© Фік В. Б., Федечко Й. М., Кривко Ю. Я., Корнійчук О. П.

УДК 611. 311:616-008. 87:615. 33]-08

Фік В. Б., Федечко Й. М., Кривко Ю. Я., Корнійчук О. П.

МІКРОФЛОРА РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ АНТИБІОТИКА

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)

Дана робота є фрагментом НДР «Структурна організація, ангіоархітектоніка та антропометричні особливості органів у внутрішньо-та поза утробному періодах розвитку, за умов екзо- та ендопатогенних факторів», № держ. реєстрації 0115 U000041.

Вступ. Лабораторні лінії білих щурів є однією з найпоширеніших експериментальних біологічних моделей, у тому числі й при вивченні мікробіоценозів організму. Видові та кількісні дослідження мікрофлори ротової порожнини щурів показали, що до складу її входять багато видів бактерій, зокрема, кокова мікрофлора, грамнегативні ентеробактерії, лактобактерії [15]. Стан мікрофлори ротової порожнини щурів змінювався під впливом інтоксикації фторурацилом [12], а також при дії алоксану [13]. Зміни мікрофлори ротової порожнини щурів відмічено при вираженій імуносупресії [17]. Відмічено зміни мікрофлори ротової порожнини щурів унаслідок гіпосалівації або під впливом сахарозної дієти [14].

Результати таких досліджень вказують на відповідність лабораторної моделі до клініко-лабораторних досліджень мікрофлори ротової порожнини людини [1]. Як і в усіх біологічних нішах, мікроорганізми ротової порожнини створюють своєрідний біоценоз, який в останні роки розглядається як стійка біологічна система, в якій існують складні взаємовідношення як між її складовими, так і з макроорганізмом [4, 18]. Основні елементи таких біоценозів включають аеробні та анаеробні бактерії, а також гриби та найпростіші. Аеробні бактерії, поглинаючи кисень виступають як синергісти анаеробних, при цьому відмічається достатня кореляція між рівнем аеробних та анаеробних бактерій, що дає можливість охарактеризувати стан мікробіоценозу в цілому за окремими його елементами [9]. Зміни цього мікробіоценозу розвиваються на фоні порушення специфічної імунної відповіді та неспецифічних факторів захисту в тканинах порожнини рота [2, 5]. В екологічно несприятливих регіонах у населення відмічаються зміни мікрофлори рота в бік зменшення лактобактерій і підвищення видового і кількісного складу умовно-патогенної кокової мікрофлори, грибів Candida та розвитку патологічних процесів [7, 9].

При порушенні імунітету відмічають збільшення кількості умовно-патогенної мікрофлори та стійке порушення складу мікробіоценозів ротової порожнини з розвитком уражень зубів і тканин пародонту. Ступінь дисбактеріозу відповідає важкості уражень пародонту [6, 11, 16, 18]. Окремі повідомлення вказують, що в осіб, залежних від наркотичних препаратів, зокрема, опіоїдів, розвиваються гнійно-запальні процеси з ураженням пародонту [3, 10].

Мета досліджень. Вивчити та дослідити аеробну мікрофлору ротової порожнини щурів на фоні введення антибіотика широкого спектру дії, як етап створення лабораторної моделі стоматологічних уражень при опіоїдній інтоксикації та вивчення протекторної дії антибіотиків.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження було проведено на білих щурах-самцях лінії Wistar, віком 3,5-7,5 місяців, масою 160-200 г. Тварини відібрані для експерименту, перебували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тварини обстежувались щодо відсутності патологічних проявів; з цією ж метою проводився загальний огляд ротової порожнини, відмічаючи забарвлення, вологість, відсутність уражень слизової присінку рота, ясен та власне ротової порожнини.

Тварини були розділені на дві групи по 10 особин. У першій групі вводився антибіотичний препарат «Офрамакс» протягом середнього рекомендованого часу антибіотикотерапії в клінічних умовах (11 діб). Тварини контрольної групи препарат не одержували. Мікробіологічні дослідження проводились тричі – на початку експерименту, після закінчення курсу введення антибіотика та наприкінці часу спостереження (6 тижнів) [8]. Матеріал забирали каліброваною бактеріологічною петлею (0,02 мл.) з основних біотопів рота – з поверхні зубів на межі твердої

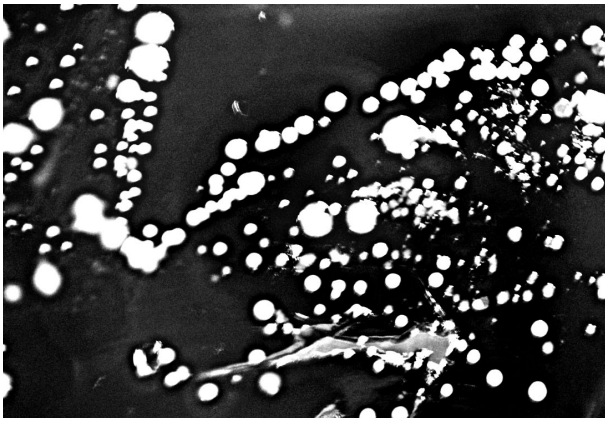

Рис. 1. Колонії різних видів бактерій на кров'яному агарі (посів з міжзубних проміжків щура). Зб. х 2, чашка Петрі.

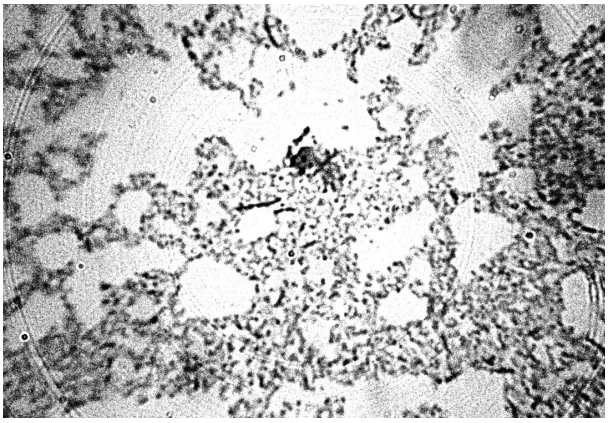

Рис. 2. Мікрофото 2 ок. ×8, об. ×90, імерсія. Стафілококи. Мазок із колонії, фарбування за Грамом.

тканини та ясен у міжзубних проміжках, присінку рота та ротової порожнини. Із забраного матеріалу готували мазки, фарбуючи їх за методом Грама. Одночасно проводили посів у пробірки з цукровим бульйоном, на м'ясо-пептонний агар, кров'яний агар, жовтково-сольовий агар, середовище Ендо та середовище Сабуро. Для визначення кількісних показників, матеріал суспендували в бульйоні і в об'ємі 0,02 мл, засівали на відповідні щільні середовища у чашках Петрі, а через 24 год. підраховували кількість колоній різних видів, орієнтуючись на особливості морфології колоній, наявність і тип гемолізу (**рис.1**), розклад лактози на середовищі Ендо, морфотинкторіальні властивості мікроорганізмів у мазках з колоній (**рис. 2**).

Кількісні показники визначали в колонієутворюючих одиницях (КУО/0,02 мл). Видовий склад мікроорганізмів визначався за комплексом морфотинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей.

Результати досліджень та їх обговорення. При мікроскопічному дослідженні мазків із порожнини рота у тварин виявлялась переважно грампозитивна флора – паличкоподібні та ниткоподібні грампозитивні палички, кокова флора у вигляді скупчень та коротких ланцюжків, грамнегативні палички та коки, поодинокі дріжджеподібні клітини. В мазках виявлялись по кілька епітеліальних клітин з адсорбованою коковою мікрофлорою. При бактеріологічних дослідженнях у тварин виявлялась сапрофітна мікрофлора – коагулазонегативні стафілококи, за біохімічним профілем – *S. saprophyticus*, негемолітичні та α- гемолітичні стрептококи, ешерихії, грампозитивні неспорові палички, дифтероїди, грампозитивні спорові палички, а також гриби *Candida*. Як правило, на початку експерименту у тварин з кожного біотопу виділялося по кілька видів мікроорганізмів, але у тварин піддослідної групи ця кількість не перевищувала 1-2, частково збільшуючись до кінця періоду спостереження. Видовий склад і відсоток виділення окремих видів у тварин обох груп показаний в **табл. 1.**

Як видно з **табл. 1**, у тварин контрольної групи найчастіше виділялись з поверхні зубів коагулазонегативні стафілококи негемолітичні (75% особин) та негемолітичні стрептококи (85%). Із слизової присінку рота часто виділялись ешерихії (70% тварин) та грампозитивні неспорові палички (60%). З ротової порожнини у 85% щурів виділялись α- гемолітичні стрептококи. Протягом усього періоду спостереження не відмічено істотних змін видового складу мікрофлори, хоча спостерігалась тенденція до збільшення кількості особин, від яких виділено 5 і більше культур мікроорганізмів з різних біотопів ротової порожнини.

У тварин піддослідної групи на початку дослідження видовий склад мікроорганізмів у різних біотопах не відрізнявся від контрольних, що пояснюється однаковими умовами утримання. Проте, після двотижневого курсу введення антибіотика виявлено своєрідне «спрощення» складу мікробіоценозів у всіх біотопах, що виявлялось як при мікроскопії мазків із первинного матеріалу, так і при бактеріологічному дослідженні. Не виявлялись ешерихії, гемолітичні стафілококи, грампозитивні спорові та неспорові бактерії. В умовах дії антибіотика селективну перевагу одержували негемолітичні стрептококи, очевидно за рахунок видів, стійких до антибіотиків. Наприкінці досліду, через два тижні після останнього введення препарату, мікрофлора біотопів ротової порожнини щурів частково відновлювалась, хоча ті види мікроорганізмів, які частково або повністю елімінувались під дією антибіотика виділялись у меншої кількості особин. Кількісні характеристики мікрофлори показані в **табл. 2.**

Як видно з **табл. 2**, у тварин контрольної групи, стафілококи різних видів виявлялись у кількостях 27±2 – 30±1,5 КУО\0,02 мл на початку досліду з тенденцією до зростання наприкінці спостереження (32±3 – 35±2,6 КУО/0,02 мл). Кількісні показники стрептококової мікрофлори не змінювались протягом періоду спостереження.

У тварин дослідної групи на початку експерименту кількісні показники бактеріальної мікрофлори

Таблиця 1

Видовий склад мікроорганізмів у відсотковому співвідношенні в різні терміни спостереження експериментальних тварин

Біотоп	Види мікроорганізмів	Група 1			Група 2 (контрольна)		
		На початку досліду	Після відміни антибіотика	Наприкінці досліду	На початку досліду	На третьому тижні	Наприкінці досліду
Поверхня зубів	Коагулазонегативні стафілококи негемолітичні	70%	30%	55%	75%	75%	80%
	Коагулазонегатині стафілококи гемолітичні	30%	-	25%	30%	35%	35%
	Стрептококи негемолітичні	80%	80%	85%	85%	85%	85%
	α- гемолітичні стрептококи	25%	15%	20%	30%	35%	40%
	ешерихії	20%	-	5%	25%	20%	35%
	Грампозитивні неспорові палички (дифтероїди)	45%	-	35%	40%	40%	50%
	Грампозитивні спорові палички	55%	-	40%	50%	55%	75%
Присінок рота	Коагулазонегативні стафілококи негемолітичні	40%	20%	20%	55%	40%	50%
	Коагулазонегатині стафілококи гемолітичні	20%	_	40%	25%	35%	45%
	Стрептококи негемолітичні	60%	80%	70%	55%	50%	70%
	α- гемолітичні стрептококи	35%	25%	20%	25%	35%	30%
	ешерихії	60%	_	10%	70%	60%	65%
	Грампозитивні неспорові палички (дифтероїди)	40%	_	30%	45%	40%	45%
	Грампозитивні спорові палички	65%	_	45%	60%	60%	60%
Власне ротова порожнина	Коагулазонегативні стафілококи негемолітичні	80%	70%	60%	55%	60%	80%
	Коагулазонегатині стафілококи гемолітичні	60%	_	30%	65%	55%	65%
	Стрептококи негемолітичні	80%	80%	90%	85%	95%	90%
	α- гемолітичні стрептококи	45%	25%	20%	45%	55%	65%
	ешерихії	15%	_	5%	20%	20%	25%
	Грампозитивні неспорові палички (дифтероїди)	35%	_	50%	45%	35%	45%
	Грампозитивні спорові палички	25%	_	65%	20%	25%	25%
	Candida	_	10%	15%	_	_	_

Таблиця 2

Кількісні характеристики мікрофлори ротової порожнини білих щурів в різні терміни спостереження

Види мікроорганізмів	Група 1 к-сть бактерій КУО/0,02 мл			Група 2(контроль) к-сть бактерій КУО/0,02 мл		
	на початку досліду	після відміни антибіотика	наприкінці	на початку досліду	на третьому тижні	наприкінці досліду
Коагуогулазонегативні негемолітичні стафілококи	34±2	_	15±2	27±2	29±3	32±3
Коагуогулазонегативні гемолітичні стафілококи	28±2	_	18±1	30±1,5	32±2	35±2,5
Негемолітичні стрептококи	47±5	21±2	31±3	49±5	52±6	48±4
α-гемолітичні стрептококи	37±5	12±0,9	26±4	36±4	32±4	35±3
Ешерихії	26±4	_	15±1	21±3	25±3	23±3
Грампозитивні неспорові палички	14±2	_	_	12±2	14±2	12±1
Спорові палички	8±0,7	_	_	7±0,5	7±0,6	9±0,8
Candida	_	4±0,2	6±0,3	_	_	_

біотопів ротової порожнини щурів істотно не відрізнялись від контрольних. Після двотижневого курсу введення антибіотика, як було сказано вище, не виділялися бактерії, зокрема, стафілококи, ешерихії, грампозитивні бактерії, тобто ті види, щодо яких можна передбачувати контамінацію ззовні. Кількість негемолітичних і гемолітичних стрептококів зменшувалась у 2,5 – 3 рази, хоча негемолітичні стрептококи виділялися у 80% тварин (**табл. 1**). У кількох тварин виявлено гриби Candida у невеликих кількостях. Через 2 тижні після припинення дії антибіотиків видовий склад мікрофлори відновлювався, хоча кількісні показники основних видів були нижчими ніж на початку досліду.

Висновки. Таким чином, проведені дослідження вказують, що аеробна мікрофлора різних біотопів ротової порожнини стабільна, хоча й відрізняється у різних особин за кількістю ізольованих видів та інтенсивністю контамінації. Видовий склад мікрофлори становлять непатогенні та умовно-патогенні бактерії–коагулазонегативні стафілококи, в т. ч. гемолітичні, стрептококи, α-гемоліттичні та негемолітитчні. У багатьох особин виділялись ешерихії та грампозитивні палички. Під впливом антибіотика широкого спектру дії змінювався видовий та кількісний склад мікрофлори, яка через 2 тижні після відміни препарату частково відновлювалась.

Перспективи подальших досліджень. Одержані дані вказують на можливість використовувати досліджену біологічну модель для оцінки дії шкідливих впливів на організм щурів, зокрема для вивчення опіоїдної інтоксикації.

Література

1. Аркадьева Г. Е. Микробиоценоз ротовой полости в норме и при некоторых патологических состояниях. Учебное пособие для врачей / Г. Е. Аркадьева. – СПбГМУ : СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, 2000. – 23 с.
2. Гаврилова О. А. Мониторинг чувствительности к антибиотикам микрофлоры ротовой полости рта у практически здоровых детей и больных хроническим гастродуоденитом / О. А. Гаврилова, Б. Н. Давыдов, Ю. В. Червинец [та ін.] // Стоматология. – 2009. – №6. – С. 62-65.
3. Долова А. И. Применение антиоксиданта мексидола в комплексном лечении хронического пародонтита у пациентов, страдающих наркотической зависимостью от опиатов (экспериментально-клиническое исследование) : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14.00.21 «Стоматология» / А. И. Долова. – Москва, 2005. – 23 с.
4. Зорина О. А. Взаимосвязь качественного и количественного состава биоценозов ротовой полости и индивидуального генетического профиля на фоне воспалительных заболеваний пародонта : автореф. дис. на соискание ученой степени доктора мед. наук : спец. 14.01.14 «Стоматология» / О. А. Зорина. – Москва, 2011. – 42 с.
5. Кравченко Л. С. Зміни біохімічних та імунологічних показників факторів захисту ротової рідини при захворюваннях слизової оболонки порожнини рота / Л. С. Кравченко, Н. С. Бас // Український стоматологічний альманах. – 2011. – №6. – С. 38-42.
6. Лебедев Д. В. Микробиоценозы полости рта у больных генерализованным пародонтитом, способ диагностики и коррекции : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук: спец. 03.02.03 «Микробиология» / Д. В. Лебедев. – Москва, 2011. – 23 с.
7. Панченко А. В. Распространенность и биологические свойства стафилококков, колонизирующих полость рта при кариесе и пародонтите : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 03.02.03 «Микробиология» / А. В. Панченко. – Волгоград : 2011. – 25 с.
8. Патент №79565 Україна, МПК 2006. 01. Спосіб контролю за розвитком гнійно-запальних процесів ротової порожнини на фоні впливу опіоїдного анальгетика в умовах моделювання / Фік В. Б., Федечко Й. М., Кривко Ю. Я., Пальтов Є. В.,

Онисько Р. М., Фітькало О. С.; Заявник і патентовласник Львівський нац. . мед. ун-т ім. Данила Галицького. – Номер заявки u 201ё2 12 479; заявл. 01, 11.2012; опубл. 25.04.2013; Бюл. № 8.
9. Царев В. Н. Антимикробная терапия в стоматологии / В. Н. Царев, Р. В. Ушаков. – Москва, 2004. – 143 с.
10. Якунич А. М. Особливості діагностики, клінічного перебігу та лікування сепсису у хворих-наркоманів: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. мед. наук : спец. 14. 01. 03 «Хірургія» / А. М. Якунич. – Запоріжжя, 2008. – 23 с.
11. Borges M. A. Microbiological composition associated with vitamin D receptor gene polymorphism in chronic periodontitis / M. A. Borges, L. C. de Figueiredo, R. B. de Brito [et al.] // Braz. Oral Res. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 203-208.
12. Bьltzingslцwen I. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria / I. Bьltzingslцwen, I. Adlerberth, A. E. Wold [et al.] // Oral Microbiol. Immunol. – 2003. – Vol. 18, № 5. – P. 278-284.
13. Mc Namara T. F. The development of an altered gingival crevicular microflora in the alloxan-diabetic rat / T. F. Mc Namara, N. S. Ramamurthy, J. E. Mulvihill, L. M. Golub // Arch Oral Biol. – 1982. – Vol. 27, № 3. – P. 217-223.
14. Ooshima T. Effects of hyposalivation on the oral microflora of rats fed sucrose or wheat flour diets / T. Ooshima, T. Yoshida, T. Hashida [et al.] // Caries Res. – 1992. – Vol. 26, № 2. – P. 124-131.
15. Socransky S. S. Quantitative studies of the bacterial flora of the periodontium in rice rats / S. S. Socransky, J. B. Macdonald, S. J. Sawyer, A. M. Auskaps // Arch. Oral. Biol. – 1960. – Vol. 2, № 2. – P. 104–110.
16. Wang L. F. Matrix mettalloproteinase-9 gene polymorphisms in nasal polyposis / L. F. Wang, C. Y. Chien, C. F. Tai // BMC Med. Genet. – 2010. – Vol. 10, № 11. – P. 85.
17. Waterman P. A. Jr. Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats / P. A. Jr. Waterman, M. Torabinejad, P. J. McMillan, J. D. Kettering // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 1998. – Vol. 85, № 6. – P. 720.
18. Zijnge V. Oral biofilm architecture on natural teeth / V. Zijnge, M. B. van Leeuwen, J. E. Degener [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 2. – P. 9321.

УДК 611. 311:616-008. 87:615. 33]-08

МІКРОФЛОРА РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ АНТИБІОТИКА

Фік В. Б., Федечко Й. М., Кривко Ю. Я., Корнійчук О. П.

Резюме. Проведено мікробіологічне дослідження мікрофлори ротової порожнини щурів на фоні введення антибіотика широкого спектру дії. Встановлено, що аеробна мікрофлора різних біотопів ротової порожнини стабільна, проте відрізняється в різних особин за кількістю ізольованих видів та інтенсивністю контамінації. Під дією антибіотика змінюється видовий і кількісний склад мікрофлори, який через 2 тижні після відміни препарату частково відновлюється.

Ключові слова: тварини, мікрофлора, антибіотик, ротова порожнина.

УДК 611. 311:616-008. 87:615. 33]-08

МИКРОФЛОРА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИБИОТИКА

Фик В. Б., Федечко Й. М., Крывко Ю. Я., Корнийчук Е. П.

Резюме. Проведено микробиологическое исследование микрофлоры ротовой полости крыс на фоне введения антибиотика широкого спектра действия. Установлено, что аэробная микрофлора разных биотопов ротовой полости стабильная, но отличается у разных особей по количеству изолированных видов и интенсивностью контаминации. Под воздействием антибиотика изменяется видовой и количественный состав микрофлоры, который через 2 недели после отмены препарата частично восстанавливался.

Ключевые слова: животные, микрофлора, антибиотик, ротовая полость.

UDC 611. 311:616-008. 87:615. 33]-08

The Microflora of the Laboratory Rat's Oral Cavity under the Action of Antibiotic

Fik V. B., Fedechko Y. M., Kryvko Y. Ya., Korniychuk O. P.

Abstract. The research is conducted on white rats-males, the age group 3,5-7,5 months, the weight 160-200 g. The animals were in the conditions of vivarium, the general review of the oral cavity, marking colouring, humidity, absence of lesion of mucous membrane of oral cavity was conducted. The animals were divided into two groups that included 10 individuals. The first group was administered antibiotic drug "Ophramaks" for 11 days. The animals in the control group didn't receive medicine. The Microbiological studies were conducted at the beginning of the experiment, after completion of antibiotic administering and in the end of the observation time (6 weeks). From the collected material, smears were prepared and stained according to the Gram's method. Simultaneously, crop in test tubes with growth medium was performed. The species composition of microorganisms was determined by the complex of morpho-tinctorial, cultural and biochemical properties.

The microscopic studies of smears from the oral cavity of animals manifested mainly gram-positive flora. The bacteriological studies of animals revealed saprophytic microflora by biochemical profile – *S. saprophyticus*, non-hemolytic and α- hemolytic streptococci, escherichia, Gram-positive spore and slowly sticks dyfteroyidy and fungi *Candida.* At the beginning of the experiment the animals from each habitat allocated several species of microorganisms, but in the experimental animals this amount does not exceed 1-2, partly increases by the end of the observation period. Throughout the period of observation significant changes were not seen in species

composition of microflora, although there was a tendency to increase the number of individuals from which 5 and more cultures of microorganism from different biotops of the oral cavity were selected. In the experimental animal groups at the beginning of the experiment species composition of microorganisms in different biotops did not differ from the control one, due to the same conditions. However, after a two-week course of antibiotic administration was revealed a kind of "simplification" microbiocenosis part in all biotops that revealed both in smear of primary material, and in bacteriological study. In terms of the antibiotic selective advantage obtained nonhemolytic streptococci, apparently due to species that are resistant to antibiotics. At the end of the experiment, 2 weeks after the last injection, habitat microflora of the oral cavity of rats partially restored, although the types of microorganisms that are partially or fully eliminated under antibiotic allocated to fewer individuals. The animals of the experimental group at the beginning of the experiment, the quantitative bacterial flora of biotops of the oral cavity in rats were not significantly different from control. After 2 weeks termination of antibiotic ,the species composition of microflora was recovering, although the main types of quantitative indicators were lower than at the beginning of the experiment. Thus, conducted examination indicate that aerobic microflora of different biotops of the oral cavity is stable, though it is different in various individuals by the number of isolated species and intensity of contamination. The species composition of microorganisms are pathogenic and opportunistic bacteria. Under the influence of broad-spectrum antibiotics varied species and number of microorganisms that 2 weeks after discontinuation was partially restoring. The obtained data indicates the possibility of using researched biological model to assess the effects of harmful impact on the body of rats, particularly for the study of opioid intoxication.

Keywords: animals, microflora, antibiotic, oral cavity.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 05. 02. 2015 р.