

SKŁAD MIKROBIOMU TKANEK OKOŁOWIERZCHOŁKOWYCH ZĘBA LECZONEGO ENDODONTYCZNIE Z ZAPOCZĄTKOWANYM PROCESEM ROPNYM

Anna Turska-Szewczuk¹, Dorota Samborska¹, Katarzyna Dworaczek¹

Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Akademicka 19, 20-033 Lublin



Wprowadzenie

Zęby pozornie prawidłowo przeleczone endodontycznie, bez obserwowalnych objawów klinicznych, a także ze zmianami okołowierzchołkowymi i torbielami stanowią istotne źródło infekcji w rozwoju choroby odogniskowej. Dane kliniczne wskazują, że źródła zakażeń pierwotnych są często zlokalizowane w przydatkach, układzie moczowym, drogach żółciowych, jednak aż 90% z nich powstaje w obrębie głowy. Ucho środkowe, zatoki przynosowe, a zwłaszcza jama ustna, migdałki, zęby i tkanki przyzębia stanowią 80% wszystkich zmian o charakterze zapalnym, a wśród nich pierwsze miejsce zajmują ogniska zębopochodne [1,2].

Cel

Celem pracy było określenie zmian w składzie mikrobiomu bakteryjnego tkanek okołowierzchołkowych zęba przeleczonego endodontycznie, z zapoczątkowanym procesem ropnym, w zależności od czasu trwania hodowli preparatu w warunkach beztlenowych w bulionie tioglikolanowym w temperaturze 37°C.

Metody

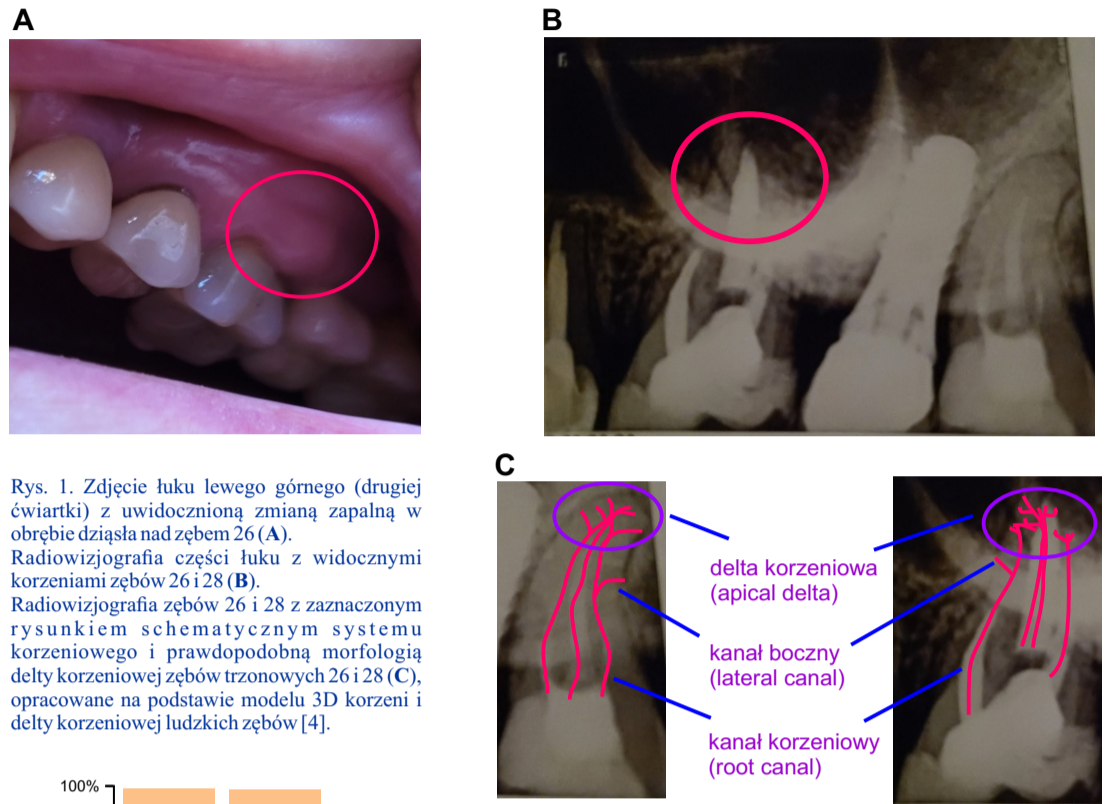
Z obu prób po 10 (abs1) i 28 dniach hodowli (abs2-pasaż do świeżego podłoża) w warunkach beztlenowych w bulionie tioglikolanowym w temperaturze 37°C, wyizolowano genomowe DNA metodą automatyczną z wykorzystaniem drobinek magnetycznych i zestawu MagnifiQ 1 genomic DNA instant kit (A&A Biotechnology), a po sprawdzeniu jego ilości oraz czystości, skierowano do dalszych badań. Analiza struktury metagenomicznej populacji bakterii została wykonana dla obu prób techniką wysokoprzepustowego sekwencjonowania NGS (MiSeq Illumina, Genomed SA) hiperzmiennego regionu V3-V4 genu dla 16S rRNA. Analizę bioinformatyczną amplikonów wykonano z wykorzystaniem oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6 oraz QIIME 2 [3] w oparciu o sekwencje referencyjne zdeponowane w bazie Silva 138.

Wyniki

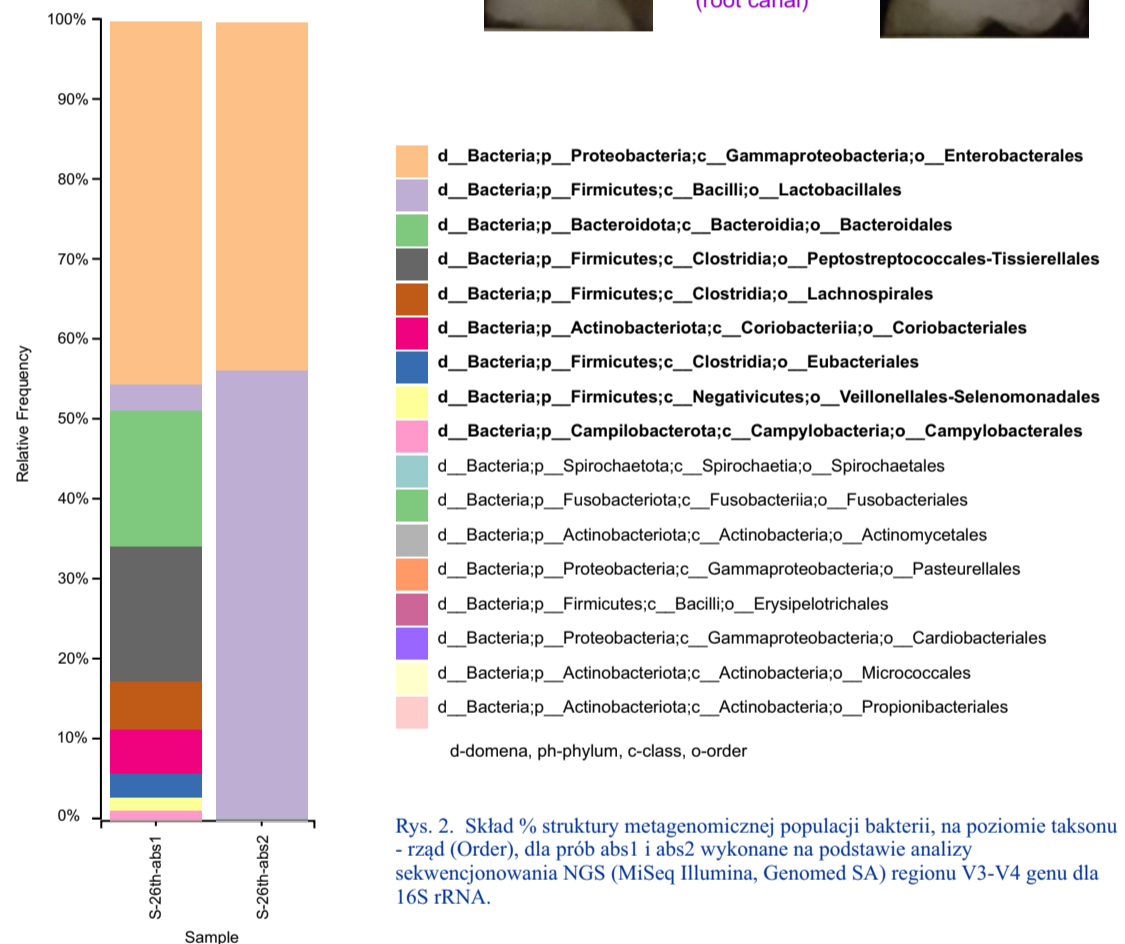
Wyjściową mikrobiotę do badań (próba abs1) tkanek okołowierzchołkowych zęba stanowili w zdecydowanej większości przedstawiciele rzędów Enterobacterales, Bacteroidales i Peptostreptococcales-Tissierellales (80% populacji). Najliczniej wśród taksonów były reprezentowane rodzaje, odpowiednio, *Citrobacter* (45,4%), *Prevotella* i *Porphyromonas* (12,1%) oraz *Peptoniphilus* (11,7%).

Wśród taksonów na poziomie rzędu zauważalny był także udział Lachnospirales (6%) i Coriobacteriales (5%), z dominującymi rodzajami *Shuttleworthia* i *Olsenella*. Z kolei, liczebność reprezentantów kolejnych trzech taksonów: Lactobacillales, Eubacteriales oraz Veillonellales-Selenomonadales była zdecydowanie niższa, na poziomie od 2,5 do 3,0%.

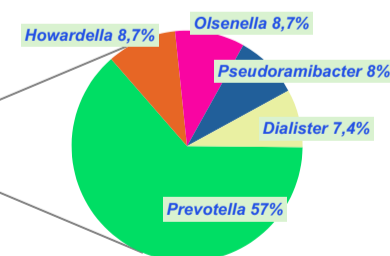
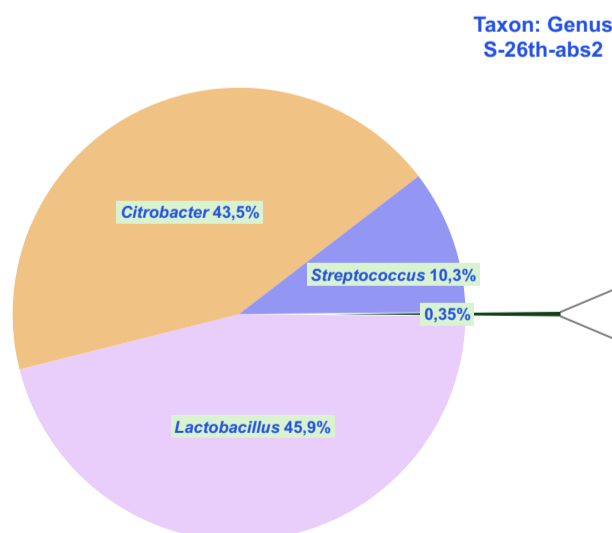
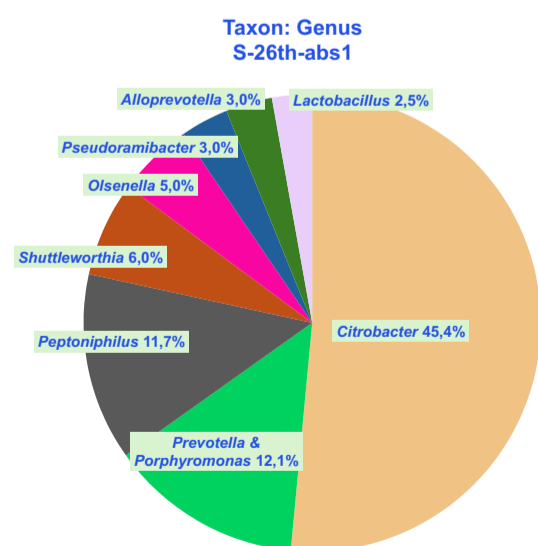
Pasaż i dłuższy czas hodowli w warunkach beztlenowych (próba abs2), w bulionie tioglikolanowym zmienił strukturę mikrobioty redukując jej różnorodność i ostatecznie promując wzrost drobnoustrojów rzędu Lactobacillales (56,15%), z rodzajami *Lactobacillus* i *Streptococcus*, których liczebność przewyższała przedstawicieli rzędu Enterobacterales (43,5%).



Rys. 1. Zdjęcie łuku lewego górnego (drugiej ćwiartki) z uwidocznioną zmianą zapalną w obrębie dziąsła nad zębem 26 (A). Radiowizjografia części łuku z widocznymi korzeniami zębów 26 i 28 (B). Radiowizjografia zębów 26 i 28 z zaznaczonym rysunkiem schematycznym systemu korzeniowego i prawdopodobną morfologią delty korzeniowej zębów trzonowych 26 i 28 (C), opracowane na podstawie modelu 3D korzeni i delty korzeniowej ludzkich zębów [4].



Rys. 2. Skład % struktury metagenomicznej populacji bakterii, na poziomie taksonu - rząd (Order), dla prób abs1 i abs2 wykonane na podstawie analizy sekwencjonowania NGS (MiSeq Illumina, Genomed SA) regionu V3-V4 genu dla 16S rRNA.



Rys. 3. Skład % struktury metagenomicznej populacji bakterii, na poziomie rodzaju (Order), wykonane na podstawie analizy sekwencjonowania NGS regionu V3-V4 genu dla 16S rRNA.

Literatura:

- [1] Nowak-Kwater B., Kwater A., Chomyszyn-Gajewska M. Znaczenie zębopochodnych ognisk zakażenia. *Przewodnik Lekarza*, 2003 (7/8), 108-114.
- [2] Niedzielska L., Wziątek-Kuczmik D. Wpływ zębopochodnych ognisk infekcji na choroby innych narządów - przegląd piśmiennictwa. *Chirurgia Polska*, 2007, 9(2), 92-96.
- [3] Bolyen, E., Rideout, J., Dillon, M. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 *Nature Biotechnology*, 2019, 37(8), 852-857.
- [4] Mazzi-Chaves, J., Silva-Sousa, Y. et al. (2020). Micro-computed tomographic assessment of the variability and morphological features of root canal system and their ramifications. *Journal of Applied Oral Science*. 2020, 28. 10.1590/1678-7757-2019-0393.

Wnioski

Hodowla drobnoustrojów tkanki okołowierzchołkowej zęba przeleczonego endodontycznie, z zapoczątkowanym procesem ropnym, prowadzona w warunkach beztlenowych w bulionie tioglikolanowym w temp. 37°C pozwala na uzyskanie materiału jakościowego, odpowiedniego do badań metagenomicznych NGS populacji bakterii (region V3-V4 16S rDNA).

Pasaż oraz dłuższy czas hodowli w warunkach beztlenowych zmieniają strukturę mikrobioty redukując jej różnorodność, która nie odzwierciedla początkowego składu.