaemia and steatosis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1372–1382. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.07.002>
39. Kim HY, Song M-K, Gho YS, et al. Extracellular vesicles derived from the periodontal pathogen Filifactor alocis induce systemic bone loss through Toll-like receptor 2. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(12):e12157. doi: <https://doi.org/10.1002/jev2.12157>

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Царев Виктор Николаевич**, д.м.н., профессор [Viktor N. Tsarev, MD, PhD, Professor]; адрес: 127473, Москва, ул. Деlegatesкая, д. 20/1 [address: 20/1, Delegateskaya str., 127473, Moscow, Russia]; e-mail: nikola777@rambler.ru, SPIN-код: 8180-4941, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

**Янушевич Олег Олегович**, д.м.н., профессор, академик РАН [Oleg O. Yanushevich, MD, PhD, Professor, Academician of the RAS]; e-mail: rectorat.mgmsu@gmail.com, SPIN-код: 1452-1387, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0059-4980>

**Николаева Елена Николаевна**, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник [Elena N. Nikolaeva, MD, PhD, Professor, Chief Scientific Officer]; e-mail: el.nikolaeva@bk.ru, SPIN-код: 9150-4102, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7854-3262>

**Балмасова Ирина Петровна**, д.м.н., профессор [Irina P. Balmasova, MD, PhD, Professor]; e-mail: iri.balm@mail.ru, SPIN-код: 8025-8611, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

**Ипполитов Евгений Валерьевич**, д.м.н., профессор [Evgeny V. Ippolitov, MD, PhD, Professor]; e-mail: ippo@bk.ru, SPIN-код: 3002-7360, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

**Царева Татьяна Викторовна**, к.м.н., доцент [Tatiana V. Tsareva, MD, PhD, Assistant Professor]; e-mail: tancha-leo84@mail.ru, SPIN-код: 2028-8404, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

**Подпорин Михаил Сергеевич**, к.м.н., научный сотрудник [Mikhail S. Podporin, MD, PhD, Research Associate]; e-mail: podporin.mikhail@yandex.ru, SPIN-код: 1937-4996, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

**Пonomарева Анна Геннадиевна**, д.м.н., профессор [Anna G. Ponomareva, MD, PhD, Professor]; e-mail: lara12346@yandex.ru, SPIN-код: 3930-5307, ORCID: <https://orcid.org/0000-00012-2685-7235>