

СРАВНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ  
МИКРОБИОТЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПАЦИЕНТОВ  
С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПЕРИОДОНТИТОМ

Охремчук Е.В.<sup>1</sup>, Коско А.Д.<sup>1</sup>, Гасич Е.Л.<sup>1</sup>, Рубникович А.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет

*Актуальность:* Изучение состава микробиота ротовой полости в динамике имеет важное значение для разработки лечебных и профилактических мероприятий пациентов с болезнями пародонта. Данные исследования выполняются методом NGS-секвенирования. Точность полимеразной цепной реакции (ПЦР) имеет решающее значение для получения надежных результатов ампликонного секвенирования и установления истинного разнообразия микроорганизмов в изучаемых образцах биологического материала ротовой полости [1-3]. Тем не менее, такие параметры, как термостабильность, процессивность и специфичность, различаются даже между высокоточными ДНК-полимеразами. В соответствии со стандартным протоколом по подготовке библиотек для 16S-метагеномного секвенирования в ПЦР используется высокоточная полимеразы КАРА. По данным научных источников полимеразы Q5 является наиболее перспективной заменой КАРА-полимеразы, так как точность ее в 280 раз превышает таковую полимеразы Taq и практически в два раза – точность полимеразы КАРА. Из отечественных производителей наиболее широкий спектр полимераз предлагает ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь), среди них высокоточная полимеразы Flash.

*Цель исследования:* Сравнение ДНК-полимераз для изучения микробиоты пародонтальных карманов пациентов с генерализованным пародонтитом.

*Материал и методы:* На основании протокола создания библиотек для 16S-метагеномного секвенирования на матрице четырех образцов метагеномной ДНК, выделенной из содержимого периодонтальных карманов пациентов с генерализованным периодонтитом, с помощью ДНК-полимераз Flash (АртБиотех, Республика Беларусь) и Q5 подготовлены библиотеки генов 16S рРНК (таблица 1). Секвенирование осуществляли с помощью реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) на платформе Illumina MiSeq. Обработку метатаксономических данных проводили путем применения скрипта preprocess16S (<https://github.com/masikol/preprocess16S>) и специализированных библиотек (dada2, phyloseq и др.) для языка программирования R.

Оценивали полимеразы по следующим параметрам: чувствительность к количеству матричной ДНК в ПЦР при использовании стандартного протокола амплификации для 16S-метагеномного секвенирования; количество химерных последовательностей, образуемых в ходе ПЦР; число вариантов ампликонных последовательностей (ВАП) в библиотеках, подготовленных на основе одного образца матричной ДНК.

Таблица 1. Концентрация ДНК в образцах метагеномной ДНК

Образец	Концентрация ДНК, нг/мкл
P1	3,7
P2	0,5
P3	0,3
P5	0,2

*Результаты исследования:* Электрофоретический анализ продуктов амплификации не выявил значительных отличий в применении полимераз Flash и Q5: продукты амплификации детектировались во всех образцах, кроме P5, для которого использовали наименьшее количество матричной ДНК. Проведены очистка на магнитных частицах и индексирование ампликонов в соответствии

со следующими протоколами, составленными на основе специальных инструкций.

Последующий электрофоретический анализ свидетельствует о том, что подготовка библиотек с помощью полимеразы Q5 позволяет получить библиотеки даже при низкой входной концентрации матричной ДНК. Получены кривые разряжения данных секвенирования, в которых присутствует лишь 7 линий, так как 8-й образец исключен из анализа: библиотека на основе образца ДНК P5 с помощью полимеразы Flash не содержит достаточной информации, число объединенных прочтений в образце соответствует 0. Выход кривых на плато свидетельствует о том, что увеличение количества прочтений не приводит к увеличению детектируемых вариантов ампликонных последовательностей в образцах. Следовательно, накоплено достаточное количество данных для дальнейшего исследования. В библиотеках, подготовленных с помощью полимеразы Flash, суммарно выявлены 104 варианта ампликонных последовательностей, полимеразы Q5 – 154. При этом из детектируемых число общих ВАП между различными полимеразы составило 46%. В связи с тем, что несколько ВАП могут соответствовать одному и тому же таксону бактерий, проведено агрегирование ВАП на уровне вида. Таким образом, можно непосредственно определить число видов бактерий, присутствующих в метатаксономических библиотеках. При агрегировании до уровня вида количество общих ВАП составило 57%. Меньшее число ВАП в библиотеках на основе Flash частично является следствием исключения из анализа образца F5. Более полное объяснение получено путем оценки биоразнообразия в наборах данных. Уровень  $\alpha$ -разнообразия (индекс Шеннона) указывает на то, что полимеразы Q5 позволяет амплифицировать регионы генов 16S рРНК более широкого спектра микроорганизмов.

Таким образом, для подготовки ампликонных библиотек предпочтительным является использование полимеразы Q5, характеризующейся более эффективным накоплением продуктов

амплификации на различных матричных ДНК. В тройку наиболее часто представленных в образце P1 входили семейства Porphyromonadaceae (34,0 %), Fusobacteriaceae (22,9 %), Tannerellaceae (12,7 %). Даже в такой небольшой выборке полученные данные хорошо согласуются с литературными: во всех образцах значительная доля прочтений ДНК приходится на *Fusobacterium nucleatum* — оппортуниста ротовой полости. Исследования последних лет демонстрируют, что *F. nucleatum* концентрируется в очагах поражения при болезнях периодонта, галитозе, пульпите, раке ротовой полости и системных заболеваниях. *Porphyromonas gingivalis* также является одним из важнейших периопатогенов красного комплекса, влияющих на обострение хронического периодонтита. ДНК данных бактерий преобладала в образце P1. Результаты по присутствию данных организмов совпадают с результатами ПЦР в РВ: данный таксон детектируется в образцах P1 и P3. Бактерии *Tannerella forsythia* принимают участие в прогрессировании болезней периодонта, что приводит к разрушению тканей. Этот таксон обнаруживается во всех образцах, что согласуется с данными ПЦР в РВ. Представители рода *Leptotrichia* являются частью нормальной микробиоты ротовой полости человека и редко ассоциированы с деструктивными процессами. Исключение — иммунокомпрометированные пациенты, а также с нейтропенией.

Бактерии рода *Capnocytophaga* признаны частью нормальной микробиоты ротовой полости, их роль в развитии различных болезней периодонта неоднозначна. Вид *Capnocytophaga leadbetteri* часто обнаруживается в ротовой полости детей. *Prevotella* - это анаэробные комменсалы, обитающие на слизистой оболочке ротовой полости и в зубном налете с раннего возраста. Известно лишь несколько штаммов превотелл-возбудителей различных оппортунистических эндогенных инфекций, в том числе периодонтита. Вид *Prevotella oris* включает как комментальных представителей, так и штаммы, способные вызывать серьезные оральные и системные инфекции.

Ряд исследований выявил связь между присутствием представителей *Selenomonas* sp. и болезнями периодонта. Представители *Alloprevotella tanneriae*

обнаруживаются и у индивидов со здоровым периодонтом, и у пациентов с генерализованным периодонтитом. Подготовка библиотек с помощью полимеразы Q5 позволяет получить библиотеки в электрофоретически детектируемых количествах при меньшей входной концентрации матричной ДНК в сравнении с полимеразой Flash (минимальная концентрация ДНК-матрицы в реакции составила 40 пг). Процент химерных нуклеотидных последовательностей статистически значимо не отличался от данных, подготовленных на одной матрице с помощью различных полимераз. Общее число ВАП от Flash-полимеразы, составило 104, с помощью Q5-полимеразы – 121, из них число общих ВАП – 81, что соответствует 81 %. Значения индекса Шеннона (мера  $\alpha$ -разнообразия), установленные на основе данных о количестве ВАП, также статистически значимо не отличались между исследуемыми группами. Использование полимеразы Q5 позволило получить ампликоны регионов генов 16S рРНК более широкого спектра микроорганизмов, что подтверждается количеством уникальных ВАП в образцах при объединении последовательностей на основании таксономической классификации. Число общих видов микроорганизмов между библиотеками, подготовленными с помощью двух полимераз, составило 56 (67%), число уникальных таксонов с полимеразой Flash, равнялось 10 (12%), с полимеразой Q5 – 18 (21%). Большинство уникальных таксонов с помощью полимеразы Q5 отнесены к отделу Firmicutes, в то время как в библиотеках, подготовленных с помощью Flash-полимеразы, 50% уникальных таксонов принадлежат отделу Proteobacteria.

*Заключение:* Таким образом, не выявлено статистически значимых отличий в числе химерных последовательностей, а также в количестве вариантов ампликонных последовательностей при использовании полимераз Flash и Q5 в подготовке библиотек генов 16S рРНК. Однако, в метатаксономических исследованиях микробиоты периодонтальных карманов из двух сравниваемых ДНК-полимераз предпочтительным является применение полимеразы Q5 (Республика Беларусь), характеризующейся более

эффективным накоплением продуктов амплификации на различных матричных ДНК. Важным преимуществом использования полимеразы Q5 является невысокий выход нуклеиновых кислот на этапе экстракции ДНК из содержимого периодонтальных карманов, что диктует ее широкое применение.

#### Список литературы

1. Marioti A.J., Rumpf D.A. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-cotllagen protein production / Marioti A.J., Rumpf D.A. //J. of Periodontol. – 1999. – Vol 70. – P. 1443-1448
2. Slots J. Selections of antimicrobial agents in periodontal therapy / Slots J. // J. of Perio-dont Res. – 2002. Vol 37. – P. 389-398.
3. Царев В.Н., Дмитриева Л.А., Мегрелишвили Н.А., Носик А.С. [и др.]. Клинико-микробиологическая оценка эффективности применения «Элюдрила», «Пародиума» и «Эльгидиума» при комплексном лечении пародонтита / Царев В.Н. [и др.] // Пародонтология. – 2003. № 1(26). – С. 63-68.

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

## **АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СТОМАТОЛОГИИ**

Сборник научных трудов,

*посвященный основателю*

*кафедры ортопедической стоматологии КГМУ,*

*профессору Исаак Михайловичу Оксману*

Казань

2025