Експериментальні дослідження

КЛІНІЧНА СТОМАТОЛОГІЯ

https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/kl-stomat

DOI 10.11603/2311-9624.2024.1.13918
УДК 59.085:(616.311 + 616.314-007.1)

©В. В. Гороховський[1], О. В. Дєньга[2]

Одеський національний медичний університет[1]
Державна установа «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії Національної академії медичних наук України»[2]
e-mail: gorohovskiyvv@ukr.net

Вплив моделювання порушення термінів прорізування зубів на показники мікробіоценозу в слизовій оболонці порожнини рота експериментальних тварин

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції/Received: 12.01.2024 р.

Ключові слова: прорізування зубів; гіпотиреоз; гіпертиреоз; антибіотики; слизова оболонки порожнини рота.

АНОТАЦІЯ

Резюме. Слизова оболонка порожнини рота є одним із найважливіших бар'єрів, що захищає організм від патогенних мікроорганізмів, механічного ушкодження та інших видів ендогенного та екзогенного впливів. Для ефективного функціонування слизової оболонки ротової порожнини необхідне дотримання багатьох умов. Серед них варто відмітити кислотно-лужну рівновагу, підтримку нормального біоценозу та дотримання визначеної активності ферментів, таких, як уреаза і лізоцим.

Мета дослідження – вивчити ступінь дисбіозу в щурів при моделюванні порушення термінів прорізування зубів шляхом визначення активності уреази та лізоциму.

Матеріали і методи. Експеримент виконано на 20 білих лабораторних щурах-самках та 37 щурятах. Починаючи з першого дня введення препаратів, до самок підсаджували самців. Залежно від використаних препаратів, тварин поділили на 4 групи: перша – інтактна (дієта віварію); друга – L-тироксин в дозі 10 мг/кг + дієта віварію; третя – антибіотики («Цефоперазон» 180 мг/кг – вагітність, «Амоксиклав» 135 мг/кг – лактація) + дієта віварію; четверта – «Мерказоліл» (20 мг/кг – вагітність), (50 мг/кг – лактація) + дієта віварію. Подальші дослідження проводили на щурятах, яких народили самки, що отримували ці препарати. Щурят виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) після періоду лактації приблизно у віці 35 діб. Загальна тривалість експерименту склала 56 діб. У щурів усіх груп проводили біохімічний аналіз ферментів слизової оболонки порожнини рота.

Результати досліджень та їх обговорення. У слизовій оболонці порожнини рота щурів другої групи (раннє прорізування) ступінь дисбіозу збільшився у 15,3 раза порівняно зі щурами інтактної групи. При моделюванні затримки прорізування зубів у щурів третьої групи (антибіотики) рівень дисбіозу збільшився у 17,8 раза порівняно зі щурами першої групи. У четвертій групі щурів, які отримували від самок, в яких у період вагітності й лактації був дефіцит тиреоїдних гормонів, рівень дисбіозу був у 30,2 рази більший за показники інтактної групи щурів.

Висновки. Отримані результати свідчать про дуже високий ступень дисбіозу в слизовій оболонці порожнини рота щурів, яким моделювали затримку та раннє прорізування зубів.

Вступ. Слизова оболонка порожнини рота є одним із найважливіших бар'єрів, який захищає організм від патогенних мікроорганізмів, механічного ушкодження та інших видів ендогенного та екзогенного впливів [1, 2, 5]. Для ефективного функціонування слизової оболонки ротової порожнини необхідне дотримання багатьох умов [8, 9]. Серед них варто відмітити кислотно-лужну рівновагу, підтримку нормального біоценозу та дотримання визначеної активності ферментів, таких, як уреаза і лізоцим [4, 7].

Уреаза – це фермент, що здатний розщеплювати сечовину на аміак та вуглекислий газ. Збільшення її активності у порожнині рота може свідчити про збільшення кількості патогенних мікроорганізмів, що синтезують цей фермент [3, 10, 11]. У слизовій оболонці ротової порожнини уреаза відіграє важливу роль у підтримці кислотно-лужного балансу. Порушення кислотно-лужного балансу, у свою чергу, є важливим каріесогенним фактором [12, 13]. Вивчення активності уреази у слизовій оболонці порожнини рота дозволяє визначити рівень кислотності в порожнині рота та виявити можливі проблеми, пов'язані з кислотно-лужним балансом.

Лізоцим – це важливий фактор неспецифічної імунорезистентності. За своєю природою він є ферментом, здатним руйнувати бактеріальну клітинну стінку патогенних бактерій та чинити противірусну та протигрибкову дії. Його бактерицидна дія досягається шляхом гідролізу β-1,4 глікозидних зв'язків між N-ацетилмурамовою кислотою і N-ацетилглюкозаміном пептидоглікану клітинної стінки у грампозитивних і грамнегативних бактерій. Лізоцим проявляє цитолітичну активність здебільшого до грампозитивних бактерій, активність відносно клітин грамнегативних мікроорганізмів значно менша [14, 15]. Таким чином, вивчення активності лізоциму дозволяє визначити ефективність захисного бар'єра ротової порожнини та виявити можливі проблеми, пов'язані з порушенням імунорезистентності.

Метою дослідження було вивчити ступінь дисбіозу в щурів при моделюванні порушення термінів прорізування зубів шляхом визначення активності уреази та лізоциму.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження виконано на 20 білих лабораторних щурах-самках та 37 щурятах, які були народжені від них. Залежно від використаних препаратів, тварин поділили на 4 групи:

1. Інтактна (дієта віварію).
2. Дієта віварію + L-тироксин у дозі 10 мг/кг.
3. Дієта віварію + антибіотики («Цефоперазон» 180 мг/кг – вагітність, «Амоксиклав» 135 мг/кг – лактація).
4. Дієта віварію + препарат «Мерказоліл» (20 мг/кг – вагітність), (50 мг/кг – лактація).

Починаючи з першого дня введення препаратів, до самок підсаджували самців. У щурів другої групи моделювали стан експериментального гіпертиреозу шляхом щоденного перорального введення препарату L-тироксин («Берлін-Хемі», Німеччина) у дозі 10 мг/кг маси тіла щоденно протягом вагітності (21 добу) та лактації (до кінця проведення експерименту).

Введення антибіотиків у третьої групі щурів проводили за наступною схемою: два курси препарату «Цефоперазон» (ТОВ «АВАНТ», Україна), який вводили перорально (розчин антибіотика у питній воді) в дозі 180 мг/кг з першої доби експерименту протягом 6 діб, після 8 днів перерви проводили другий курс. Після 8 діб перерви щурам проводили два курси препарату «Амоксиклав» («Лек», Словенія) в дозі 135 мг/кг (по 6 діб). Цей період збігся з пологами, тобто під час лактації щури отримували два курси амоксиклаву. Всього було проведено чотири курси антибіотикотерапії з трьома перервами. Використовували ін'єкційну форму антибіотиків, які добре розчинялись і корелювали з терапевтичними дозам для людини.

У щурів четвертої групи моделювали стан експериментального гіпотиреозу шляхом перорального введення препарату «Мерказоліл» (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна). Протягом вагітності (21 доба) щури отримували препарат у дозі 20 мг/кг щоденно, протягом лактації (до кінця експерименту) дозу збільшували до 50 мг/кг.

Подальші дослідження проводили на щурятах, які були народжені від самок, що отримували різні препарати. Групи були відповідними:

1. Інтактна (дієта віварію), n=7.
2. Дієта віварію + L-тироксин, n=12.
3. Дієта віварію + антибіотики, n=11
4. Дієта віварію + препарат «Мерказоліл», n=7.

Щурят виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) після періоду лактації приблизно у віці 35 діб. Загальна тривалість експерименту склала 56 діб. Протягом експерименту в щурят визначалась дата початку прорізування зубів (молярів верхньої та

нижньої щелеп) і ступінь їх прорізування. В результаті досліджень у тварин другої групи виявлено раннє прорізування зубів, у щурів третьої та четвертої груп – затримка прорізування зубів. У тварин усіх груп проводили біохімічний аналіз ферментів слизової оболонки порожнини рота. Слизову оболонку порожнини рота відділяли за допомогою скальпеля, ножиць та пінцета. Зважували і гомогенізували у 0,05 М трис-HCl буфері pH 7,5 з розрахунку 20 мг тканини на 1 мл буфера. Гомогенізацію здійснювали в порцелянових ступках, розташованих на заморожених акумуляторах холоду. Гомогенати при постійному помішуванні розміщували протягом 30 хв у холодильнику, потім центрифугували при 2500 об/хв і +4 °С 15 хв. Супернатант переносили в пробірки і проводили біохімічний аналіз.

Принцип визначення активності уреази полягає у здатності ферменту розщеплювати сечовину до аміаку, який з реактивом Неслера дає жовте забарвлення. Інтенсивність забарвлення проби прямо пропорційна активності уреази в гомогенаті.

Визначення активності лізоциму засноване на його здатності розщеплювати субстрат Micrococcus lysodeikticus, що супроводжується просвітленням субстрату, ступінь якого буде пропорційний активності лізоциму. Активність лізоциму перераховували в од/кг слизової оболонки.

Ступінь дисбіозу слизових оболонок травного тракту розраховували як відношення показників активності уреази і лізоциму за формулою:

$$СД = \frac{У_{відн}}{Л_{відн}}$$

Результати розрахунку ступеня дисбіозу виражали в ум. од. [16].

При статистичній обробці отриманих результатів використовували комп'ютерну програму STATISTICA 6.1. для оцінки їхньої достовірності та похибок вимірювань. Статистично значущу відмінність між альтернативними кількісними ознаками з розподілом, відповідним нормальному закону, оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента.

При роботі з тваринами керувалися Законом України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009 р.) з урахуванням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

Результати досліджень та їх обговорення. Вплив L-тироксину, антибіотиків та мерказолілу, які щури отримували внутрішньоутробно та з молоком матері, на біохімічні показники мікробіоценозу в слизовій оболонці порожнини рота досліджуваних тварин представлені в таблиці.

Введення запропонованих препаратів самкам призвело до достовірного збільшення активності уреази у слизовій оболонці їх щурят. Так, у тварин другої групи (раннє прорізування зубів) рівень уреази був у 7,5 раза ($p<0,001$) більший за показник інтактної групи щурів. У третій групі (антибіотики (затримка прорізування зубів)) цей показник був у 6,8 раза ($p<0,001$) більший порівняно з інтактною групою щурів. При моделюванні затримки прорізування зубів у тварин четвертої групи (препарат «Мерказоліл») активність уреази була у 8,8 раза більша ($p<0,001$) відносно показників інтактної групи. Це свідчить про збільшення кількості патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, синтезуючих цей фермент, у порожнині рота тварин (табл.).

Показники активності лізоциму в слизовій оболонці порожнини рота достовірно зменши-

Таблиця. Показники мікробіоценозу в слизовій оболонці порожнини рота експериментальних тварин

Група щурів	Активність уреази, мк-кат/кг	Активність лізоциму, од./г	Ступінь дисбіозу
Інтактна (дієта віварію) (n=7)	0,04±0,008	0,213±0,010	1,24±0,001
Дієта віварію + L-тироксин (n=12)	0,30±0,06 p<0,001	0,104±0,009 p<0,001	15,3±1,8 p<0,001
Дієта віварію + антибіотики (n=11)	0,27±0,01 p<0,001	0,080±0,002 p<0,001	17,8±2,0 p<0,001
Дієта віварію + препарат «Мерказоліл» (n=7)	0,35±0,02 p<0,001	0,061±0,002 p<0,001	30,2±2,6 p<0,001

Примітка. p – показник достовірності відмінностей з інтактною групою.

лися у досліджуваних щурят усіх груп. Найнижчий показник даного ферменту виявлено в четвертій групі тварин, яким моделювали затримку прорізування зубів. У цій групі активність лізоциму склала (0,061±0,002) од./г, що достовірно менше від показників першої групи щурів на 71,4 % ($p<0,001$). При моделюванні затримки прорізування зубів у щурів третьої групи рівень активності лізоциму достовірно зменшився на 62,4 % ($p<0,001$) порівняно з інтактними щурами. У тварин другої групи (раннє прорізування зубів) рівень активності лізоциму зменшився 51,2 % ($p<0,001$) порівняно зі щурами першої групи (табл.). Тобто під впливом усіх введених препаратів відбулось пригнічення неспецифічного імунітету та антимікробного захисту в порожнині рота дослідних тварин. Низькою активністю лізоциму можна пояснити і високий рівень контамінації умовно-патогенних бактерій на слизовій оболонці порожнини рота щурів, які в період внутрішньоутробного розвитку та ранній постнатальний період отримували антибіотики або відчували нестачу або надлишок тиреоїдних гормонів.

Розрахунковий показник ступеня дисбіозу найбільш наочно характеризує зміни у системі мікробіоценозу біотопу. Так, у слизовій оболонці порожнини рота щурів другої групи (раннє прорізування) ступінь дисбіозу збільшився у 15,3 раза порівняно зі щурами першої групи. При моделюванні затримки прорізування зубів у тварин третьої групи (антибіотики) рівень дисбіозу підвищився у 17,8 раза відносно щурів першої групи. У четвертій групі щурів, отриманих від самок, у яких в період вагітності й лактації був дефіцит тиреоїдних гормонів, рівень дисбіозу був у 30,2 рази більший за показники інтактної групи щурів. Отримані результати свідчать про дуже високий ступінь дисбіозу в слизовій оболонці порожнини рота тварин, матері яких отримували досліджувані препарати в період вагітності та лактації. Найвищий показник зареєстровано після введення мерказолілу (табл.).

Висновки. У результаті проведених досліджень виявлено зниження антимікробного захисту слизової оболонки порожнини рота при моделюванні затримки та раннього прорізування зубів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Şenel S. An overview of physical, microbiological and immune barriers of oral mucosa / S. Şenel // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – No. 22 (15). – P. 7821.
2. The Bigger Picture: Why Oral Mucosa Heals Better Than Skin / M. Waasdorp, B. P. Krom, F. J. Bikker [et al.] // Biomolecules. – 2021. – Vol.6. – No. 11 (8). – P. 1165.
3. Каськова Л. Ф. Показники лізоциму та уреази ротової рідини дітей, які часто хворіють на ГРВІ / Л. Ф. Каськова, О. С. Павленкова // Молодий вчений. – 2015. – № 16 (96). – С. 71–73.
4. Immune Tolerance in the Oral Mucosa / H. F. Pelaez-Prestel, J. L. Sanchez-Trincado, E. M. Lafuente, P. A. Reche // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 10. – No. 22 (22). – P. 12149.
5. Crosstalk between the oral microbiota, mucosal immunity, and the epithelial barrier regulates oral mucosal disease pathogenesis / D. Lin, L. Yang, L. Wen [et al.] // Mucosal Immunol. – 2021. – No. 14 (6). – P. 1247–1258.
6. Armed to the teeth – the oral mucosa immunity system and microbiota / M. Ptasiewicz, E. Grywalska, P. Mertowska [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – No. 23 (2). – P. 882.
7. Immunomodulatory role of oral microbiota in inflammatory diseases and allergic conditions / C. M. Moreno, E. Boeree, C. M. T. Freitas, K. S. Weber Front // Allergy. – 2023. – No. 17 (4). – P. 1067483.
8. Human diseases, immunity and the oral microbiota-Insights gained from metagenomic studies / A. Idris, S. Hasnain, L. Huat, D. Koh // Oral. Sci. Int. – 2017. – No. 14. – P. 27–32.
9. Yamashita Y. The oral microbiome and human health / Y. Yamashita, T. Takeshita // J. Oral. Sci. – 2017. – No. 59. – P. 201–206.
10. Yee J. K. Helicobacter pylori colonization of the oral cavity: A milestone discovery / J. K. Yee // World J Gastroenterol. – 2016. – Vol. 14, No. 22 (2). – P. 641–648.
11. Graham D.Y. Helicobacter pylori urease for diagnosis of Helicobacter pylori infection: A mini review / D. Y. Graham, M. Miftahussurur // J. Adv. Res. – 2018. – Vol. 31, No. 13. – P. 51–57.
12. Профілактика стоматологічних захворювань : підруч. для студ. ви- щих мед. навч. закл. / Л. Ф. Каськова, Л. І. Амосова, О. О. Карпенко [та ін.] ; за ред. проф. Л. Ф. Каськової. – Х. : Факт, 2011. – 392 с.
13. Мельник В. С. Профілактика стоматологічних захворювань : навчальний посібник / В. С. Мельник, Л. Ф. Горзов, Л. М. Білищук. – Ужгород, 2019. – 136 с.
14. Ragland S. A. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of

lysozyme / S. A. Ragland, A. K. Criss // PLoS Pathog. – 2017. – Vol. 21, No. 13 (9). – P. e1006512.
15. Gajda E. Lizozym--występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań [Lysozyme--occurrence in nature, biological properties and possible applications] / E. Gajda, G. Bugla-Płoskońska // Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). – 2014. – Vol. 21, No. 68. – P. 1501–1515.
16. Методи дослідження стану кишечнику та кісток у лабораторних щурів: довідник / О. А. Макаренко, Л. М. Хромагіна, І. В. Ходаков [та ін.]. – Одеса : видавець С. Л. Назарчук, 2022. – 81 с.

©V. V. Horokhovskyi[1], O. V. Denga[2]

Odesa National Medical University[1]

The Institute of Stomatology and Maxillo-facial Surgery National Academy of Medical Sciences of Ukraine[2]

The influence of simulation of the abnormal timing of dentition on indices of microbiocenosis in the mucous membrane of the oral cavity of experimental animals

Summary. The mucous membrane of the oral cavity is one of the most important barriers that protects the body from pathogenic microorganisms, mechanical damage and other types of endogenous and exogenous influences. For the effective functioning of the mucous membrane of the oral cavity, compliance with many conditions is necessary. Among them, it is worth noting acid-alkaline balance, maintenance of normal biocenosis and compliance with the specified activity of enzymes, such as urease and lysozyme.
The aim of the study – to study the degree of dysbiosis in rats during modeling of eruption disorders by determining the activity of urease and lysozyme.
Materials and Methods. The experiment was performed on 20 white female laboratory rats and 37 male rats. Starting from the first day of drug administration, the males were put together with females. Depending on the drugs used, the animals were divided into 4 groups: 1. Intact (vivarium diet); 2. L-thyroxine in a dose of 10 mg/kg + vivarium diet; 3. Antibiotics (cefoperazone 180 mg/kg – pregnancy, amoxiclav 135 mg/kg – lactation) + vivarium diet; 4. Mercazolil – (20 mg/kg – pregnancy), (50 mg/kg – lactation) + vivarium diet. Further studies were conducted on little rat that were born from the females receiving these drugs. Rats were removed from the experiment under thiopental anesthesia (20 mg/kg) after the lactation period at approximately 35 days of age. The total duration of the experiment was 56 days. During the experiment, the date of the beginning of dentition and the degree of eruption were determined in little rat. A biochemical analysis of the enzymes of the mucous membrane of the oral cavity was performed in rats of all groups.
Results and Discussion. The degree of dysbiosis in the mucous membrane of the oral cavity of rats of the 2nd group (early eruption) increased by 15.3 times compared to rats of the intact group. When simulating the delay in eruption in rats of the 3rd group (antibiotics), the level of dysbiosis increased by 17.8 times compared to those of the 1st group. In the 4th group of rats, which were obtained from the females in which there was a deficiency of thyroid hormones during pregnancy and lactation, the level of dysbiosis was 30.2 times higher than the indices in the intact group of rats.
Conclusions. The results obtained indicate a very high degree of dysbiosis in the mucous membrane of the oral cavity of rats that were modeled delayed and early dentition.

Key words: dentition; hypothyroidism; hyperthyroidism; antibiotics; oral mucosa.

REFERENCES

1. Şenel, S. (2021). An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(15), 7821.
2. Waasdorp, M., Krom, B.P., Bikker, F.J., van Zuijlen, P.P.M., Niessen, F.B., & Gibbs, S. (2021). The Bigger Picture: Why Oral Mucosa Heals Better Than Skin. *Biomolecules*, 6, 11(8), 1165.
3. Kaskova, L.F., & Pavlenkova, O.S. (2015). Pokaznyky lizotsymu ta ureazy rotovoyi ridyny ditey, yaki chasto khvoriyut' na HRVI [Indicators of lysozyme and urease in the oral fluid of children with frequent ARVI]. *Molodyy vchenyy – Young scientist,* 16(96), 71-73 [in Ukrainian].
4. Pelaez-Prestel, H.F., Sanchez-Trincado, J.L., Lafuente, E.M., & Reche, P.A. (2021). Immune Tolerance in the Oral Mucosa. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 22(22), 12149.
5. Lin, D., Yang, L., Wen, L., Lu, H., Chen, Q., & Wang, Z. (2021). Crosstalk between the oral microbiota, mucosal immunity, and the epithelial barrier regulates oral mucosal disease pathogenesis. *Mucosal Immunol*, 14(6), 1247-1258.
6. Ptasiewicz, M., Grywalska, E., Mertowska, P., Korona-Głowniak, I., Poniewierska-Baran, A., Niedźwiedzka-Rystwej, P., & Chałas, R. (2022). Armed to the Teeth-The Oral Mucosa Immunity System and Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(2), 882.
7. Moreno, C.M., Boeree, E., Freitas, C.M.T., & Weber, K.S. (2023). Immunomodulatory role of oral microbiota in inflammatory diseases and allergic conditions. *Front. Allergy*, 4, 1067483.
8. Idris, A., Hasnain S., Huat, L., & Koh, D. (2017). Human diseases, immunity and the oral microbiota-Insights gained, from metagenomic studies. *Oral. Sci. Int.*, 14, 27-32.
9. Yamashita, Y., & Takeshita, T. (2017). The oral microbiome and human health. *J. Oral. Sci*, 59, 201-206.
10. Yee, J.K. (2016). Helicobacter pylori colonization of the oral cavity: A milestone discovery. *World J. Gastroenterol.*, 14, 22(2), 641-648.
11. Graham, D.Y., & Miftahussurur, M. (2018). Helicobacter pylori urease for diagnosis of Helicobacter pylori infection: A mini review. *J. Adv. Res.*, 31, 13, 51-57.
12. Kaskova, L.F., Amosova, L.I., & Karpenko, O.O. (2011). *Profilaktyka stomatolohichnykh zakhvoryuvan [Prevention of dental diseases].* Kharkiv: Fact [in Ukrainian].
13. Melnyk, V.S., Gorzov, L.F., & Bilyschuk, L.M. (2017). *Profilaktyka stomatolohichnykh zakhvoryuvan [Prevention of dental diseases].* Uzhhorod [in Ukrainian].
14. Ragland, S.A., & Criss, A.K. (2017). From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.*, 21, 13(9), e1006512.
15. Gajda, E., & Bugla-Płoskońska, G. (2014). Lizozym--występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań [Lysozyme--occurrence in nature, biological properties and possible applications]. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, 21, 68, 1501-1515.
16. Makarenko, O.A., Hromagina, L.M., Hodakov, I.V., Majkova, G.V., Mudrik, L.M., Kika, V.V., & Mogilevska, T.V. (2022). *Metody doslidzhennya stanu kyshechnyku ta kistok u laboratornykh shchuriv. Dovidnyk [Methods of researching the state of intestines and bones in laboratory rats: a guide].* Odesa: vydavets S.L. Nazarchuk [in Ukrainian].