

# Експериментально-теоретичний

УДК:[616.314.17 – 092.9: 615.243.3] – 08

А. М. Манько<sup>1</sup>, К. С. Непорада<sup>1</sup>, А. А. Сухомлин<sup>1</sup>, Т. В. Берегова<sup>2</sup>, Д. С. Янковський<sup>3</sup>

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА КОРЕНЦІЯ МУЛЬТИПРОБІОТИКОМ «СИМБІТЕР® АЦИДОФІЛЬНИЙ» ПАТОЛОГІЧНИХ ЗМІН У ОРГАНАХ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦІДНОСТІ

<sup>1</sup>. ВДНЗ України «УМСА», м. Полтава, кафедра медичної, біологічної та біоорганічної хімії

<sup>2</sup>. НДІ ім. Петра Богача біологічного факультету Київського національного університету ім. Т. Шевченка, відділ фармако-фізіології, м. Київ

<sup>3</sup>. Науково-виробнича компанія «О.Д. Пролісок», м. Київ

**Вступ.** Провідна роль у розвитку патологічних змін у органах порожнини рота за умов тривалого введення інгібітору протонної помпи (ІПП) належить гіпоацідності шлункового соку, що призводить до розвитку дисбіозу різних відділів ШКТ [14].

З метою корекції дисбіозу ротової порожнини за тривалого застосування ІПП омепразолу в комплексному лікуванні кислотозалежних захворювань органів системи травлення ми застосовували пробіотик, який не тільки корегує порушення біоценозу ШКТ, а й позитивно впливає на імунну та ендокринну системи організму [1, 19].

Мультипробіотик останнього покоління «Симбітер® ацидофільний» — це мутуалістичний симбіоз 14 штамів пробіотичних бактерій (біфідобактерій, лактобацил, лактококків та пропіоново-кислих бактерій) із високою концентрацією життєдіяльних клітин ( $10^{11-12}$  КУО/доз.), володіє широким спектром фізіологічно цінних властивостей із синергізмом найважливіших пробіотичних властивостей [10]. Він не потребує додаткової активації, а починає проявляти свою дію одразу з ротової порожнини, оскільки це жива біомаса клітин, а не ліофілізат, у якому мікроорганізми перебувають у анабіозі. Згідно із сучасними уявленнями, механізм позитивної дії пробіотика заснований на багатоманітності властивостей індигенної мікрофлори [13, 18].

**Метою** нашого дослідження було вивчення впливу мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» на органи порожнини рота за умов довготривалого гіпоацідитету шлункового соку.

**Матеріали та методи дослідження.** Експерименти виконані на 41 щурі-самці лінії «Вістар» вагою 180 – 250 г із дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією. Дослідним тваринам протягом 28 діб внутрішньоочеревинно вводили омепразол («Sigma», США) дозою 14 мг/кг, мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» («О.Д. Пролісок», Україна), який уводили перорально дозою 0, 14 мл/кг окремо та в поєднанні. Контрольним тваринам протягом цього часу вводили 0, 2 мл води для ін'єкцій. Евтаназію тварин здійснювали під уретановим наркозом шляхом кровопускання. Об'єктами дослідження були м'які, кісткова тканини пародонта і слизні зализи тварин [5, 11], у гомогенаті яких визначали активність НО-синтази (NOS) (КФ: 1.14.13.39) [16], уміст нітрит-аніонів [16], окисно-модифікованих протеїнів (ОМП) [6] і молекул середньої маси (МСМ) [3] та кров тварин. Після завершення експерименту робили забір крові для визначення концентрації гастрину в плазмі крові радіоімунологічним методом із використанням аналітичного набору фірми «MP Biomedicals, LLC» (USA). Нами встановлено, що вміст гастрину в плазмі крові щурів контрольної

групи на 28 день експерименту становив  $59, 0 \pm 35, 5$  пг/мл, у дослідних тварин —  $170, 7 \pm 90, 7$  пг/мл. Отже, за умов тривалого введення ІПП спостерігається гіпергастринемія, яка є наслідком розвитку гіпоацідності шлункового соку [20]. У ході проведених бактеріальних досліджень вивчали особливості контамінації слизової оболонки кишечнику умовно-патогенною та нормальнюю мікрофлорою після 28 діб від початку експерименту. Вивчення мікробіоценозу кишечника охоплювало аналіз видового та кількісного складу мікрофлори.

Мікроекологія кишечнику в контрольних щурів характеризувалася широким спектром транзитної мікрофлори. До складу умовно-патогенних бактерій входили різні представники ентеробактерій (ешерихії, цитробактер, клебсієла, протей, ентеробактер та ін.), виділялися також стафілококи, ентерокок та гриби роду Кандида. У 90 % інтактних тварин патогенна мікрофлора з кишечнику практично не висівалася. Концентрація лактобацил та біфідумбактерій досягала високого рівня —  $10^7$  –  $10^9$  КУО/г. Бактеріологічні дослідження вмісту кишечнику в щурів із гіпоацідністю дозволили виявити негативні зміни мікроекології, які полягали в дисбалансі між показниками умовно-патогенної та нормальної мікрофлори. Зареєстровано підвищення частоти і загальної кількості стафілококів та ентеробактерій роду *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, а також грибів роду

# Експериментально-теоретичний

Кандида. У 70 % щурів зареєстровано дефіцит індигенної мікрофлори, її концентрація складала лише  $10^4 - 10^5$  КУО/г. Застосування «Симбітеру® ацидофільного» супроводжувалося нормалізацією показників контамінації кишеч-

нику представниками нормальної та умовно-патогенної мікрофлори: зменшилися кількісні показники висіву стафілококу золотистого, ентеробактерій, грибів роду Кандида, зросла популяція лакто- та біфідобактерій.

Таблиця 1

**Активність NO-сінтази в тканинах пародонта і слинних залозах щурів за умов тривалого використання ІПП та корекції «Симбітером® ацидофільним», ( $M \pm m$ )**

Групи тварин	Активність NO-сінтази в м'яких тканинах пародонта, нмоль [ $\text{NO}_2^-$ ]/г*хв.	Активність NO-сінтази в кістковій тканині пародонта, нмоль [ $\text{NO}_2^-$ ]/г*хв.	Активність NO-сінтази в слинних залозах, нмоль [ $\text{NO}_2^-$ ]/г*хв.
1. Контроль (n=12)	0,123 ± 0,020	0,154 ± 0,012	3,97±0,11
2. Омепразол 28 діб (n=17)	0,103 ± 0,031	0,174 ± 0,018	5,76±0,25
3. Омепразол + симбітер 28 діб (n=8)	0,338 ± 0,079	0,181 ± 0,024	6,77±0,15
4. Симбітер 28 діб (n=4)	0,647 ± 0,379	0,217 ± 0,033	3,90±0,08
Статистичний показник	$P_{1-2}>0.05$ $P_{1-4}>0.05$ $P_{1-3}<0.05$ $P_{2-3}<0.05$ $P_{2-4}>0.05$	$P_{1-2}>0.05$ $P_{1-4}>0.05$ $P_{1-3}<0.05$ $P_{2-3}<0.05$ $P_{2-4}<0.05$	$P_{1-2}<0.05$ $P_{1-4}>0.05$ $P_{1-3}<0.05$ $P_{2-3}<0.05$ $P_{2-4}<0.05$

Примітка: n – кількість тварин.

Таблиця 2

**Уміст  $\text{NO}_2^-$  в тканинах пародонта та слинних залозах щурів за умов тривалого використання ІПП і корекції "Симбітером® ацидофільним", ( $M \pm m$ )**

Групи тварин	Уміст $\text{NO}_2^-$ в м'яких тканинах пародонта, ммоль/г	Уміст $\text{NO}_2^-$ в кістковій тканині пародонта, ммоль/г	Уміст $\text{NO}_2^-$ в слинних залозах, ммоль/г
1. Контроль (n=12)	0,062 ± 0,012	0,058 ± 0,006	0,164 ± 0,007
2. Омепразол 28 діб (n=17)	0,066 ± 0,010	0,069 ± 0,005	0,194 ± 0,006
3. Омепразол + симбітер 28 діб (n=8)	0,198 ± 0,023	0,144 ± 0,015	0,198 ± 0,003
4. Симбітер 28 діб (n=4)	0,113 ± 0,020	0,109 ± 0,020	0,164 ± 0,004
Статистичний показник	$P_{1-2}>0.05$ $P_{1-4}<0.05$ $P_{1-3}<0.05$ $P_{2-3}<0.05$ $P_{2-4}<0.05$	$P_{1-2}>0.05$ $P_{1-4}<0.05$ $P_{1-3}<0.05$ $P_{2-3}<0.05$ $P_{2-4}<0.05$	$P_{1-2}<0.05$ $P_{1-4}>0.05$ $P_{1-3}<0.05$ $P_{2-3}<0.05$ $P_{2-4}<0.05$

Примітка: n – кількість тварин.

Отже, мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» здатний ефективно стабілізувати колонізаційну резистентність та нормалізувати баланс між основними видами облігатної та умовно-патогенної мікрофлори за умов тривалої гіпоацидності в кишечнику та в ротовій порожнині.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Оксид азоту є важливим регулятором внутрішньо- та міжклітинних процесів у живих організмах [17]. Загальновідомо, що у виникненні багатьох патологічних процесів важливу роль відіграє ендотеліальна дисфункція, в розвитку якої провідну роль відіграє дисбаланс у системі оксиду азоту [10]. Метаболізм кісткової тканини пародонта суттєво відрізняється від метаболізму м'яких тканин пародонта, зважаючи на особливості васкуляризації, інтенсивність основного обміну, процесів ремоделювання, функціональне навантаження, існування взаємозв'язку між кістковою тканиною пародонта і цементом коренів зубів, перерозподіл дентального навантаження на кісткову тканину [7].

Для дослідження NO-єргічної системи тканин пародонта та слинних залоз щурів за умов омепразол-індукованої гіпергастринемії визначали активність NO-сінтази та вміст  $\text{NO}_2^-$ , який є кінцевим продуктом обміну NO.

З таблиці 1 видно, що тривале введення ІПП тваринам протягом 28 діб сприяло зниженню в 1, 2 разу активності NO-сінтази в м'яких тканинах пародонта в порівнянні з контролем. Найвища активність NO-сінтази відзначається у тварин, яким 28 діб уводили «Симбітер® ацидофільний» — у 5, 26 разу вища, ніж у контрольних тварин (табл. 1). При 28-денному введенні «Симбітер® ацидофільний» активність NO-сінтази зростає в 1, 23 разу в кістковій тканині пародонта в порівнянні з тваринами, яким протягом цього часу вводили лише ІПП (табл. 1). У тканинах слинних залоз активність NO-сінтази при 28-денному введенні омепразолу підвищилася у

# Експериментально-теоретичний

**Уміст ОМП у тканинах пародонта і слинних залозах щурів за умов тривалого використання ІПП та корекції "Симбітером® ацидофільним", ( $M \pm m$ )**

Групи тварин	Уміст ОМП у м'яких тканинах пародонта, у.о.	Уміст ОМП у слинних залозах, у.о.
1. Контроль (n=12)	0,059 ± 0,008	0,363 ± 0,026
2. Омепразол 28 діб (n=17)	0,211 ± 0,007	0,484 ± 0,023
3. Омепразол + симбітер 28 діб (n=8)	0,072 ± 0,006	0,449 ± 0,012
4. Симбітер 28 діб (n=4)	0,053 ± 0,005	0,338 ± 0,017
Статистичний показник	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$

Примітка: n – кількість тварин.

Таблиця 3

гіпергастринемії вміст нітратів збільшився в 1, 18 разу (р<0, 05), а за умов корекції мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» уміст нітратів достовірно не змінився.

Отже, введення щурам мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» за умов омепразол-індукованого гіпоацидиту сприяє нормалізації кровообігу та місцевих регуляторних процесів у тканинах пародонта і слинних залоз.

Універсальним механізмом ушкодження тканин під дією різних факторів є активація ВРО [2, 8], індикаторним показником якої є визначення вмісту ОМП [15]. Активування процесів ВРО призводить до підвищення вмісту МСМ і спричиняє ендогенну інтоксикацію [4, 12].

Аналізуючи вміст ОМП у м'яких тканинах пародонта, виявили їх достовірне зниження у 2, 9 разу за умов введення омепразолу на тлі «Симбітеру® ацидофільного» на 28 добу експерименту в порівнянні з тваринами без корекції (табл. 3). Наявне достовірне зниження вмісту ОМП у 4 рази в тканинах пародонта щурів, яким уводили «Симбітер® ацидофільний» 28 діб у порівнянні з тими, яким уводили омепразол 28 діб (р<0, 05) (табл. 3). З таблиці 3 видно, що вміст окисно-модифікованих протеїнів у слинних залозах щурів в умовах омепразол-індукованої гіпергастринемії на 28 добу введення омепразолу підвищився в 1, 33 разу (р<0, 05) в порівнянні з контролем, а використання мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» сприяло вірогідному зниженню вмісту ОМП у тканинах слинних залоз у порівнянні зі щурами без корекції.

На 28 добу зростає в 1, 06 разу (р<0, 05) уміст МСМ у тканинах пародонта щурів, яким 28 діб уводили омепразол в порівнянні з контролем, тоді як у тварин, яким уводили «Симбітер® ацидофільний» протягом цього часу, він достовірно знизився в 1, 14 разу в порівнянні зі щурами без корекції (табл. 4). Уміст молекул середньої маси в слинних залозах щурів

**Уміст МСМ у тканинах пародонта та слинних залозах щурів за умов тривалого використання ІПП і корекції "Симбітером® ацидофільним", ( $M \pm m$ )**

Групи тварин	Уміст МСМ у м'яких тканинах пародонта, у.о.	Уміст МСМ у слинних залозах, у.о.
1. Контроль (n=12)	0,174 ± 0,002	0,243 ± 0,016
2. Омепразол 28 діб (n=17)	0,185 ± 0,004	0,321 ± 0,024
3. Омепразол + симбітер 28 діб (n=8)	0,175 ± 0,001	0,290 ± 0,012
4. Симбітер 28 діб (n=4)	0,163 ± 0,002	0,228 ± 0,009
Статистичний показник	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} < 0,05$ $P_{1-3} > 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$	$P_{1-2} < 0,05$ $P_{1-4} > 0,05$ $P_{1-3} < 0,05$ $P_{2-3} < 0,05$ $P_{2-4} < 0,05$

Примітка: n – кількість тварин.

1, 45 разу, а за умов корекції із застосуванням мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» активність NO-сінтази на 28 день експерименту підвищилася в 1, 18 разу (р<0, 05) в порівнянні зі щурами без корекції (табл. 1).

$\text{NO}_2^-$  — кінцевий продукт обміну  $\text{NO}$  в організмі. При запальних процесах, активації макрофагів і нейтрофілів, а також розвитку патогенної мікрофлори органів шлунково-кишкового тракту вміст іонів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  значно підвищується [9].

На 28 добу експерименту вміст нітрат-аніону в м'яких тканинах пародонта щурів із корекцією зрос у 3 рази відповідно в порівнянні з щурами, яким у цей час уводили лише ІПП, що пояснюється високою активністю ферменту NOS (табл. 2). При 28-денному введенні «Симбітер® ацидофільний» уміст нітратів у кістковій тканині пародонта достовірно зростає в 1, 58 разу в порівнянні з тваринами, яким протягом цього часу вводили лише ІПП (табл. 2). У слинних залозах за умов омепразол-індукованої

за 28-денноого введення омепразолу підвищився в 1,32 разу ( $p<0,05$ ) впорівнянні з контролем. Аналізуючи вміст МСМ у тканинах слинних залоз щурів за умов використання мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний», спостерігаємо достовірне зниження їх умісту в порівнянні з тваринами без корекції (табл. 4).

Отже, застосування мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний» інгібує процеси ВРО та знижує ендотоксемічний ефект довготривалого введення омепразолу в тканинах пародонта і слинних залоз.

**Висновок.** Отже, експериментальна ефективність пробіотикотерапії за умов тривалого гіпоацидиту доведена на підставі нормалізації ендотеліальної дисфункції, пригнічення процесів вільнорадикального окиснення та запобігання розвитку ендотоксемії за рахунок зниження вмісту МСМ у тканинах пародонта і слинних залоз.

**Перспективи подальших досліджень.** За умов довготривалого використання ПП виникає гіпоацидитет, який, як відомо, призводить до дисбіоценозу. Тому перспективною є розробка профілактики дисбіоценозу шляхом використання мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний».

## Література

1. Микроэкологические нарушения у детей и современные возможности повышения эффективности их коррекции/В.В. Бережной, С.А. Крамарев [и др.]//Здоровье женщины. — 2002. — № 4 (12). — С.79 – 92.
2. Величковский Б. Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды/Б. Т. Величковский//Вестник РАМН. — 2001. — № 6. — С. 45 – 52.
3. Габриэлян Н.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей/Н.И. Габриэлян, В.И. Липатова//Лабораторное дело. — 1983. — № 3. — С. 131 – 140.
4. Громашевская Л.Л. «Средние молекулы» как один из показателей метаболической интоксикации в организме/Л.Л. Громашевская//Лабораторная диагностика. — 1997. — № 1. — С. 11 – 16.
5. Денисов А.Б. Типовые формы патологии слюнных желез/Денисов А.Б., Леонтьев В.К., Ю.А. Петрович. — М.: РУССО, 1996. — 150 с.
6. Оксидательная модификация белков сыворотки крови человека. Метод ее определения/Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров [и др.]//Вопросы медицинской химии. — 1995. — № 1. — С.24 – 26.
7. Поворознюк В.В. Костная система и заболевания пародонта/Поворознюк В.В., Мазур И.П. — К.: Експрес, 2004. — 446 с.
8. Путилина Ф.Е. Свободнорадикальное окисление: учебн. пособ./Путилина Ф.Е. — СПб.: Издательство СПб. ун-та, 2008. — 161 с.
9. Реутов В.П. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих/[Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С.]. — М.: Наука, 1998. — 159 с.
10. Тарасенко Л.М. Биохимия органов полости рта/Тарасенко Л.М., Непорада К.С. — Полтава: ОАО «Изд-во «Полтава», 2008 – 72 с.
11. Тарасенко Л.М. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты)/[Тарасенко Л.М., Суханова Г.А., Мищенко В.П., Непорада К.С.]. — Томск: Издательство НТЛ, 2002. — 124 с.
12. Усенко Л.В. Эндотоксикоз: современный взгляд на проблему/Л.В. Усенко, Л.А. Мальцева//Мистецтво лікування. — 2000. — № 1. — С.13 – 15.
13. Янковский Д.С. Биологические особенности пропионовокислых бактерий, используемых в составе мультипробиотиков группы «Симбітер»/Д.С. Янковский, В.В. Бережной, Г.С. Дымент//Современная педиатрия. — 2004. — № 4 (5). — С.161 – 167.
14. Янковский Д.С. Микробная экология человека. Современные возможности ее поддержания и восстановления/Янковский Д.С. — К.: Эксперт ЛТД, 2005. — 362 с.
15. Armstrong D. Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols/Armstrong D. — New Jersey: Human Press Inc, 2002. — 322 p.
16. Hevel I.M. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase/I.M. Hevel//J. Biol. Chem. — 1991. — Vol.266, № 34. — P.22789 – 22791.
17. Garthwaite J. Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system/Garthwaite J. — Amsterdam: Excerpta medica, 1990. — P.138 – 155.
18. Kaur I.P. Probiotics: potential pharmaceutical application/I. P. Kaur, K. Chopra, A. Saini//Eur. J. Pharmaceutical Sci. — 2002. — Vol. 15, № 1. — C.1 – 9.
19. Mercenier A. Probiotics as bioterapeutic agent: present knowledge and future prospects/A. Mercenier, S. Pavan, B. Pot//Curr. Pharm. Des. — 2003. — Vol. 9. — P.175 – 191.
20. Thompson J.C. Gastrointestinal hormones/J.C. Thompson, M. Marx//Curr. Probl. Surg. — 1984. — № 21(6). — P. 1 – 80.

Стаття надійшла  
12.11.2010 р.

## *Експериментально-теоретичний*

### **Резюме**

Длительное применение омепразола приводит к развитию метаболических нарушений в тканях пародонта и слюнных желез, таких как дисбаланс NO-эргической системы и активации свободно-радикального окисления, которые позитивно корректируются применением мультипробиотика «Симбите<sup>®</sup> ацидофильный».

**Ключевые слова:** пародонт, омепразол, слюнные железы, гипоацидитет, нитриты, окислительный стресс, «Симбите<sup>®</sup> ацидофильный».

Табл. 4, библ. 20.

### **Summary**

Long-term usage of omeprazole leads to metabolic disorders in periodontium and salivary tissues, such as disbalance of NO-ergic system and activation of free-radical oxidation, that are positively corrected by multiprobiotic of new generation «Symbiter<sup>®</sup> acidophilic».

**Key words:** periodontium, omeprazole, hypoacidity, NOS, nitrite-anion, oxidative-modified proteins, middle mass molecules, «Symbiter<sup>®</sup> acidophilic».

Tab. 4, bibl. 20.