

В. Б. Фіс, П. М. Феденко, Ю. Я. Кривко
 Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького

ДИСБІОЗИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ПРИ ТРИВАЛОМУ ВПЛИВІ ОПІОЇДНОГО АНАЛЬГЕТИКА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Експерименти проводились на білих щурах-самцях (20), віком 3,5-7,5 міс. Тварини отримували опіоїдний анальгетик, похідне морфіну (10 тижнів). Проводили мікроскопічне дослідження мазків і бактеріологічні посіви.

Мікробіологічні дослідження вказують, що при опіатній інтоксикації розвивається дисбактеріоз ротової порожнини, з'являються патогенні та активізуються умовнопатогенні види бактерій. Результати наших досліджень співпадають з даними літератури, які вказують на значення грампозитивної мікрофлори у розвитку гнійно-запальних процесів у ротовій порожнині, зокрема значення *St. aureus*, якому властивий широкий діапазон адаптаційних властивостей та наявність токсинів з некротичною дією.

Ключові слова: ротова порожнина, опіоїд, мікробіологічне дослідження.

Робота є фрагментом НДР: «Структурна організація, ангіоархітектоніка та антропометричні особливості органів у внутрішньо-та поза утробному періодах розвитку, за умов екзо- та ендопатогенних факторів» (№ дкржрестрації 0115 U000041).

Зловживання психоактивними речовинами стало одним з найбільш актуальних питань сучасної наркології, особливо в час складних соціально-економічних перетворень в суспільстві. Зокрема, наркоманія сприяє розвитку і ускладнює перебіг усіх стоматологічних захворювань, утруднює проведення диференціальної діагностики та лікування патології органів ротової порожнини [3].

Згідно із сучасними уявленнями, мікрофлора ротової порожнини складає особливий мікробіоценоз, який в нормі бере участь у певних фізіологічних процесах, але при порушеннях видового і кількісного складу стає етіологічним фактором при розвитку хвороб зубів і пародонту. При цих процесах спостерігаються виражені зміни складу мікрофлори зубної бляшки та гінгівальних кишень з переважанням грамнегативної мікрофлори, зокрема анаеробних видів [1, 4, 9, 10, 11]. При поширенні запального процесу на тканини періодонту можливе проникнення мікроорганізмів у порожнину зуба з подальшим розвитком пульпіту, етіологічним фактором якого є анаеробна грамнегативна мікрофлора [4, 10]. При гнійно-запальних процесах тканин пародонту, зокрема, ясен часто виділяються коагулазонегативні та коагулазопозитивні стафілококи, зокрема, *St. aureus* [5, 8].

Проте, питання про зв'язок між видовим складом і кількісними співвідношеннями мікробіоценозів ротової порожнини та формою і стадією запальних процесів пародонту залишається дискусійним і потребує подальшого вивчення із застосуванням сучасних методик мікробіологічних досліджень [2]. Мікробіологічні дослідження дають можливість конкретизувати етіологічні фактори при різних захворюваннях ротової порожнини і вибрати оптимальні способи лікування і профілактики [1, 4, 12].

Метою роботи було дослідити зміни мікробіоценозів ротової порожнини експериментальних тварин при тривалій дії опіоїдного анальгетика та виявлення мікробних агентів, що спричиняють розвиток патологічних змін у тканинах пародонту.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти проводились на білих щурах-самцях (20 особин) віком 3,5-7,5 місяців, масою тіла 160-200 г. Усі тварини, відібрані для експерименту, перебували в умовах віварію, в якому забезпечувались умови згідно «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин». Візуально визначався стан слизової оболонки в ділянках власне ротової порожнини та присінку рота. При ретельному огляді звертали увагу на відсутність запальних змін чи інших патологічних явищ, орієнтуючись на вологість та колір слизової, відсутність ерозій, нальотів, виразок. У піддослідних тварин слизова була помірно зволожена, блідо-рожевого кольору, без видимих патологічних змін.

Опіоїдну інтоксикацію у тварин відтворювали за методикою [6]. Піддослідні тварини протягом 70 днів (10 тижнів) отримували опіоїдний анальгетик («Налбуфін», похідне морфіну). Опіоїд вводили дом'язово, один раз в день, в однаковий час з поступовим, через 2 тижні, підвищенням дози.

Протягом усього періоду експерименту велись спостереження за станом слизової власне ротової порожнини та присінку рота з оцінкою ступеня вираженості патологічних змін: 0 балів –

без видимих змін; ступінь 1—зміна кольору, набряк слизової; ступінь 2— зміна кольору, набряк слизової, ерозії; ступінь 3— зміна кольору, набряк слизової, ерозії, виразки; ступінь 4— зміна кольору, набряк слизової, ерозії, виразки, некротичні зміни. Бактеріологічні дослідження проводились на початку експерименту та наприкінці спостереження (десятий тиждень). Ці дослідження включали мікроскопічне дослідження мазків і бактеріологічні посіви з метою оцінки видового і кількісного складу мікрофлори [7]. Матеріал забирався за допомогою стерильної каліброваної бактеріологічної петлі (0,02 мл.) з поверхні зубів (зубної бляшки), а також з вільної частини ясен в пришийковій ділянці зуба. Посіви проводили в пробірки з цукровим бульйоном, на м'ясо-пептонний агар, жовтково-сольовий агар, середовище Ендо і середовище Сабуро. Кількісні показники визначались в колонієутворюючих одиницях на 0,02 мл (КУО \ 0,02мл). Виділені культури ідентифікували за комплексом морфотинкторіальних, культуральних і біохімічних властивостей. Паралельно готували препарати-мазки для мікроскопічного дослідження за методом Грама. У мазках оцінювали наявність клітинних елементів слизової, еритроцитів, лейкоцитів і морфотинкторіальні типи мікрофлори.

Результати дослідження та їх обговорення. Перед початком дослідження, при мікроскопії, у складі мікрофлори зубної бляшки піддослідних тварин виявлено переважання грампозитивної кокової і паличкоподібної мікрофлори. Виявлялись поодинокі епітеліальні клітини та лейкоцити.

При бактеріологічному дослідженні виявлялась грампозитивна кокова мікрофлора (коагулазонегативні стафілококи, негемолітичні та α - гемолітичні стрептококи), неспоріві та споріві грампозитивні палички, а також грамнегативні коки та палички. Патогенні види бактерій не виявлялись. Від однієї піддослідної тварини виділялось до 5 видів аеробних бактерій у різних комбінаціях, у яких переважали негемолітичні та α - гемолітичні стрептококи, коагулазонегативні стафілококи, споріві та неспоріві грампозитивні палички та в окремих тварин – ешерихії в помірних кількостях (рис. 1).

На десятому тижні експерименту практично у всіх тварин (95%) відмічались запальні зміни слизової власне ротової порожнини, присінку рта та ясен. Виразненість цих змін була різною. Набряк і значне почервоніння слизових без ерозій чи виразок (ступінь 1) виявлено у 10% тварин. Такі ж зміни з поверхневими ерозіями слизової (ступінь 2) відмічались у 30% тварин. Більш глибокі ураження з утворенням виразок (ступінь 3) розвинулись також у третини піддослідних тварин. У 25% щурів зміни слизових набули характеру некротичного процесу (табл. 1).

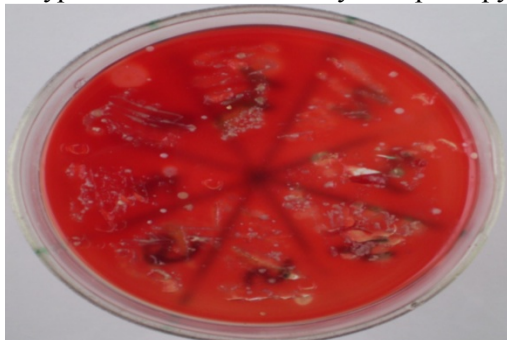


Рис. 1. Зб. 1 x 1. Ріст різних видів бактерій на кров'яному агарі (первинний посів з ротової порожнини щура).

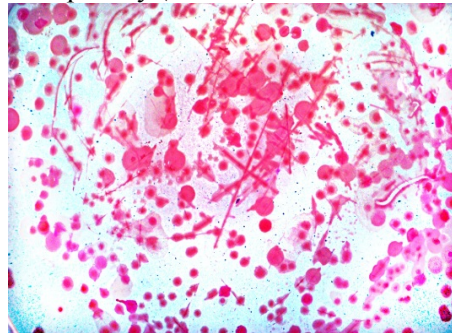


Рис. 2. 10-й тиждень. Мікрофото зубної бляшки. Об. x 90, ок. x 80. Ознаки запально-некротичного процесу.

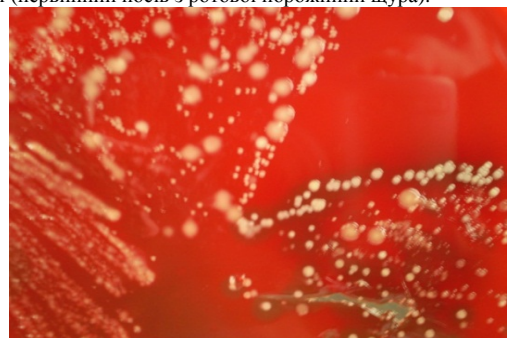


Рис. 3. 10-й тиждень. Зб. 1 x 4. На середовищі кров'яного агару колонії гемолітичних і негемолітичних стафілококів.

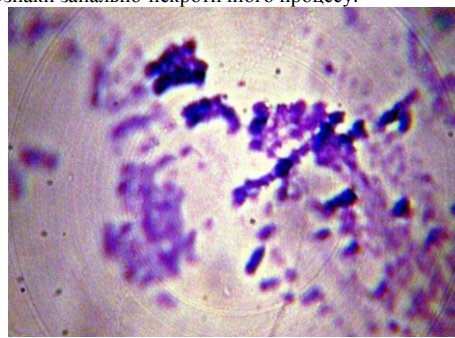


Рис. 4. 10-й тиждень. Мікрофото із зубної бляшки. Об. x 90, ок. x 80, імерсія. Клітини грибів Candida.

Таблиця 1

Результати бактеріологічних досліджень мікрофлори ротової порожнини щурів при тривалій опіятній інтоксикації

Вираженість процесу	Кількість тварин	Мікробні асоціації			Патогенні та умовно-патогенні види	
		≥5 видів	3-4 види	1-2 Види	Назва виду	Кількісні показники КУО(0,02мл
0	1 (5%)	1	-	-	St. aureus	не виявл.
					Е. coli гемолітична	не виявл.
					Коагулазонегативні стафілококи	22±3,1
					Е. coli	26±3,4
					α- гемолітичні стрептококи	29±3,1
1	2(10%)	1	1	-	Candida	11±1,7
					St. aureus	9±1,3
					Е. coli гемолітичні	поодин. кол
					Коагулазонегативні стафілококи	56±2,6
					Е. coli	23±1,6
2	6(30%)	-	4	2	α- гемолітичні стрептококи	52±3,3
					Candida	5±0,5
					St. aureus	13±1,2
					Е. coli гемолітичні	поодин. кол
					Коагулазонегативні стафілококи	65±3,6
3	6 (30%)	-	2	4	Е. coli	24±2,5
					α- гемолітичні стрептококи	56±2,8
					Candida	10±0,6
					St. aureus	21±2,1
					Е. coli гемолітичні	поодин. кол
4	5(25%)	-	-	6	Коагулазонегативні стафілококи	68±2,9
					Е. coli	26±1,9
					α-гемолітичні стрептококи	61±3,1
					Candida	5±0,5
					St. aureus	35±2,4
					Е. coli гемолітичні	поодин. кол
					Коагулазонегативні стафілококи	72±3,4
					Е. coli	34±2,2
					α- гемолітичні стрептококи	61±3,6
					Candida	5±0,3

При мікроскопічному дослідженні мазків виявлено певні особливості в залежності від ступеня розвитку процесу. При першому ступені виявлено епітелій слизової - клітини до 10 в полі зору, на поверхні яких часто спостерігалась адсорбція кокової мікрофлори. Лейкоцити - до 20 у полі зору. При другому – третьому ступені розвитку патологічного процесу збільшувалась кількість лейкоцитів до 70 в полі зору, епітеліальних клітин з ознаками дегенерації, мікробних клітин – по всьому полі зору, часто у вигляді скупчень (бляшок) які можна було ідентифікувати як стафілококи чи стрептококи. При четвертому ступені мікроскопічна картина вказувала на запально-некротичний процес, зокрема, виявляли епітеліальні клітини з ознаками дегенеративних змін та руйнування, по всьому полі зору – мононуклеари та сегментоядерні лейкоцити, еритроцити, автофагоцитоз еритроцитів. Переважала грамнегативна мікрофлора, сформована у вигляді скупчень–бляшок, а також скупчення кокової грампозитивної мікрофлори (рис. 2).

Як видно з табл. 1, із слизової оболонки ротової порожнини виділялись мікробні культури як асоціації різних видів. Склад цих асоціацій, а також кількісні характеристики окремих видів залежав від ступеня розвитку запального процесу. У всіх піддослідних тварин виявлено патогенні види - St. aureus, ешерихії з гемолітичними властивостями. При початкових ступенях виділялося

по 3-4 види бактерій, а при виражених запальних та некротичних змінах – по 1-2 види, але в значно більших кількостях.

Кількість *St. aureus* зросла в 4 рази. Також зростала кількість умовно-патогенних та сапрофітних бактерій, зокрема ешерихій, коагулазонегативних стафілококів, гемолітичних стафілококів (рис. 3) та α -гемолітичних стрептококів. Постійно виділялись гриби *Candida* (рис. 4).

Заключення

Таким чином, мікробіологічні дослідження вказують, що при опіатній інтоксикації розвиваються зміни мікрофлори ротової порожнини піддослідних щурів, які можна характеризувати як дисбактеріоз, при якому з'являються патогенні та активізуються умовно-патогенні види бактерій. При цьому сапрофітні бактерії, серед яких можливі мікроби-антагоністи перестають виділятися або виділяються в менших кількостях. Очевидно, що патогенна та умовно-патогенна мікрофлора стає етіологічним фактором запальних процесів у слизовій порожнині рота, включаючи присінок та ясна, оскільки ступінь бактеріологічних змін корелює із ступенем розвитку патологічного процесу. Результати наших досліджень співпадають з даними літератури [8], які вказують на значення грампозитивної мікрофлори у розвитку гнійно-запальних процесів у ротовій порожнині, зокрема значення *St. aureus*, якому властивий широкий діапазон адаптаційних властивостей та наявність токсинів з некротичною дією [5].

Перспективи подальших досліджень. Одержані результати вказують на необхідність подальших досліджень з використанням запропонованої моделі, але з більш тривалим періодом спостереження.

Список літератури

1. Dobrovolska M. K. Stan biocenozu klinichnih zubojasennih kishen' hvorih na generalizovaniy parodontit / M. K. Dobrovolska, V. M. Gelej, N.I. Gelej // Klinichna stomatologija. – 2014, № 2. - S. 17-19
2. Zorina O. A. Vzaimosvjaz' kachestvennogo i kolichestvennogo sostava biocenozov rotovoj polosti i individual'nogo genetičeskogo profilja na fone vospalitel'nyh zabojevanij parodonta: avtoref. dis. na soiskanie nauch. stepeni dokt. med. nauk: spec. 14.01.14 «Stomatologija» / O. A. Zorina // – Moskva, - 2011. – 42 s.
3. Kolchev A. A. Kliniko-laboratornaja harakteristika sostojanija organov i tkanej polosti rta u podrostkov bol'nyh opijnoj narkomaniej: avtoref. dis. na soiskanie nauch. stepeni kand. med. nauk:spec. 14.01.06 «Psihiatrija» / A. A. Kolchev // – Moskva, - 2005. – 21 s.
4. Lebedev D.V. Mikrobiocenozy polosti rta u bol'nyh generalizovannym paradontitom, sposob diagnostiki i korekcii: avtoref. dis. na soskanie nauch. stepeni kand. med. nauk: spec. 03.02.03 «Mikrobiologija» / D.V. Lebedev // – Moskva, - 2011. – 23 s.
5. Panchenko A. V. Rasprostranennost' i biologičeskie svojstva stafilokokkov, kolonizirujushhih polost' rta pri kariese i parodontite: avtoref. dis. na soiskanie nauch. stepeni kand. med. nauk: spec. 03.02.03 «Mikrobiologija» / A.V.Panchenko // – Volgograd: - 2011. – 25 s.
6. Patent № 71438 Україна, МПК 2006. 01. Sposib modeljuvannja povedinkovih reakcij v eksperimental'nih tvarin pri hronichnomu vplivi opioidu / Pal'tov Є.V., Fik V.B., Vil'hova I.V., Onis'ko R.M., Fit'kalo O.S., Krivko Ju.Ja.; Zajavnik i patentovlasnik L'viv's'kij nac. med. un-t imeni Danila Galic'kogo. – Nomer zajavki u 2012 00427; zajavl. 16.01.2012; opubl. 10.07.2012, Bjul. № 13
7. Patent № 79565 Україна, МПК 2006.01. Sposib kontrolju za rozvitkom gnijno-zapal'nih procesiv rotovoi porozhnini na foni vplivu opioidnogo anal'getika v umovah modeljuvannja / Fik V.B., Fedechko J.M., Krivko Ju.Ja., Pal'tov Є.V., Onis'ko R.M., Fit'kalo O.S.; Zajavnik i patentovlasnik L'viv's'kij nac. med. un-t imeni Danila Galic'kogo. – Nomer zajavki u 2012 12479; zajavl. 01.11.2012;opubl. 25.04.2013; Bjul. № 8
8. Fursa A. A. Osobennosti diagnostiki i lechenija ostryh gnojnyh zabojevanij mjagkih tkanej u bol'nyh s dissocial'nym tipom povedenija: avtoref. diss. na soisk. nauch. stepeni kand. med. nauk: spec. 14.01.17. – “Hirurgija” / A.A. Fursa // - Moskva, - 2011. – 25 s.
9. Aas J. A. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity / J.A. Aas, B.J. Paster, L.N. Stokes [et al.] // J.Clin. Microbiol. - 2005. - Vol.43, №11. - P.5721-5732.
10. Botero J. E. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population / J.E. Botero, A. Contreras, G. Lafaurie [et al.] // J. Periodontol. - 2007. -Vol.78, №4. - P.696-704.
11. Damir T. Effects of different blood groups on the reproduction of periodontal pocket bacteria / T. Damir, H. Uslu, R. Orbac [et al.] // Int Dent J., - 2009. - Vol. 59, №2. - P. 83-86.
12. Naka S. Distribution of periodontopathic bacterial species in Japanese children with developmental disabilities / S. Naka, A. Yamana, K. Nakano [et al.] // BMC Oral Health. - 2009. -Vol.23, №9. - P.24.

Реферати

ДИСБИОЗЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВЛИЯНИИ ОПИОИДНОГО АНАЛЬГЕТИКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Фик В.Б., Федечко Й.М., Крывко Ю.Я.

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах (20), возраст 3,5-7,5 мес. Животные получали опиоидный анальгетик, производное морфина на протяжении 10 недель. Проводили микроскопическое исследование мазков и бактериологические

ORAL CAVITY DYSBIOSIS UNDER THE DURABLE OPIOID ANALGESIC INFLUENCE IN EXPERIMENT.

Fik V. B., Fedechko Y. M., Kryvko Y. Ya.

Experiments were hold on white male rats (20) aged 3,5-7,5 months. Experimental animals had been receiving opioid analgesic, derivative of morphine, once a week during 10 weeks. Bacteriological investigation included

посевы. Микробиологические исследования указывают, что при опиатной интоксикации развивается дисбактериоз ротовой полости, появляются патогенные и активизируются условнопатогенные виды бактерий. Результаты наших исследований совпадают с данными литературы, которые указывают на значение грамположительной микрофлоры в развитии гнойно-воспалительных процессов в ротовой полости, в частности, значение *St. aureus*, которому свойственны широкий диапазон адаптационных свойств и наличие токсинов с некротическим действием.

Ключевые слова: ротовая полость, опиоид, микробиологическое исследование.

Стаття надійшла 1.03.2015 р.

taking a culture and microscopic investigation of the smear. Microbiological investigations show that changes of bacterial population of the oral cavity which develop under the opioid intoxication can be characterized as dysbiosis. Results of our investigation which indicate the importance of the gram-positive microflora in development of inflammatory process in the oral cavity, in particular, importance of the *St. aureus*, which has wide range of adaptability characteristics and toxins with necrotic influence.

Key words: oral cavity, opioid, microbiological investigation.

Рецензент Куц О.Г.

УДК 611.82-053.13

В. С. Школьник

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, м. Вінниця

СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ СПИННОГО МОЗКУ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ 39-40 ТИЖНІВ ПРЕНАТАЛЬНОГО ПЕРІОДУ

В результаті проведеного комплексного анатомо-гістологічного дослідження нами встановлені морфометричні параметри, цитоархітектонічні особливості структури сегментів спинного мозку плодів людини 39-40 тиж. внутрішньоутробного періоду розвитку, а також морфологія нейроепітелію та особливості проліферації НСК.

Ключові слова: спинний мозок, сіра речовина, біла речовина, нейроепітелій.

Спинний мозок – важливий центр регуляції функцій внутрішніх органів та тіла, який характеризується низкою закономірностей розвитку і будови, як у філо-, так і у онтогенезі [3]. За останні роки дослідники розвитку спинного мозку людини стикнулися із проблемами в інтерпретації отриманих даних про його структуру. Обширні відомості про мікроархітектоніку мозку не дозволяють авторам достатньо повно пояснити особливості його функціонування як цілісної системи [1]. Завдяки досягненням імунології, біохімії, молекулярної біології, були суттєво розширені можливості гістологічних методів дослідження, які при використанні сучасних імуноцитохімічних підходів дозволяють вивчати організацію елементів тканин *in situ* нервової системи [2]. Зокрема, значно зросла кількість досліджень, щодо вивчення науковцями гістогенезу нейральних стовбурових клітин [6]. Відомо, що поліпотентні НСК мігрують вздовж радіальних гліальних волокон до місць своєї постійної локалізації [7]. Проте, предметом дискусії лишається роль радіальної глії у процесах диференціювання нейронів і клітин нейроглії [9], мало описана морфологія нейроепітелію [11], а також відсутнє системне описання гістогенезу структур сегментів спинного мозку [10].

Метою роботи було вивчення морфометричних параметрів структур сегментів на різних рівнях спинного мозку плодів людини 39-40 тиж. внутрішньоутробного розвитку, а також встановлення особливостей цитоархітектоніки та диференціювання клітин сірої речовини.

Матеріал та методи дослідження. Проведено анатомо-гістологічне дослідження спинного мозку 18 плодів людини гестаційним терміном 39-40 тижнів. Тім'яно-куприкова довжина склала $378,9 \pm 20,5$ мм, вага – $3379,1 \pm 102,7$ г (вроджені вади розвитку ЦНС відсутні).

Матеріал для досліджень був отриманий в Обласному патологоанатомічному бюро м. Вінниці, після чого фіксувався 10% нейтральним розчином формальдегіду. Після виготовлення целоїдинових та парафінових блоків проводились серії зрізів спинного мозку товщиною 8-10 мкм. Оглядові препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином, толуїдиновим синім, за Ван-Гізон та проводили імпрегнацію сріблом по Більшовському. Для імуногістохімічного дослідження були використані діагностичні моноклональні антитіла фірми "DacoCytomation": віментин, S-100 (гліальний фібрілярний кислий білок), Ki-67 та синаптофізин.

Під час морфометричного дослідження спинного мозку була застосована комп'ютерна гістометрія (Photo M 1.21). Отримані в процесі дослідження цифрові дані оброблені статистично.

Матеріали дослідження не заперечують основним біоетичним нормам Гельсінської декларації прийнятої 59-ою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації у 2008 році (витяг з протоколу засідання Комітету біоетики ВНМУ ім. М. І. Пирогова № 9 від 04.09.2014 р.).

Результати дослідження та їх обговорення. В процесі дослідження нами встановлено, що у середньому довжина спинного мозку плодів 39-40 тиж. складає $192,3 \pm 6,2$ мм, вага – $3,2 \pm 0,2$ г.