ДЕЯКІ АСПЕКТИ ВИВЧЕННЯ СТАНУ МІКРОФЛОРИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ

Дяченко В. Ф., Воронкіна І. А., Марющенко А. М., Сердечна Е. С., Бірюкова С. В., Кхедер С. С.

Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України

Вивчення стану мікрофлори ротової порожнини відіграє важливу роль для встановлення патогенетичних механізмів виникнення гнійно-запальних захворювань тканин пародонту. Мікробіом ротової порожнини людини налічує більше 700 видів мікроорганізмів, які заселяють різні біотопи, включаючи зуби, ясна, язик, щоки, тверде і м'яке піднебіння, а також мигдалини. Термін «мікробіом» був введений в 2001 році Джошуа Ледербергом для позначення «екологічної сукупності коменсальних, симбіотичних та патогенних мікроорганізмів нашого тіла, які відіграють роль «детермінант здоров'я та захворювань» [1].

Під впливом різних чинників у якісному та кількісному складі мікрофлори ротової порожнини відбуваються зміни. На її стан впливають спосіб життя, вік, харчування людини, дотримання правил гігієни ротової порожнини, а також наявність різних хвороб, в тому числі різні порушення та хвороби в самій ротовій порожнині, та інші фактори. Оскільки існує постійний потік мікроорганізмів, що потрапляють до ротової порожнини з оточуючого середовища, необхідно відрізняти їх від ендогенних видів, які Теодор Роузбері назвав місцевими мікробами або нормальною мікрофлорою [2, 3].

Вважається, що різницю між ними неможливо встановити безпосередньо дослідженнями лише ізолятів від людей. Необхідно порівнювати їх з ізолятами з зовнішнього середовища, аби встановити, які клони швидко відновлюються в організмі хазяїна, або – в оточуючому середовищі. Тобто встановити, з яким ареалом різні види бактерій тісніше пов'язані. До прикладу вважається, що види роду *Prevotella* виявлені лише в мікробіоті ссавців, тоді як види роду *Sphingomonas* знаходять в оточуючому середовищі при дослідженнях озер та ґрунтів. Ступінь асоціації з організмом хазяїна для різних родів сильно відрізняється в залежності від філогенетичного положення. Так практично всі роди *Bacteroidetes*, пов'язані з хазяїном, водночас, як всі роди *Alphaproteobacteria* вважаються перехідними від оточуючого середовища [4].

Аналіз мікробіому ротової порожнини здорових людей з використанням останніх досягнень в технології секвенування виявив, що більша частина видів бактеріальних мікроорганізмів у здорових людей, ідентична [5, 6].

На основі міжнародних досліджень останніх років створено базу філогенетичних даних про мікробіом ротової порожнини людини - Human Oral Microbiome Database (HOMD), яка включає біля 700 таксонів (окремих видів та підгруп) та 13 типів *Actinobacteria, Fusobacteria, Chlamidia, Chloroflexi, Euryarchaeota, Firmicutes, Proteobacteria Spirochaetes,* SR1, *Synergistetes, Tenericutes* и TM7. HOMD – це перша філогенетична база результатів вивчення мікробіому, яка спрямована на розуміння здоров'я та розвитку хвороб ротової порожнини людини (включаючи карієс, гнійно-запальні хвороби пародонту та інші).

Для того, щоб визначити відносну чисельність таксонів та виявити нові види мікробіоти ротової порожнини, було проведено аналіз 36 043 клонів генів 16S рРНК з більше ніж 1000 ізолятів. За результатами виявлено 1179 таксонів, з яких біля 280 видів бактерій були виділені культурально та отримали офіційну назву, біля 8 % – культивовані, але не названі, а 68 % виявилися такими, що не культивуються. Таким чином, було підтверджено, що більше половини видів бактерій, існуючих в ротовій порожнині, не можливо культивувати на живильних середовищах [4, 7].

З розвитком методів молекулярної біології, зокрема методів якісного та кількісного визначення нуклеїнових кислот, стало можливим визначати не тільки склад, а й відносну кількість мікроорганізмів в різних суббіотопах ротової порожнини. Групою дослідників методом кількісної ПЛР в реальному часі проведено визначення співвідношення шести найбільш важливих пародонтопатогенів та сумарної мікрофлори пародонтальних карманів в групах здорових людей та у хворих на пародонти різного ступеню тяжкості. Було встановлено, що під час розвитку пародонтиту відмічається тенденція до збільшення кількості всіх мікроорганізмів в пародонтальному кармані (за показником бактеріальної маси). Найбільш суттєво зростає кількість *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* і *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus).* При важкій формі хронічного генералізованого пародонтиту (ХГП) кількість цих збудників збільшується більше ніж у 100 разів. Отримані результати свідчать про можливість використання кількісної оцінки співвідношення патогенних представників мікробіоценозу пародонтальних карманів як діагностичного інструмента, з метою прогнозування розвитку пародонтиту. Автори рекомендують використовувати визначення співвідношення *P.gingivalis, P.intermedia* та *T.forsythensis,* загальної бактеріальної маси та геномної ДНК пацієнта [8].

Водночас слід відмітити, що результати досліджень частоти виявлення пародонтопатогенів у здорових осіб та у хворих на ХГП, опубліковані різними авторами, суттєво різняться. Так Braga R.R. та Carvalho M.A. виявили *P. intermedia* у 80,0 % здорових осіб і у 90,0 % хворих на ХГП, *P. gingivalis* 46,6 % здорових осіб і у 70,0 % хворих на ХГП, *A. actinomycetemcomitans* – в усіх обстежених в обох групах. У дослідженнях Hyvärinen K. не виявлено статистично вірогідної різниці вмісту *P. gingivalis A.actinomycetemcomitans, P. intermedia, T.forsythensis* и *T. denticola* в зразках слини здорових людей та хворих на ХГП [9, 10].

DOI: 10.5281/zenodo.4382168

Дослідження мікробіому людини проводяться крім сучасних генетично-молекулярних методів, також і класичними, давно відомими методами. Так групою дослідників при вивченні впливу низькомолекулярних імуномодуляторів бактеріального походження на склад мікробіоценозу проведено дослідження складу мікробіому ротової порожнини методом хромато-мас-спектрометрії з визначенням кількісного вмісту маркерів: альдегидів, стеринів, карбонових кислот. Нижнє граничне значення чутливості методу дорівнювало 10^4 КУО/мл. Встановлено, що частота присутності мікроорганізмів в ротовій рідині у здорових людей віком 18-23 років складала (у %) для: *Streptococcus mutans* - 97,92; *Fusobacterium nucleatum - 91, 66; Veillonella* spp.- 83,33; *Candida albicans - 58,3; Neisseria* spp.- 37,5; *Bifidobacterium* spp.- 60,41; *Eubacterium* spp. - 10,41; *Lactobacterium* spp.- 56,25; *Porphyromonas gingivalis- 12,5; Clostridium* spp.- 81,25; *Staphylococus epidermidis -64,5; Actinomyces* spp. – 39,58 [11].

Вченими також проведена оцінка мікробного соціуму ротової порожнини (слина/мазок з поверхні проживання мікробіоти) здорових дітей з метою створення «мікробних образів здоров'я» – як контролю, який можливо використовувати у вивченні мікробіоти при розвитку різних патологічних процесів, в тому числі й інфекційного походження. За допомогою метода газової хромато-мас-спектрометрії мікробних маркерів були виявлені специфічні хімічні маркери 38 таксонів мікроорганізмів у ротовій порожнині здорових дітей віком до 14 років. Авторами виявлено високу подібність структури мікробіоти слини та мазка з поверхні ротової порожнини у умовно здорових дітей, що може свідчити про шляхи переміщення представників різних видів бактерій. Найбільшу увагу автори приділяють кількісній оцінці бактерій роду *Alcaligenes* spp. Представники роду *Alcaligenes* spp. є продуцентами антибактеріальних компонентів, що дезорганізують ріст широкого кола бактерій, а також ініціюють В-лімфоцити лімфоїдних фолікулів до продукції *Alcaligenes*-специфічних антитіл. Також встановлено, що *Bacillus cereus, Corynebacterium* spp., *Candida* домінували в слині, а *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens, Prevotella* spp., *Aspergillus* spp. и *Alcaligenes* spp – у мазках. Крім того, 29 таксонів були спільними для всіх зразків, що свідчило про перехресні шляхи переміщення культур бактеріальних представників різних видів та родів мікробної спільноти та їх функціональній мінливості. Авторами виявлені певні особливості мікробіоти ротової порожнини: так, у дітей, з часом, поступово підвищується кількість представників роду *Clostridium* spp. та знижується кількість біфідобактерій [12].

Що стосується класичних бактеріологічних методів дослідження, то вони, вочевидь, використовуються в найбільшій мірі в рутинній практиці, для вивчення стану мікробіому людини, в тому числі і ротової порожнини.

Пошук нових методів профілактики та лікування гнійно-запальних захворювань пародонту нерозривно пов'язаний з виділенням чистих культур збудників та вивченням їх біологічних властивостей: чутливості до дії антибіотиків, впливу різних фізичних факторів (ультрафіолетове, лазерне випромінювання, релятивістські електрони та ін.) на руйнацію бактеріальних клітин [13].

Оскільки, до пародонтопатогенних збудників відносять, в основному, представників аспорогенних анаеробних бактерій (*Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Prevotella nigrescens, Parvimonas micra)*, які складно культивуються або не культивуються на простих живильних середовищах, то такі дослідження потребують особливих умов та удосконалених бактеріологічних технологій Для вивчення цих мікроорганізмів використовують сучасні поживні середовища, багаті на різні живильні речовини, вітамінні комплекси та інш.

Використання бактеріологічних методів дозволяє оцінити ефективність лікування при запальних захворюваннях у тканинах пародонту, вивчити асоціації мікрофлори пародонтальних карманів під час та після проведеної комплексної терапії. Так, дослідження, проведені Eremenko A.V. та Karakov K.G., показали присутність у вмісті пародонтальних карманів мікробних асоціацій, які налічували кілька видів збудників. Проведена порівняльна кількісна оцінка присутності збудників в динаміці процесу лікування дозволила встановити, що під час та після лікування мікробний пейзаж пародонтальних карманів суттєво змінювався [14].

Отримані дані дозволяють поглибити розуміння патогенетичних процесів у розвитку гнійно-запальних захворювань у тканинах пародонту, підібрати ефективну схему лікування таких захворювань, для досягнення кінцевої мети – елімінації збудника, нормалізації показників мікрофлори ротової порожнини, і, врешті-решт, здоров'я пацієнта.

Узагальнюючи наведені результати вивчення стану мікрофлори ротової порожнини у здорових осіб та у хворих з гнійно-запальними захворюваннями у тканинах пародонту, проведеного шляхом застосування різних методів дослідження, можна констатувати, що:

– бактеріологічні методи дослідження мікрофлори ротової порожнини не втрачають своєї важливості та потребують постійного удосконалення, що пов'язано, насамперед, з труднощами культивування деяких збудників патологічних процесів у тканинах пародонту;

– встановлення переліку мікроорганізмів – «маркерів стану здоров'я» тканин пародонту та кількісних мікробіологічних показників захворювання, є в наш час важливою та поки що не вирішеною проблемою. Досягнення цієї мети потребує аналізу та узагальнення значного об'єму експериментальних результатів, отриманих різними дослідниками.

DOI: 10.5281/zenodo.4382168

Some aspects of studying the state of the oral microflora

Dyachenko Valentina, Voronkina Iryna, Maryuschenko Anatoly, Serdechna Eleonora, Biryukova Svetlana, Kheder Said

The study of the microflora of the oral cavity plays an important role in establishing the pathogenetic mechanisms of purulent-inflammatory diseases of periodontal tissues. The human oral microbiome includes more than 700 species of microorganisms that inhabit various habitats, including teeth, gums, tongue, cheeks, hard and soft palate, and tonsils. The term "microbiome" was coined in 2001 by Joshua Lederberg to denote the ecological set of commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms in our body that play the role of "determinants of health and disease". Under the influence of various factors in the qualitative and quantitative composition of the microflora of the oral cavity there are changes. Her condition is influenced by lifestyle, age, human nutrition, compliance with the rules of oral hygiene, as well as the presence of various diseases, including various disorders and diseases in the oral cavity, and other factors. Because there is a constant flow of microorganisms that enter the oral cavity from the environment, it is necessary to distinguish them from endogenous species, which Theodore Rosebury called local microbes or normal microflora. It is believed that the difference between them cannot be established directly by studies of human isolates alone. It is necessary to compare them with isolates from the external environment to determine which clones are rapidly restored in the host organism, or in the environment. Analysis of the oral microbiome of healthy people using the latest advances in sequencing technology revealed that most species of bacterial microorganisms in healthy people are identical. Based on international research in recent years, a database of phylogenetic data on the human oral microbiome - Human Oral Microbiome Database (HOMD), which includes about 700 taxa (individual species and subgroups) and 13 types of Actinobacteria, Fusobacteria, Chlamidia, Chloroflexi, Furyarchaeota Proteobacteria Spirochaetes, SR1, Synergistetes, Tenericutes and TM7. HOMD is the first phylogenetic base of microbiome results, which aims to understand the health and development of human oral diseases (including caries, purulent-inflammatory periodontal diseases and others). In order to determine the relative number of taxa and to identify new species of oral microbiota, 36,043 clones of 16S rRNA genes with more than 1000 isolates were analyzed. The results revealed 1,179 taxa, of which about 280 species of bacteria were isolated culturally and received an official name, about 8% - cultivated but not named, and 68% were non-cultivated. Thus, it was confirmed that more than half of the species of bacteria existing in the oral cavity cannot be cultured on nutrient media. As for the classical bacteriological methods of research, they are obviously used to the greatest extent in routine practice, to study the state of the human microbiome, including the oral cavity. The search for new methods of prevention and treatment of purulent-inflammatory periodontal diseases is inextricably linked with the isolation of pure cultures of pathogens and the study of their biological properties: sensitivity to antibiotics, exposure to various physical factors (ultraviolet, laser radiation, relativistic electrons, etc.) cells.

Keywords: oral microflora, studying, review

References

1. Lederberg, J., and Mccray A. T. Ome sweet 'omics—a genealogical treasury of words. *Scientist.* 2001. 15. 8-10.
2. Ribeiro, A.A., Azcarate-Peril M.A., Cadenas M.B. et al. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS One.* 2017. 12 (7). e0180621.
3. Rosebury, T. Microorganisms indigenous to man. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, NY. 1962. 435
4. Floyd E Dewhirst, Tuste Chen, Jacques Izard, Bruce J Paster, Anne C R Tanner, Wen-Han Yu, Abirami Lakshmanan, William G Wade The human oral microbiome J Bacteriol.2010. 192(19). 5002-17. doi: 10.1128/JB.00542-10. Epub 2010 Jul 23.
5. Zaura Egija, Nicu Elena A., Krom Bastiaan P and Keijser Bart J. F. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. Front Cell Infect Microbiol. 2014. 4. 85.doi: 10.3389/fcimb.2014.00085
6. Zaura E., Keijser B.J., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. BMC Microbiol. 2009. 9. 259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259
7. Krendelev M.S. Normal microflora in the human oral cavity. Modern Problems of Science and Education. Surgery. 2015. 5. 635. http://www.science-education.ru/ru/article/ view?id=21628
8. Zorina O. A., Kulakov A. A., Boriskina O. A., Rebrikov D. V. Correlation of pathogenic representatives of microbiocenosis of periodontal pockets in periodontitis of varying severity. Acta naturae. 2011. 3. 2 (9).
9. Braga R.R., Carvalho M.A., Bruca-Romero O., Teixeira R.E., Costa J.E., Mendes E.N., Farias L.M., Magalhres P.P. Anaerobe. 2010. 16. 3. P. 234–239.
10. Hyvärinen K., Laitinen S., Paju S., Hakala A., Suominen Taipale L., Skurnik M., Könönen E., Pussinen P.J. Innate Immun. 2009. 15. 4. 195–204.
11. Guryanova Svetlana V., Borisova O.Yu., Kolesnikova N.V., Lezhava N.L., Kozlov I.G., Gudima G.O. The effect of muramyl peptide on the microbial landscape of the oral cavity. Immunology. 2019. 40 (6). 34–40. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16005
12. Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Timofeeva A.V. Microbial society of environmental niche: oral cavity of the healthy children. Russian Journal of Infection and Immunity. 2018. 8(1). 54-60. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-54-60
13. Babikova Marina Sergeevna. Characterization of the microflora of free oral fluid in persons using dental orthopedic structures, and determination of the effect of low-intensity electromagnetic radiation on biofilm formation in bacteria: abstract of thesis. ... Candidate of Medical Sciences: 02/03/03 Place of protection: Yuzh.-Ur. state honey. un-t. Chelyabinsk, 2018.24 p.

DOI: 10.5281/zenodo.4382168

14. Eremenko A.V., Karakov K.G., Khachaturyan E.E., et al. The results of a comprehensive periodontal therapy using the device "vector" and antimicrobial photodynamic laser system. Modern Problems of Science and Education. Surgery. 2016. 5. http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25409
15. Al Habashneh, Rola Asa'ad, Farah A. Khader, Yousef. Photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. Quintessence Int. 2015. 8. 677-690. doi:10.3290/j.qi.a34078, PubMed:25918763
16. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ.. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. Journal of dental research. 2012. 10. 914-920 DOI: 10.1177/0022034512457373
17. Loesche W J , Grossman N S. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. Clin Microbiol Rev. 2001. 14(4). 727-52 DOI: 10.1128/CMR.14.4.727-752.2001
18. Hyvärinen K., Laitinen S., Paju S., et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. Innate Immunity. 2009. 15. 4. C. 195-204.

DOI: 10.5281/zenodo.4382168