

MIKROBIOTA USTNE VOTLINE HUMAN ORAL MICROBIOME

AVTOR / AUTHOR:

Aleš Lapanje, Tomaž Rijavec

*Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju
Jamova 39, Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ales.lapanje@ijs.si

SLOVAR:

Vrstna bogatost (angl. richness) – mera številčnosti vrst, kjer preštejemo število vseh različnih vrst, ki smo jih določili v nekem okolju,

Vrstna raznolikost (angl. diversity) – mera raznolikosti vrst kjer se upošteva tudi kakšna je pogostost osebkov določene vrste. To pomeni, če je v dveh okoljih enako število bioloških vrst in so v enem izmed teh dveh okolij osebkovi enakomerno razporejeni po vrstah, je v tem okolju večja vrstna raznolikost kot v drugem okolju, kjer je osebkov ene vrste več kot drugih,

Patobiont – komenzalen mikroorganizem, ki ali v določenih pogojih povzroča bolezni ali pa ustvari pogoje, da se lahko razvije bolezen,

Disbioza – stanje mikrobovne združbe pri človeku, ki vpliva na gostitelja tako, da v nekem določenem času privede do bolezenskega stanja v gostitelju,

Niša – okolje, ki s svojimi fizikalno kemijskimi (temperatura, pH, koncentracija snovi itd.), ekološkimi (medvrstna razmerja kot so to tekmovalnost, simbioza itd.), biološkimi (sposobnost razgradnje določenih snovi, hitrost rasti v določenih fizikalno kemijskih razmerah itd.) parametri določi kateri organizmi bodo lahko to okolje zavzeli in v njem uspevali,

POVZETEK

Človeški mikrobiom ustne votline je v zelo občutljivem odnosu z imunskim sistemom gostitelja. Pri zdravi populaciji mikrobiom ustne votline sestavljajo normalne bakterijske skupine skupaj z majhnimi količinami potencialno patogenih bakterij. Sestava zdravega mikrobioma ustne votline je specifična za določene starostne skupine in ni povezana z vrsto spola.

Dejavniki, kot so nezdrava hrana, kajenje, slaba ustna higiena ali genetska predispozicija lahko porušijo zdrav mikrobiom in lahko tvorijo disbiotično združbo. Čeprav vrstna sestava in delovanje mikrobnih biofilmov v ustih vplivata na prognozo dveh znanih bolezni, kariesa in paradontalne bolezni, lahko pripisujemo njune vplive tudi na razvoj drugih bolezni, kot so artritis, kardiovaskularne bolezni ter rast in razvoja ploda.

Trenutno vemo veliko o strukturi združbe in prostorski porazdelitvi mikroorganizmov v ustnem ekosistemu, vendar manjkajo mehanistične študije interakcij z gostiteljem, kar lahko vodi do razvoja učinkovitih pristopov zdravljenja bolezni, ki jih povzročajo mikrobi v ustni votlini.

KLJUČNE BESEDE:

probiotične bakterije, paradontalna bolezen, karies, patobiont, biofilm

ABSTRACT

Human oral microbiom is in a very fragile interaction with host immune system. In healthy population is composed of normal bacterial groups together with small amounts of potentially pathogenic bacteria. Such healthy oral microbiome is more similar between the same age groups within the population and it is not affected with the sex type.

"Catastrophic" events such as unhealthy food intake, smoking, bad oral hygiene or genetic predisposition can disrupt healthy microbiome and can form dysbiotic community. Although the oral microbial biofilm structure affect prognosis of two well known diseases, caries and periodontal disease, it can also attribute to the development of arthritis, cardiovascular diseases as well as growth and development of embryo.

Currently we know a lot about the community structure and spatial distribution of microorganisms in the oral ecosystem, but we miss mechanistic stud-

ies of interactions with hosts, which can lead to development of effective treatments for common diseases.

KEY WORDS:

probiotic bacteria, periodontal disease, caries, pathobiont, biofilm

- Osnovni mikrobiom (ang. core microbiome) – del mikrobne združbe posameznika, ki je prisoten pri vseh analiziranih okoljih (predel na osebkku npr. zobje, dlesni, koža) oziroma celih osebkkih,
- Holomikrobiom – vsi mikrobi skupaj, ki smo jih določili v vseh okoljih oz. pri vseh osebah,
- Receptor - mesto na površini celice na katerega se vežejo različne snovi vključno molekule na površini drugih celic in vplivajo na medcelično povezavo kot tudi na medcelično komunikacijo,
- Sev - podvrsta določene vrste, ki ima lahko zelo drugačne lastnosti kot drug sev iste vrste. Npr. eden sev je lahko patogen za razliko od drugega, pa čeprav sta oba pripadnika iste vrste,
- Normalna mikrobiota - del indigene združbe, ki predstavlja skupine mikroorganizmov, ki so prisotne v velikem številu pri različnih osebkih iste populacije,
- Indigena združba - združba sestavljena iz mikrobov, ki so evolucijsko povezani z gostiteljem (avtohtoni mikrobi), normalno mikrobioto in patogenimi mikrobi.

1 UVOD

Ustni mikrobiom je sestavljen iz zelo velikega števila različnih mikroorganizmov in je tudi eden izmed najbolj preučenihih človeških mikrobiomov, predvsem zaradi enostavnosti vzorčenja in dostopnosti do vzorčnega mesta. Mogoče ravno zaradi tega so bile zobne obloge že pred več kot 300 leti vir iz katerega je van Leeuwenhoek, ki ga štejemo za očeta mikrobiologije, pridobil prve mikroorganizme, jih je opazoval s svojim primitivnim mikroskopom, opisal njihove oblike ter načine gibanja.

Velika raznolikost mikrobioma ustne votline je v veliki meri posledica izredno različnih pogojev v ustih. Ti pogoji so predvsem: različne lastnosti površin na katere se pritrjujejo mikroorganizmi (npr. zobje, dlesni, sluznice, jezik), stalno

odplavljanje in mešanje celic planktonskih mikroorganizmov s tokom sline, vnašanje različne hrane ter povečevanje dostopnosti hranil med in po hranjenju zaradi mehanskega in encimskega delovanja gostitelja. Poleg tega tudi spremembe temperature ob pitju tople in mrzle pijače vplivajo na preživetje enih in propad drugih mikrobov. S tem se vrši selekcija v prid takšnih, ki lahko te stresne pogoje preživijo. Ne smemo tudi zanemariti vpliva prisotnosti mikrobov v hrani in pijači, ki prihaja v ustno votlino, saj lahko ti mikrobi vplivajo na lokalni imunski odziv in posredno tudi na to, ali bo v ustih več ali manj različnih mikrobov. Sama prisotnost mikrobov pa ne pomeni, da so ti tudi aktivni, na kar vplivajo tudi zgoraj naštetih fizikalno kemijski in ekološki parametri. Danes vemo, da mikrobi v ustih lahko živijo suspendirano v tekočinah, slini ali pa so pritrjeni na zobe, dlesni, bukalno sluznico ali jezik in tvorijo biofilme, ki so sestavljeni iz različnih vrst in sevov mikroorganizmov. Za razumevanje tega ekosistema je potrebno dodati, tudi dve biološki komponenti, na eni strani gostitelja, ki s svojim imunskim odzivom stalno nadzoruje rast mikrobov, in na drugi strani značilnosti sestave mikrobne združbe, ki omogoča stalno interakcijo med mikrobi na različnih ravneh, kot npr. ustvarjanje anaerobnih niš, izmenjava hranil in sprejemnikov elektronov dihalne verige, tvorbo protimikrobnih substanc ter snovi za aktivacijo sistemov za zaznavanje celične gostote, ki lahko delujejo znotraj ene vrste ali medvrstno, in nenazadnje tudi izpostavljanje različnih receptorjev na površini, ki omogočajo prostorsko ureditev različnih mikrobnih celic in vzpostavitev končne fizikalne in vrstne strukture biofilma. Mikrobi lahko med seboj komunicirajo kemijsko z različnimi substancami, ki jih izločajo, tvorijo protimikrobne substance in s tem preprečujejo razraščanje drugih mikrobov, s svojim delovanjem spreminjajo lokalni pH, količino kisika in dostopnost hranil, s čimer ustvarjajo mikrookolja. Nenazadnje tudi same mikrobne celice s svojimi receptorji vplivajo na to, kakšno bo zaporedje vezave drugih mikroorganizmov, kako trdno se bodo celice med seboj vezale in s tem regulirajo, kakšen fizikalno trden in vrstno raznolik bo na koncu biofilm.

2 ČLOVEŠKI MIKROBIOM USTNE VOTLINE

2.1 SESTAVA

Čeprav je ustni mikrobiom izpostavljen številnim dejavnikom in je eden najbolj dinamičnih, tako po sestavi kot tudi aktiv-



nosti, zaradi številnih vplivov iz zunanjega okolja, pa se po vrstni sestavi zelo dobro loči od ostalih mikrobiomov v in na človeku (1). Ločimo lahko jedro oz. osnovni mikrobiom, iz le nekaj rodov, in pa holomikrobiom, ki ga sestavlja od okoli 600 do 2000 različnih filotipov (2). Pri tem je bilo ugotovljeno, da vsako področje v ustni votlini vsebuje različne mikrobe, ki se spreminjajo v časovnih intervalih, kar kaže, da je sestava združbe v ustni votlini nišno pogojena (3). Količina patogenih bakterij v slini je pogojena tudi z vrstno raznolikostjo, saj večja kot je raznolikost, večja je zastopnost patogenih mikrobov (4). V grobem lahko rečemo, da debela bakterij kot so Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes bolj prevladujejo v slini, Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes v zobnih oblogah in Firmicutes ter Proteobacteria predstavljajo več kot 90 % vseh mikroorganizmov živečih na bukalni sluznici.

S starostjo se spreminja tudi združba mikrobov v ustni votlini. Pri novorojenčkih prevladujejo bakterije iz debela Firmicutes in pri starejših ljudeh iz debela Proteobacteria. Ob rojstvu je ustna votlina kolonizirana z bakterijami iz debel Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Firmicutes in Bacteroidetes, pri čemer so sicer prisotne tudi bakterije iz rodov *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* in *Propionibacterium*, ampak so bolj redke. Pri novorojenčkih so pogoste bakterije iz rodov *Streptococcus*, *Gamella*, in *Granulicatella*. Pri novorojenčkih je 50 % prisotnost bakterij iz debela *Spirochaetes*, katerih delež se pri starejših povečuje (4). Glede na vse te izsledke, lahko rečemo, da so si mikrobiomi enako starih ljudi med seboj bolj podobni kot med posamezniki različnih generacij. Če analiziramo različne predele ustne votline so v zobnem plaku med različnimi osebami prisotne le bakterije iz rodov *Streptococcus*, *Derrxia*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Granulicatella*, *Eikinella*, *Prevotella*. Če primerjamo sestavo mikrobioma ustne votline med različnimi osebki vidimo, da so samo bakterije rodu *Streptococcus* prisotne tako v slini kot tudi na bukalni sluznici. Med različnimi generacijami so skupni le *Streptococcus*, *Neisseria*, *Capnocytophaga*, *Granulicatella*, *Prevotella*, *Rothia*, *Bergeyella*, *Gemella*, *Porphyromonas* izmed več kot 32 različnih rodov (4).

Skoraj od samega začetka, takoj po rojstvu, pa so na različnih predelih v ustni votlini prisotne tudi bakterije iz rodov, ki imajo patogene predstavnike. Najmanj je le-teh pri novorojenčkih in največ pri ljudeh s stalnimi zobmi in pri starejših ljudeh.

V različnih predelih ustne votline kot tudi pri različno starih skupinah ljudi, se jedrni (core) mikrobiom zelo razlikuje tudi po vrstni bogatosti. Tako je najmanjši jedrni (core) mikrobiom v slini in sluznicah pri novorojenčkih, saj je le-ta zelo

ALI STE VEDELI?

- Ljudje smo se s svojimi mikrobnimi prijatelji razvijali 1,5 milijone let in smo ustvarili zelo tesne povezave. Te medsebojne relacije med nami in mikrobi so tako pomembne, da s svojimi simbiotskimi mikrobi tvorimo t.i. superorganizem oz. holobiont.

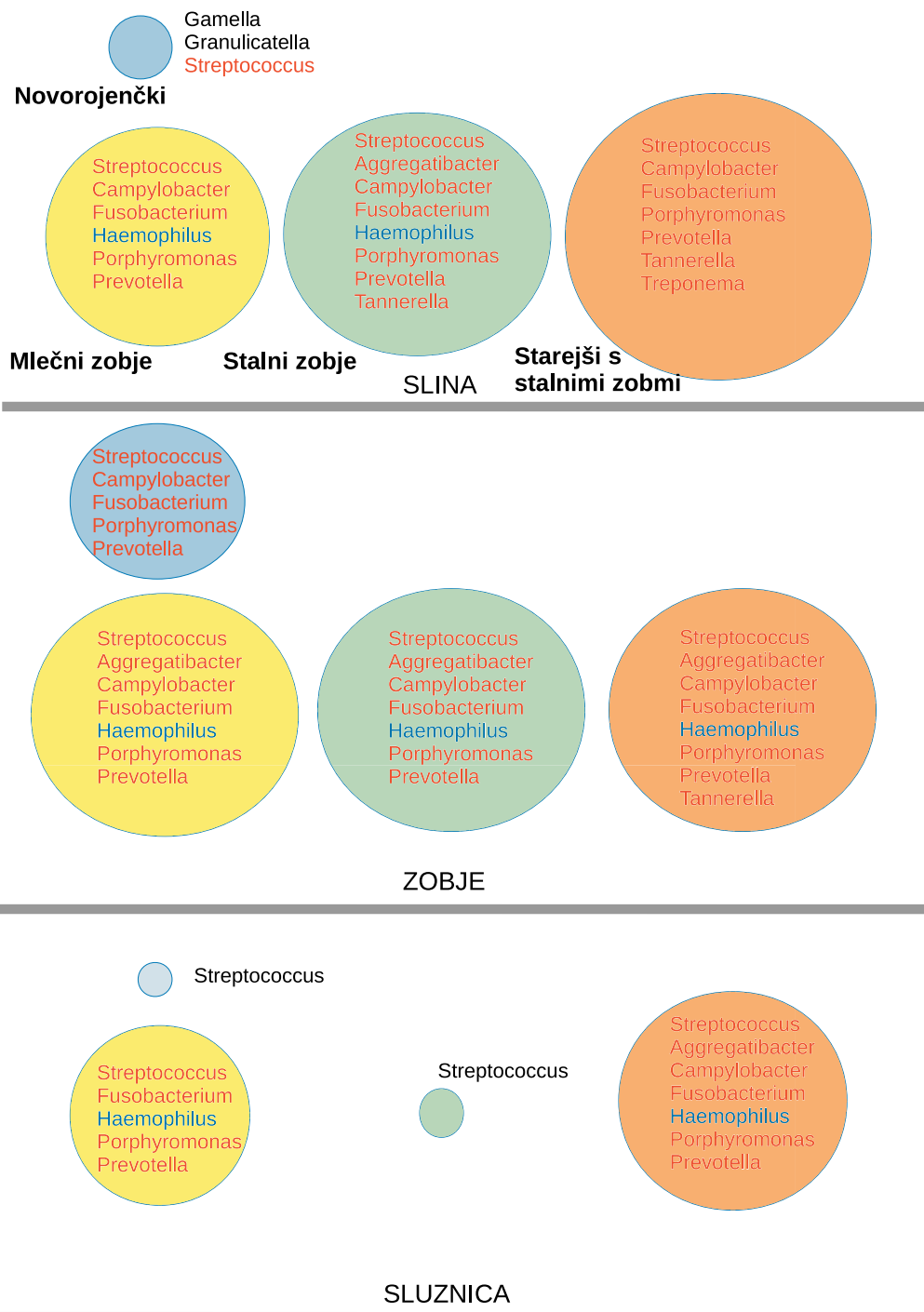
nedefiniran in slabo kontroliran z imunskim sistemom. Zelo velik pa na zobeh starejših oseb (Slika 1). Pri tem je največja raznolikost bakterij v slini (5) ali v zobnih oblogah (4) in najmanjša na bukalni sluznici. Na bukalni sluznici se pojavlja več podobnih bakterijskih filogenetskih skupin z zobnimi oblogami kot pa s slino in jezikom med različnimi starostnimi skupinami pri čemer pa razlik med spoloma ni mogoče določiti (4).

Pri novorojenčkih je mikrobiom v slini izredno nestabilen in je sestavljen predvsem iz bakterij iz rodov *Gamella* in *Granulicatella* ter *Streptococcus*. S pojavom mlečnih zob se sestava združbe v slini bolj ustali. Najbolj so odvisne od prisotnosti mlečnih zob bakterije iz rodu *Abiotrophia*, ki se pojavijo tako v slini kot tudi v zobnih oblogah pri starostnih skupinah, ki imajo mlečne zobe, in izginejo s pojavljanjem stalnih zob (4).

Na vrstno sestavo mikrobiote ustne votline močno vpliva tudi na kakšen način se otrok rodi. Tako je bilo opisano, da otrok, ki se rodi skozi porodni kanal ima v ustih v prvih 3 mesecih več različnih filotipov kot otrok, ki se je rodil s carskim rezom (6). Pri slednjih večina mikrobov, ki so prisotni v ustih, izvira iz kožne mikrobne združbe, s prevladujočo bakterijo *Slackia exigua*, ki je pogosto prisotna pri infekcijah zobnega kanala, paradontalnih obolenjih in različnih abscesih (6, 7).

Glede na dosedanje izsledke lahko rečemo, da so predstavniki zdrave ustne združbe v slini predvsem: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Granulicatella adiacens*, *Neisseria flavescens*, *Rothia mucilaginosa* in *Prevotella melaninogenica*. Pri tem pa v slini najdemo pri zdravih ljudeh tudi patogene bakterije kot npr. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Fillifactor alocis*, kot tudi karies povzročajoče bakterije vključno z bakterijo vrste *Streptococcus mutans* (8).

V zobnem biofilmu prevladujejo bakterije iz debel Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, and Proteobacteria med katerimi pa so najbolj zastopani rodovi *Actinomyces*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Rothia*, *Capno-*



Slika 1. Velikost osnovnega mikrobioma in prisotnost patobiontov v ustih pri osebah pripadajočih različnim starostnim skupinam. Velikost krogov prikazuje relativno velikost jedrnega mikrobioma. Napisani so le rodovi, ki so potencialno patogeni pri velikih jedrnih mikrobiomih in vsi rodovi pri malih. Z rdečimi črkami so označeni patobionti ustne votline.

Figure 1. The size of the core microbiome and the presence of pathobionts in the oral cavity in different age groups. The size of the circles shows the relative size of the core microbial. Only genera that are potentially pathogenic in large core microbiomes and all genera in small core microbiomes are written. In the red letters, the pathobionts of the oral cavity are marked.

cytophaga, Selenomonas, Treponema in TM7 1 in 5 (5). Ob nastanku zgodnjega zobnega plaka pa je značilna prisotnost bakterija *Fusobacterium nucleatum*. V slini kot tudi na bukalni sluznici so značilne predvsem bakterije iz debla Firmicutes. Združbe bakterij v izoblikovanih zobnih oblogah so sestavljene iz enakomerno zastopanih skupin bakterij.

Razvoj mikrobne združbe v ustih je odvisen tudi od količine sline, ki se izloča. Pri posameznikih z manj sline se mikrobna združba spreminja v združbo, ki je značilna za karies (kariogeno), ki ima sposobnost zniževanja pH s pomočjo nastanka fermentativnih produktov metabolizma v biofilmih na površini zob (9). Poveča se število bakterij *Catonella* sp., *S. mutans*, *Lactobacillus fermentum*, *Scardovia wiggsiae*, različni sevi vrste *Atopobium parvulum* in *Veillonella* spp. Kot tudi bakterije, ki so povezane s slabo ustno higieno *Megasphaera* sp. in *Oribacterium* spp.

Pomembno je tudi vedeti, da različne vrste zob kot tudi različne strani (površine) istega zoba kolonizirajo različne bakterije (9), saj je kolonizacija zob pogojena s tem kje se nahajajo. Tako je večinoma kolonizacija bukalnih delov zob bolj podobna kolonizaciji bukalne sluznice in kolonizacija površine spodnjih zadnjih delov sekalcev bolj podobna mikrobiomu jezika (9).

Pri tem pa ne smemo zanemariti, da veliko mikroorganizmov pride v ustno votlino tudi s hrano. Le-ti predstavljajo prehodne mikrobove, ki v ustni votlini ne uspevajo.

2.2. KOLONIZACIJA

Največ je znanega o kolonizaciji površine zob in znatno manj o kolonizaciji sluznic v ustni votlini. Kolonizacija zoba se prične najprej z vezavo različnih proteinov, dolgovernih ogljikohidratov in glikoproteinov (npr. gp340, aglutinini, mucini) (10). Največjo potentnost za vezavo imajo mikrobi iz rodu *Streptococcus* (npr. *S. mitis*), ki se lahko s svojimi receptorji dobro pritrldijo na npr. gp340, α -amilazo, imunoglobuline, fibronektin, laktoferrin in α 2-makroglobulin (11). Bakterije iz rodu *Streptococcus* (*S. sanguinis*, *S. oralis*, in *S. mitis* biovar 1) primarno poseljujejo zobno sklenino v prvih 4 urah po izpostavitvi očiščene zobne površine. Te skupine bakterij se zelo dobro povezujejo z bakterijami iz rodu *Actinomyces* (slika 2, stopnja 1), ki pričnejo poseljevanje nastalega primarnega streptokoknega biofilma po 4 urah do nekje 8 ur (12). Temu pa sledijo bakterije iz rodov *Vaillonella* ter *Neisseria* (slika 2, stopnja 2). Takšen biofilm ni še dosegel zrele strukturne in vrstne sestave in se v njem zelo redko pojavljajo potencialno patogeni mikrobi kot so to npr. *Tannerella forsythensis* (v starejši literaturi *Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis* in *Tre-*

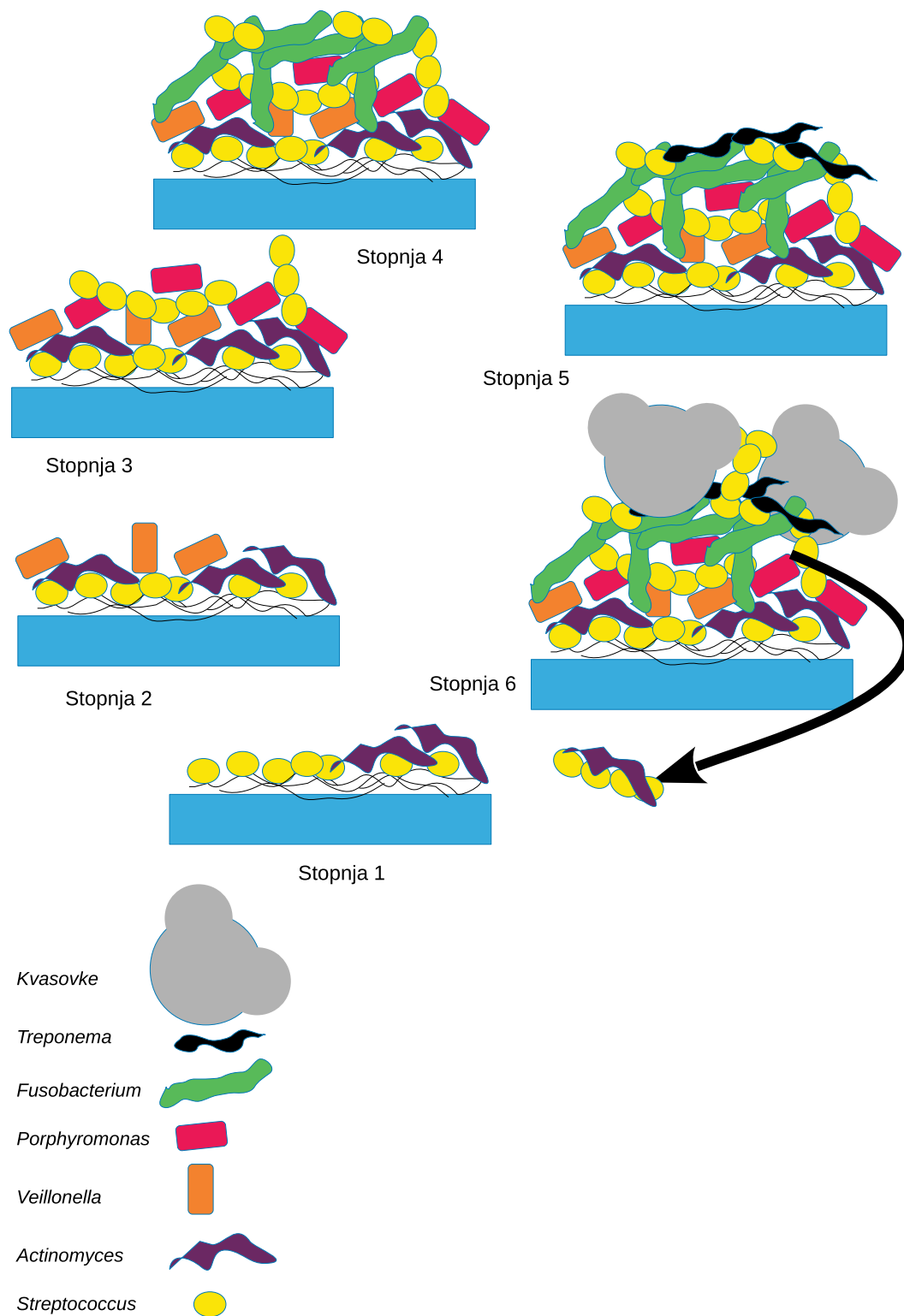
ponema denticola kot tudi *Aggregatibacter* (v starejši literaturi *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (13) (slika 2, stopnje 3 do 6) za razliko od zrelega biofilma v katerem pa se množično razraščajo patogeni mikroorganizmi. Iz zrelega biofilma se najraje odluščijo celice streptokokov, ki lahko na novi površini ponovno pričnejo s kolonizacijo.

Principi medsebojne kompeticije tudi v zobnem biofilmu močno vplivajo na uspešnost vzpostavitve biofilma. Mikrobi lahko naseljujejo površine posamič tj. kot posamezne celice, pri čemer pa morajo biti pogoji ustrezni, da lahko ta bakterija raste in se deli. Glede na okoljske pogoje v na novo vzpostavljeni mikrobni površini, je uspešnost kolonizacije vsekakor večja, če se pritrldijo na površine skupki različnih bakterij, ki se med seboj metabolno dopolnjujejo. Za nastanek tovrstnih skupkov, pa je izrednega pomena izpostavitve različnih receptorjev na površini. Glede na receptorje in fizikalne interakcije med bakterijskimi celicami, najbolj pogosto opazimo skupke celic, ki vsebujejo bakteriji vrste *S. gordonii* in *P. gingivalis*, ki med seboj sodelujejo tudi na nivoju komunikacije s signalnimi molekulami, kar omogoči uspešno kolonizacijo. Za razliko, če se bakterija vrste *P. gingivalis* poveže z bakterijo vrste *S. cristatus*, se ne inducirajo geni za tvorbo pritrjevalnega aparata pri *P. gingivalis* in biofilm, ki nastane, ni trden (14, 15). Podobno lahko vpliva tudi avtoinduktivni medvrstni sistem AI2, ki omogoča *A. oris* rast, če je le-ta prisotna skupaj z bakterijo *S. oralis*. Podobno koagregirajo tudi bakterije *A. actinomycetemcomitans* z *Veillonella* sp. in *F. nucleatum*. Pri tem pa je znano, da le celice *A. actinomycetemcomitans* vsebujejo homolog AI2 transporterskega sistema IsrB in se lahko odzivajo na AI2 signal, ki stimulira nadaljnje biokemijske procese za pripravo celic za tvorbo biofilma (16, 17).

Glede na dosedanje poznavanje razvoja biofilmov lahko nastanek biofilma na zobni površini pogojujejo naslednji principi ki so po vsej verjetnosti med seboj povezani:

1. koagregacija celic, ki omogoča tesno interakcijo med različnimi celicami in hiter preklon iz planktonskega v sesilni način življenja,
2. znotraj vrstno in medvrstno pritrjevanje celic,
3. metabolna sklopljenost različnih celic, ki pogojujejo prisotnost metabolitov in dostopnost kisika ter tvorbo niš,
4. medvrstna celična komunikacija, ki stimulira prepis genov za izgradnjo površinskih receptorjev in s tem uspešnejšo kolonizacijo,
5. interakcija z gostiteljevim imunskim sistemom, ki lahko povzroči lokalni imunski odziv.

Vseh 5 principov omogoči nastanek zobnega plaka z značilno radialno strukturo, ki temelji na streptokokih, ki so



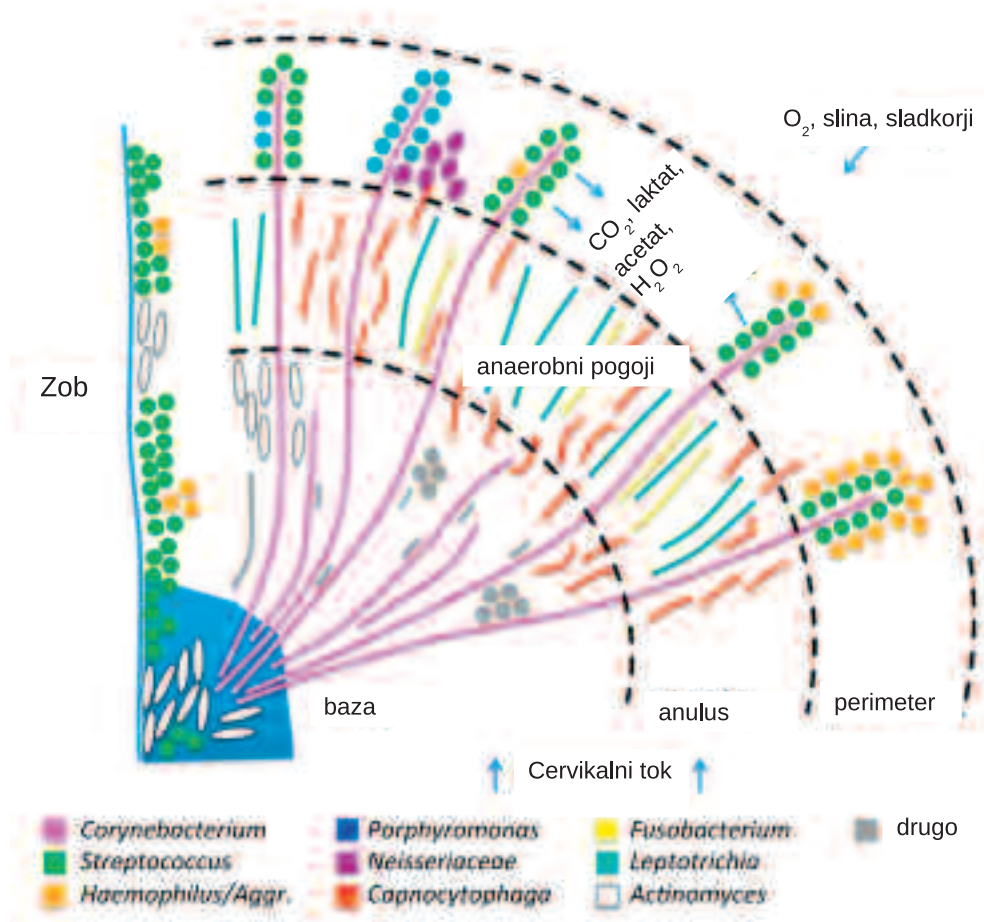
Slika 2. Stopnje kolonizacije zobne površine s strani mikroorganizmov.
 Figure 2. Stages of the colonisation by microorganisms of the exposed tooth surface



kot prvi kolonizatorji površine in omogočajo nadaljnjo kolonizacijo različnih vrst in s tem vzpostavitev niš (18). Izgled takšne radialne strukture ustvarijo korinebakterije (Slika 3). Tovrstne interakcije so bile opisane in na podlagi zgoraj opisanih sukcesij biofilma so ugotovili, kako so med seboj različne bakterijske celice kompatibilne zaradi izražanja in izpostavitve ustreznih receptorjev na površini celic. Ključnega pomena za večjo kolonizacijo patobiontov je interakcija različnih bakterijskih celic s celicami vrste *Fusobac-*

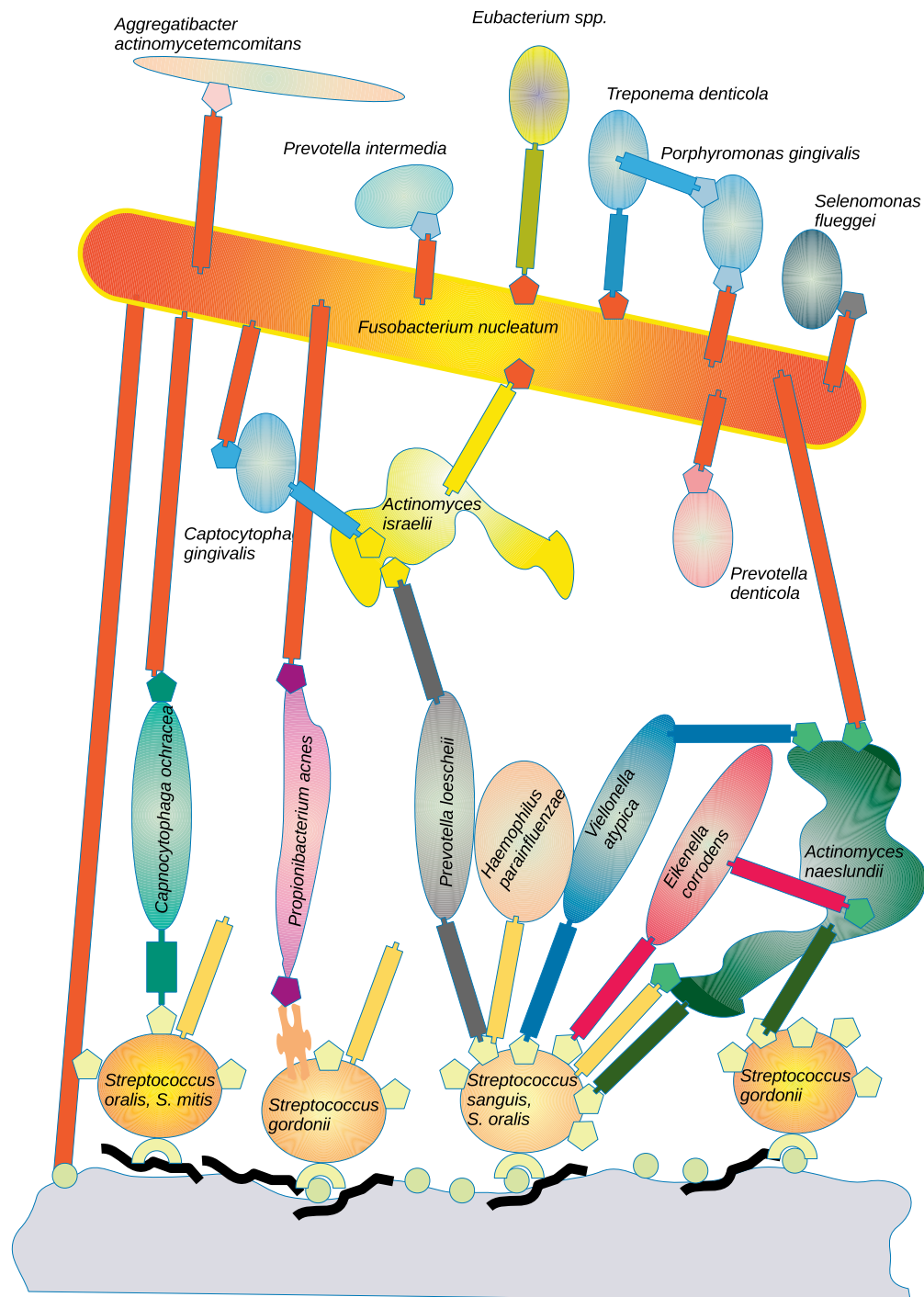
terium nucleatum, ki se lahko s svojimi receptorji na površini kot tudi z različnimi adhezini povezuje z največ različnimi mikroorganizmi (Slika 4) (19).

Tako kot je pogojena tvorba biofilma s tem kako se med seboj povezujejo različne bakterijske celice, so možni tudi negativni učinki med bakterijskimi celicami, kjer ena celica okupira na površini izpostavljene receptorje in prepreči vezavo drugi. To imenujemo kompeticijska izključitev in predstavlja potencialni terapevtski pristop z načinom kolonizacije



Slika 3. Radialna struktura razvitega biofilma na zobni površini. Takšna struktura je pogojena z razrastjo bakterij iz rodi *Corynebacterium*. V vsakem predelu takšnega biofilma se lahko vršijo različni metabolni procesi zaradi prisotnosti različnih hranil kot tudi spremembi redoks potenciala (prirejeno po Welch, J. L. M., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(6), E791-E800.).

Figure 3. Radial structure of the developed biofilm on the tooth surface. Such a structure is dependant on the presence and growth of bacteria belonging genus *Corynebacterium*. In each region of such a biofilm, different metabolic processes can be performed due to the presence of various nutrients as well as the differences in the redox potential (adapted according to Welch, J. L. M., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2016). Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(6), E791-E800.).



Slika 4. Medsebojna prostorska razporeditev bakterijskih celic. Razporeditev ni odvisna samo od nižnjih pogojev (npr. slika 3), ampak tudi od potencialnih variant vezav med različnimi mikrobnimi celicami (prirejeno po Kolenbrander, P. E., & London, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of bacteriology*, 175(11), 3247).

Figure 4. Spatial distribution of bacterial cells. The arrangement does not depend only on niche conditions (eg Figure 3), but also on potential variants of binding between different microbial cells (adaptdated according to Kolenbrander, P. E., & London, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of bacteriology*, 175(11), 3247).



ALI STE VEDELI?

- Ker so rezultati relacij med mikrobi in gostiteljem lahko patološke spremembe v ustni votlini, smo v Sloveniji razvili molekularne metode in analitične pristope, ki omogočajo analizo sestave celotnega mikrobioma ustne votline večjega števila posameznikov v samo dveh dneh. Takšen pristop nam omogoča poglobljene raziskave in predvsem razvoj ustrezne diagnostike posameznikov.

zobne površine z inhibitornimi bakterijskimi celicami kar imenujemo Eco – Evo princip delovanja (20) .

Danes je v mikrobiološki znanosti centralna dogma takšna, da temelji kolonizacija, rast in delitev mikroorganizmov na tem, da so pogoji ustrezni in zagotavljajo nastanek niš, kar imenujemo nišna hipoteza. Pri tem pa je nezanemarljiva diametralno nasprotna nevtralna hipoteza, ki pa v osnovi temelji na imigraciji in emigraciji mikroorganizmov v sistem, ki ga opazujemo. Pri tem je pomembno, kako so mikrobi aktivni, kaj proizvajajo oz. kaj razgrajujejo, kako hitro rastejo in kako hitro gredo skozi opazovani sistem. Tako lahko določeni mikrobi, ki prihajajo v ustni ekosistem, gredo le skozenj in niso aktivni (npr. paraprotiotiki (21)), ampak s svojimi površinskimi receptorji, izločenimi encimi in protimikrobnimi substancami (postbiotiki (22)) vplivajo na prave kolonizatorje kot tudi na imunski sistem. Kako ti mikrobi vplivajo na mikrobnni ekosistem v ustni votlini kot tudi drugje na/v človeškem telesu pa je za enkrat še povsem neznan. Ne glede na obe hipotezi, je značilno, da se po kakršnem koli posegu v mikrobnno združbo v ustni votlini le-ta povrne v združbo v 90 % prvotne sestave, vendar le pri nekadilcih v nasprotju s kadilci (23), zato so kadilci bolj podvrženi obolenju obzobnih tkiv kot nekadilci.

3 NASTANEK BOLEZNI

Labilen in dinamičen odnos med različnimi mikroorganizmi v ustnem mikrobiomu, imunskim sistemom in okoljskimi parametri vplivajo na to, kako se bo nastajajoči biofilm zgradil. Poleg tega je nastanek bolezni pogojen ne samo z vrstno sestavo, ampak tudi kateri sevi so prisotni. Tako ima lahko posameznik v svojem mikrobiomu patobionte, ampak ne bo nikoli razvil katere izmed bolezni zob in obzobnih tkiv. Za razvoj bolezni je značilno, da se iz simbiot-

skega razmerja zaradi določenega okoljskega dejavnika (npr. prehrana, zmanjšan imunski odziv, kajenje itd.), močno razmnoži patogeni del združbe, ki pa je v manjših količinah prisoten tudi pri popolnoma zdravih ljudeh (24, 25). Razlikujemo lahko vplive mikrobioma direktno na nastanek bolezni v ustih kot npr. karies in paradontalna bolezen, ter bolezni, ki nastanejo zaradi vdora mikroorganizmov v kri, ali pa zaradi interakcij z imunskim sistemom in vplivom na nastanek bolezni drugje v organizmu kot npr. razvoj artritis. Disbiotični mikrobiom ustne votline tako predstavlja povečano tveganje za nastanek bolezni kot so rakava obolenja, diabetes mellitus tipa 2, srčno žilne bolezni, bakteriemija, in prezgodnji porod ter rojstvo novorojenčkov z manjšo porodno težo (zbrano v 25).

3.1. KARIES IN PARODONTALNA BOLEZEN – MIKROBNI VIDIK

Na splošno bi lahko rekli, da je nastanek kariesa posredovan z mikrobnno združbo, ki omogoča nastanek kislega pH v ustni votlini in paradontalna bolezen kadar je ta združba usmerjena v nastanek zvišanega pH v ustni votlini. Kisli pH je posledica produktov fermentacije ogljikovih hidratov (laktat, acetat, format) in bazičen zaradi razgradnje proteinov (nastajanje aminov iz proteinov in amonijevega iona iz uree). Velika razlika med tema dvema boleznima je tudi v tem, da se pri bolnikih s kariesom mikrobnna raznolikost zmanjša, pri čemer se pri paradontalni bolezni poveča (26). Vrstna sestava se v primeru nastajanja kariesa spremeni, saj se poveča število mutans streptokokov in laktobacilov kar pa pri zdravih ljudeh tega ne zaznavamo. Pri zdravih ljudeh so odsotne bakterije skupine mutans in so od streptokokov normalno prisotni le bakterije vrst *S. gordonii* in *S. mitis* (27).

V primeru paradontalne bolezni se ob nastanku obsežnega plaka tvorijo anaerobne niše. Sama prisotnost biofilma in nastanek gingivitisa še ne pomeni začetek stanja, ki pahne mikrobnno združbo iz simbiotske v disbiotično. Predvideva se, da nastanek obsežnih anaerobnih niš v subgingivalnem predelu, povečan imunski odziv, povečan tok subgingivalne tekočine bogate s proteini, kar omogoči razrast mikrobov s proteolitično aktivnostjo in povzroči nastanek "spirale", ki vodi v obsežnejša vnetja (28). Danes vemo, da obstaja več skupin bakterij, ki jih razdelimo po kompleksih od vijoličnega do rdečega in ki imajo pomembno vlogo v razvoju paradontalne bolezni. Med najbolj znanimi patobionti, ki so močno vpleteni v nastanek paradontalne bolezni so *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* in *Treponema denticola*. Kljub temu, da ni jasne povezave z nastankom

bolezeni, pa je njihova skupna lastnost ta, da zelo uspešno zavirajo gostiteljev imunski odziv (29). Ta trditev je podkrepjena na podlagi analiz mikroorganizmov invazivne parodontalne bolezni. To obliko bolezni je moč pripisati eni vrsti bakterije *A. actinomycetemcomitans* sev JP2 in s tem se poenostavi kompleksnost delovanja različnih bakterij v biofilmu. Ta sev ima močno povečan prepis gena za leukotoksin, ker ima delečijo promotorja in s tem vpliva na imunski odziv v obzornem tkivu (periodontiju) (29). Poleg tega so tovrstni invazivni tipi bakterij sposobni tudi zavirati komplement z izločanjem gingipaina skupaj s karilizinom ali interpainom A (30).

4 RAZISKAVE V SLOVENIJI

Ustna votlina zdravih posameznikov, ki še niso imeli zobozdravstvenih posegov, nimajo prisotnega kariesa in ne kažejo nikakršnih simptomov obolenja, je dober vir probiotičnih bakterij. Čeprav je veliko bakterij s klasičnimi tehnikami gojenja na hranilnih gojiščih v laboratoriju mogoče preprosto izolirati, pa se je potrebno pri izboru primernih vrst oziroma sevov najprej vprašati: (i) kateri posamezniki so najprimernejši kandidati za zbiranje materiala za vzorčenje, (ii) kakšne vzorce in na katerem mestu je najprimerneje odvzeti vzorce in (iii) kdaj je najprimernejši čas za odvzem vzorca.

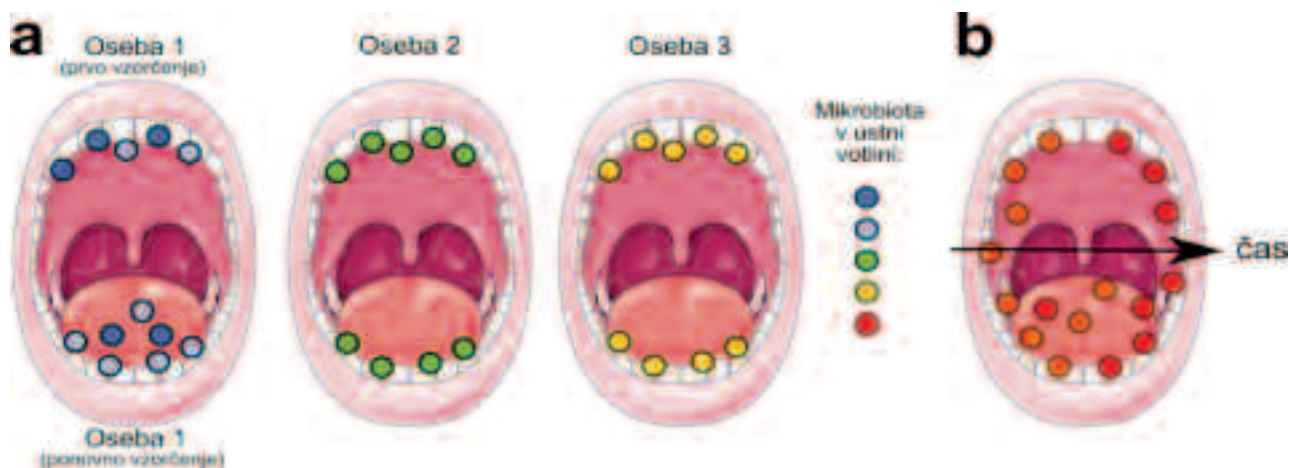
V okviru slovenske študije bakterijske mikrobiote v ustni votlini posameznikov, smo uspešno zbrali različne bakterijske seve, ki so imeli potencial za probiotično delovanje (Rijavec s sod., v *pripravi*). V okviru študije smo za uspešno izolacijo potencialnih probiotikov najprej poskušali spoznati značilnosti mikrobiote v ustni votlini, kar nam je pomagalo izbrati kriterije za izbor posameznikov, vrste vzorcev in čas vzorčenja. V ta namen smo trem posameznikom odvzeli vzorce z bukalne sluznice, površine jezika in površine zob v različnih časovnih obdobjih s točno določenim režimom prehranjevanja, vnosa tekočin in čiščenja zob. S pomočjo izolacije celokupne DNA v vzorcih, pomnoževanja gena za 16S rRNA in denaturacijske gradientne gelske elektroforeze smo uspešno pridobili filogenetske profile bakterijskih združb v posameznih vzorcih. Njihova medsebojna primerjava je pokazala, da imajo posamezniki v ustni votlini precej individualne bakterijske združbe, kar pomeni, da je za zbiranje uporabnih bakterijskih sevov potrebno vzorčiti veliko število posameznikov in da je zato posameznik sam sebi tudi najboljši vir potencialnih probiotičnih bakterij. Pri-

merjava posameznih predelov ustne votline je pokazala, da sta si bakterijski združbi na površini zob in jezika med seboj najbolj različni, tiste na bukalni sluznici pa so po svoji sestavi delno podobne združbam iz obeh preostalih predelov vzorčenja. Bukalna sluznica je tako dober vir bakterij, ki so bolj razširjene v ustni votlini, na površini zob in jezika pa lahko najdemo bolj lokalno prisotne posameznike. Časovni izbor vzorčenja je pokazal, da so združbe v ustih zelo spremenljive, kar pomeni, da je za zbiranje bakterijskih sevov primerno večkratno vzorčenje v daljšem časovnem obdobju (Slika 5).

V okviru študije smo pri posameznikih z znaki parodontalne polezni preverili prisotnost patogenih bakterij v času 48 h po kliničnem čiščenju parodontalnih žepov (Rijavec s sod., v *pripravi*). Rezultati so pokazali, da lahko z analitskimi molekularno biološkimi tehnikami takoj po kliničnem čiščenju zaznamo DNA patogenih bakterij, kar je najverjetneje ostank razbitih patogenih bakterijskih celic. V nadaljevanju takšne DNA ne opazimo več, potem pa se že prej kot v 24 urah ponovno pojavi v vedno večjih količinah, kar pomeni, da se številčnost patogenih bakterij ponovno začne povečevati. Časovno okno takoj po čiščenju parodontalnih žepov je tako primerno za vnos probiotičnih bakterij, ki bodo poselle površino in zavrlle ponovno naselitev patogenih bakterij.

S pomočjo poznavanja osnovnih značilnosti mikrobiote v ustni votlini smo v nadaljevanju s pomočjo gojenja na hranilnih gojiščih izolirali 32 potencialno probiotičnih bakterijskih sevov, ki so proizvajali in izločali spojine z protimikrobnimi lastnostmi proti po gramu negativnima bakterijama *Escherichia coli* in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Med potencialno probiotičnimi izolati so prevladovali sporigene bakterije iz rodu *Bacillus*, ostale predstavnike pa smo po molekularni identifikaciji uvrstili v rodova *Stenotrophomonas* in *Staphylococcus*. Med izolati smo bolj natančno okarakterizirali dva izmed njih z namenom razvoja novih sistemov za vnos potencialnih probiotičnih bakterij nazaj v izbrane predele v ustni votlini. V sodelovanju s prof. Dr. Julijano Kristl iz Fakultete za framacijo in prof. Dr. Milanom Petelinom iz Medicinske fakulteta, oba iz Univerze v Ljubljani smo uspešno razvili sisteme za kapsuliranje bakterijskih celic in spor v obliki mikrokapsul (31) in nanovlaken (32). Oba sistema omogočata nadaljnji razvoj in uporabo dveh ali več različnih probiotičnih bakterij oziroma kombiniranje probiotičnih bakterij in antibiotikov. Predvsem slednji pristop, pri katerem po delovanju sproščenega antibiotika, lahko mesta delovanja hitro poselimo z izbranimi probiotiki, je v zadnjem času pridobil veliko zanimanja, saj omogoča zdravljenje in vnos probiotičnih bakterij hkrati (33).





Slika 5. Mikrobiota v ustni votlini je (a) individualna pri vsakem posamezniku in se (b) zelo spremeni v času po kliničnem čiščenju zob. Obarvani krogi shematsko ponazarjajo bakterijske predstavnike v mikrobioti ustne votline pri različnih posameznikih (a) oziroma pri enem posamezniku (a, Oseba 1 in b). Oseba 1 je bila vzorčena dvakrat z vmesnim večmesečnim časovnim obdobjem. Izvorna grafika ustne votline je licencirana s strani Servier Medial Art pod licenco Creative Commons Attribution 3.0 Unported License [https://smart.servier.com/smart_image/oral-cavity/].

Figure 5. The microbiota in the oral cavity is (a) individual in every person and (b) is significantly changed during the time after clinical dental cleaning. Colored circles schematically illustrate bacterial representative groups in the microbiota of the oral cavity in different individuals (a) or in one individual (a, Person 1 and b). Person 1 was sampled twice with an intermediate period of several months. The original graphic of the oral cavity is licensed from the site Servier Medial Art pod licenco Creative Commons Attribution 3.0 Unported License [https://smart.servier.com/smart_image/oral-cavity/].

5 SKLEP

Zagotovo lahko trdimo, da ustna votlina vsekakor ne more biti sterilni prostor. V ustni votlini bolnega človeku ob vsakem posegu z željo k odstranjevanju patobiontov, pa pozabljam, da odstranimo tudi številne mikrobove, ki so izredno koristni za nas. To odstranjevanje promovira še hitrejšo kolonizacijo patogenov in ponavljanje, če ne slabšanje, bolezenskega stanja. Zaradi tega je izredno pomembno kako z mikrobovno združbo v ustih "upravljamo". Da pa bi lahko zelo uspešno upravljali z njo, pa je potrebno narediti še veliko raziskav, saj kljub temu, da danes vemo ogromno o sestavi mikrobioma ustne votline, kot tudi o fiziologiji posameznega mikroba v laboratorijskih razmerah, pa zelo težko napovemo kako se bo na prisotnost posameznega mikroba odzval gostitelj. V naših laboratorij zato razvijamo številne pristope, ki omogočajo upravljanje z nastajanjem in razvojem biofilma na podlagi Eco-Evo principov in se izogibamo pristopom, ki vključujejo uničevanje mikrobov z dezinficenci in antibiotiki.

6 ZAHVALA

Za finančno podporo se zahvaljujemo Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, ki je podprla raziskave s projekti: Nanozdravila z antibiotiki in probiotiki za lokalno zdravljenje parodontalne bolezni (J1-9194), Nevropsihološke disfunkcije, ki jih povzročata nizka stopnja izpostavljenosti izbranim onesnaževalom iz okolja pri občutljivi populaciji - NEURODYS (J7-9400) in Elektrostatska imobilizacija bakterij in vpliv na njihovo fiziologijo (J4-7640).

7 VIRI

1. Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Giglio, M. G. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486: 207-214.



2. Chen, H., Jiang, W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Frontiers in microbiology* 2014; 5: 508.
3. Xu, X., He, J., Xue, J., Wang, Y., Li, K., Zhang, K., Li, M. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environmental microbiology* 2015; 17(3): 699-710.
4. Takeshita, T., Kageyama, S., Furuta, M., Tsuboi, H., Takeuchi, K., Shibata, Y., Yamashita, Y. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Scientific reports* 2016; 6: 22164.
5. Liu, B., Faller, L. L., Klitgord, N., Mazumdar, V., Ghodsi, M., Sommer, D. D., Stine, O. C. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PloS one* 2012; 7(6): e37919.
6. Lif Holgerson, P., Harnevik, L., Hernell, O., Tanner, A. C. R., Johansson, I. Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *Journal of dental research* 2011; 90(10): 1183-1188.
7. Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107(26): 11971-11975.
8. Takeshita, T., Kageyama, S., Furuta, M., Tsuboi, H., Takeuchi, K., Shibata, Y., Yamashita, Y. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Scientific reports* 2016; 6: 22164.
9. Proctor, D. M., Fukuyama, J. A., Loomer, P. M., Armitage, G. C., Lee, S. A., Davis, N. M., Relman, D. A. A spatial gradient of bacterial diversity in the human oral cavity shaped by salivary flow. *Nature communications* 2018; 9(1): 681.
10. Loimaranta, V., Jakubovics, N. S., Hytönen, J., Finne, J., Jenkinson, H. F., Strömberg, N. Fluid-or surface-phase human salivary scavenger protein gp340 exposes different bacterial recognition properties. *Infection and immunity* 2005; 73(4): 2245-2252.
11. Scannapieco, F. A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1995; 5(3): 203-248.
12. Palmer Jr, R. J., Gordon, S. M., Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *Journal of bacteriology* 2003; 185(11): 3400-3409.
13. Li, J., Helmerhorst, E. J., Leone, C. W., Troxler, R. F., Yaskell, T., Haffajee, A. D., Oppenheim, F. G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of applied microbiology* 2004; 97(6): 1311-1318.
14. Lamont, R. J., El-Sabaeny, A., Park, Y., Cook, G. S., Costerton, J. W., Demuth, D. R. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology* 2002; 148(6): 1627-1636.
15. Chung, W. O., Demuth, D. R., Lamont, R. J. Identification of a *Porphyromonas gingivalis* Receptor for the *Streptococcus gordonii* SspB Protein. *Infection and immunity* 2000; 68(12): 6758-6762.
16. Shao, H., James, D., Lamont, R. J., Demuth, D. R. Differential interaction of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* LsrB and RbsB proteins with autoinducer 2. *Journal of bacteriology* 2007; 189(15): 5559-5565.
17. Shao, H., Lamont, R. J., Demuth, D. R. Autoinducer 2 is required for biofilm growth of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. *Infection and immunity* 2007; 75(9): 4211-4218.
18. Welch, J. L. M., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E., Borisy, G. G. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; 113(6): E791-E800.
19. Kolenbrander, P. E., London, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of bacteriology* 1993; 175(11): 3247-3252.
20. Pallen M. J., Wren B. W. Bacterial pathogenomics. *Nature* 2007; 449: 835-842.
21. de Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C., Sant'Ana, A. S. Paraprobiotics: evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology* 2016; 58: 96-114.
22. Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology* 2018; 75: 105-114.
23. Kumar, P. S., Mason, M. R., Mouthguards: does the indigenous microbiome play a role in maintaining oral health?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2015; 5: 35.
24. Marsh, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology* 2003; 149(2): 279-294.
25. He, J., Li, Y., Cao, Y., Xue, J., Zhou, X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia microbiologica* 2015; 60(1): 69-80.
26. Simon-Soro, A., Tomás, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M. D., Nyvad, B., Mira, A. Microbial geography of the oral cavity. *Journal of dental research* 2013; 92(7): 616-621.
27. Marsh, P. D., Bradshaw, D. J. Dental plaque as a biofilm. *Journal of industrial microbiology* 1995; 15(3): 169-175.
28. Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., Zaura, E. The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal* 2016; 221(10): 657-666.
29. Curtis, M. A., Zenobia, C., Darveau, R. P. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell host & microbe* 2011; 10(4): 302-306.
30. Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine* 2015; 21(3): 172-183.
31. Mirtič, J., Rijavec, T., Zupančič, Š., Pobirk, A.Z., Lapanje, A., Kristl, J. Development of probiotic-loaded microcapsules for local delivery: Physical properties, cell release and growth. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018; 121: 178-187.
32. Zupančič, S., Rijavec, T., Lapanje, A., Petelin, M., Kristl, J., Kocbek, P. Nanofibers with Incorporated Autochthonous Bacteria as Potential Probiotics for Local Treatment of Periodontal Disease. *Biomacromolecules* 2018; 19(11): 4299-4306.
33. Li, Z., Behrens, A.M., Ginat, N., Tzeng, S.Y., Lu, X., Sivan, S., Langer, R. and Jaklenec, A. Biofilm-Inspired Encapsulation of Probiotics for the Treatment of Complex Infections. *Advanced Materials* 2018; 30(51): 1803925.