

ВОЗМОЖНОСТИ ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ПАРОДОНТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ В ПОЛОСТИ РТА

POSSIBILITIES OF GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY OF MICROBIAL MARKERS IN THE DIAGNOSIS OF PERIODONTAL MICROFLORA IN THE ORAL CAVITY

**L. Burlakova
O. Gizinger
A. Muraev
E. Delidova
S. Ivanov
N. Yamurkova
Yu. Sergeev
A. Dolgalev**

Summary. As part of our study, microbial communities in patients with peri-implantitis were evaluated using diagnostic methods such as PCR, 16s metagenomic sequencing and GC-MS.

The aim of the study was to evaluate the correlation of the results obtained as a result of PCR, 16s metagenomic sequencing and GC-MS methods.

Materials and methods. The saliva of 10 patients with chronic peri-implantitis aged 18 to 80 years was studied.

Results. The obtained PCR data confirmed the presence of major periodontal pathogens such as *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *F. nucleatum*. Metagenomic sequencing revealed not only the presence but also the number of these bacteria, demonstrating their dominance in the microbiome. GC-MS analyses revealed elevated concentrations of certain bacterial genera and showed that 54.25 % of microorganisms were conditionally pathogenic, which highlights the violation of the microecological status in the oral cavity of patients. The data obtained indicate a decrease in the diversity of genera and species in the microbiome, which supports the theory that the maintenance of the inflammatory process in peri-implantitis is associated with dysbiotic changes in the microbial community, leading to the dominance of pathogenic species and the progression of the disease.

Keywords: gas chromatography-mass spectrometry, oral microflora, periodontopathogenic microflora, peri-implantitis.

Бурлакова Любовь Александровна

Аспирант,

Российский университет дружбы народов, Москва

Гизингер Оксана Анатольевна

д.б.н., Российский университет дружбы народов, Москва

Мураев Александр Александрович

д.м.н., Российский университет дружбы народов, Москва

Делидова Екатерина Владимировна

к.м.н., врач стоматолог-хирург, пародонтолог,

имплантолог; «ООО Дента Вита Престиж», Москва

Иванов Сергей Юрьевич

член-корр. РАН, профессор, д.м.н., ФГАОУ ВО Первый

Московский государственный медицинский

университет им. И.М. Сеченова

(Сеченовский Университет)

Ямуркова Нина Федоровна

д.м.н., доцент, заслуженный врач Российской Федерации,

челюстно-лицевой хирург высшей категории

ГБУЗ НО ГKB N 39, г. Нижний Новгород

Сергеев Юрий Андреевич

к.м.н., врач-стоматолог ортопед, ассистент,

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный

медицинский университет

shererrrr9@gmail.com

Долгалева Александр Александрович

д.м.н., доцент, ФГБОУ ВО Ставропольский

государственный медицинский университет

Аннотация. В рамках проведенного нами исследования оценивались микробные сообщества у пациентов с периимплантитом с использованием таких методов диагностики, как ПЦР, метагеномное секвенирование 16s и ГХ-МС. Целью исследования была оценка корреляции результатов, полученных в результате методов ПЦР, метагеномного секвенирования 16s и ГХ-МС. *Материалы и методы.* Проведено исследование слюны 10 пациентов с хроническим периимплантитом в возрасте от 18 до 80 лет. *Результаты.* Полученные данные ПЦР подтвердили наличие основных пародонтопатогенов, таких как *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *T. forsythia* и *F. nucleatum*. Метагеномное секвенирование позволило выявить не только присутствие, но и количество этих бактерий, демонстрируя их доминирование в микробиоме. ГХ-МС анализы выявили повышенные концентрации некоторых родов бактерий и показали, что 54,25 % микроорганизмов относились к условно-патогенным, что подчеркивает нарушение микроэкологического статуса в ротовой полости пациентов. Полученные данные указывают на снижение разнообразия родов и видов в микробиоме, что поддерживает теорию о том, что поддержание воспалительного процесса при периимплантите связано с дисбиотическими изменениями в микробном сообществе, приводящими к доминированию патогенных видов и прогрессированию заболевания.

Ключевые слова: газовая хромато-масс-спектрометрия, микрофлора полости рта, пародонтопатогенная микрофлора, периимплантит.

Введение

Около трети всех пациентов и 20 % действующих дентальных имплантатов сталкиваются с проблемой периимплантита. (Kordbacheh Changi et al., 2019). В связи с этим большой научный и клинический интерес вызывает изучение патогенеза данного заболевания. Считается, что основной причиной развития периимплантита является бактериальная инфекция [1, 2, 3], схожая с пародонтопатогенной флорой, и нарушение факторов местной резистентности. [6]. Разнообразие и состав микробиоты полости рта играют важную роль в регуляции иммунного ответа и выраженности воспаления. Концепция изменения микробной среды как механизма профилактики развития дисбиоза в ротовой полости имеет важное значение [4, 5, 6]. Функциональные различия и вирулентность между штаммами одного и того же вида, выражающиеся в измененных профилях транскрипции, могут непосредственно усиливать патогенность всего сообщества. Эта последняя область недостаточно изучена в контексте периимплантационных инфекций и заслуживает более тщательного рассмотрения. Работа по изучению факторов, влияющих на функциональную патогенность отдельных микроорганизмов и сообщества в целом, может значительно помочь в создании более эффективных стратегий для оценки рисков, профилактики, диагностики и лечения, когда это станет необходимым.

Поэтому диагностика широкого спектра представителей бактериального сообщества, а не одних только пародонтогенных представителей имеет большое клиническое значение.

Целью данного исследования было изучить диагностические возможности газовой хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров, метагеномного секвенирования 16s рРНК и ПЦР в определении состояния микрофлоры полости рта у пациентов с периимплантитом.

Материалы и методы

В настоящем исследовании был изучен состав микробиоты смешанной слюны у 10 пациентов от 18 до 80 лет с подтвержденным диагнозом периимплантит (K10.2 Воспалительные заболевания челюстей) тремя различными методами. Проводили: 1) газовую хромато-масс-спектрометрию микробных маркеров, 2) метагеномное секвенирование 16s рРНК, 3) полимеразную цепную реакцию (ПЦР) основных пародонтопатогенов.

Смешанную слюну для анализов собирали утром, натощак, до гигиены полости рта в пластмассовую пробирку типа Эппендорф с плотной крышкой. У каждого пациента было получено по 3 пробирки для каждого вида

исследования. Образцы замораживали при температуре -18°C . После набора всех образцов, материалы направляли в соответствующие лаборатории.

Газовая хромато-масс-спектрометрия микробных маркеров слюны проводилась на аппарате Маэстро Альфа МС (Россия, Интерлаб).

Метагеномное секвенирование слюны методом 16s рРНК. Тотальную ДНК выделяли из образцов, подвергнутых гомогенизации в лизирующем растворе со стеклянными шариками. Далее ДНК осаждалась на колонках (Qiagen, Germantown, MD, USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Библиотеки для секвенирования 16S ДНК были подготовлены в соответствии с протоколом Illumina по подготовке 16S метагеномных библиотек для секвенирования (Part #15044223 Rev. B). Для амплификации целевого фрагмента гена 16S рРНК с помощью рекомендованных праймеров для области V3-V4 использовали 5 нг общей ДНК на образец. Проводили 25 циклов полимеразной цепной реакции с использованием смеси KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x). Полученный продукт очищался с помощью контейнеров SPRI. Индексацию ампликонов проводили с использованием KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x) (Roche Diagnostics, Zug, Switzerland) и набора Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Полученные библиотеки секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Секвенирование образцов проводили в генетической лаборатории «СЕРБАЛАБ» (С.-Петербург).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) антигенов пародонтопатогенов проводили на аппарате Freedom EVO-2 150 Base, Tecan (Швейцария). Благодаря анализу ПЦР выявляли пародонтопатогенные бактерии: *P. endodontalis*; *P.gingivalis*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Tannerella forsythia*; *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*; *Fusobacterium nucleatum*. Полученные образцы обрабатывали в лаборатории «Литекс» (Москва).

Статистическая обработка данных. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Описательная статистика включала количественные показатели: средние арифметические величины (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 — Q3).

Сравнение показателей разных групп, учитывая большое количество участников, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований

Результат газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Согласно усреднённым нормам, принятым для ГХ-МС микробиоты полости рта, значение общей бактериальной нагрузки у здоровых пациентов составляет $5\ 331 \cdot 10^5$ КОЕ/гр. В нашем исследовании мы получили среднее значение общей бактериальной нагрузки у пациентов с периимплантитом $4990 \cdot 10^5$, что говорит об недостаточном развитии микробиоты.

Доля условно-патогенных микроорганизмов (без вирусов), влияющих на возможное развитие патологических процессов в среднем составила $2718,2 \cdot 10^5$ КОЕ/гр или 54,25 %, что также указывает на дисбиоз, так как микробиотическое ядро (бифидо-, лакто-, эу- и пропионовые бактерии) по средней норме считается условно-нормальной в пределах 70 %. В данном исследовании дружественные микроорганизмы, входящие в состав микробиотического (метаболического) ядра в среднем составили: *Bifidobacterium* spp. — $73,6 \cdot 10^5$ при средней норме $225 \cdot 10^5$ КОЕ/гр, *Eubacterium* spp. — $893,7 \cdot 10^5$ при средней норме $565 \cdot 10^5$ КОЕ/гр, *Lactobacillus* spp. — $655 \cdot 10^5$ при средней норме $659 \cdot 10^5$ КОЕ/гр, *Propionibacterium freudenreichii* — $260,5 \cdot 10^5$ при средней норме $243 \cdot 10^5$ КОЕ/гр.

Среднее значение содержания *Porphyromonas* spp. по анализу газовой хромато-масс-спектрометрии составило $2,5 \cdot 10^5$ клеток (норма $< 10^5$ клеток), *Prevotella* spp. — $13,9 \cdot 10^5$ КОЕ/гр (средняя норма $10 \cdot 10^5$ КОЕ/гр, но не более $20 \cdot 10^5$ КОЕ/гр), *Fusobacterium* spp. — $29,4 \cdot 10^5$ КОЕ/гр (средняя норма $18 \cdot 10^5$ клеток, но не более $36 \cdot 10^5$ КОЕ/гр).

Обнаружение определенных видов пародонтопатогенов, таких как *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, может быть связано с увеличенной бактериальной нагрузкой указанных видов бактерий, которая выявлена при анализе газовой хромато-масс-спектрометрии.

Результаты ПЦР диагностики пародонтопатогенных бактерий

Анализ ПЦР на наличие пародонтопатогенов выявил *Periodontalis* и *P.gingivalis* в 70 % случаев, что может указывать на их широкое распространение среди исследуемой выборки. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* обнаружен только в 10 % образцов с высокой нижней границей ДИ, что показывает его редкое присутствие. Этот вид ассоциируется с агрессивным пародонтитом, следовательно, его уровень может быть критическим даже при низком присутствии.

Treponema denticola обнаружен в 30 % образцов. Возможно, это указывает на менее агрессивный воспалительный процесс в пародонте среди исследуемых пациентов. *Prevotella intermedia* присутствует в 40 % образцов. Этот вид часто связывают с пародонтальными и десневыми заболеваниями, что может указывать на проблемы с выявляемостью или колебания в уровне колонизации. *Tannerella forsythia* и *Fusobacterium nucleatum* обнаружены в 90 % случаев. Они известны как основные патогены, ассоциированные с хроническим пародонтитом, что свидетельствует об их высоком уровне в общем микробиоме полости рта у большинства испытуемых.

Результаты метагеномного секвенирования 16s рРНК

Porphyromonas spp. ($M \pm SD: 2,49 \pm 2,20$ %) имеет среднее значение с относительно большим стандартным отклонением, что указывает на значительные колебания уровня этих бактерий в разных образцах. *Prevotella* spp. ($Me: 0,15$ %), часто связаны с инфекциями полости рта, включая заболевания десен, медианное значение достаточно низкое, но верхняя граница диапазона достигает 5,40 %, что указывает на возможное значительное присутствие у отдельных лиц. *Fusobacterium* spp. ($Me: 3,35$ %) также ассоциирован с пародонтальными заболеваниями и может способствовать образованию биопленок в полости рта. Важно отметить высокое максимальное значение (15,50 %), подчеркивающее значительное присутствие у некоторых образцов. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($Me: 0,00$ %) незначительно присутствует в образцах, но тем не менее, даже минимальное его обнаружение может быть клинически значимо из-за связи с агрессивным пародонтитом.

Сравнение результатов различных методов

Согласно данным в таблице 1, *Periodontalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* и *P.gingivalis*, обнаруженные в результате анализа метагеномного секвенирования, статистически значимо коррелируют с результатами анализа ПЦР, в которых эти бактерии также были обнаружены, что, например, может свидетельствовать о более высокой чувствительности анализа метагеномного секвенирования. *Fusobacterium nucleatum* и *Treponema denticola* также были обнаружены в результате исследования обоих исследований, но имели более низкие показатели корреляции между собой, что может указывать на специфичность и особенности распространения данной бактерии в различных микробиомах. *Tannerella forsythia* показывает несущественное статистическое различие, сугубо указывающее на равномерное распределение или равное присутствие, вне зависимости от метода детекции.

Таблица 1.
Описательная статистика результатов анализа
метагеномного секвенирования 16s рРНК в зависимости
от ПЦР диагностики бактерий

Показатели процентного содержания видов бактерий после метагеномного секвенирования 16s рРНК, %	ПЦР		p
	Обнаружено	Не обнаружено	
<i>P.gingivalis</i> , Me [IQR]	0,00 [0,00; 0,00]	3,00 [2,45; 3,35]	0,015*
<i>P.endodontalis</i> , M (SD)	0,00 (0,00)	0,87 (0,41)	0,007*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , Me [IQR]	0,00 [0,00; 0,00]	0,02 [0,02; 0,02]	0,003
<i>Treponema denticola</i> , M (SD)	0,00 (0,00)	0,24 (0,14)	0,092
<i>Prevotella intermedia</i> , M (SD)	0,00 (0,00)	3,13 (2,12)	0,006*
<i>Tannerella forsythia</i> , Me [IQR]	0,00 [0,00; 0,00]	0,14 [0,09; 0,26]	0,114
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , Me [IQR]	0,00 [0,00; 0,00]	2,56 [0,27; 3,60]	0,112

Данные таблицы могут указывать на то, что метагеномное секвенирование может выявлять значимые уровни некоторых бактерий, которые не были обнаружены ПЦР методами, что может быть связано как с различиями в чувствительности между методами, так и с разнообразием микробных сообществ в разных образцах. Это подчеркивает необходимость комбинации различных методов для повышения точности диагностики микробных патогенов в стоматологии.

Таблица 2.
Описательная статистика количественных переменных у пациентов с периимплантитом по данным ГХ-МС и метагеномного секвенирования 16s рРНК

Показатели	Me	Q ₁ —Q ₃	n	min	max
Общая бактериальная нагрузка газовой хромато-масс-спектрометрии (10 ^{*5} КОЕ/гр)	4868,50	3431,75 –5196,00	10	3233,00	5299,00
Разнообразие родов бактерий у пациентов с периимплантитом (метагеномное секвенирование 16s)	57,00	55,25 –81,25	10	47,00	97,00

Исходя из данных, указанных в таблице 2, можно проследить, что медианное значение нагрузки находится ниже нормального оптимального уровня, но разброс

остаётся относительно невысоким (мин.: 3233, макс.: 5299 x 10⁵ КОЕ/гр). Это может указывать на относительное снижение общей количественной нагрузки микробов.

Что касается разнообразия родов бактерий, медианное значение значительно ниже оптимального уровня (100–150), что подчеркивает существенное понижение микробиомного разнообразия у пациентов с периимплантитом. Существенная редукция разнообразия может указывать на дисбиоз и возможное доминирование конкретных патогенных микроорганизмов, что характерно для патологических состояний. Таким образом, эти два анализа подтверждают и дополняют друг друга.

Для наглядного представления корреляции между анализом ГХ-МС и ПЦР составлена таблица (табл. 3). Например, обнаружение *P. gingivalis* в 70 % случаев в результате ПЦР может коррелировать с увеличенным содержанием *Porphyromonas* spp., обнаруженным в анализе газовой хромато-масс-спектрометрии. Аналогично, высокая частота обнаружения *T. forsythia* и *F. nucleatum* может быть связана с увеличенными значениями *Prevotella* spp. и *Fusobacterium* spp. соответственно.

Обсуждение полученных результатов

Анализируя полученные данные, можно утверждать, что у пациентов с периимплантитом разнообразие родов бактерий было ниже оптимальных значений. Это может свидетельствовать о дисбактериозе в ротовой полости и усилении воспалительного процесса в зоне имплантации. Что касается общей бактериальной нагрузки по методике газовой хромато-масс-спектрометрии, то у 90 % пациентов также было выявлено значение ниже оптимальных показателей, что также может указывать на наличие дисбиоза и нарушение микробиоценоза ротовой полости, что способствует развитию воспалительных процессов. Интересно, что лишь 10 % пациентов имели нормальную бактериальную нагрузку, что свидетельствует о редком выявлении оптимальных значений в данной группе.

В состав анализа ПЦР входят бактериоиды, обладающие рядом одинаковых признаков и общей экологией: чаще всего они являются представителями нормальной микрофлоры. Исходя из полученных результатов ПЦР, в 50 % данных клинических случаев наблюдается смещение видового состава в сторону грамотрицательных анаэробных палочек, что могло привести к изменению микробиологического состава, развитию патологических изменений в ротовой полости. Патогенные микроорганизмы оказывают различное токсическое действие на ткани пародонта, что является одной из причин развития воспалительных заболеваний.

Таблица 3.

Корреляции между анализом ГХ-МС и ПЦР

	<i>P.endodontalis</i>	<i>P.gingivalis</i>	<i>Porphyromonas spp.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella spp.</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium spp.</i>
	ПЦР	ПЦР	ГХ-МС	ПЦР	ПЦР	ПЦР	ГХ-МС	ПЦР	ПЦР	ГХ-МС
1	да	да	6*10 ⁵	нет	нет	нет	18*10 ⁵	да	да	15*10 ⁵
2	нет	да	<10 ⁵	нет	нет	нет	15*10 ⁵	да	да	8*10 ⁵
3	да	да	6*10 ⁵	нет	нет	да	15*10 ⁵	да	да	20*10 ⁵
4	да	нет	< 10 ⁵	нет	нет	нет	15*10 ⁵	да	да	< 10 ⁵
5	да	да	< 10 ⁵	нет	да	да	< 10 ⁵	да	да	132*10 ⁵
6	да	да	< 10 ⁵	нет	да	нет	15*10 ⁵	да	да	< 10 ⁵
7	да	нет	< 10 ⁵	нет	нет	нет	< 10 ⁵	нет	нет	13*10 ⁵
8	нет	да	< 10 ⁵	нет	нет	нет	61*10 ⁵	да	да	38*10 ⁵
9	нет	нет	< 10 ⁵	нет	нет	да	< 10 ⁵	да	да	41*10 ⁵
10	да	да	13*10 ⁵	да	да	да	< 10	да	да	27*10 ⁵

Рост токсичных бактерий при дефиците дружественной биоты может говорить о дисбиозе, а также о поддержании воспалительного процесса в полости рта. Так как газовая хромато-масс-спектрометрия показывает количество бактерий в биотопе, она позволяет наблюдать за динамикой лечения пациента и проводить коррекцию, если это требуется, а также может позволить выявлять признаки, указывающие на возможность развития патологического процесса на ранней стадии.

Анализ газовой хромато-масс-спектрометрии и ПЦР диагностика парадонтогенов в полости рта отлично дополняют друг друга, так как в первый не входят такие бактерии как *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, но выявление которых важно для выбора правильной тактики лечения. В то же время, оба анализа показывают наличие таких родов бактерий, как *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.* В анализе ПЦР отражаются конкретные виды этих родов, а именно *P.gingivalis*, *P.endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*. Анализ метагеномного секвенирования 16s рНК и ПЦР диагностика парадонтопатогенных бактерий могут дополнять друг друга, поскольку метод секвенирования отображает наличие или отсутствие парадонтопатогенных видов бактерий.

Корреляция между данными ПЦР, ГХ-МС и метагеномного секвенирования 16s рНК может помочь в бо-

лее точной оценке активности инфекционного процесса и разнообразия микробиома у пациентов. Оба метода вместе дают более полную картину микробиологического ландшафта в полости рта.

Комбинированное использование разных методов диагностики подчеркивает необходимость интегративного подхода для определения наиболее значимых патогенов и соответствующего выбора терапевтических стратегий, направленных на контроль и управление периимплантитом и другими парадонтоальными заболеваниями.

Выводы

Анализ ГХ-МС, метагеномное секвенирование 16s, ПЦР диагностика бактерий выявила присутствие схожих родов и видов парадонтопатогенов, а также дисбактериоз.

По данным ПЦР у пациентов с периимплантитом обнаружены *P.endodontalis*, *P.gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и *Fusobacterium nucleatum*. Анализ метагеномного секвенирования выявил те же виды бактерий, что и ПЦР, но уже в количественно. Анализ ГХ-МС выявил повышенное содержание определенных родов бактерий, таких как *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*

Анализы ГХ-МС и метагеномное секвенирование выявили снижение микробиологического статуса в смешанной слюне у пациентов с периимплантитом. При этом доля условно-патогенных микроорганизмов, по результатам анализа ГХ-МС, составила 54,25 %, что говорит о возможном развитии патологических процессов, благодаря чему можно предположить, что поддержание воспалительного процесса при периимплантите обу-

словлены снижением таксономического (родового или видового) состава микробных сообществ. Существенно пониженное разнообразие микробного состава подчеркивает нарушение нормальной экосистемы полости рта и колонизацию некоторыми устойчивыми патогенными видами, что является типичным для прогрессирования периимплантита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kunaal Dhingra, Amit Kumar Dinda, Sarat Kumar Kottarath, Prabhat Kumar Chaudhari, Flora Verma. Mucoadhesive silver nanoparticle-based local drug delivery system for peri-implantitis management in COVID-19 era. Part 1: antimicrobial and safety in-vitro analysis, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10.1016/j.jobcr.2021.11.007, 12, 1, (177–181), (2022).
2. Prisca Walter, Miha Pirc, Alexis Ioannidis, Jürg Hüsler, Ronald E. Jung, Christoph H.F. Hämmerle, Daniel S. Thoma. Randomized controlled clinical study comparing two types of two-piece dental implants supporting fixed restorations — Results at 8 years of loading, *Clinical Oral Implants Research*, 10.1111/clr.13893, 33, 3, (333–341), (2022).
3. Nikolina Kesar, Paul Weigl, Georg-Hubertus Nentwig, Mischa Krebs. Prevalence and risk of peri-implant diseases based on the type of prosthetic restoration: A retrospective study after 17 to 23 years, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 10.1016/j.prosdent.2021.11.030, (2022).
4. Setbo E. et al. Utility of probiotics for maintenance or improvement of health status in older people — a scoping review // *The journal of nutrition, health & aging*. — 2019. — Т. 23. — No. 4. — С. 364–372.
5. McKenney P.T., Pamer E. G. From hype to hope: the gut microbiota in enteric infectious disease // *Cell*. — 2015. — Т. 163. — No. 6. — С. 1326–1332.
6. Heitz-Mayfield, L.J.A. Peri-implant mucositis / L.J.A. Heitz-Mayfield, G.E. Salvi // *Journal of Clinical Periodontology*. — 2018. — Vol. 45. — No S20. — P. S237–S245.

© Бурлакова Любовь Александровна; Гизингер Оксана Анатольевна; Мураев Александр Александрович;
 Делидова Екатерина Владимировна; Иванов Сергей Юрьевич; Ямуркова Нина Федоровна;
 Сергеев Юрий Андреевич (shererrrr9@gmail.com); Долгалев Александр Александрович
 Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»