

КЛИНИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
CLINICAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337

Церамиды как биомаркеры хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом второго типа

К.Г. Унаньян¹, И.П. Балмасова², В.Н. Царев², А.М. Мкртумян²,
К.С. Эльбекьян³, К.Г. Каракоев³, С.Д. Арутюнов²

¹ Динская Центральная районная больница, Краснодар, Российская Федерация

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

³ Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Ассоциация хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 является одним из наиболее частых проявлений системных эффектов, этиологически связанных с пародонтопатогенными бактериями в составе биопленки зубодесневой борозды. В связи с этим исследование метаболических механизмов, приводящих к таким системным эффектам и служащих их маркерами, является актуальной проблемой. *Цель.* Исследование особенностей метаболизма сфинголипидов/церамидов, как продуцируемых этиологически значимой микрофлорой, так и присутствующих в тканях пародонта пациентов на примере ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2. *Материалы и методы.* Группы наблюдения включали 58 больных хроническим пародонтитом в ассоциации с сахарным диабетом типа 2, 39 больных хроническим пародонтитом без сопутствующей системной патологии, 27 условно здоровых людей. Всем обследованным проводились молекулярно-генетические исследования таксономического и метаболического профилей микробиоты зубодесневой борозды / пародонтальных карманов с использованием 16S секвенирования и оценка в слюне фосфорилированных церамидов по активности фермента церамид киназы. *Результаты.* Было установлено, что при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 имеются особенности таксономического состава микробиоты зубодесневой борозды/пародонтальных карманов, которые сочетаются со снижением метаболизма сфинголипидов. Кроме того, у этих больных в зависимости от длительности сахарного диабета отмечено нарастающее падение в слюне церамид киназы, определяющей фосфорилирование сфинголипидов/церамидов. *Заключение.* При ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 системные эффекты микробиоты зубодесневой борозды / пародонтальных карманов проявляются снижением метаболизма сфинголипидов, обусловленных в том числе снижением церамид киназы в тканях пародонта, что может служить маркером сочетанного патологического процесса.

Ключевые слова: хронический пародонтит, сахарный диабет типа 2, микробиота, сфинголипиды, церамиды, церамид киназа

© Унаньян К.Г., Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М., Эльбекьян К.С., Каракоев К.Г., Арутюнов С.Д., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Вклад авторов: Унаньян К.Г. – сбор и статистическая обработка клинического материала, оформление и интерпретация результатов; Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М. – анализ данных литературы по проблеме, обсуждение результатов исследования; Эльбекьян К.С., Караков К.Г. – организация и выполнение лабораторных исследований, их оценка; Арутюнов С.Д. – планирование исследований, оформление и интерпретация результатов.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют, что исследование проводилось в отсутствие каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов

Благодарности. Авторы выражают большую благодарность сотрудникам Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России (Москва) за выполнение метагеномного анализа.

Поступила 20.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Унаньян К.Г., Балмасова И.П., Царев В.Н., Мкртумян А.М., Эльбекьян К.С., Караков К.Г., Арутюнов С.Д. Церамиды как биомаркеры хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом второго типа // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 325–337. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337

Ceramids as biomarkers of chronic periodontitis associated with type 2 diabetes

K.G. Unanyan¹, I.P. Balmasova², V.N. Tsarev², A.M. Mkrtyumyan²,
K.S. Elbekyan³, K.G. Karakov³, S.D. Arutyunov²

¹ Dinskaya Central District Hospital, Krasnodar, Russian Federation

² A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
Moscow, Russian Federation

³ Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Annotation. Relevance. The association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus is one of the most frequent manifestations of systemic effects that are etiologically associated with periodontopathogenic bacteria in the biofilm of the gingival sulcus. In this regard, the study of the metabolic mechanisms leading to such systemic effects and serving their markers is an urgent problem. **Aim.** Study of the features of sphingolipid/ceramide metabolism, both produced by etiologically significant microflora, and present in periodontal tissues of patients on the example of the association of chronic periodontitis with type 2 diabetes. **Materials and methods.** The observation groups included 58 patients with chronic periodontitis in association with type 2 diabetes, 39 patients with chronic periodontitis without concomitant systemic pathology, and 27 conditionally healthy people. All the examined patients underwent molecular genetic studies of the taxonomic and metabolic profiles of the dental sulcus/periodontal pockets microbiota using 16S sequencing and evaluation of phosphorylated ceramides in saliva by the activity of the ceramid kinase enzyme. **Results.** It was found that in the Association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus, there are features of the taxonomic composition of the dental sulcus/periodontal pockets microbiota, which are combined with a decrease in sphingolipid metabolism. In addition, in these patients, depending on the duration of diabetes mellitus, there was an increasing drop in the saliva of ceramid kinase, which determines the phosphorylation of sphingolipids/ceramides. **Conclusion.** In the Association of chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus, the systemic effects of the dental sulcus/periodontal pockets microbiota are manifested by a decrease in sphingolipid metabolism, including a decrease in ceramid kinase in periodontal tissues, which can serve as a marker of the combined pathological process.

Key words: chronic periodontitis, type 2 diabetes mellitus, microbiota, sphingolipids, ceramides, ceramid kinase

Author contributions: Unanyan K.G. – collection and statistical processing of clinical material, design and interpretation of results; Balmasova I.P., Tsarev V.N., Mkrtumyan A.M. – analysis of literature data on the problem, discussion of research results; Elbekyan K.S., Karakov K.G. – organization and execution of laboratory studies, their evaluation; Arutyunov S.D. – research planning, design and interpretation of results.

Conflict of interest statement. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments. The authors express great gratitude to the staff of the Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine of Federal Medical and Biological Agency of Russia (Moscow) for metagenomic analysis performing.

Received 20.08.2020. 2020. Accepted 11.09.2020.

For citation: Unanyan K.G., Balmasova I.P., Tsarev V.N., Mkrtumyan A.M., Elbekyan K.S., Karakov K.G., Arutyunov S.D. Ceramids as biomarkers of chronic periodontitis associated with type 2 diabetes mellitus. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):325–337. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-325-337

Введение

Заболевания пародонта – это, в основном, хронические инфекционные заболевания, возникающие в результате реакции на микробиом зубного налета, содержащий различные виды пародонтопатогенных бактерий. Эти заболевания имеют сложный этиопатогенез и возникают в результате сочетания целого ряда факторов, приводящих к разрушению пародонта, необратимой резорбции костной ткани и потере зубов [1]. Заболевания пародонта – одни из наиболее часто встречающихся патологических состояний: в процентном отношении распространенность заболеваний пародонта в мировом масштабе составляет в среднем 94,3 % [2].

Помимо того, что заболевания пародонта оказывают большое влияние на здоровье населения в силу их распространенности, они связаны с рядом системных заболеваний [3], включая сахарный диабет [4], сердечно-сосудистые заболевания, в том числе атеросклероз [5], ревматоидный артрит [6], исходы беременности [7] и многие другие.

Большинство авторов признает, что ведущее значение в этиологии поражения околозубных тканей выполняют грамотрицательные анаэробные бактерии, к числу которых, в частности, причисляют *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas*

endodontalis и другие [8]. Каждый из указанных микроорганизмов обладает уникальным набором факторов вирулентности, сочетание которых обеспечивает синергизм пародонтопатогенного эффекта формирующихся микробных ассоциаций [9].

Гораздо менее изученной проблемой является роль пародонтопатогенной микрофлоры и сопутствующих им бактерий в развитии системных эффектов, в частности, при сочетании заболеваний пародонта с сахарным диабетом 2-го типа.

Сахарный диабет относится к категории широко распространенных метаболических патологических процессов. Это довольно сложное и неоднозначное по этиопатогенезу заболевание возникает либо в связи с неспособностью β -клеток поджелудочной железы вырабатывать инсулин либо из-за развития устойчивости клеток периферических тканей к инсулину. Диабет типа 2 (инсулинонезависимый), составляющий 90 % среди всех больных сахарным диабетом, характеризуется относительной гиперинсулинемией и вызван устойчивостью клеток к инсулину [10].

По мнению современных исследователей, в основе патогенеза сахарного диабета лежат четыре ведущих механизма – гипергликемия, резистентность клеток к инсулину, гиперлипидемия, иммунные дисфункции [11]. Указанные механизмы, проявляющиеся на местном уровне, лежат в основе патогенеза и хронического пародонтита, в соответствии

с чем в последние годы появилось довольно много свидетельств того, что не только сахарный диабет влияет на развитие пародонтита, но и заболевания пародонта могут оказывать воздействие на развитие и течение сахарного диабета [12], в том числе через пародонтопатогенную микрофлору.

В этом контексте особое значение придается липидным компонентам пародонтопатогенов, в частности, сфинголипидам. Сфинголипиды – это класс липидов, относящихся к производным алифатических аминокислот. Наиболее простыми сфинголипидами являются церамиды, которые содержат в своем составе сфингозин и жирную кислоту [13].

К настоящему времени известно, что фосфорилированные дигидроцерамиды пародонтопатогенов, в частности, *P. gingivalis*, способствуют провоспалительным реакциям и морфологическим изменениям фибробластов [14] и содержатся в образцах десневой ткани с клиническими проявлениями пародонтита. Фосфорилированные дигидроцерамиды *P. gingivalis* способны к взаимодействию с Toll-подобный рецептором 2 (TLR2) и стимулируют секрецию дендритными клетками интерлейкина-6 [15], ингибируют функции остеобластов и отложение минералов в костной ткани *in vivo* и *in vitro* [16]. Показано также, что отсутствие синтеза сфинголипидов у *P. gingivalis* снижает экспрессию таких факторов вирулентности этих бактерий, как гингипаины и капсула [17]. Сфинголипиды участвуют в процессах внутриклеточной инвазии пародонтопатогенов, способствуют их выживанию внутри клеток человека и дальнейшему распространению по организму, обеспечивая системные эффекты [18]. При этом фосфорилированные дигидроцерамиды бактерий, образующиеся под влиянием церамид киназы, могут восстанавливаться, попадая в ткани человека [19].

В тканях человека сфинголипиды/церамиды могут реализовать многие системные эффекты. В частности, отмечено участие церамидов в апоптозе β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы и их роль в формировании резистентности к инсулину и патогенезе сахарного диабета 2-го типа [20]. Воздействуя на макрофаги, фосфорилированные с участием церамид киназы церамиды оказывают антиапоптотический эффект и подавляют воспалительные реакции [21].

Таким образом, сфинголипиды/церамиды пародонтопатогенов играют огромную роль в становлении вирулентности этих бактерий и в принципе могут способствовать проявлению не только местных (в пародонтальных тканях), но и системных эффектов, хотя детали такой взаимосвязи пока не ясны. В связи с этим целью данной работы служило исследование особенностей метаболизма сфинголипидов/церамидов, как продуцируемых этиологически значимой микрофлорой, так и присутствующих в тканях пародонта пациентов на примере ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2.

Материалы и методы

Клинический материал включал 124 человека, которые составили 3 группы исследования – основную группу, группу сравнения и контрольную группу. В основную группу входили 58 пациентов с ассоциацией хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2; группа сравнения состояла из 39 больных хроническим пародонтитом без сопутствующей соматической патологии; контрольная группа содержала 27 человек без признаков хронического пародонтита с санированной ротовой полостью. Во всех группах преобладали женщины, все обследованные пациенты были в возрасте от 45 до 70 лет.

У всех обследованных людей было получено информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). При этом проводились молекулярно-генетические исследования микробиоты зубодесневой борозды/ пародонтальных карманов и оценка в слюне фосфорилированных церамидов по активности фермента церамид киназы.

Количественную оценку содержания в биоматериале из пародонтальных карманов/зубодесневой борозды бактерий, принадлежащих к родам *Porphyromonas* и *Sphingobacteria*, проводили с использованием набора «Дентоскрин» производства ООО НПФ Литех согласно протоколу производителя.

Для выполнения метагеномного анализа тотальную бактериальную ДНК из образцов выделяли с использованием QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) согласно инструкциям производителя. Образцы ДНК для 16S секвенирования методом дробовика готовились путем пулирования геномной ДНК образцов внутри каждой группы исследования, взятых в эквимольных количествах. Для обогащения геномной ДНК микробов каждого пула использовались комплекты для обогащения ДНК микробиома Nebnext в соответствии с инструкциями производителя. Для проведения таксономического анализа результатов секвенирования переменных участков гена 16S рРНК была применена биоинформационная платформа микробиома QIIME2 (Quantitative Insights into Microbial Ecology) [22] и база данных SILVA [23]. Для выявления статистических различий между группами на уровне метаболических путей применяли статистический анализ метаболических профилей STAMP [24] и балансы дендрограммы (CoDa dendrogram) [25].

Количественное определение церамид киназы в слюне проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием микропланшетного ридера «Дупех MRX II» (Dyplex technologies, USA) в соответствии с инструкцией по применению прибора и тест-систем.

Результаты и обсуждение

При анализе данных секвенирования 16S гена малой субъединицы рибосомальной РНК было обнаружено 60 бактериальных родов в пулированных образцах всех трех групп исследования. Пулированные (смешанные) образцы использовались с учетом группы, к которой принадлежали обследованные, чтобы обеспечить необходимое для метагеномного анализа (методом дробовика) количество бактериальной ДНК в изучаемой пробе.

Для выяснения роли пародонтопатогенной микрофлоры в составе микробиоты пародонтальных карманов при хроническом пародонтите и зубодесневой борозды у здоровых людей, прежде всего, определялось распределением этих родов бактерий в группах исследования. Для этой цели использовался поэтапный биоинформационный анализ, как это показано на рисунке 1. Для построения модели таксономических различий между группами исследования использовались так называемые балансы дендрограммы (CoDa dendrogram). Эта модель описывает интенсивность таксономических изменений при перемещении профилей метагеномов от здорового состояния к хроническому пародонтиту и далее к хроническому пародонтиту, ассоциированному с сахарным диабетом типа 2.

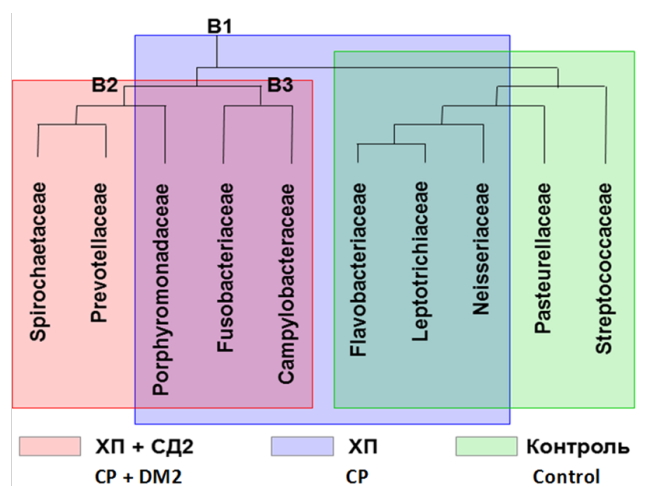


Рис. 1. Балансы дендрограммы преимущественного таксономического состава микробиоты в группах исследования
Fig. 1. CoDa dendrograms of the predominant taxonomic composition of the microbiota in the study groups

Как следует из дендрограммы, из всего многообразия семейств бактерий, обитающих в полости рта и входящих в состав биопленки пародонтальных карманов / зубодесневой борозды, наибольшее представительство приходится на 10 семейств, которые регистрировались во всех случаях, но с разной частотой встречаемости в группах. Баланс В1 позволяет довольно четко разграничивать состав микробиомов группы здоровых людей и больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2.

Так, группа хронического пародонтита в ассоциации сахарного диабета типа 2 связана с относительным ростом представительства 5 бактериальных семейств: *Campylobacteraceae*, *Fusobacteriaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* и *Spirochaetaceae*, а относительное содержание бактерий семейств *Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae*, *Neisseriaceae*, *Flavobacteriaceae* и *Leptotrichiaceae* уменьшалось. В то же время здоровое состояние (контрольная группа) характеризовалось прямо противоположным образом.

Интересно, что группа хронического пародонтита без сопутствующей системной патологии занимала пограничное положение между двумя другими группами. Кроме того, балансы В2 и В3 показывают, что семейства бактерий *Prevotellaceae* (в него входит *Prevotella intermedia*) и *Spirochaetaceae* (входит *Treponema denticola*) больше связаны с группой хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, чем с группой только хронического пародонтита, а семейства *Porphyromonadaceae* (включает пародонтопатогены *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*), *Fusobacteriaceae* (*Fusobacterium nucleatum*), *Campylobacteraceae* с большей частотой отмечены при хроническом пародонтите без сопутствующей патологии.

Как показывает рисунок 2, таксономические различия в метагеномах разных групп исследования были ассоциированы с различиями в функциональном (метаболическом) потенциале микробных сообществ.

Оценка результатов, полученных в результате определения состояния метаболических реакций в пародонте с участием микробиома, проводилась в сравнительном аспекте: путем сопоставления групп «хронический пародонтит – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – контроль», «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2 – хронический пародонтит».

При сравнении групп «хронический пародонтит – контроль» основные различия касались обмена аминокислот и энергетического обмена. В группе хронического пародонтита был снижен уровень обмена таких аминокислот, как цистеин, метионин (ko00270), гистидин (ko00340), а также наблюдалось относительное снижение роли метаболических путей серы (ko00920) и глицеролипидов (ko00561).

Группа хронического пародонтита в сочетании с сахарным диабетом типа 2 и контрольная группа различаются по гораздо большему числу метаболических признаков, причем совершенно иных, чем выявленных при предыдущем сопоставлении. Единственный признак, который отличает от контроля наличие хронического пародонтита вне зависимости от сопутствующей патологии – это снижение метаболизма глицеролипидов. Этот результат показывает, что метаболизм микробиома при хроническом пародонтите, ассоциированном с сахарным диабетом типа 2, принципиально отличается от метаболизма микробиома в отсутствие сопутствующей патологии.

Наиболее отчетливо эти особенности регистрируются при сравнении двух групп хронического пародонтита между собой. Были выявлены 5 метаболических путей, по которым отмечалось подобное различие. Группа «хронический пародонтит + сахарный диабет типа 2» характеризовалась повышенным метаболизмом цистеина и метионина (ko00270) и снижением метаболизма пиримидина (ko00240), метаболизма метана (ko00680), биосинтеза жирных кислот (ko00061) и метаболизма сфинголипидов (ko00600). Такой признак, как снижение метаболизма, присущего стафилококковой инфекции, в данном случае не рассматривается нами как не связанный с этиологией хронического пародонтита.

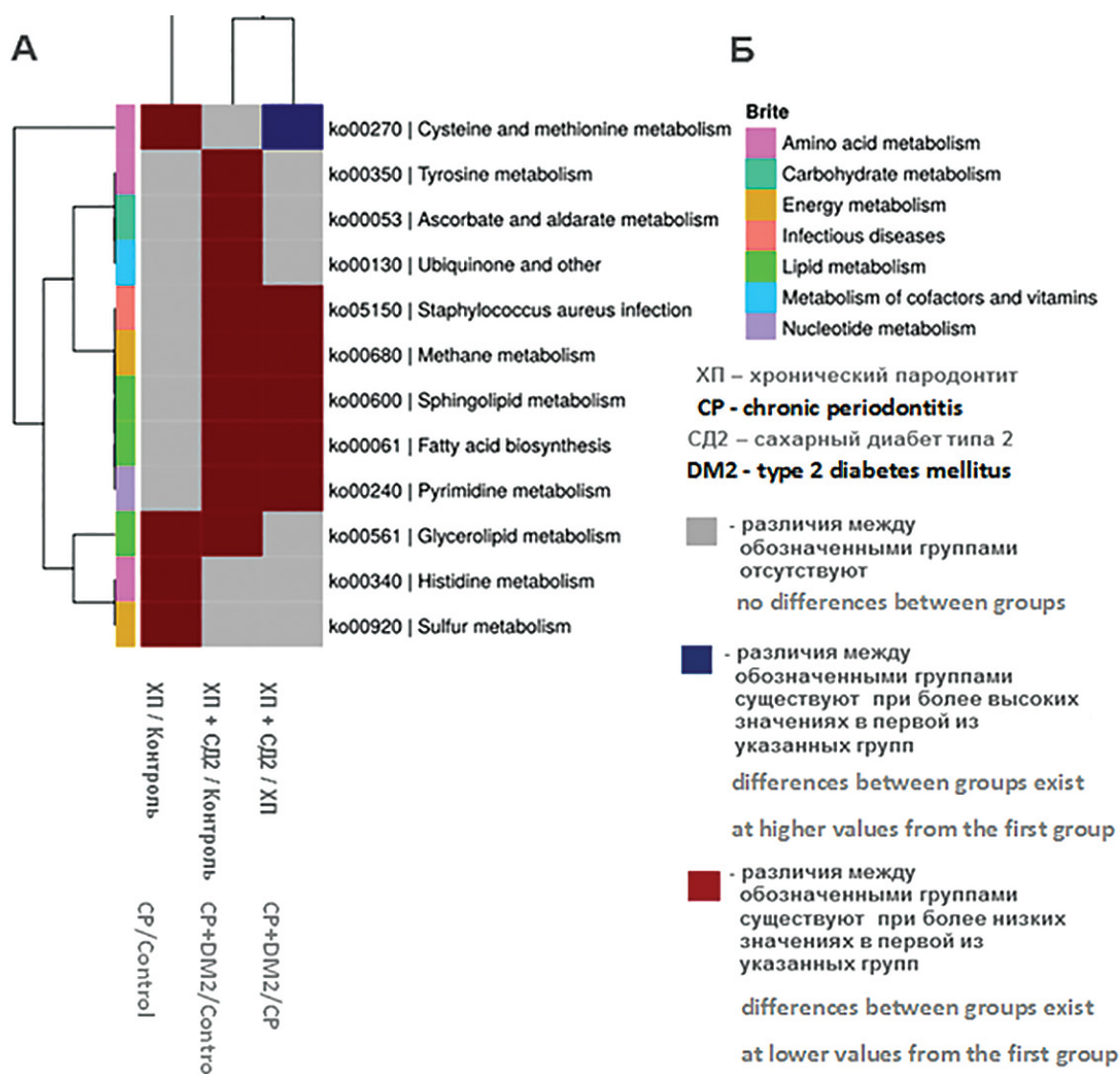


Рис. 2. А – график межгрупповых различий в функциональном профиле микробиома пародонтальных карманов/зубодесневой борозды; Б – природа метаболических реакций

Fig. 2. А – graph of group differences in the functional profile of the microbiome periodontal pockets/gingival sulcus; Б – nature of metabolic reactions

Таким образом, есть четыре метаболических пути, сокращение которых характерно для группы хронического пародонтита в сочетании с сахарным диабетом типа 2 и отличает эту группу от контрольной группы и группы хронического пародонтита: метаболизм пириимидина (ko00240), метаболизм метана (ko00680), метаболизм сфинголипидов (ko00600) и биосинтез жирных кислот (ko00061).

Иными словами, среди указанных особенностей довольно значительную часть составляет липидный метаболизм.

Исходя из контекста данной работы, снижение метаболизма сфинголипидов как особенность микробиома у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, представляется очень важной. Источники научной

литературы показывают, что в составе микробиома полости рта наиболее активными продуцентами сфинголипидов, в том числе фосфорилированных керамидов, среди пародонтопатогенов являются представители семейства Porphyromonadaceae [26]. Кроме того, сфинголипиды в большом количестве продуцируют сапрофитические микроорганизмы, обитающие в полости рта и принадлежащие к семейству Sphingobacteriaceae [27].

Методом ПЦР определялось суммарное содержание в биологическом материале из пародонтальных карманов/зубодесневой борозды во всех трех группах исследования представителей названных семейств. 95 % доверительные интервалы грам-эквивалентов ДНК бактерий родов в Porphyromonas и Sphingobacteria, а также диагностическая значимость различий в содержании этих бактерий в исследуемых группах путем построения ROC-кривых и определения площади под ними (AUC) представлены на рисунке 3.

Рисунки показывают, что представители рода Porphyromonas исключительно редко обнаруживаются в контрольной группе здоровых людей и с довольно высокой частотой при хроническом пародонтите, независимо от ассоциации с сахарным диабетом типа 2, хотя тенденция к более высоким значениям присуща этим бактериям в группе хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2. Построение ROC-кривых, отражающих соотношение чувствительности и специфичности диагностической пробы, показало максимальные значения площади под ROC-кривой (AUC), равные 1,0, для различий группы хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, с контролем, но, в отличие от столь высокой значимости разницы между указанными группами, AUC для двух групп хронического пародонтита была равна 0,615, то есть показывала лишь умеренную диагностическую значимость.

Совершенно иные соотношения установлены по содержанию в пародонтальных карманах/зубодесневой борозде сапрофитических бактерий рода Sphingobacteria, тоже способных к продукции сфинголипидов. Наиболее высокое содержание этих бактерий выявлено в группе контроля. Меньшие

значения были присущи группе хронического пародонтита, а наиболее низкое содержание, близкое к нулю, определено при хроническом пародонтите, ассоциированном с сахарным диабетом типа 2. Диагностическая значимость этих результатов была очень высокой и в единицах AUC выражалась в значениях, близких к единице (0,917; 0,925).

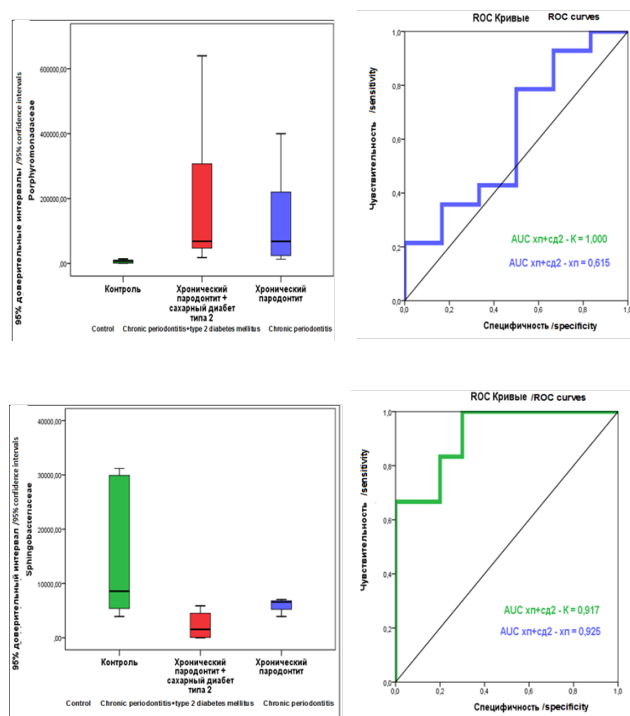


Рис. 3. 95 % доверительные интервалы содержания в микробиоме пародонтальных карманов/зубодесневой борозды основных продуцентов керамидов в группах исследования

Fig. 3. 95 % confidence intervals in the microbiome of periodontal pockets/gingival sulcus of the main ceramide producers in the study groups

С учетом того, что одним из важнейших показателей обмена фосфорилированных керамидов в тканях ротовой полости может служить содержание керамид киназы в слюне обследуемых людей, было проведено подобное тестирование в слюне больных хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, а также здоровых лиц. Результаты такого исследования представлены в таблице 1 и на рисунке 4.

Таблица 1
Содержание церамид киназы в слюне в группах исследования

Группы исследования/ Research Groups	Церамидаза слюны (нг/мл)/ Salivary ceramidase (ng/ml)	p по критерию Манна-Уитни/ p by criterion Mann-Whitney
Группа хронического пародонтита в ассоциации с сахарным диабетом типа 2/ Chronic periodontitis group in association with type 2 diabetes mellitus	16,9 ± 14,2	$p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$
Хронический пародонтит/ Chronic periodontitis	44,0 ± 18,7	$p_1 = 0,004^*$
Контрольная группа/ Control group	71,3 ± 15,0	-

Примечание: p_1 – вероятность различий между показателями в группах больных хроническим пародонтитом и контролем, p_2 – вероятность различий между показателями в группах больных хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, * – достоверность различий

Note: p_1 – the probability of differences between the indicators in the groups of patients with chronic periodontitis and control, p_2 – the probability of differences between the indicators in the groups of patients with chronic periodontitis, associated and not associated with type 2 diabetes mellitus, * – significance of differences

Как следует из таблицы и рисунка, содержание церамид киназы в слюне больных хроническим пародонтитом достоверно падает – на 38 %. При этом в тех случаях, когда хронический пародонтит сочетается с сахарным диабетом типа 2, падение уровня церамид киназы становится еще более значительным и достигает 76 %.

Описания этого феномена мы не обнаружили в доступной литературе, в то время как показатель уровня церамид киназы в слюне может служить маркером хронического пародонтита. Мы предположили также, что степень падения уровня церамид киназы в слюне при сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 может иметь прогностическое значение (95 % доверительный интервал ниже 25 нг/мл).

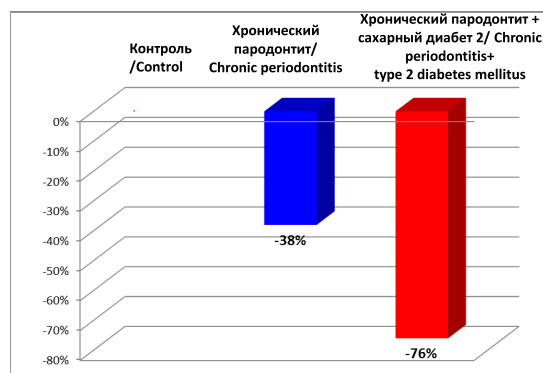


Рис. 4. Проценты отклонения от контроля содержания церамид киназы в слюне больных по группам исследования

Fig. 4. Percentage deviation from control of ceramide kinase content in saliva of study groups patients

Для проверки высказанного предположения была сделана попытка установить взаимосвязь между продолжительностью сахарного диабета и степенью падения церамид киназы в слюне, как это показано на рисунке 5.

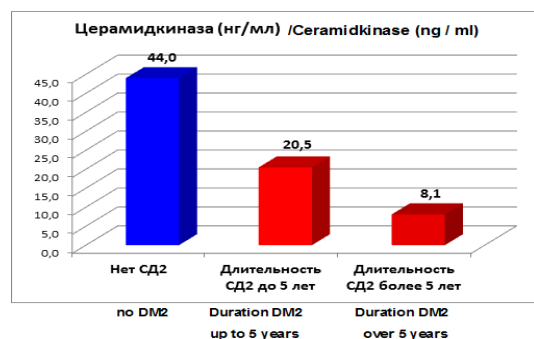


Рис. 5. Степень снижения среднего уровня церамид киназы в слюне больных хроническим пародонтитом в зависимости от наличия и длительности сахарного диабета типа 2 (СД2)

Fig. 5. The degree of decrease in the average level of ceramide kinase in the saliva of patients with chronic periodontitis, depending on the presence and duration of type 2 diabetes (CD2)

Как следует из рисунка, падение уровня церамид киназы, связанное с развитием сопутствующего сахарного диабета типа 2, зависело от длительности последнего. Так, при продолжительности заболевания более 5 лет степень падения содержания церамид киназы в слюне возрастала по средним ве-

личинам в 2,5 раза. Более того, попытка определить корреляцию между таким общепринятым критерием развития сахарного диабета, как рост содержания глюкозы в крови и уровнем церамид киназы в слюне, показал достоверную корреляционную связь между этими параметрами ($r = -0,508^*$), в то время как в отсутствие сахарного диабета у больных хроническим пародонтитом значимой корреляционной связи установить не удалось ($r = 0,031$, где r – коэффициент корреляции).

Таким образом, у больных хроническим пародонтитом падение уровня церамид киназы в слюне ниже 25 нг/мл может свидетельствовать об угрозе развития системных эффектов в виде сопутствующего сахарного диабета 2-го типа.

Результаты исследования, на наш взгляд, требуют обсуждения в нескольких аспектах – (1) существуют ли особенности микробиома пародонта таксономического или метаболического характера при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2; (2) может ли хронический пародонтит в той или иной степени влиять на течение сахарного диабета? (2) играют ли сфинголипиды/церамиды пародонтопатогенов патогенетически значимую роль при наличии такого влияния? (3) существуют ли маркеры подобного влияния?

Проведенные исследования на метагеномном уровне с использованием биоинформационных технологий несомненно доказывают, что как таксономический состав микробиоты пародонтальных карманов, так и метаболизм входящих в ее состав бактерий обладают выраженными особенностями у пациентов с ассоциацией хронического пародонтита. В контексте поставленных задач обращает на себя внимание зарегистрированное нами отчетливое преобладание в составе микробиома пародонта при сочетанной патологии пародонтопатогенных бактерий семейств Porphyromonadaceae и Prevotellaceae с установленной в результате многочисленных исследований способностью к активной продукции сфинголипидов и принадлежащих к ним церамидов, которые могут не только оказывать широкий спектр воздействий на ткани пародонта [14, 15, 16, 17], но и принимать участие в патогенезе сахарного диабета второго типа, а также проявлять другие системные эффекты [18,

20, 21]. Эти факты свидетельствуют в пользу той точки зрения, что хронический пародонтит через свою микрорфлору может оказывать влияние на течение сахарного диабета.

Подобное влияние не является односторонним. Полученные нами в результате биоинформационного анализа данные косвенно свидетельствуют о том, что состав микробиома пародонта при его хроническом воспалении является промежуточным статусом между здоровым состоянием и хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2. Иными словами, ассоциация хронического пародонтита на фоне сахарного диабета типа 2 может расцениваться не столько как первичное, сколько как вторичное состояние, то есть микробиом пародонта в значительной степени связан с сопутствующим сахарным диабетом и реагирует на него изменением своего таксономического состава.

В то же время оценка полученных результатов на метаболическом уровне выявила и довольно противоречивые данные. Метагеномным анализом было установлено, что в группе хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, отмечалось падение биосинтеза сфинголипидов в составе микробиома пародонтальных тканей. С одной стороны, этому теоретически могло бы способствовать низкое содержание в микробиоме этих больных сапрофитических бактерий рода *Sphingobacteria*, характеризующихся выраженной способностью к синтезу сфинголипидов [27], однако, наряду с этим, в биопленке больных данной группы отмечено, как было показано выше, довольно высокое содержание других сфинголипид-продуцирующих бактерий, относящихся к пародонтопатогенам. Таким образом, при ассоциации сахарного диабета и хронического пародонтита было зарегистрировано определенное противоречие – рост содержания в составе микробиома пародонта бактерий, активно продуцирующих сфинголипиды и их разновидность – церамиды, а с другой стороны, несомненное падение способности микробиома к метаболизму сфинголипидов.

Чтобы разрешить это противоречие, не установленное при хроническом пародонтите без сопутствующей патологии, была сделана попытка уста-

новить возможный механизм развития указанного феномена. Она основана на том, что большинство биологических эффектов керамидов связано с их фосфорилированной фракцией [26], формирование которой происходит при участии фермента керамидкиназы [19], содержание которой в ротовой полости (в слюне) определялось в процессе исследований.

Было отмечено падение уровня керамидкиназы в слюне, которое клинически можно связать с ростом провоспалительных эффектов в тканях, сопутствующих сахарному диабету, а патогенетически – с ростом проапоптотического действия фосфорилированных керамидов [20, 21], продуцируемых пародонтопатогенами, на пораженные ими клетки при сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2, усугубляющих течение хронического пародонтита.

В этой ситуации зарегистрированное нами в ходе метагеномного анализа снижение биосинтеза сфинголипидов при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 на фоне столь резкого падения активности тканевой керамидкиназы и роста присутствия ключевого пародонтопатогена *P. gingivalis* можно интерпретировать следующим образом.

P. gingivalis реализует свою вирулентность и воспалительно-повреждающее действие на ткани, в первую очередь, с участием фосфорилированных керамидов. Снижение эффективности этого процесса при сопутствующем сахарном диабете типа 2 с его способностью создавать условия для прогрессирующего развития хронического пародонтита противоречит создавшейся ситуации и может означать только одно – происходит «экранирование» данного пародонтопатогена от защитных и метаболических реакций пародонтальных тканей с соответствующими фенотипическими изменениями бактериальных клеток. Такое экранирование и сопутствующие ему изменения фенотипа возможны, например, при переходе этого пародонтопатогена к внутриклеточному паразитированию, что обеспечило бы ему рост выживаемости внутри клеток и возможность распространяться по организму, например, в составе макрофагов, с осуществлением системных эффектов.

Выводы

1. Микробиом пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, отличается по своим таксономическим признакам (более высокое содержание представителей семейств (Prevotellaceae и Spirochaetaceae) от такового у пациентов с хроническим пародонтитом без сопутствующей системной патологии.

2. Микробиом пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, отличается по набору характерных метаболических признаков от такового у пациентов с хроническим пародонтитом без сопутствующей системной патологии.

3. В набор характерных метаболических признаков микробиома пародонтальных карманов у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, входит падение метаболизма сфинголипидов.

4. В слюне больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, достоверно снижено содержание керамидкиназы, участвующей в метаболизме наиболее активной фаракции сфинголипидов – фосфорилированных керамидов.

5. Степень падения в слюне уровня керамидкиназы связано с длительностью сахарного диабета и уровнем глюкозы в крови и при значениях <25 нг/мл может служить маркером сочетанной патологии – хронического пародонтита и сахарного диабета второго типа.

Библиографический список

1. Hajshengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012. Vol. 10 (10). P. 717–725.
2. Лепеева Н.А., Ермолаева Л.А., Шишкин А.Н. Состояние тканей пародонта у больных метаболическим синдромом. *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2012. Т. 11 (3). С. 145–152.
3. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *J Biomed Sci*. 2019. Vol. 42 (1). P. 27–35.
4. Moodley A., Wood N.H., Shangase S.L. The relationship between periodontitis and diabetes: a brief review. *SADJ*. 2013. Vol. 68 (6). P. 260–264.

5. Genco R.J., Van Dyke T.E. Prevention: reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol*. 2010. Vol. 7 (9). P. 479–480.
6. Kim J.-H., Choi I.A., Lee J.Y. et al. Periodontal pathogens and the association between periodontitis and rheumatoid arthritis in Korean adults. *J Periodontal Implant Sci*. 2018. Vol. 48 (6). P. 347–359.
7. Han Y.W. Oral health and adverse pregnancy outcomes – what’s next? *J Dent Res*. 2011. Vol. 90 (3). P. 289–293.
8. Николаева Е.Н., Царев В.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – индикаторы риска возникновения и развития пародонтита (часть 2). *Стоматология для всех*. 2011. № 4. С. 4–7.
9. Wolcott R., Costeryon J.W., Raoult D., Cutler S.J. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect*. 2013. Vol. 19 (2). P. 107–112.
10. Ng M.L., Wadham C., Sukocheva O.A. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies. *Int J Mol Med*. 2017. Vol. 39 (2). P. 243–252.
11. Verhulst M.J.L., Loos B.G., Gerdes V.E.A., Teeuw W.J. Evaluating all potential oral complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019. Vol. 10. P. 56–104.
12. Stanko P., Holla L.I. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014. Vol. 158 (1). P. 35–38.
13. Bartke N., Hannun Y.A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *J Lipid Res*. 2009. Vol. 50. P. 91–96.
14. Nichols F.C., Riep B., Mun J. et al. Structures and biological activity of phosphorylated dihydroceramides of *Porphyromonas gingivalis*. *J Lipid Res*. 2004. Vol. 45 (12). P. 2317–2330.
15. Nichols F.C., Housley W.J., O’Conor C.A. et al. Unique lipids from a common human bacterium represent a new class of Toll-like receptor 2 ligands capable of enhancing autoimmunity. *Am J Pathol*. 2009. Vol. 175 (6). P. 2430–2438.
16. Olsen I., Nichols F.C. Are sphingolipids and serine dipeptide lipids underestimated virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*? *Infect Immun*. 2018. Vol. 86 (7). e00035–18.
17. Moye Z.D., Valiuskyte K., Dewhirst F.E. et al. Synthesis of sphingolipids impacts survival of *Porphyromonas gingivalis* and the presentation of surface polysaccharides. *Front Microbiol*. 2016. Vol. 7. P. 1919–1931.
18. Li L., Michel R., Cohen J. et al. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*. 2008. Vol. 8. P. 26–36.
19. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B. et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One*. 2011. Vol. 6 (2). – e16771.
20. Кузьменко Д.И., Климентьева Т.К. Церамид: роль в апоптозе и патогенезе резистентности к инсулину. *Биохимия*. 2016. Т. 81 (9). С. 913–927.
21. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Мальшев И.Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. *Патогенез*. 2008. Т. 6 (4). С. 31–39.
22. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016. Vol. 13 (7). P. 581–583.
23. 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. Vol. 41. P. 590–596.
24. Parks D.H., Tyson G.W., Hugtholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30 (21). P. 3123–3124.
25. Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J.J. Exploring compositional data with the CoDa-dendrogram. *Austrian J Statistics*. 2011. Vol. 40 (1–2). P. 103–113.
26. Nichols F.C. Novel ceramides recovered from *Porphyromonas gingivalis*: Relationship to adult periodontitis. *J Lipid Res*. 1998. Vol. 39 (12). P. 2360–2372.
27. Lazarevic V., Whiteson K., Hernandez D. et al. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010. Vol. 11. P. 523–533.

References

1. Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(10):717–725.
2. Lepeeva N.A., Yermolayeva L.A., Shishkin A.N. Condition of periodontal tissues in patients with metabolic syndrome. *St. Petersburg University Vestnik*. 2012;11(3):145–152. (in Russ.).
3. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Journal of Biomedical Science*. 2019;42(1):27–35.
4. Moodley A., Wood N.H., Shangase S.L. The relationship between periodontitis and diabetes: a brief review. *Journal of the South African Dental Association*. 2013;68(6):260–264.
5. Genco R.J., Van Dyke T.E. Prevention: reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nature Reviews Cardiology*. 2010; 7(9):479–480.
6. Kim J.-H., Choi I.A., Lee J.Y. et al. Periodontal pathogens and the association between periodontitis and rheumatoid arthritis in Korean adults. *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2018;48(6):347–359.
7. Han Y.W. Oral health and adverse pregnancy outcomes – what’s next? *Journal of Dental Research*. 2011; 90(3):289–293.
8. Nikolaeva E.N., Tsarev V.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria – indicators of the risk of periodontitis (part 2). *Stomatology for everyone*. 2011;4:4–7. (in Russ.).
9. Wolcott R., Costeryon J.W., Raoult D., Cutler S.J. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(2):107–112.
10. Ng M.L., Wadham C., Sukocheva O.A. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;39(2):243–252.
11. Verhulst M.J.L., Loos B.G., Gerdes V.E.A., Teeuw W.J. Evaluating all potential oral complications of diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2019;10:56–104.
12. Stanko P., Holla L.I. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the Palacky University, Olomouc, Czech Repub*. 2014;158 (1):35–38.
13. Bartke N., Hannun Y.A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *Journal of Lipid Research*. 2009;50:91–96.
14. Nichols F.C., Riep B., Mun J. et al. Structures and biological

- activity of phosphorylated dihydroceramides of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Lipid Research*. 2004;45(12):2317–2330.
15. Nichols F.C., Housley W.J., O’Conor C.A. et al. Unique lipids from a common human bacterium represent a new class of Toll-like receptor 2 ligands capable of enhancing autoimmunity. *The American Journal of Pathology*. 2009;175(6):2430–2438.
 16. Olsen I., Nichols F.C. Are sphingolipids and serine dipeptide lipids underestimated virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*? *Infection and Immunity*. 2018;86(7): e00035–18.
 17. Moye Z.D., Valiuskyte K., Dewhirst F.E. et al. Synthesis of sphingolipids impacts survival of *Porphyromonas gingivalis* and the presentation of surface polysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1919–1931.
 18. Li L., Michel R., Cohen J. et al. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*. 2008; 8:26–36.
 19. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B. et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One*. 2011;6(2): e16771.
 20. Kuzmenko D.I., Klimentyeva T.K. Ceramid: role in apoptosis and pathogenesis of insulin resistance. *Biochemistry*. 2016;81(9):913–927. (in Russ.).
 21. Monastyrskaya E.A., Lamina S.V., Malyshev I.I. M1 and M2 phenotypes of activated macrophages and their role in immune response and pathology. *Pathogenesis*. 2008; 6(4):31–39. (in Russ.).
 22. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 2016;13(7):581–583.
 23. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:590–596.
 24. Parks D.H., Tyson G.W., Hugtholtz P., Beiko R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 2014;30 (21):3123–3124.
 25. Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J.J. Exploring compositional data with the CoDa-dendrogram. *Austrian Journal of Statistics*. 2011; 40(1–2):103–113.
 26. Nichols F.C. Novel ceramides recovered from *Porphyromonas gingivalis*: Relationship to adult periodontitis. *Journal of Lipid Research*. 1998;39 (12):2360–2372.
 27. Lazarevic V., Whiteson K., Hernandez D. et al. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010;11:523–533.

Ответственный за переписку: Балмасова Ирина Петровна – д.м.н., профессор, зав. лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний НИМСИ ФГБОУ ВО Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, 105275, Россия, Москва, 8-я ул. Соколиной Горы, д. 15. E-mail: iri.balm@mail.ru

Унаньян К.Г.	SPIN: 6996–2071; ORCID: 0000–0002–9109–8431
Балмасова И.П.	SPIN: 8025–8611; ORCID: 0000–0001–8194–2419
Царев В.Н.	SPIN: 8180–4941; ORCID: 0000–0002–3311–0367
Мкртумян А.М.	SPIN: 1980–8700; ORCID: 0000–0003–1316–5245
Эльбекьян К.С.	SPIN: 2403–8663; ORCID: 0000–0003–2403–8663
Караков К.Г.	SPIN: 7085–4329; ORCID: 0000–0001–9012–4784
Арутюнов С.Д.	SPIN: 1052–4131; ORCID: 0000–0001–6512–8724

Corresponding author: Balmasova Irina – MD., Professor, Head of the laboratory of pathogenesis and methods of treatment of infectious diseases of A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine&Dentistry, 105275, Russia, Moscow, 8th Street of Sokolinaya Gora, 15. E-mail: iri.balm@mail.ru

Unanyan K.G.	ORCID: 0000–0002–9109–8431
Balmasova I.P.	ORCID: 0000–0001–8194–2419
Tsarev V.N.	ORCID: 0000–0002–3311–0367
Mkrtyumyan A.M.	ORCID: 0000–0003–1316–5245
Elbekyan K.S.	ORCID: 0000–0003–2403–8663
Karakov K.G.	ORCID: 0000–0001–9012–4784
Arutyunov S.D.	ORCID: 0000–0001–6512–8724