

УДК 616.31 – 008.87 – 078.33

О. Л. Личковська\*, Г.М. Мельничук

## ДОСЛІДЖЕННЯ КОРОТКОЛАНЦЮГОВИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ – МЕТАБОЛІТІВ ПАРОДОНТОПАТОГЕННОЇ МІКРОФЛОРИ – ЯК ДІАГНОСТИЧНИХ МАРКЕРІВ СТАНУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького\*

Державний вищий навчальний заклад «Івано-Франківський національний медичний університет»

### Вступ

На сьогодні встановлено, що провідним чинником у розвитку генералізованого пародонтиту (ГП) є пародонтопатогенна мікрофлора. Науковцями виокремлено т. зв. „червоний” та „оранжевий” комплекси бактерій-пародонтопатогенів, які відіграють основну роль у деструкції тканин пародонта. До них належать облигатні грамнегативні анаеробні бактерії з родин *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, а також грампозитивні *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*; рідше факультативні анаероби *Actinobacillus actinomycescomitans* [1; 2]. Ці бактерії виділяють ендотоксини (ліпополісахариди), протеолітичні ферменти (гіалуронідазу, колагеназу, еластазу та ін.), а також коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), які мають потужний ушкоджувальний потенціал щодо тканин пародонта [3].

Для діагностування стану мікробіоценозу ротової порожнини використовують різні методи, зокрема бактеріологічний і полімеразної ланцюгової реакції, в застосуванні яких є свої недоліки і складності [4; 5; 6; 7]. Ще одним методом діагностики є непрямий метод, що базується на визначенні метаболітів мікрофлори, зокрема КЛЖК або летких жирних кислот [6]. Установлено, що спектри і рівні КЛЖК, які виявляються в багатьох біологічних субстратах, у т. ч. у ротовій рідині, відображають структурний та метаболічний дисбаланс стану мікрофлори і корелюють із клінічними проявами хвороб [8].

КЛЖК («short chain fatty acids» SCFA) – це монокарбонові кислоти з довжиною ланцюга до 8 атомів вуглецю, до яких належать оцтова, пропіонова, ізомасляна, масляна, ізовалеріанова, валеріанова, ізокапронова і капронова кислоти. Оцтова, пропіонова і масляна кислоти належать до нерозгалужених КЛЖК, утворюючись при анаеробному бродінні вуглеводів; розгалужені КЛЖК (ізомасляна з валіну та ізовалеріанова з лейцину) утворюються як проміжний продукт розщеплення білків [9] унаслідок метаболізму цукролітичної та протеолітичної мікрофлори, в основному анаеробів, і можуть використовуватися для визначення кількості й активності окремих родів аеробних і анаеробних мікроорганізмів, які продукують ці метаболіти [10]. Анаеробні мікроорганізми (бактерії роду *Bacteroides* та ін.) синтезують пропіонову кислоту; бактерії роду *Clostridium*, *Fusobacterium* та ін. масляну; аеробні бактерії (*E. coli*, стрептококи,

стафілококи) оцтову кислоту й ізокислоти [11].

Продукція КЛЖК власною мікрофлорою – один із найважливіших механізмів саморегуляції її росту і життєдіяльності [6]. Вивільняючись у мікросередовище, вони проникають через біомембрани, впливаючи на місцеві та системні метаболічні процеси організму людини, пригнічуючи проліферацію ясенних фібробластів, хемотаксис і деградуляцію поліморфноядерних лейкоцитів та фагоцитоз. КЛЖК із культури *P. gingivalis* (масляна, оцтова, ізовалеріанова кислоти), *P. loescheii* (пропіонова, масляна, оцтова й ізовалеріанова кислоти) і *F. nucleatum* (масляна, оцтова кислоти) пригнічують Т- і В-клітинну проліферацію [12].

Установлено, що надмірна кількість КЛЖК у хворих на ГП викликає дисфункцію захисних механізмів через патологічний вплив на тканини пародонта, спричиняючи резорбцію кісткової тканини [9; 13].

Використання цього непрямого діагностичного методу оцінки стану мікробіоценозу на сьогодні в стоматології мало поширене, дослідження – поодинокі, а тому проведення їх у хворих на ГП актуальне.

**Мета:** вивчити вміст і співвідношення коротколанцюгових жирних кислот у ротовій рідині хворих на ГП початкового-I і I-II ступенів розвитку.

### Матеріали і методи

Обстежено 78 осіб віком від 20 до 44 років, без соматичних хвороб, серед них: 18 осіб зі здоровим пародонтом і 60 хворих на ГП хронічного перебігу початкового, I і II ступенів розвитку, яких розділили на дві групи: хворі початкового-I ступеня (30 осіб) – I група і I-II ступенів (30 пацієнтів) – II група.

Досліджували якісний і кількісний вміст КЛЖК у ротовій рідині (яку забирали натще в одноразові пластикові пробірки, заморозували і зберігали при температурі -15°C) після її розмороження в газорідному хроматографі «Shimadzu GC 2014» («Shimadzu», Японія) з детектором іонізації в полум'ї, використовуючи кварцеву капілярну колонку довжиною 50 м, внутрішнім діаметром 0,2 мм, із нерухомою фазою типу FFAP (кополімер поліетиленгліколю з тринітротерефталевою кислотою) і товщиною плівки 0,33 мкм. Температуру в колонці програмували на 150°C, підвищуючи її зі швидкістю 5°C за хвилину до температури 200°C, витримували так 10 хвилин. Газ-носієм азот, швидкість якого – 1 мл/хв; поділ потоку – 1:15. Керування процесом газорідної хроматографії та розраху-

нки здійснювали за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення «GC Solution».

Вивчали такі показники: абсолютну концентрацію оцтової (C2), пропіонової (C3), масляної (C4), капронової кислот (C6), загальний уміст КЛЖК із нерозгалуженим ланцюгом (Cn), сумарну концентрацію ізокилот (ізомаляної ізоC4, ізовалеріанової ізоC5 та ізокапронової ізоC6). Визначали анаеробний індекс (AI), який обчислюється як співвідношення суми концентрацій відновлених кислот до менше відновлених або суми концентрацій пропіонової і масляної кислот до оцтової кислоти за формулою:  $AI = \frac{C_2 + C_4}{C_3}$ .

### Результати дослідження

Нами встановлено, що у хворих на ГП уміст КЛЖК у ротовій рідині змінювався (табл.). Зокрема, в разі ГП початкового-I ступеня рівень оцтової кислоти (C2) порівняно зі здоровими знижувався в 1,44 раза ( $p < 0,05$ ), а I-II ступенів – у 4,15 раза ( $p < 0,001$ ).

При цьому концентрація інших нерозгалужених КЛЖК достовірно зростала: за ГП початкового-I ступеня кількість пропіонової кислоти (C3) перевищувала показники в здорових у 2,02 раза ( $p < 0,001$ ), масляної (C4) – в 5,88 раза ( $p < 0,001$ ), капронової (C6) – у 1,47 раза ( $p < 0,001$ ). При ураженні хворих ГП I-II ступенів рівень пропіонової кислоти (C3) зростав у 3,19 раза ( $p < 0,001$ ), масляної (C4) – у 12,29 раза ( $p < 0,001$ ), а капронової (C6) – у 2,2 раза ( $p < 0,001$ ).

Аналізуючи дані концентрацій вивчених КЛЖК, отримані у хворих на ГП за різних ступенів розвитку хвороби, бачимо, що зниження рівня C<sub>2</sub> у хворих I групи було у 2,88 раза меншим, ніж у II групі ( $p_1 < 0,001$ ), а підвищення показників умісту інших кислот було в II групі більшим, ніж у I, зокрема: C<sub>3</sub> – в 1,58 раза ( $p_1 < 0,01$ ), C<sub>4</sub> – у 2,09 раза ( $p_1 < 0,001$ ), C<sub>6</sub> – у 1,5 раза ( $p_1 < 0,001$ ).

Загальна концентрація нерозгалужених КЛЖК (Cn) також відрізнялася від такої в здорових. Так, у хворих на ГП початкового-I ступеня вона підвищувалася на 24,87% ( $p < 0,001$ ), I-II ступенів – на 50,26% ( $p < 0,001$ ), а різниця між групами була 20,34% ( $p_1 < 0,001$ ).

При визначенні окисно-відновного потенціалу середовища, вираженого значенням AI, нами встановлено, що при ГП хронічного перебігу цей індекс зміщувався в бік відновлених кислот, відповідно AI достовірно зростав. Різниця з групою здорових пацієнтів у разі ГП початкового-I ступеня склала 3,78 раза ( $p < 0,001$ ), а I-II ступеня – 19,13 раза ( $p < 0,001$ ), а відмінність між I і II групами досягла 5,06 раза ( $p_1 < 0,001$ ).

Під впливом пародонтопатогенних мікроорганізмів у хворих на ГП дещо змінювався показник сумарного вмісту ізокилот (ізоCn), що проявлялося незначним зростанням його: у хворих на ГП початкового-I ступеня – на 31,37% ( $p > 0,05$ ), а I-II ступенів – на 45,10% ( $p > 0,05$ ). Різниця між обома групами хворих за цими показниками становила 10,45% ( $p_1 > 0,05$ ).

Усі вищезгадані зміни показників КЛЖК корелювали зі ступенем розвитку запального процесу в пародонті.

### Обговорення

Отримані в результаті проведених досліджень дані дали змогу порівняти картину метаболічних змін мікробіоценозу в ротовій порожнині хворих на ГП хронічного перебігу початкового-I і I-II ступенів розвитку зі здоровими пацієнтами та між собою. Установлене зростання загальної концентрації КЛЖК у ротовій рідині в разі ГП, особливо при I-II ступенях, може свідчити про зростання активності аеробної та, особливо, анаеробної мікрофлори.

Завдяки аналізу кількості окремих КЛЖК із нерозгалуженим ланцюгом у профілі C2-C4 виявлено певні особливості, а саме: зростання концентрації пропіонової та масляної кислот при зниженні концентрації оцтової кислоти. Ці дані віддзеркалюють пригнічення аеробної флори на тлі зростання активності анаеробної мікрофлори, а саме родів *Clostridium*, *Bacteroides* і *Fusobacterium* [10]. Зростання концентрації масляної кислоти ймовірно свідчить не лише про втягування в запальний процес бактероїдів, пропіонобактерій, а й бактерій роду клостридій, указуючи на погіршення стану мікробіоценозу [6].

Підвищення показника AI у хворих на ГП хронічного перебігу, особливо при ГП I-II ступенів, може вказувати на активацію факультативної й облигатної анаеробної мікрофлори. Незначне зростання на цьому тлі сумарного вмісту ізокилот у хворих на ГП пояснюється тим, що вони є продуктами метаболізму білків, в основному, аеробною мікрофлорою, і меншою мірою – анаеробною. Отримані дані резонують із думкою про домінуючу роль мікрофлори, особливо анаеробної, в патогенезі ГП [15].

### Висновки

1. У ротовій рідині хворих на ГП достовірно змінювалася концентрація нерозгалужених КЛЖК, а саме: знижувався рівень оцтової кислоти ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) і підвищувався вміст пропіонової, масляної, капронової кислот ( $p < 0,001$ ), особливо при ГП I-II ступенів розвитку.

2. Загальний уміст КЛЖК і анаеробний індекс у хворих на ГП вірогідно підвищувалися, особливо при ГП I-II ступенів ( $p < 0,001$ ), що засвідчило зростання кількості пародонтопатогенів у ротовій порожнині.

3. Сумарний уміст ізокилот у випадку ГП підвищувався, але несуттєво ( $p > 0,05$ ): це є віддзеркаленням зростання процесів протеолізу в ротовій порожнині, за який більшою мірою відповідальна аеробна ланка мікробіоценозу, ніж анаеробна.

4. Дослідження КЛЖК методом газорідинної хроматографії дає змогу опосередковано діагностувати порушення мікробіоценозу ротової порожнини у хворих на ГП при зменшенні часових і фінансових затрат.

Перспективою подальших досліджень є вивчення змін концентрацій КЛЖК у хворих на ГП під впливом комплексного лікування.

Зміни показників абсолютної концентрації коротколанцюгових жирних кислот у хворих на ГП початкового-I і I-II ступені

Показники	Здорові, n=18	Хворі на ГП хронічного перебігу	
		поч.-I ст. (I група), n=30	I-II ст. (II група), n=30
C2 (оцтова кислота), мг/г	0,270±0,04	0,187±0,00 p<0,05	0,065±0,01 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001
C3 (пропіонова кислота), мг/г	0,093±0,02	0,188±0,02 p<0,001	0,297±0,03 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,01
C4 (масляна кислота), мг/г	0,017±0,00	0,100±0,01 p<0,001	0,209±0,02 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001
C6 (капронова кислота), мг/г	0,0015±0,00	0,0022±0,00 p<0,001	0,0033±0,00 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001
Загальний уміст Cn (C2+... C6), мг/г	0,382±0,01	0,477±0,02 p<0,001	0,574±0,02 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001
Анаеробний індекс, од.	0,407±0,05	1,540±0,04 p<0,001	7,785±0,05 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001
Ізо Cn (ізо C4+ ізо C5+ізо C6), мг/г	0,051±0,01	0,067±0,01 p>0,05	0,074±0,00 p>0,05 p <sub>1</sub> >0,05

Примітка: вказана вірогідність різниці показників:

p – до величини в здорових;

p<sub>1</sub> – до величини у хворих на ГП початкового-I ступеня.

## Література

- Haffajee A.D. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases / A.D. Haffajee, S.S. Socransky // Periodontology, 2000. – 1994. – Vol. 5. – P. 78-111.
- Вольф Г.Ф. Пародонтология / Г.Ф. Вольф, Э.М. Ратейцхак, К. Ратейцхак; пер. с нем.; под ред. проф. Г.М. Барер. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 548 с.
- Грудянов А.И. Методы диагностики воспалительных заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, О.А. Зорина. – М.: Медицинское информационное агентство, 2009. – 112 с.
- Роль микробного фактора в развитии пародонтита / Н.П. Ярынич-Бучинская, И.П. Кайдашев, П.Н. Скрипников [и др.] // Стоматолог. – 2007. – № 4. – С. 4-5.
- Свирин В.В. Состояние микробиоценоза полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта и возможность его коррекции / В.В. Свирин, В.О. Богданова, М.Д. Ардатская // Кремлевская медицина. – 2010. – №1. – С. 11-17.
- Богданова В.О. Оценка метаболитов микрофлоры при воспалительных заболеваниях пародонта: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.01.14 „Стоматология” / В.О. Богданова. – М., 2011. – 26 с.
- Зорина О.А. Количественная оценка соотношения патогенных представителей микробиоценоза полости рта в норме и при пародонтите / О.А. Зорина, А.А. Кулаков, Д.В. Ребриков // Стоматология. – 2011. – №3. – С. 40-42.
- Белобородова Н.В. Метаболиты анаэробных бактерий (летучие жирные кислоты) и реактивность макроорганизма / Н.В. Белобородова, С.М. Белобородов // Антибиотики и химиотерапия. 2000. – №2. – С. 28-36.
- Influence of short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria on procoagulant activity produced by Escherichia coli and Bacteroides fragilis-stimulated leucocytes: possible role in intraabdominal abscess formation / [G. Miragliotta, A. Mosca, G.M. Minoia, R. Del Prete] // Microbios. – 1993. – Vol. 75. – P. 233-240.
- Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание/ Б.А. Шендеров. – М.: Грант, 1998. – Т.1. -111 с.
- Клинические возможности использования метаболитов микрофлоры в диагностике и лечении воспалительных заболеваний пародонта / [В.О. Богданова, В.В. Свирин, М.Д. Ардатская, С.А. Заславский] // Стоматология для всех. – 2009. – № 4. С. 46-50.
- Барер Г.М. Терапевтическая стоматология. Часть 2. Болезни пародонта / Г.М. Барер. – М.: ЭОТАР-Медиа, 2008. – 224 с.
- Филатова Е.С. Комплексная оценка состояния тканей пародонта по химическому составу сред полости рта и содержанию нуклеазопозитивных микроорганизмов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.00.21 „Стоматология” / Е.С. Филатова. – М., 2002. – 23 с.

Стаття надійшла  
16.02.2017 р.

### Резюме

Обстежено 78 осіб віком від 20 до 44 років, без соматичних хвороб, серед яких: 18 здорових і 60 хворих на генералізований пародонтит (ГП) хронічного перебігу початкового- I (30) і I-II (30) ступенів розвитку. Стан мікробіоценозу ротової порожнини оцінювали непрямим способом – шляхом визначення метаболітів бактерій, зокрема коротколанцюгових жирних кислот (КЛЖК) у ротовій рідині за допомогою методу газорідинної хроматографії. Визначили абсолютну концентрацію оцтової, пропіонової, масляної, капронової кислот; загальний уміст коротколанцюгових жирних кислот із нерозгалуженим ланцюгом; анаеробний індекс (AI) та сумарну концентрацію ізокилот (ізомасляної, ізовалеріанової та ізокапронової).

У ротовій рідині хворих на ГП достовірно змінювалася концентрація нерозгалужених КЛЖК, а саме: знижувався рівень оцтової кислоти і підвищувався вміст пропіонової, масляної, капронової кислот, особливо при ГП I-II ступенів розвитку. Загальний уміст КЛЖК та AI у хворих на ГП вірогідно підвищувалися, особливо при ГП I-II ступенів, що засвідчило зростання кількості пародонтопатогенів у ротовій порожнині. Сумарний уміст ізокилот у випадку ГП підвищувався, але несуттєво: це є віддзеркаленням зростання процесів протеолізу в ротовій порожнині, за який більшою мірою відповідає аеробна ланка мікробіоценозу, ніж анаеробна.

Дослідження КЛЖК методом газорідинної хроматографії дає змогу опосередковано діагностувати порушення мікробіоценозу ротової порожнини у хворих на ГП. Використання цього методу завдяки його простоті та швидкості отримання результатів є перспективним.

**Ключові слова:** генералізований пародонтит, мікробіоценоз, коротколанцюгові жирні кислоти, ротова рідина.

### Резюме

Обследовано 78 человек в возрасте от 20 до 44 лет, без соматических болезней, среди которых: 18 здоровых и 60 больных генерализованным пародонтитом (ГП) хронического течения начальной-I (30) и I-II (30) степеней развития. Состояние микробиоценоза ротовой полости оценивали косвенным способом – путем определения метаболитов бактерий, а именно короткоцепочных жирных кислот (КЛЖК) в ротовой жидкости с помощью метода газожидкостной хроматографии. Определяли абсолютную концентрацию уксусной, пропионовой, масляной, капроновой кислот, общее содержание короткоцепочных жирных кислот с неразветвленной цепью, анаэробный индекс (AI) и суммарную концентрацию изокилот (изомасляной, изовалериановой и изокапроновой).

У больных ГП в ротовой жидкости достоверно изменялась концентрация неразветвленных КЛЖК, а именно: снижался уровень уксусной кислоты и повышалось содержание пропионовой, масляной, капроновой кислот, особенно при ГП I-II степеней развития. Общее содержание КЛЖК и AI у больных ГП достоверно повышалось, особенно при ГП I-II степеней, что свидетельствует о росте количества пародонтопатогенов в ротовой полости. Суммарное содержание изокилот при ГП повышалось, но несущественно: это является отражением роста процессов протеолиза в ротовой полости, за который в большей степени отвечает аэробное звено микробиоценоза, чем анаэробное.

Исследование КЛЖК методом газожидкостной хроматографии позволяет косвенно диагностировать нарушения микробиоценоза ротовой полости у больных ГП. Использование этого метода благодаря его простоте и быстроте получения результатов является перспективным.

**Ключевые слова:** генерализованный пародонтит, микробиоценоз, короткоцепочные жирные кислоты, ротовая жидкость.

UDC 616.31 – 008.87 – 078.33

## EXAMINING OF SHORT CHAIN FATTY ACIDS – METABOLITES OF PERIODONTAL PATHOGENIC FLORA – AS MARKERS OF DIAGNOSTIC OF MICROBIOCENOSIS OF ORAL CAVITY

*O.L. Lychkovska, G.M. Melnychuk*

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

State Higher Educational Establishment «Ivano-Frankivsk National Medical University»

### Summary

**Introduction.** It has been established thus far that periodontal pathogenic flora is the leading factor in the development of generalized periodontitis (GP) as it produces endotoxins, proteolytic enzymes, as well as short chain fatty acids (SCFA), which have significant damaging potential for periodontal tissues.

The object of the research is to examine content and ratio of the short chain fatty acids in oral fluid of patients with generalized periodontitis (GP) at the initial-I and I-II stage of development.

**Materials and methods.** Seventy-eight persons aged between 20 and 44 years old without somatic diseases, including 18 healthy persons and 60 with (GP) disease with chronicity at the initial (30) and I-II (30) stage

of development were examined. State of microbiocenosis in oral cavity was assessed indirectly by identifying metabolites of bacteria, namely SCFA in oral fluid using the method of gas-liquid chromatography. The qualitative and quantitative content of SCFA in oral fluid was examined at the gas-liquid chromatograph Shimadzu GC 2014. Absolute concentration of acetic, propionic, butyric, and caproic acids was estimated, as well as total content of the short chain fatty acids with unbranched chain, anaerobic index (AI), and total concentration of isoacids (isobutyric, isovalerianic, and isocaproic).

**Research results and discussions.** Concentration of the unbranched SCFA was changing significantly in oral cavity of patients with GP as follows: level of acetic acid was decreasing, while the content of propionic, butyric, and caproic acids was increasing, especially in case of GP at the I-II stage of development. These data reflect the suppression of aerobic flora associated with the growing activity of anaerobic microflora, namely genera of Clostridium, Bacteroides, and Fusobacterium. Increasing concentration of butyric acid is probably indicative not only of the involvement of bacteroides and propionibacteria into the inflammation period, but also bacteria of the Clostridium genus, by highlighting the deterioration of the state of microbiocenosis.

Total content of the SCFA and the AI in patients with GP was increasing significantly, especially in case of GP at the I-II degree, which testified to growth in the number of periodontopathogens in oral cavity. Total content of isoacids in case of GP was increasing, but not significantly; it reflects the growth in the processes of proteolysis in oral cavity, for which the aerobic link of microbiocenosis is more responsible than anaerobic one.

**Conclusions.** Concentration of the unbranched SCFA was changing significantly in oral cavity of patients with GP as follows: level of acetic acid was decreasing ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ), while the content of propionic, butyric, and caproic acids was increasing ( $p < 0,001$ ), especially in case of GP at the I-II stage of development.

Total content of the SCFA and the AI in patients with GP was increasing significantly, especially in case of GP at the I-II degree ( $p < 0,001$ ), which testified to growth in the number of periodontopathogens in oral cavity.

Total content of isoacids in case of GP was increasing, but not significantly ( $p > 0,05$ ); it reflects the growth in the processes of proteolysis in oral cavity, for which the aerobic link of microbiocenosis is more responsible than anaerobic one.

Examining the SCFA with the method of gas-liquid chromatography enables to diagnose indirectly the malformation of microbiocenosis of oral cavity in patients with GP in view of reducing the time and financial expenditures.

So, one can say, its simplicity and quickness, achievement of the results are main advantages of usage of this method.

**Key words:** generalized periodontitis, microbiocenosis, short chain fatty acids, oral fluid.