

ẢNH HƯỞNG CỦA LANSOPRAZOLE LÊN QUÁ TRÌNH HÔ HẤP VÀ MỘT SỐ ENZIM CHỐNG TỒN THƯƠNG OXY HOÁ CỦA VI KHUẨN XOANG MIỆNG

NGUYỄN THỊ MAI PHƯƠNG, ROBERT E. MARQUIS

I. MỞ ĐẦU

Các nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy sử dụng chất kháng khuẩn là biện pháp hữu hiệu nhất hiện nay để phòng ngừa sâu răng và các bệnh về răng miệng. Cho đến nay, fluo vẫn được xem là một tác nhân chống sâu răng có hiệu quả cao và được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm vệ sinh và bảo vệ răng. Tuy nhiên, tình trạng nhiễm fluo (fluorosis) được phát hiện trong các cộng đồng dân cư đã khiến các nhà nghiên cứu và các tổ hợp sản xuất phải cân nhắc việc sử dụng chất này và tìm thêm những chất mới để có thể sử dụng kết hợp với fluo ở nồng độ thật thấp nhưng vẫn hiệu quả trong việc chống sâu răng. Đã có những công trình nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên cũng như tổng hợp có tác dụng kháng vi khuẩn xoang miệng. Hàng loạt những chất có tác dụng kháng khuẩn đã được nghiên cứu và sử dụng ở dạng đơn lẻ hay kết hợp với fluo và một vài hợp chất khác trong đó có chlorohexidine, hexitidine, SDS, triclosan... [8, 9, 11].

Các chất benzimidazole và dẫn suất của chúng như omeprazole (OM) hay lansoprazole (LAN), được sử dụng rộng rãi để kiểm soát sự sinh axit quá mức của các tế bào tiết axit trong dạ dày thông qua sự ức chế enzym H^+/K^+ P-ATPase của các tế bào này. Các chất này hiện nay đang được sử dụng trong điều trị các bệnh viêm loét dạ dày. Sự axit hoá cũng là yếu tố chính của các bệnh đường miệng, mà trước tiên là sâu răng, dẫn đến việc sứt mòn men răng và gây sâu răng. Các nghiên cứu đã phát hiện thấy có tới trên 500 loài vi khuẩn khác nhau cư trú trong xoang miệng [5], trong đó có các vi khuẩn có khả năng sinh axit như các streptococci, các vi khuẩn có khả năng sinh H_2O_2 như *S. sanguis*, *S. gordonii*, các vi khuẩn có khả năng sinh kiềm (NH_3) như *S. salivarius* hay *S. rattus*, các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc như *Fusobacterium nucleatum* hay *Prevotella intermedia*... gây bệnh viêm nướu răng (gingivitis) hay viêm quanh răng (periodontal diseases). Vi khuẩn liên quan trực tiếp đến sâu răng là các đột biến streptococci như *Streptococcus mutans* hay *Streptococcus sobrinus* do có khả năng chịu axit cao và sinh axit mạnh. Theo hướng nghiên cứu tìm kiếm những chất kháng khuẩn mới có tiềm năng chống sâu răng, chúng tôi đã tiến hành khảo sát vai trò sinh lý của benzimidazole trong đó có lansoprazole (LAN) và omeprazole (OM) lên một số vi khuẩn xoang miệng. Kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi [11] đã cho thấy benzimidazole có khả năng ức chế mạnh sự sinh axit của tế bào streptococci. Ngoài ra, các chất này có tác dụng ức chế các enzym trên màng, tham gia vào quá trình vận chuyển đường là PTS và F-ATPase. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu về tác dụng của lansoprazole lên quá trình hô hấp và lên một số enzym chống tồn thương oxy hoá của vi khuẩn xoang miệng.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Nghiên cứu này đã sử dụng một số chủng vi khuẩn xoang miệng gồm: chủng chống chịu và sinh axit *Streptococcus mutans* GS-5; *Streptococcus mutans* UA159, chủng kém chịu axit và

sinh H_2O_2 *Streptococcus sanguis* NCTC 1094; chủng vi khuẩn kỵ khí bắt buộc gây viêm lợi *Fusobacterium nucleatum* ACTC 28566, chủng sinh catalase *Actenomyces naeslundii* và chủng sinh pseudocatalase *Lactobacillus plantarum*. Các chủng này đều là quà tặng của giáo sư Robert E. Marquis, Khoa Vi sinh và Miễn dịch học, Đại học Rochester, Hoa Kỳ. Đây là những chủng vi khuẩn có lí lịch rõ ràng và được rất nhiều phòng thí nghiệm nghiên cứu về sâu răng trên thế giới sử dụng.

Lansoprazole (LAN) và các enzym, hoá chất dùng trong nghiên cứu này đều được mua từ hãng Sigma (Hoa Kỳ).

2. Phương pháp

a. Chuẩn bị dịch chiết tế bào

Tế bào sau khi rửa với dung dịch muối KCl 50 mM có chứa $MgCl_2$ 1 mM được hoà trong đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Lấy một thể tích dịch tế bào trộn với một thể tích cát thủy tinh (tỉ lệ 1:1) và nghiền phá bằng máy làm vỡ tế bào. Mức độ phá vỡ tế bào được kiểm tra bằng kính hiển vi. Dịch chiết tế bào thu được bằng cách li tâm ở 13 000 g trong 10 phút ở 4°C để thu dịch trong dùng cho xác định hoạt tính enzym.

b. Hô hấp của tế bào

Tế bào được thu từ pha ổn định của quá trình sinh trưởng. Sau khi li tâm và rửa hai lần với dung dịch muối KCl 50 mM có chứa $MgCl_2$ 1 mM, tế bào được hoà vào dung dịch đệm photphat 20 mM có chứa 0,5% glucose ở pH 7,0. Mật độ tế bào đạt khoảng 1,5 mg trọng lượng khô/ 1ml. Dung dịch tế bào được lắc kĩ để đạt độ bão hoà không khí và được dùng ngay để đo lượng O_2 tiêu thụ ở nhiệt độ phòng sử dụng máy đo O_2 , VWR Model 4000 theo phương pháp được mô tả bởi Caldwell và cộng sự [2].

c. Các phương pháp nghiên cứu enzym

Hoạt độ của các enzym NOX và SOD của *S. mutans* được xác định sử dụng dịch chiết tế bào. Hoạt tính của NADH oxidase được xác định ở 25°C theo phương pháp của Poole và Claiborne [12]. Một đơn vị hoạt tính NADH oxidase là lượng enzym xúc tác để oxy hoá 1 μ mol NADH trong thời gian 1 phút ở điều kiện phản ứng.

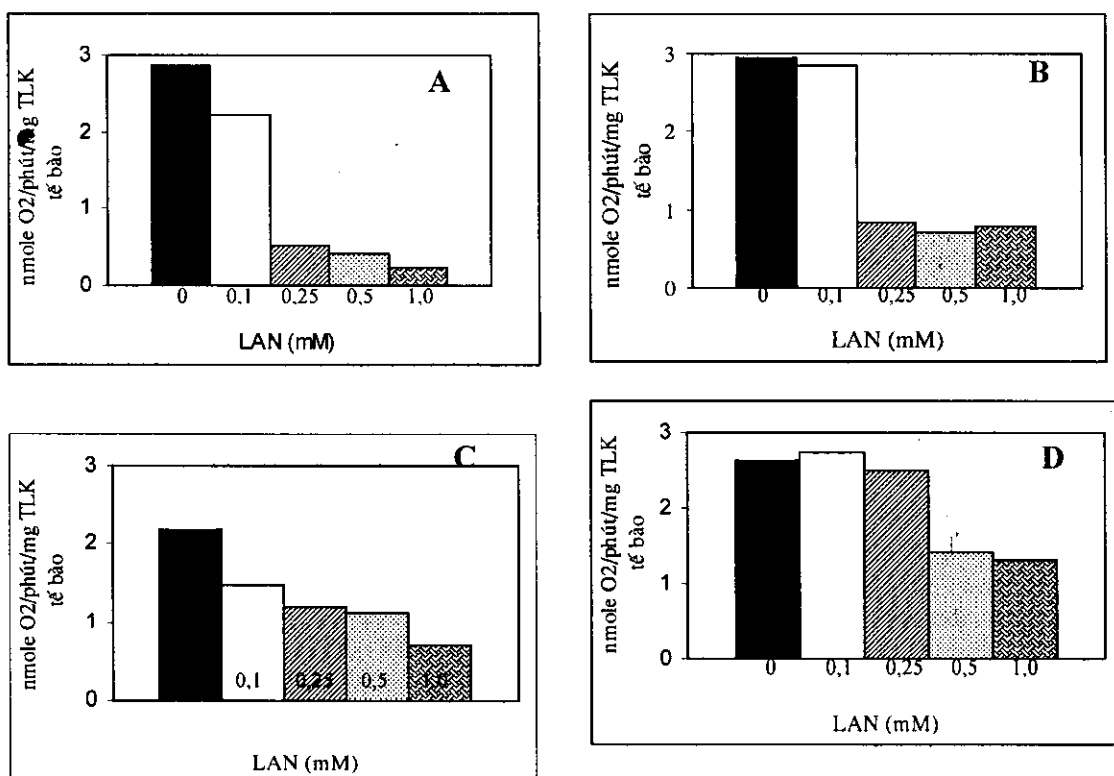
Hoạt độ superoxide dismutase (SOD) được xác định theo phương pháp của McCord và Fredovich [6] thông qua sự ức chế quá trình khử cytochrom C bởi xanthine khi có mặt xanthine oxidase. Một đơn vị hoạt độ SOD là lượng SOD có khả năng làm giảm 50% tốc độ khử cytochrom C trong các điều kiện phân tích.

Hoạt độ catalase (CAT) và pseudocatalase (PCAT) [19] được xác định theo phương pháp của Thibodeau và cộng sự [15]. Hoạt tính catalase của *A. naeslundii* được xác định sử dụng tế bào nguyên vẹn. Tế bào thu được sau khi li tâm ở 6000 g trong 15 phút và rửa 2 lần bằng nước cất sẽ được hoà trở lại trong KCl 50 mM. Phản ứng enzym được bắt đầu bằng việc thêm H_2O_2 vào hỗn hợp phản ứng có chứa tế bào và đệm phosphate kali 0,1 M để đạt nồng độ cuối cùng là 60 mM. Hỗn hợp phản ứng được ủ 5 phút ở 25°C trước khi NaN_3 được thêm vào để dừng phản ứng. Nồng độ H_2O_2 khởi đầu và còn lại trong hỗn hợp phản ứng được xác định bằng thuốc thử tinh thể tím (leuco crystal violet) trong sự có mặt của peroxidase từ củ cải ngựa. Hoạt tính được biểu diễn như là μ mole H_2O_2 bị phân huỷ trong 1 phút ở điều kiện phản ứng. Các mẫu nghiên cứu được pha loãng đủ để peroxidase không bị ức chế bởi NaN_3 . Hoạt tính pseudocatalase của *L. plantarum* được xác định theo qui trình tương tự cho catalase nhưng sử dụng phương pháp ly tâm nhanh để dừng phản ứng vì enzym pseudocatalase không nhạy cảm với NaN_3 .

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của LAN lên quá trình hô hấp của một số vi khuẩn xoang miệng

Các vi khuẩn xoang miệng có khả năng hô hấp (tiêu thụ oxy) cao nhưng lại không có chuỗi vận chuyển điện tử trên màng để có thể tiến hành quá trình phosphoryl hoá, oxy hoá. Việc tiến hành hô hấp không sử dụng phản ứng phosphoryl hoá, oxy hoá là vấn đề vẫn chưa giải thích được mặc dù tế bào vẫn cần NAD^+ như là chất nhận điện tử, ví dụ trong quá trình đường phân. Các vi khuẩn xoang miệng khác có khả năng hô hấp trung bình là những loài kỵ khí bắt buộc như *Fusobacterium nucleatum* hay *Prevotella intermedia*. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở hình 1 cho thấy LAN đã ức chế sự hô hấp của các tế bào *S. mutans* GS-5 (1A), *S. mutans* UA159 (1B), *S. sanguis* NCTC 10904 (1C), và *F. nucleatum* ATCC 25586 (1D). Các đột biến streptococci *S. mutans* GS-5 và UA159 dường như là nhạy cảm nhất với LAN. Nồng độ ức chế 50% hoạt tính hô hấp (IC_{50}) là khoảng 0,2 mM và chỉ một phần nhỏ của quá trình hô hấp là không nhạy cảm với LAN. Hô hấp của *S. sanguis* tỏ ra phức tạp hơn khi đáp ứng với LAN thể hiện thông qua việc một phần của quá trình hô hấp này nhạy cảm với LAN như streptococci, một phần khác chỉ nhạy cảm vừa phải với chất kháng khuẩn này và phần đáng kể là không nhạy cảm với LAN. Hô hấp của *F. nucleatum* cũng gồm hai phần nhạy cảm (chiếm khoảng 50%) và không nhạy cảm với LAN. Điều này giải thích tại sao chỉ số IC_{50} của *F. nucleatum* cao hơn đáng kể so với các vi khuẩn khác ($\text{IC}_{50} = 0,5$).



Hình 1. Ảnh hưởng của LAN lên quá trình hô hấp của một số vi khuẩn xoang miệng

A) *S. mutans* UA159; B) *S. mutans* GS-5; C) *S. sanguis* NCTC 10904; D) *F. nucleatum* ACTC 28566

2. Ảnh hưởng của LAN lên một số enzym chống tổn thương oxy hoá

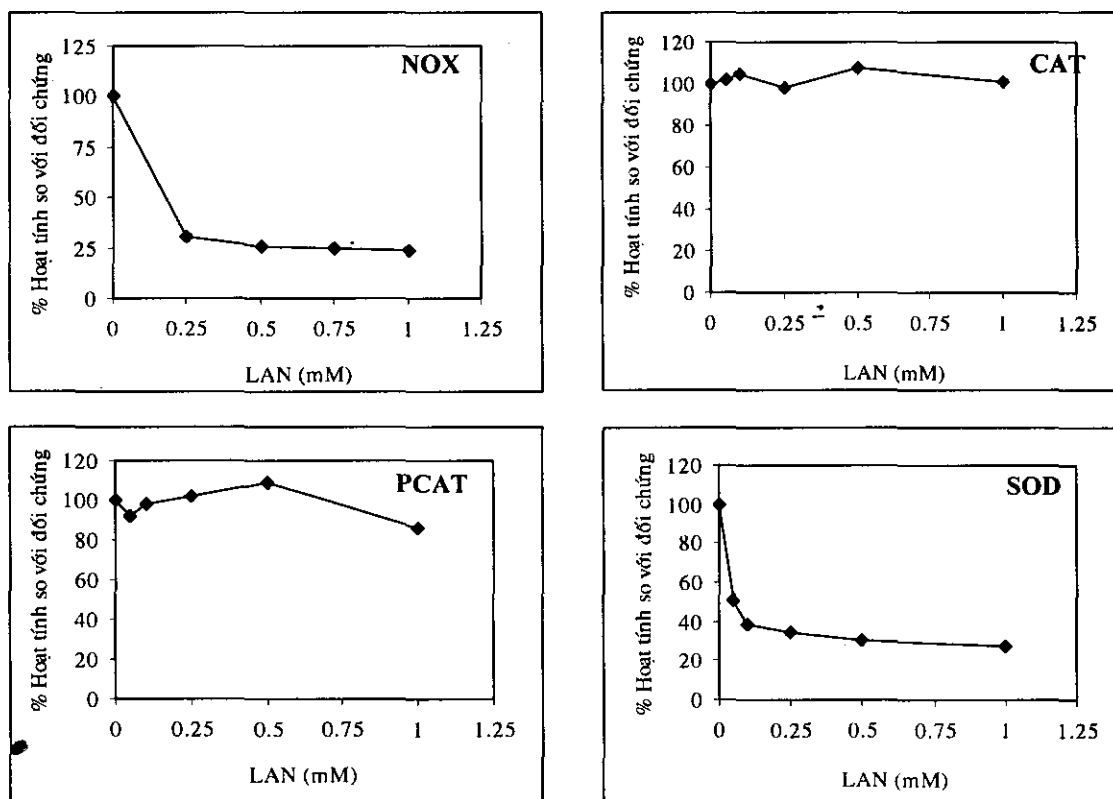
Trong quá trình hô hấp, các vi khuẩn xoang miệng sinh ra các gốc oxy hoạt động (reactive oxygen species) như O_2^- , H_2O_2 có khả năng gây tổn thương oxy hoá lên tế bào [5]. Để bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxy hoá, hàng loạt các enzym bảo vệ đã được sinh tổng hợp, trong đó có các enzym như superoxide dismutase (SOD), NADH oxidase (NOX), catalase (CAT), pseudocatalase (PCAT) [1, 4, 13]. Enzim NADH oxidase còn đóng vai trò chính trong quá trình sử dụng oxy của các streptococci xoang miệng cũng như với *F. nucleatum* [3]. Enzim này rất hoạt động ở các cơ thể kỵ khí và được xem là enzym chìa khoá cho sự phát triển của *F. nucleatum* trong điều kiện có oxy cũng như để tạo ra môi trường khử cho sự phát triển của những cơ thể kỵ khí bắt buộc như *P. gingivalis* và *P. intermedia*. NADH oxidase gồm các enzym là Nox-1, xúc tác cho phản ứng chuyển 2 điện tử từ NADH sang một phân tử oxy và giải phóng ra peroxit hydro với sự góp mặt của 2 proton. Enzim này là một hợp phần của phức hệ alkylperoxidase với hai thành phần là AhpF (Nox-1) và AhpC có hoạt tính peroxidase (phân giải H_2O_2 khi có chất khử). Enzim Nox-2 của NADH oxidase xúc tác cho sự chuyển 4 điện tử từ hai phân tử NADH sang một phân tử oxy để tạo ra hai phân tử nước với sự góp mặt của 4 proton. Nox-1 được phát hiện là có hoạt tính cao ở các chủng vi khuẩn sản xuất H_2O_2 chủ yếu của trong mảng bám răng như *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. oralis* còn Nox-2 lại trội hơn Nox-1 ở *S. mutans*. Nhờ NADH oxidase, quá trình khử đơn trị oxy được hạn chế, qua đó hạn chế được sự hình thành gốc oxy hoạt động. Chính vì vậy, enzym này được xem là có vai trò chống tổn thương oxy hoá [14].

Các số liệu ở hình 2 cho thấy NADH oxidase của *S. mutans*, tác nhân chính gây sâu răng, tỏ ra nhạy cảm với LAN. Nồng độ IC_{50} là khoảng 2,0 mM đối với *S. mutans*. Các kết quả gợi ý rằng hô hấp của tế bào bị ức chế chủ yếu là do enzym NOX nhạy cảm với LAN. Việc phát hiện thấy LAN ức chế sự hô hấp của vi khuẩn xoang miệng đã cho thấy nó có khả năng làm giảm sự tạo gốc oxy hoạt động và vì vậy, là một chất có tác dụng chống oxy hoá xét trên khía cạnh ức chế hô hấp. Tuy nhiên, sự hô hấp lại phụ thuộc một phần vào NADH oxidase là enzym có vai trò như là một trong những nguồn tái tạo NAD^+ từ NADH, một chất nhận cho tác nhân khử của quá trình đường phân. Vì thế, xét trên khía cạnh trao đổi chất thì sự nhạy cảm của NADH oxidase với LAN có thể gây ra những vấn đề bất lợi cho tế bào.

Một điều thú vị là SOD, enzym có vai trò triệt tiêu gốc O_2^- , nhờ đó ngăn chặn sự tạo gốc oxy hoạt động và tổn thương oxy hoá cho tế bào, cũng tỏ ra nhạy cảm với tác nhân kháng khuẩn này. Cụ thể là ở nồng độ khoảng 0,1 mM, LAN đã ức chế tới 50% hoạt tính của enzym. Mức độ nhạy cảm của enzym này và NOX là tương đương nhau. Trong số nhiều chất kháng khuẩn mà chúng tôi đã nghiên cứu, chỉ một số ít trong đó có LAN là có khả năng ức chế hoạt động của SOD.

CAT dường như có vai trò chìa khoá trong hệ sinh thái mảng bám răng để ngăn chặn tổn thương trực tiếp do H_2O_2 gây ra hay tổn thương gián tiếp do việc sinh hypothiocyanide thông qua các phản ứng của peroxidase trong nước bọt. Phan và cộng sự [10] đã phát hiện thấy cả enzym CAT của *A. neaslundii* và PCAT của *L. plantarum* đều nhạy cảm với NaF ở nồng độ khoảng 1 mM tại pH thấp (4,0 – 5,0), là giá trị pH của mảng bám răng khi bị axit hoá do vi khuẩn đồng hoá đường. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, enzym CAT của *A. neaslundii* lại không nhạy cảm với LAN (hình 2). PCAT, enzym giả CAT của *L. plantarum* có chứa ion kim loại Mn thay cho hem trong trường hợp của CAT, cũng không bị ức chế. Phát hiện này cũng được chúng tôi tìm thấy với các tác nhân kháng khuẩn khác như kẽm (Zn) hay 8-hydroxyquinoline trong một số nghiên cứu trước đây [7, 8]. Lý do tại sao các enzym này không nhạy cảm với LAN là vấn đề cần phải tiếp tục làm sáng tỏ. Như vậy có thể thấy, tác dụng kháng

khuẩn của LAN lên vi khuẩn xoang miệng trong đó có các streptococci là do chúng có khả năng ức chế hoạt tính các enzym hô hấp và bảo vệ tổn thương oxy hoá là NOX và SOD.



Hình 2. Ảnh hưởng của LAN lên một số enzym chống tổn thương oxy hoá; 100% hoạt tính của đối chứng = 0,12 đơn vị/mg protein; 51 đơn vị/mg protein, 18 đơn vị/mg trọng lượng khô tế bào và 12 đơn vị/mg trọng lượng khô tế bào tương ứng với các enzym NOX (*S. mutans*), SOD (*S. mutans*), CAT (*A. naeslundii*) và PCAT (*L. plantarum*), theo thứ tự

IV. KẾT LUẬN

1. LAN có khả năng ức chế mạnh quá trình hô hấp của vi khuẩn xoang miệng.
2. Tác dụng kháng khuẩn của LAN có thể là do chất này đã ức chế các enzym chịu trách nhiệm cho quá trình hô hấp và bảo vệ tổn thương oxy hoá của vi khuẩn là NADH oxidase (NOX) và superoxide dismutase (SOD).

Lời cảm ơn. Nghiên cứu này được thực hiện nhờ kinh phí được tài trợ từ chương trình nghiên cứu cơ bản trong lĩnh vực Khoa học và Sự sống giai đoạn 2006-2009.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bazzichi C.M. Clinic - Experiment Rheumatol **20** (2002) 761-766.
2. C. E. Caldwell and R. E. Marquis - Oral Microbiol Immunol **14** (1999) 66-72.
3. M. Highuchi, Y. Yamamoto, L. B. Poole, M. Shimada, Y. Sato, N. Takahashi, Y. Kamio - J. Bacteriol. **18** (1999) 5940-5947.

4. J. A. Imlay - Ann. Rev. Microbiol. **57** (2003) 395-418.
5. R. E. Marquis - J. Indust. Microbiol. **15** (1995) 198-207.
6. J. M. McCord, I. Fridovich - J. Biol. Chem. **244** (1969) 6049-6055.
7. Nguyen P.T.M., Phan T.N., Marquis R.E., *Adv. Natural. Sci.*(2006). (Submitted).
8. Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đỗ Ngọc Liên, Robert E. Marquis - Tạp chí Di truyền học & ứng dụng **2** (2003) 18-23.
9. T. N. Phan, T. Buckner, J. Sheng, J. D. Baldeck, and R. E. Marquis - Oral Microbiol. Immunol. **19** (2004) 31-38.
10. T. N. Phan, A. M. Krisch, R. E. Marquis - Oral Microbiol. Immunol. **16** (2001) 28-33.
11. P. T. M. Nguyen, J. D. Balzac, J. Olslo, R. E. Marquis - Oral Microbiol. Immunol. **20** (2005) 1-8.
12. L. B. Poole and A. Claiborne - J. Biol. Chem. **261** (1986) 14525-14533.
13. S. R. Powell - J. Nutr. **130** (2000) 1447S-1454S.
14. G. Storz and J. A. Imlay - Curr. Opinion Microbiol. **2** (1999) 188-194.
15. H. K. Thibodeau and B. A. Keef - Oral Microbiol. Immunol. **5** (1999) 328-331.

SUMMARY

EFFECT OF LANSOPRAZOLE ON RESPIRATION AND SOME ANTIOXIDANT ENZYMEES OF ORAL BACTERIA

Benzimidazoles such as lansoprazole (LAN) or omeprazole (OM) are widely used as proton-pump inhibitors to control stomach hyperacidity and have been found also to have antimicrobial actions against *Helicobacter pylori* and oral streptococci. We found that it acts also to suppress respiration of oral streptococci and of *Fusobacterium nucleatum*, an organism associated with development of gingivitis. LAN was a potent inhibitor of respiration of the oral streptococci *Streptococcus mutans* GS-5 or UA 159 and *S. sanguis* NCTC 10904. 50% inhibitory concentrations for intact cells in suspensions were about 0.20 mM with nearly complete inhibition of O₂ metabolism at higher LAN levels. 0.5 mM LAN inhibited O₂ utilization by *F. nucleatum* ATCC 25586 by some 50%, but almost 50% of O₂ metabolism by the anaerobe was not LAN sensitive. NADH oxidase plays the major role on O₂ utilization by oral streptococci and is also important for *F. nucleatum*. In cell extracts of *S. mutans*, the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of LAN for NADH oxidase activity was ca. 0.1 mM. LAN was inhibitory also for the protective enzyme SOD with IC₅₀ of 0.1 mM. However, the enzymes catalase of *Actinomyces naeslundii* and pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum* were not sensitive to LAN. Mechanism of action of LAN on oral bacteria seems to be complicated and needs further work to understand fully the role of this antimicrobial agent on oxidative physiology of oral bacteria.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 6 tháng 9 năm 2006

Nguyễn Thị Mai Phương,

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.:

Robert E. Marquis, Đại học Rochester, Hoa Kỳ.