

УДК 616.31-022
DOI: 10.56871/CmN-W.2023.86.86.008

МИКРОБИОТА ПОЛОСТИ РТА ПАЦИЕНТОВ ПРИ РАННЕМ ДЕТСКОМ КАРИЕСЕ — ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© Елена Александровна Климова, Наталья Александровна Соколович,
Диана Алексеевна Кузьмина

Санкт-Петербургский государственный университет, факультет стоматологии и медицинских технологий.
199106, г. Санкт-Петербург, 21-я линия В.О., 8а

Контактная информация:

Елена Александровна Климова — ассистент кафедры стоматологии. E-mail: doctor.klimova@yandex.ru
ORCID ID: 0009-0007-1740-3294

Для цитирования: Климова Е.А., Соколович Н.А., Кузьмина Д.А. Микробиота полости рта пациентов при раннем детском кариесе — пилотное исследование // Children's medicine of the North-West. 2023. Т. 11. № 2. С. 80–84. DOI: <https://doi.org/10.56871/CmN-W.2023.86.86.008>

Поступила: 06.03.2023

Одобрена: 11.04.2023

Принята к печати: 28.04.2023

Резюме. Кариозные поражения продолжают оставаться актуальной проблемой современного практического здравоохранения. По территории России недостаточно данных эпидемиологических исследований среди детей до 5 лет по заболеваемости кариесом раннего детского возраста. В западных странах пациентов с кариесом раннего детского возраста лечат в обязательном порядке в условиях общего обезболивания с сопутствующей госпитализацией, что является стрессом для ребенка и семьи, а также затратным методом для здравоохранения. Современная метагеномика дает возможность изучить фундаментальные аспекты проблемы этиологии кариеса с последующей разработкой этиотропной терапии и средств профилактики. Наряду с другими микроорганизмами по значению в развитии кариозного процесса лидирует род *Streptococcus*. Изучение патогенов, а также функции специфических генов при стоматологической патологии становится возможным при помощи метагеномного секвенирования. В настоящей работе исследован биологический материал с поверхности зубов детей с кариесом раннего детского возраста методом полимеразно-цепной реакции с последующим метагеномным секвенированием. Спектр микроорганизмов был изучен и распределен по семействам. Исследование показало необходимость дальнейшего изучения микробиоты у детей с ранним детским кариесом для выявления критически значимых патогенов и разработки специальных средств профилактики, персонализированных данному возрасту.

Ключевые слова: эпидемиология кариеса; ранний детский кариес; метагеном; биопленки; кариес.

ORAL MICROBIOTA IN EARLY-CHILDHOOD CARIES PEDIATRIC PATIENTS — THE PILOT STUDY

© Elena A. Klimova, Natalia A. Sokolovich, Diana A. Kuzmina

Saint Petersburg State University, Faculty of Dentistry and Medical Technology. 21 Line V.O. 8a, Saint Petersburg, Russian Federation, 199106

Contact information:

Elena A. Klimova — Assistant of the Department of Dentistry. E-mail: doctor.klimova@yandex.ru ORCID ID: 0009-0007-1740-3294

For citation: Klimova EA, Sokolovich NA, Kuzmina DA. Oral microbiota in early-childhood caries pediatric patients — the pilot study. Children's medicine of the North-West (St. Petersburg). 2023; 11(2):80–84. DOI: <https://doi.org/10.56871/CmN-W.2023.86.86.008>

Received: 06.03.2023

Revised: 11.04.2023

Accepted: 28.04.2023

Abstract. Carious lesions continue to be an urgent problem of modern practical healthcare. On the territory of Russia, there is insufficient data from epidemiological studies among children under 3 years of age on the incidence of early childhood caries. In Western countries, patients with early childhood caries are treated without fail under general anesthesia with concomitant hospitalization, which is stressful for the child and family, as well as a costly method for healthcare. Modern metagenomics makes possible to study the fundamental aspects of the problem of the etiology of caries with the subsequent development of etiotropic therapy and means of prevention. Along with other microorganisms, the genus *Streptococcus* is the leader in the development of the carious process. The study of pathogens, as well as the function of specific genes in dental pathology, becomes

possible with the help of metagenomic sequencing. In this paper, children with early childhood caries were studied by polymerase chain reaction followed by metagenomic sequencing. The spectrum of microorganisms in different children was studied and distributed among families. The study showed the need for further study of oral microbiota in children with early childhood caries to identify critically important pathogens.

Key words: caries epidemiology; early childhood caries; metagenome; biofilm; caries.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Кариес раннего детского возраста (КРДВ) — это медицинская и социальная проблема, которая серьезным образом влияет на здоровье ребенка и на качество жизни детей и их семей. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 620 миллионов детей в мире страдают этим заболеванием. КРДВ классифицируют как кариес, возникающий у детей младше 72 месяцев, первые признаки заболевания манифестируют в возрасте от 18 до 24 месяцев.

В мировой научной литературе кариес раннего детского возраста (КРДВ) у детей 3–5 лет определяют как одну или более кариозных (К), отсутствующих (У) по кариесогенной причине или пломбированных (П) поверхностей во временных передних зубах верхней челюсти или КПУ поверхностей в количестве более 4 (в возрасте 3 лет), более 5 (возраст 4 года) или более 6 (возраст 5 лет).

По литературным данным, 7% детей до 3 лет в развитых европейских странах имеют ранний детский кариес, а в развивающихся странах этот показатель достигает 35%. По данным Л.П. Кисельниковой (2013), распространенность кариеса у детей до 3 лет в Москве составляет 57%. По всей территории России нет данных эпидемиологических исследований среди данной возрастной группы.

В западных странах пациентов с кариесом раннего детского возраста лечат в обязательном порядке в условиях общего обезболивания с сопутствующей госпитализацией. Данный метод часто несет психологический стресс для ребенка и семьи, а также является затратным методом для здравоохранения. Кроме того, статистика рецидивов кариеса в ближайшие 2 года после санации КРДВ показывает удручающие результаты. На наш взгляд, данное заболевание требует комплексного изучения и разработки специальных персонализированных средств профилактики до возникновения патологии, а также после полной санации.

ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метагеномика дает возможность изучить фундаментальные аспекты проблемы этиологии кариеса с последующей разработкой этиотропной терапии и средств профилактики. Наряду с другими микроорганизмами по значению в развитии кариозного

процесса лидирует род *Streptococcus*. Изучение патогенов, а также функции специфических генов при стоматологической патологии становится возможным при помощи метагеномного секвенирования.

Заболевания полости рта, включая заболевания периодонта и кариес, занимают лидирующие позиции по распространенности среди инфекционных заболеваний человека [2]. Кариес продолжает оставаться актуальной проблемой в медицине всех регионов. Его разрушительное действие приводит к значительным затратам в системе здравоохранения [3].

Полость рта человека представляет собой влажную теплую среду, с легкостью заселяемую микроорганизмами. Присутствие твердых и мягких тканей, каждая из которых имеет сложную микроанатомию, способствует созданию множества различных ниш и поддерживает существование разнообразной микробиоты. В настоящее время известно, что наиболее распространенные заболевания полости рта, а именно кариес зубов и его осложнения, вероятнее всего вызваны многовидовыми сообществами, а не отдельными, изолированными патогенами [1]. Различные виды микробов сосуществуют и формируют полимикробную биопленку — зубной налет в полости рта [2, 6].

Метагеномика с помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) воспроизводит бактериальный состав и геномные профили бактерий с целью изучения взаимосвязей между микробным разнообразием, генетическими вариациями и заболеваниями полости рта. По мнению Ричарда Дж. Ламонт, исследование генома микроорганизмов полости рта находится на ранней стадии развития [6]. Роли патогенных видов и функции специфических генов в развитии стоматологического заболевания обнаружены путем метагеномного анализа. Аннотации геномов микроорганизмов ротовой полости подтверждают гипотезу ассоциации специфических генов или метаболических путей со здоровьем полости рта и со специфическими заболеваниями [6]. Учеными также предложена модель трехуровневых взаимодействий, происходящих в микробиоме и определяющих состояние стоматологического здоровья или заболевания [2].

Streptococcus являются микроорганизмами, которые имеют наиболее важное отношение к патологическим процессам, так как эти микробы часто

являются первыми колонизаторами поверхности и численно доминируют в полости рта человека. Документально зафиксировано большое число взаимодействий между *Streptococcus* и другими бактериями, и предполагают их критическую значимость в развитии многовидовых микробных сообществ и для перехода от состояния стоматологического здоровья к состоянию заболевания.

Представители рода *Streptococcus* являются грамположительными факультативными анаэробными кокками. Совершенствование техник микроскопии и моделей биопленок позволяют детализировать видение пространственного распределения *Streptococcus* в биопленке полости рта. Возросло применение методов анализа специфических генов, которые модулируют межвидовые взаимодействия. В ряде работ также установлено, что *Streptococcus* продуцируют спектр внеклеточных факторов, способствующих их интеграции в многовидовые сообщества и дают возможность им формировать «социальные сети» с соседствующими с ними видами. Эти «факторы интеграции сообщества» включают способствующие агрегации адгезины и рецепторы, малые сигнальные молекулы.

Bishop и соавт. (2009) выделили 4 группы *Streptococcus* полости рта (рис. 1) [1]. Установлено, что два вида *Streptococcus* группы *Mutans*, названные *S. mutans* и *S. sobrinus*, связаны с кариесом зубов человека. Их кислотопродуцирующие свойства и потенциал способности существования в кислой среде напрямую связаны с кариесогенным потенциалом этих бактерий. Для того чтобы выживать в кислых условиях полости рта человека с сотнями бактерий-конкурентов, оба вида развили в себе много механизмов адаптации [4].

Кариесогенный потенциал *S. mutans* может быть обусловлен множеством факторов вирулентности. Эти факторы включают способности: 1) метаболизировать углеводы с сопутствующим выделением молочной кислоты (кислотообразование); 2) устойчивость к кислой среде и способность выживать в ней; 3) облегчать связывание гидроксиапатитов и способствовать межклеточной адгезии; 4) формировать в зубном налете мультибактериальные сгруппированные структуры (формирование биопленки); 5) успешно устранять другие штаммы бактерий путем выработки бактериоцинов. Когда эти факторы вирулентности *S. mutans* и других микроорганизмов выражены фенотипически и работают совместно, биопленка зубного налета переходит в состояние прогрессирующего кариесогенного потенциала [9].

Молекулярные исследования показали, что *S. mutans* не всегда представлен при кариесе. Другие кислотопродуцирующие бактерии могут также играть роль в патогенезе кариеса у некоторых

индивидов — это *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium dentium*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*/*S. vestibularis* и *S. parasanguinis* [7–9].

Если присутствует *S. mutans*, то дополнительное присутствие бифидобактерии *Scardovia wiggsiae* тесно коррелирует с кариесом [5].

Количественное превалирование первичных колонизаторов *S. gordonii* и *S. sanguinus* в полости рта способствует ограничению роста *S. mutans* [7, 8]. Доступность кислорода для *S. gordonii* и *S. sanguinus* и продукция ими перекиси водорода позволяют этим микроорганизмам эффективно конкурировать с другими видами стрептококков, включая *S. mutans* [7–9]. *S. mutans*, напротив, может противодействовать росту других *Streptococcus* полости рта путем образования и выделения бактериоцинов [7, 8]. Межвидовой антагонизм, аналогично другим экологическим факторам в полости рта, позволяет определить исход конкурентной борьбы между *Streptococcus*, первично колонизирующими полость рта, и *S. mutans*. В конечном счете формируется состояние стоматологического здоровья пациента или развиваются заболевания, в том числе кариес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением в течение 3 месяцев находились 6 детей в возрасте 20–36 месяцев без сопутствующей общесоматической патологии, с неотягощенным аллергологическим анамнезом и ранее не применявших антибактериальную терапию. У детей было проведено полное стоматологическое обследование и выявлена необходимость плановой санации в условиях общей анестезии. Пациенты были разделены на две группы по полу.

1-я группа — 3 пациента женского пола на смешанном вскармливании.

2-я группа — 3 пациента мужского пола на смешанном вскармливании.

При вовлечении пациентов в группы критерием отбора было наличие ночного грудного вскармливания и добавленного сахара в диете. При вовлечении пациентов в группы критерием отбора было наличие ночного грудного вскармливания и добавленного сахара в диете. Пациентам до санации проводились бактериологические и молекулярно-биологические исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени.

Для бактериологического исследования проводили забор материала с поверхностями первых временных моляров нижней челюсти и резцов верхней челюсти без применения специальной гигиенической обработки. Взятие материала проводили утром, до процедуры чистки зубов, с

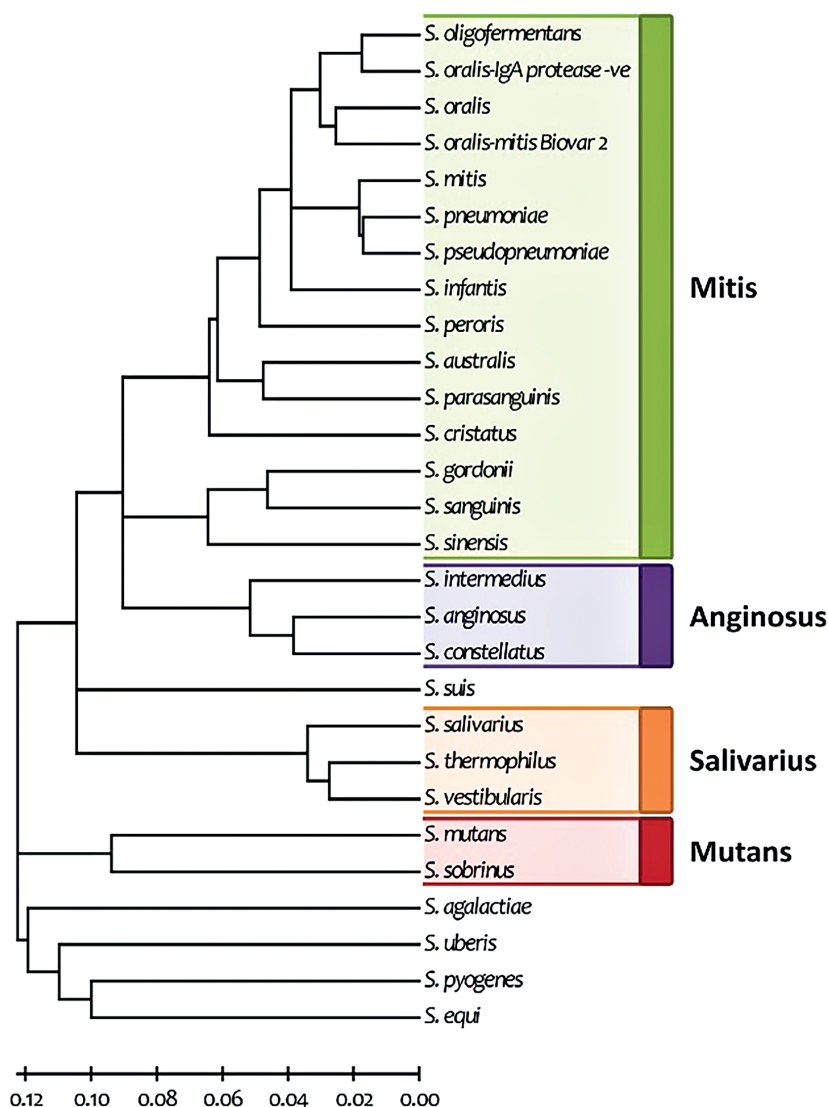


Рис. 1. Филогенетическое древо рода *Streptococcus* (по Bishop et al., 2009)

помощью стерильного бумажного эндодонтического штифта стандартного размера (№ 30) и одно-разовых стерильных полипропиленовых зондов с синтетическим ворсом, которые затем помещали в раствор «ДНК-экспресс» для последующей транспортировки. До транспортировки систему держали при температуре 2–4 °C, далее в охлажденном состоянии в течение 1 часа образцы были перемещены в лабораторию. Бактериологическое исследование проводили в соответствии с общепринятыми правилами клинической анаэробной микробиологии.

Далее образцы были подвергнуты высокопроизводительному метагеномному секвенированию в Ресурсном центре СПбГУ с помощью секвенатора Ion Torrent PGM (Life Technologies) на маркерные гены 16S РНК с помощью «универсальных» праймеров для идентификации микробного сообщества.

ВЫВОДЫ

Образцы налета, полученные с зубов, у пациентов 1-й группы женского пола показали большее количество условно-патогенной и кариесогенной микрофлоры в отличие от образцов с зубов 2-й группы. Ввиду высокой стоимости исследования данные результаты нуждаются в количественном подкреплении и будущем подтверждении или опровержении, но, на наш взгляд, достойны обсуждения в профессиональном сообществе на основании значимости данной патологии по удельному весу КРДВ среди стоматологических заболеваний детей.

Следующим этапом планируется изучить изменения микробиоты в течение 6–18 месяцев после санации для предварительных выводов по применяемым материалам и о свойствах микробиоты детского организма менять свой состав в условиях полной санации. Данная публикация также имеет

цель призвать детских стоматологов активно участвовать в научных исследованиях по изучению КРДВ.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Информированное согласие на публикацию. Авторы получили письменное согласие пациентов на публикацию медицинских данных.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patient for publication of relevant medical information within the manuscript.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jakubovics N.S., Yassin S.A., Rickard A.H. Community Interactions of Oral Streptococci. *Advances in Applied Microbiology*. 2014; 87: 102–4.
2. Xu P., Gunsolley J. Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence*. 2014; 5(3): 424–32.
3. Baynel S., Petersen P.E., Piper D. et al. The challenge for innovation in Direct restorative materials. *Adv Dent Res*. 2013; 25(1): 14–5.
4. Conrads G., De Soet J.J., Song L. et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *Journal of Oral Microbiology*. 2014; 6: 26.
5. Brown L.R., Billings R.J., Kaster A.R. Quantitative comparisons of potentially cariogenic micro-organisms cultured from non-carious and carious root and coronal tooth surfaces. *Infect Immun*. 1986; 51: 765–70.
6. Lamont R.J., Berne R.S., Leontyev V.K. Microbiology and immunology for dentists. Moscow; 2010: 86–7.
7. Kreth J., Merritt J., Shi W., Qi F. Competition and co-existence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol*. 2005; 187: 7193–7203.
8. Kreth J., Zhang Y., Herzberg M.C. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 4632–40.
9. Kreth J., Merritt J., Zhu L. et al. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacins and mutacin-like gene in *Streptococcus mutans*. *Microbiol Lett*. 2006; 265(11): 17.

REFERENCES

1. Jakubovics N.S., Yassin S.A., Rickard A.H. Community Interactions of Oral Streptococci. *Advances in Applied Microbiology*. 2014; 87: 102–4.
2. Xu P., Gunsolley J. Application of metagenomics in understanding oral health and disease. *Virulence*. 2014; 5(3): 424–32.
3. Baynel S., Petersen P.E., Piper D. et al. The challenge for innovation in Direct restorative materials. *Adv Dent Res*. 2013; 25(1): 14–5.
4. Conrads G., De Soet J.J., Song L. et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *Journal of Oral Microbiology*. 2014; 6: 26.
5. Brown L.R., Billings R.J., Kaster A.R. Quantitative comparisons of potentially cariogenic micro-organisms cultured from non-carious and carious root and coronal tooth surfaces. *Infect Immun*. 1986; 51: 765–70.
6. Lamont R.J., Berne R.S., Leontyev V.K. Microbiology and immunology for dentists. Moscow; 2010: 86–7.
7. Kreth J., Merritt J., Shi W., Qi F. Competition and co-existence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol*. 2005; 187: 7193–7203.
8. Kreth J., Zhang Y., Herzberg M.C. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 4632–40.
9. Kreth J., Merritt J., Zhu L. et al. Cell density- and ComE-dependent expression of a group of mutacins and mutacin-like gene in *Streptococcus mutans*. *Microbiol Lett*. 2006; 265(11): 17.