

Оценка состояния микрофлоры полости рта методом лазерной оптико-акустической спектроскопии

Бочкарёва О.П.¹, Кистенёв Ю.В.¹, Красножёнов Е.П.¹, Муштоватова Л.С.¹, Никотин Е.С.¹, Попова Н.О.², Фокин В.А.¹

State evaluation of the oral cavity microflora based on Laser optical-acoustic spectroscopy

Bochkaryova O.P., Kistenyov Yu.V., Krasnozhyonov Ye.P., Mushtovatova L.S., Nikotin Ye.S., Popova N.O., Fokin V.A.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ онкологии СО РАМН, г. Томск

© Бочкарёва О.П., Кистенёв Ю.В., Красножёнов Е.П. и др.

В связи с недостатками существующих методов оценки состояния микрофлоры полости рта рассмотрены возможности использования для этой цели метода лазерной оптико-акустической спектроскопии. Полученные результаты показывают перспективность данного метода для диагностики нарушения микрофлоры.

Ключевые слова: лазерная спектроскопия, микрофлора, дисбактериоз.

Owing to shortcomings of existing methods of evaluation of oral cavity microflora, reviewed possibilities for this purpose of new noninvasive method — laser optical-acoustic spectroscopy. The results show perspectives of this method for diagnosis of microflora disorders.

Key words: laser spectroscopy, microflora, disbacteriosis.

УДК 616.31-008.87-073.584:533.9.082.5

Введение

Микрофлора человека служит одним из основных факторов противoinфекционной защиты организма, в частности полости рта, являющейся воротами инфекций для кишечных и респираторных заболеваний. Нарушения в данной экосистеме приводят к ослаблению защитных механизмов макроорганизма, транслокации болезнетворных бактерий, развитию очагов эндогенной и экзогенной инфекции, неспецифической бактериемии и сепсису [9, 10].

В настоящее время основным методом оценки состояния микрофлоры различных биотопов является бактериологический анализ, который проводится в соответствии с Методическими рекомендациями МЗ СССР (приказ № 535, 1985). Данный метод является

достоверным и адекватным, однако отличается достаточно сложной, громоздкой технологией исследования и требует длительного времени (5—6 сут) для получения результата. Также существует ряд косвенных методов биохимического анализа, которые требуют определенного набора манипуляций и соответствующих временных и материальных затрат.

Таким образом, актуален поиск новых инструментальных методов для более быстрого обнаружения нарушений микрофлоры кожи и слизистых оболочек (дисбиозов).

Бактериологические исследования у пациентов онкологическими заболеваниями [3, 8, 7] показали, что микрофлора ротовой полости больных раком молочной железы значительно отличается по качественному составу от микрофлоры пациентов группы срав-

нения. Так, из ротовой полости женщин, не имеющих онкологической патологии, высевались стафилококки (21%), стрептококки (52%), энтеробактерии (17%), нейссерии (2%), грибы рода *Candida* (6%). У больных раком молочной железы большинство микроорганизмов составляли стафилококки (55%), увеличена высеваемость грибка *Candida* (12%).

Поскольку изменение микрофлоры влечет за собой изменение состава населяющих биотоп микроорганизмов, можно предположить изменение качественного и количественного состава газовой выделений последними.

В последние десятилетия все более широкое распространение получают методы неинвазивной диагностики состояния биологических объектов [5, 6], основанные на спектральном анализе газообмена биосистем с окружающей средой. При этом анализируемым объектом является, например, выдыхаемый человеком воздух или воздух, обогащенный газовыми компонентами, образованными в процессе жизнедеятельности растений и животных.

Одним из наиболее перспективных методов регистрации спектров газовых образцов считается лазерный оптико-акустический (ОА) метод [1]. К достоинствам лазерного ОА-метода регистрации спектра относятся высокое спектральное разрешение, высокая чувствительность по показателю поглощения, отсутствие сигнала, если спектральная линия излучения находится вне линий поглощения исследуемой газовой смеси, малый объем требуемого образца газа [4, 5].

Цель исследования — анализ состояния микрофлоры полости рта у пациенток с онкологическими заболеваниями на фоне химиотерапии при помощи лазерной оптико-акустической спектроскопии.

Материал и методы

Исследования проводились на базе кафедры микробиологии и вирусологии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) и отделения химиотерапии НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск) до и после курса химиотерапии больных раковыми заболеваниями.

Исследуемым материалом являлся зубной налет и мазок со слизистой поверхности щек.

В исследование были включены пациенты в возрасте старше 18 лет, подписавшие информированное согласие на участие в исследовании; имеющие верифицированный диагноз рака молочной железы, выявленный впервые, не получавшие ранее лечения цитостатиками; имеющие верифицированный диагноз немелкоклеточного либо мелкоклеточного рака легкого, не получавшие ранее цитостатического лечения.

В исследование не включались пациенты, не подписавшие информированное согласие, пациенты, получавшие в течение 12 мес до включения в исследование массивную антибактериальную терапию.

Исследование предполагало взятие мазка со слизистой оболочки щеки и забор зубного налета непосредственно перед началом курса химиотерапии и на 7—10-е сут после его окончания. Для лечения рака молочной железы пациентки получали стандартные схемы химиотерапии FAC или AT. Схема FAC включает в себя доксорубин 50 мг/м² площади тела в 1-й день, циклофосфан 500 мг/м² площади тела в 1-й день, 5-фторурацил 500 мг/м² площади тела в 1-й день. Интервал между курсами 3 нед.

Схема AT: доксорубин 50 мг/м² площади тела в 1-й день, доцетаксел 75 мг/м² площади тела во 2-й день либо паклитаксел 175 мг/м² площади тела на фоне стандартной премедикации дексаметазоном. Интервал между курсами 3 нед.

Для лечения мелкоклеточного рака легкого пациенты получали курсы химиотерапии по схеме EP: цисплатин 80 мг/м² площади тела в 1-й день, этопозид по 120 мг/м² площади тела в 1, 2, 3-й день. Интервал между курсами 3 нед.

При немелкоклеточном раке легкого применялась схема лечения EP: цисплатин 80 мг/м² площади тела в 1-й день, этопозид по 120 мг/м² площади тела в 1, 3, 5-й день. Интервал между курсами 3 нед.

Забор мазка со слизистой оболочки щек осуществлялся при помощи стерильного ватного тампона, помещенного в стерильную пробирку. Налет зубов брали посредством стерильной деревянной палочки, погружаемой в дальнейшем также в чистую стерильную пробирку.

В дальнейшем из пробирок с полученным материалом осуществлялся отбор воздуха при помощи иглы, соединенной с пробоотборником внутррезонаторного лазерного оптико-акустического сенсо-

ра ILPA-1, составлявшего приборную часть исследования.

Сенсор позволяет исследовать состав газовых смесей биологического происхождения и испарений биожидкостей в калибровочном объеме в режиме прокачки и определять в газовой смеси газовые примеси, имеющие полосы поглощения в спектральном диапазоне длин волн 9,2—10,8 мкм.

Поступившая в приемник прибора газовая проба анализировалась многократно (до 10 сканов спектра поглощения каждой пробы), после чего с полученными спектрами поглощения производились процедуры усреднения и нормировки.

Первичный обзор результатов измерений выявил наличие небольших вариаций спектра поглощения одной и той же пробы при повторном сканировании спектра. Математический анализ этих данных показал, что наиболее вероятная причина связана с масштабированием ОА-сигнала. Для коррекции данного эффекта был предложен следующий метод нормировки измерений.

Для каждого сканирования одной пробы выбирался частотный диапазон 933,18—954,84 см⁻¹ (колебательная ветвь 10Р СО₂-лазера); полученные коэффициенты поглощения в данном диапазоне складывались для каждого измерения (скана), образуя оценку интегрального поглощения пробы в данной полосе. Затем из полученных интегральных оценок поглощения выбиралась наименьшая, на нее производилось деление остальных, что давало коэффициенты нормировки для каждого измерения. После этого каждый спектральный коэффициент поглощения соответствующего измерения делился на полученный нормировочный коэффициент во всем спектральном диапазоне генерации СО₂-лазера.

Полученные результаты отображались на соответствующих графиках, построение которых осуществлялось при помощи программы Origin 7.0.

Результаты и обсуждение

Изменения усредненного спектра поглощения различных проб у нескольких пациентов представлены на рис. 1—6.

Сравнительный анализ полученных данных показывает различия газовой выделений биопроб пациентов, взятых до и после лечения химиопрепаратами.

Более значимые отличия спектров поглощения наблюдаются на мазках со слизистой оболочки щек. Газовыделения налета зубов также имеют отличия по спектру поглощения, но выражены они в меньшей степени, а если рассмотреть отдельно в отношении пациента 2 (рис. 4), то практически неразличимы.

Кроме этого, уровень поглощения газовой выделений мазка со щек до лечения был выше, чем аналогичный показатель после лечения, тогда как в отношении налета зубов наблюдалась обратная картина. Это можно объяснить, во-первых, различным качественным составом микроорганизмов соответствующих биотопов безотносительно лечения, а во-вторых, различиями в физиологической активности микроорганизмов, приводящей к специфическому изменению газовой выделений.

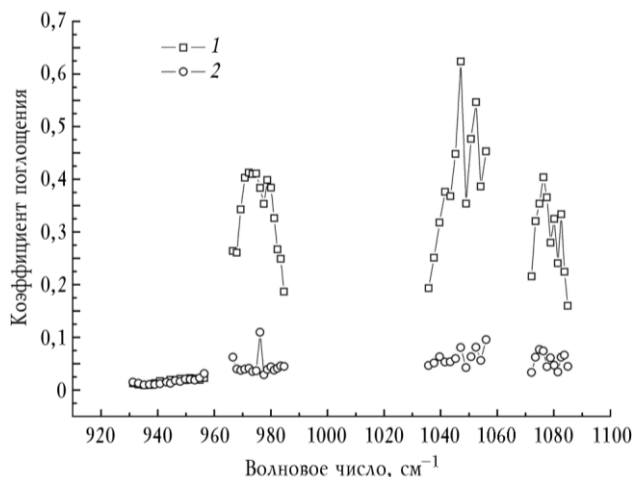


Рис. 1. Спектр поглощения газовой выделений мазка со щек пациента 1 до (1) и после (2) курса химиотерапии

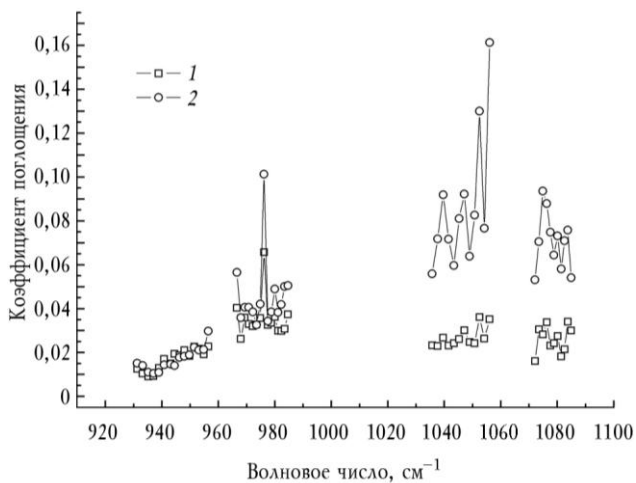


Рис. 2. Спектр поглощения газовыделений налета зубов пациента 1 до (1) и после (2) курса химиотерапии

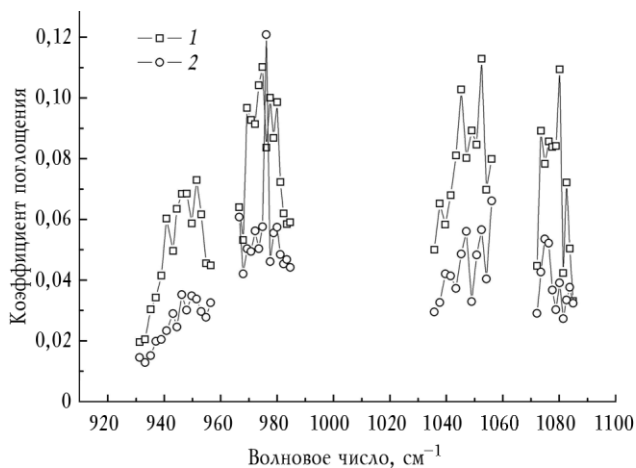


Рис. 3. Спектр поглощения газовыделений мазка со щек пациента 2 до (1) и после (2) курса химиотерапии

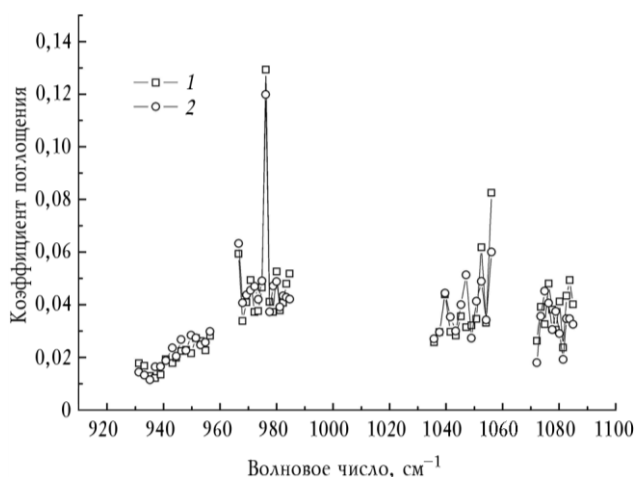


Рис. 4. Спектр поглощения газовыделений налета зубов пациента 2 до (1) и после (2) курса химиотерапии

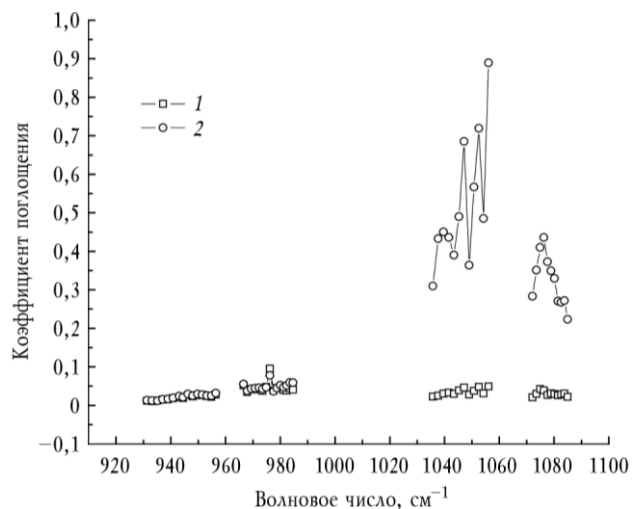


Рис. 5. Спектр поглощения газовыделений мазка со щек пациента 3 до (1) и после (2) курса химиотерапии

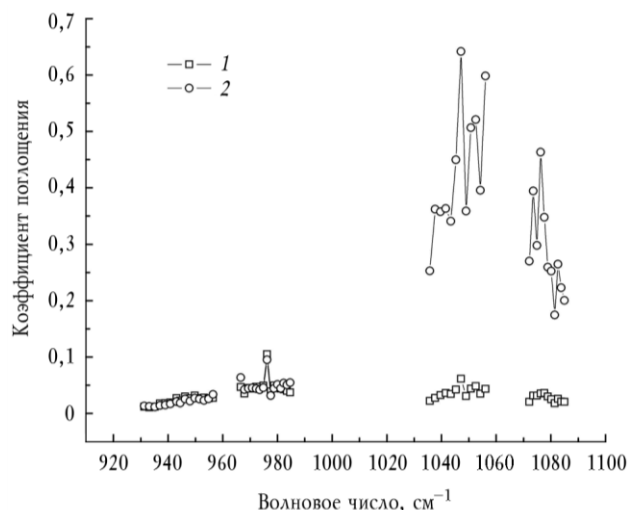


Рис. 6. Спектр поглощения газовыделений налета зубов пациента 3 до (1) и после (2) курса химиотерапии

Заключение

Результаты исследований показали, что спектры поглощения газовыделений биопроб, взятых у пациентов до и после лечения, заметно отличаются. Это свидетельствует об изменении газовыделений микрофлоры полости рта, которое, в свою очередь, можно обосновать качественными и количественными изменениями населяющих данный биотоп микроорганизмов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП (г/к № 02.740.11.0083, НШ

Бочкарёва О.П., Кистенёв Ю.В., Красножёнов Е.П. и др.

871.2008.2), РФФИ (грант № 09-02-99038 р_офи),
АВЦП Министерства образования и науки РФ (грант
№ 2.1.1/3436).

Литература

1. Антипов А.Б., Капитанов В.А., Пономарёв Ю.Н., Сапожникова В.А. Оптико-акустический метод в лазерной спектроскопии молекулярных газов. Новосибирск: Наука, 1984. 128 с.
2. Готтшиалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. 310 с.
3. Карпинская Н.П. Колонизационная резистентность слизистой оболочки полости рта у больных раком легкого в условиях противоопухолевой химиотерапии: дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2006. 112 с.
4. Козинцев В.И., Белов М.Л., Городничев В.А., Федотов Ю.В. Лазерный оптико-акустический анализ многокомпонентных газовых смесей. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2003. 352 с.
5. Степанов Е.В., Миляев В.А., Селиванов Ю.Г. Лазерная ортомолекулярная медицинская диагностика // Успехи физ. наук. 2000. Т. 170, № 4. С. 458—462.
6. Применение методов лазерной спектроскопии и нли-

Оценка состояния микрофлоры полости рта...

- нейного анализа для исследования медико-биологических объектов / под ред. Ю.В. Кистенёва. Томск: Изд-во ТПУ, 2007. 286 с.
7. Хайруллин Р.Г., Красножёнов Е.П., Чубик М.В. Колонизационная резистентность слизистой полости рта у больных раком молочной железы в условиях гипербарической оксигенации // Материалы IX съезда Всерос. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы изучения эпидемического благополучия населения Российской Федерации». М., 2007. Т. 2. С. 313.
 8. Чубик М.В., Гольдберг В.Е., Красножёнов Е.П., Карпинская Н.П. Некоторые показатели микробиологии слизистой оболочки полости рта у больных раком легкого в условиях противоопухолевой терапии // Сиб. онкол. журн. 2008. Т. 27, № 3. С. 38—42.
 9. Шендеров Б.А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. № 1. С. 61—65.
 10. Finland M. Hospital epidemiology: antibiotic usage and control // New Criteria for Antibiotic Therapy / D. van der Waaij, J. Verhoef, eds. Amsterdam, 1979. P. 253—267.

Поступила в редакцию 28.10.2009 г.

Утверждена к печати 22.12.2009 г.

Сведения об авторах

О.П. Бочкарёва — канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры микробиологии СибГМУ (г. Томск).

Ю.В. Кистенёв — д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой физики СибГМУ (г. Томск).

Е.П. Красножёнов — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии СибГМУ (г. Томск).

Л.С. Мушатоватова — канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии СибГМУ (г. Томск).

Е.С. Никотин — аспирант, старший лаборант кафедры физики СибГМУ (г. Томск).

Н.О. Попова — канд. мед. наук, научный сотрудник отделения химиотерапии НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск).

В.А. Фокин — канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической кибернетики СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Никотин Евгений Сергеевич, тел. 8-905-992-7159, e-mail: esnikotin@ngs.ru