

**ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ІНГІБУВАННЯ iNOS
ПРИ ЗАПАЛЕННІ ТКАНИН ПАРОДОНТА НА ФОНІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

Досліджено вплив цукрового діабету 1-го типу на перебіг ліпополісахаридного запалення тканин пародонта в щурів. Ліпополісахаридний пародонтит супроводжувався активацією iNOS (у крові й тканині пародонта зростав вміст NO_x) і окиснювальних процесів (збільшувався рівень ТБК-активних продуктів та окисномодифікованих білків, пригнічувалася антиоксидна система). У щурів, в яких запалення пародонта моделювали на фоні стрептозотоцинового цукрового діабету, окиснювальні процеси були значно вираженішими, ніж у тварин без діабету. Застосування селективного інгібітора iNOS аміногуанідину достовірно попереджувало явища оксидативного і нітрооксидативного стресу у тварин з пародонтитом на фоні діабету.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пародонтит, діабет, окиснювальні процеси, аміногуанідин.

ВСТУП. За даними літератури, в різних країнах світу близько 60–90 % населення страждає від запалення тканин пародонта різного ступеня тяжкості [21]. Відомо, що основним етіологічним фактором пародонтиту є ліпополісахарид анаеробних грамнегативних мікроорганізмів. Захворювання пародонта часто пов'язані із соматичними хворобами, зокрема серцево-судинною і легеневою патологіями, діабетом, хворобами шлунково-кишкового тракту, в тому числі печінки [13, 18, 20]. Цукровий діабет за своїм соціальним і медичним значенням займає важливе місце в загальній структурі захворюваності й характеризується тяжкістю лікування і серйозним прогнозом. Ряд літературних даних вказує на тісний взаємозв'язок запальних захворювань ротової порожнини з діабетом [22, 23]. Разом із тим, особливості патогенезу пародонтиту, що виникає на фоні супутнього діабету, все ще потребують детальнішого вивчення.

Діабет асоціюється з розвитком запальних процесів у тканинах, а гіперглікемія призводить до ураження білків сполучної тканини і кісткового матриксу, наприклад колагену, шляхом неферментативного глікозилювання. Відомо, що інтерлейкіни відіграють важливу роль у розвитку запалення, зокрема шляхом стимуляції індукцибельної форми синтази оксиду азоту. Було показано, що при діабеті мають місце розлади продукування про- й анти-запальних інтерлейкінів [16]. Тому, логічно,

© Г. Б. Колодницька, В. М. Коропчук, М. М. Корда, 2013.

імунологічні розлади і стимуляція запалення, що відбуваються при діабеті, можуть викликати зміни у функціонуванні системи оксиду азоту.

Відомо також, що підвищений вміст високоактивної iNOS спостерігають при пародонтиті у тканинах ясен [10, 19]. Надмірне утворення NO, що має місце при стимуляції iNOS ендотоксинами патогенної мікрофлори ротової порожнини, призводить до нітрооксидативного стресу, який, разом з активацією процесів ліпопероксидації і пригніченням системи антиоксидного захисту, є одним з основних механізмів розвитку запалення тканин пародонта [3, 6]. З огляду на таке розуміння участі NO у патогенезі діабету і пародонтиту, має будуватися стратегія лікування запалення пародонта, поєданого з діабетом. Логічно впливає, що потенційним позитивним ефектом у цьому випадку повинні володіти препарати, які б селективно пригнічували індукцибельну форму синтази оксиду азоту.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті можливість корекції порушень окиснювальних процесів при пародонтиті на фоні стрептозотоцинового цукрового діабету за допомогою селективного інгібітора iNOS аміногуанідину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті використано 40 безпородних щурів-самців масою 160–180 г. Усіх тварин поділили на чотири групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – щури, в яких викликали запалення па-

родонта (протягом 2-х тижнів через день вводили в тканини ясен по 40 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду E. Coli (ЛПС)); 3-тя – щури з пародонтитом на фоні цукрового діабету. У тварин цієї групи викликали цукровий діабет шляхом одноразового внутрішньочеревного введення стрептозотоцину в дозі 45 мг/кг. Починаючи з 30-ї доби після введення стрептозотоцину, щурам протягом 2-х тижнів через день вводили в тканини ясен по 40 мікролітрів (1 мг/мл) ЛПС. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози 12–18 ммоль/л. До 4-ї групи входили щури з пародонтитом на фоні діабету, яким, починаючи з 30-ї доби експерименту, паралельно з ЛПС щоденно протягом 14-ти діб вводили внутрішньочеревно селективний інгібітор індукцибельної NO-синтази аміногуанідин (“Sigma-Aldric”, США) у дозі 20 мг/кг [9]. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. У гомогенаті тканин пародонта та крові визначали рівень нітратів і нітритів (NO_x) [14], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], окисномодифікованих білків (ОМБ) [5], активність супероксиддисмутази (СОД) [11], каталази (КТ) [4] та вміст відновленого глутатіону (ГSH) [17]. У плазмі крові також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидну активність (ЗАА) [15].

Результати виражали як середнє±SEM з 10 експериментів. Зміни $p < 0,05$ розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У попередній роботі [8] ми показали, що оксидативний і нітрооксидативний стрес відіграє важливу роль у патогенезі пародонтиту, викликаного ендотоксинами грамнегативної мікрофлори, про що свідчить достовірне зростання вмісту в плазмі крові й пародонті щурів, яким вводили ЛПС, нітритів і нітратів, ТБК-АП та ОМБ, а також зниження активності СОД, КТ і рівня ГSH у тканинах ясен. Як видно з результатів, наведених у таблиці, якщо пародонтит розвивався на фоні цукрового діабету, практично всі показники, що характеризували активність окиснювальних процесів, достовірно погіршувалися. Так, у тварин 3-ї групи вміст ТБК-АП у плазмі крові зростав в 1,3 раза порівняно з аналогічним показником у щурів 2-ї групи, а в тканинах пародонта – в 1,2 раза. Іншим важливим параметром, що характеризує активність утворення вільних радикалів у тканинах, є ступінь окисної модифікації білків. Інтенсивність даного процесу оцінювали за вмістом у тканинах альдегідо-

і кетоніпохідних, що утворювалися при дії активних радикалів на амінокислотні залишки в молекулах білків. Вміст у плазмі крові 2,4-динітрофенілгідразонів, які визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетоніпохідних нейтрального характеру), і тих, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетоніпохідні основного характеру), підвищувався у групі тварин з пародонтитом на фоні гепатиту в 2,6–2,7 раза порівняно з тваринами, в яких моделювали пародонтит без гепатиту. В тканинах ясен щурів 3-ї групи обидва показники також достовірно (в 1,4–1,5 раза) зростали порівняно з такими у тварин 2-ї групи.

Одним із факторів, що визначають інтенсивність вільнорадикальних реакцій у біологічних тканинах, є стан системи антиоксидного захисту. З даних літератури відомо, що як при пародонтиті, так і при діабеті функціонування антиоксидної системи суттєво пригнічується [3, 7, 12]. Очевидно, саме цим можна пояснити отримані нами дані, які свідчать про те, що в щурів з пародонтитом, що розвивався на фоні цукрового діабету, порушення функціонування антиоксидної системи набагато більше виражені, ніж у тварин, яким вводили тільки ЛПС. Зокрема, активність СОД зменшилася в тканинах ясен щурів 3-ї групи, порівняно з 2-ю, в 1,5 раза, а активність КТ – у 2,1 раза. У плазмі крові спостерігали тенденцію до зниження вмісту ГSH після введення ЛПС на фоні хронічного гепатиту порівняно з відповідним показником у щурів, яким вводили тільки ЛПС, а загальна антиоксидна активність плазми крові зменшувалася в 1,3 раза.

Вищеописані результати дозволяють стверджувати, що оксидативний стрес є одним з тих фундаментальних механізмів, що відіграють важливу роль у патогенезі запалення ясен, викликаного токсинами грамнегативної мікрофлори. Особливо активізуються вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта за умов, коли токсична дія ліпополісахариду відбувається на тлі цукрового діабету.

З даних літератури відомо, що при запальних процесах у пародонті зростає експресія iNOS [10, 19]. Раніше ми також показали, що при пародонтиті достовірно підвищувався вміст продуктів обміну NO – нітритів і нітратів – у крові й тканинах пародонта і що даний показник особливо різко зростав при моделюванні пародонтиту на фоні дії гепатотропної некрозогенної отрути алілового спирту [12]. Результати даної роботи свідчать про те, що інсулінозалежний цукровий діабет також впливав на продукцію NO при дії токсину грамнегативної мікрофлори на тканини пародонта. У

Таблиця – Вплив аміногуанідину на показники інтенсивності оксидативного і нітрооксидативного стресу в плазмі крові й тканинах ясен щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні цукрового діабету

Показник	Група тварин			
	контроль	пародонтит	пародонтит+діабет	пародонтит+діабет+аміногуанідин
Плазма крові				
NO _x , ммоль/л	2,64±0,12	3,60±0,15*	4,27±0,20*#	3,10±0,26†
ТБК-АП, мкмоль/л	46,78±2,24	56,90±2,45*	72,39±5,02*#	62,3±3,25†
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	0,80±0,05	0,88±0,06	2,35±0,18*#	1,65±0,11†
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	0,55±0,03	0,80±0,07*	2,08±0,15*#	1,30±0,10†
КТ, мкат/л	0,47±0,02	0,60±0,03*	0,67±0,04*	0,62±0,04
ЦП, г/л	0,28±0,01	0,20±0,04	0,20±0,02*	0,26±0,01†
GSH, ммоль/л	2,90±0,10	2,75±0,25	2,12±0,17*	2,55±0,17†
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	54,30±3,12	45,30±2,10	35,32±2,15*#	44,40±2,05†
Тканини пародонта				
NO _x , ммоль/кг	0,92±0,07	1,28±0,08*	1,74±0,11*#	1,04±0,15†
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,63±0,16	3,80±0,15*	4,54±0,21*#	3,55±0,10†
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	3,70±0,22	6,35±0,42*	9,40±0,50*#	6,70±0,50†
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	2,85±0,19	5,84±0,45*	8,35±0,62*#	5,82±0,35†
СОД, од.	0,23±0,01	0,15±0,01*	0,10±0,008*#	0,17±0,02†
КТ, мкат/мг білка	1,07±0,08	1,25±0,15	0,59±0,02*#	1,02±0,08†
GSH, ммоль/кг	175,27±9,58	110,70±8,18*	97,73±5,18*	125,5±12,6†

Примітки:

- 1) * – зміни достовірні порівняно з контролем;
- 2) # – зміни достовірні порівняно з показниками тварин з пародонтитом;
- 3) † – зміни достовірні порівняно з показниками тварин з пародонтитом на фоні діабету.

тварин 3-ї групи вміст NO_x у плазмі крові зростає, порівняно з аналогічним показником у щурів 2-ї групи, в 1,2 раза. Ще більшою мірою (в 1,4 раза) даний показник підвищувався в тканинах пародонта тварин, яким вводили ЛПС на фоні діабету. Різне зростання рівня NO_x при дії ЛПС на фоні діабету можна пояснити тим фактом, що за дії стрептозотоцину утворюються ендотоксини, що стимулюють вироблення цитокінів, які здатні стимулювати iNOS, в тому числі й у пародонті.

Отже, можна стверджувати, що не тільки оксидативний стрес, але і порушення обміну NO, зокрема гіперекспресія індукцибельної NO-синтази в пародонті, є однією з ключових ланок патогенезу пародонтиту, що розвивається на фоні цукрового діабету. Виходячи з таких міркувань, патогенетично обґрунтованим можна вважати застосування препаратів, які б селективно інгібували індукцибельну форму NO-синтази за такої патології. Як свідчать наведені в таблиці дані, введення тваринам аміногуанідину протягом 2-х тижнів достовірно (в 1,5 раза) знижувало рівень NO_x в плазмі крові та в 1,7 раза в пародонті порівняно з групою щурів з пародонтитом на фоні діабету, яким корекцію не проводили. Відомо, що гіперпродукція NO призводить до активації вільнорадикальних реакцій у тканинах та розвитку запального процесу. Тому, очевидно, саме попередженням вироблення надмірної

кількості NO за допомогою аміногуанідину можна пояснити отримані нами дані, що свідчать про достовірне зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації в досліджуваних тканинах. Зокрема, вміст ТБК-АП у плазмі крові щурів, які піддавалися корекції, зменшувався в 1,2 раза, а в пародонті – в 1,3 раза. Введення аміногуанідину позитивно вплинуло також на параметри, що відображали ступінь окисної модифікації білків. Як у плазмі крові, так і в пародонті тварин 4-ї групи рівень альдегідо- та кетонпохідних нейтрального і кислого характеру був у середньому в 1,4–1,5 раза меншим, ніж такий у щурів 3-ї групи. Очевидно, попередження під впливом аміногуанідину надмірної активації вільнорадикальних процесів запобігало виснаженню системи антиоксидного захисту і було причиною отриманих нами результатів, що свідчать про позитивний ефект інгібітора iNOS на активність СОД, КТ, вміст ЦП та GSH, а також ЗАА плазми крові щурів з пародонтитом на фоні хронічного гепатиту.

ВИСНОВОК. Інтенсивність окиснювальних процесів при ліпополісахаридному запаленні тканин пародонта суттєво підвищується за умов супутнього інсулінозалежного цукрового діабету. Селективний інгібітор iNOS аміногуанідин ефективно запобігає гіперактивації вільнорадикальних процесів при пародонтиті на фоні діабету.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
3. Косенко К. Н. Показатели свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в ротовой жидкости больных генерализованным пародонтитом разных возрастных групп / К. Н. Косенко, Б. Б. Седлецкая, Т. П. Терешина // Вісн. стоматол. – 2004. – № 4. – С. 27–30.
4. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
5. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І. Ф. Мещишен // Буковинський мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.
6. Мороз К. А. Стан пероксидної окисації ліпідів і системи антиоксидантного захисту у хворих на генералізований пародонтит в умовах цукрового виробництва / К. А. Мороз // Експерим. клін. фізіол. біох. – 2004. – № 3. – С. 87–90.
7. Плотникова В. Г. Влияние лизоцимсодержащих препаратов на прооксидантно-антиоксидантный статус крыс при экспериментальном пародонтите / В. Г. Плотникова, О. А. Макаренко // Вісн. стоматол. – 2006. – № 2. – С. 20–25.
8. Сопотницька В. В. Корекція ліпофлавоном порушень окислювальних процесів при пародонтиті / В. В. Сопотницька, М. М. Корда // Мед. хімія. – 2012. – 14, № 4. – С. 44–48.
9. Фартушна А. М. NO-залежні зміни окиснювального метаболізму у тканинах ясен білих щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / А. М. Фартушна, В. О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2012. – 16, № 3–4. – С. 48–51.
10. Чайковська І. В. Роль порушень метаболізму оксиду азоту в патогенезі генералізованого пародонтиту // Арх. клін. експерим. мед. – 2008. – 17, № 2. – С. 226–228.
11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
12. Щерба В. В. Патогенетичні особливості перебігу пародонтиту на фоні хронічного гепатиту / В. В. Щерба, М. М. Корда // Мед. хімія. – 2012. – 14, № 2. – С. 64–68.
13. Amano A. Cardiovascular diseases and periodontal diseases / A. Amano, H. Inaba // Clin. Calcium. – 2012. – 22, № 1. – P. 43–48.
14. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media / L. Ridnour, J. E. Sim, M. Hayward [et al.] // Anal. Biochem. – 2000. – 281. – P. 223–229.
15. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp, I. L. Dormandy // Clin. Sci. and Mol. Med. – 1974. – 47. – P. 215–222.
16. Banerjee M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes / M. Banerjee, M. Saxena // Clin. Chim. Acta. – 2012. – 16, № 413. – P. 1163–1170.
17. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.
18. Herring M. E. Periodontal disease and control of diabetes mellitus / M. E. Herring, S. K. Shah // J. Am. Osteopath. Assoc. – 2006. – 106, № 7. – P. 416–421.
19. Lipid A-associated proteins from *Porphyromonas gingivalis* stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase / E. Y. Choi, Y. M. Hwang, J. Y. Lee [et al.] // J. Periodontal. Res. – 2007. – 42, № 4. – P. 350–360.
20. Nagata T. Relationship between diabetes and periodontal disease / T. Nagata // Clin. Calcium. – 2009. – 19, № 9. – P. 1291–1298.
21. Noack B. Metabolic diseases and periodontitis / B. Noack, S. Fischer // Dtsch. Med. Wochenschr. – 2012. – 137, № 22. – P. 1155–1157.
22. Relationship diabetes mellitus-periodontal disease: etiology and risk factors / L. Foia, V. Toma, D. Ungureanu [et al.] // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. – 2007. – 111(3). – P. 748–753.
23. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis / N. G. Chavarry, M. V. Vettore, C. Sansone, A. Sheiham // Oral. Health. Prev. Dent. – 2009. – 7(2). – P. 107–127.

Г. Б. Колодницька, В. М. Коропчук, М. М. Корда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ iNOS ПРИ ВОСПАЛЕНИИ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Резюме

Исследовано влияние сахарного диабета 1-го типа на течение липополисахаридного воспаления тканей пародонта у крыс. Липополисахаридный пародонтит сопровождался активацией iNOS (в крови и ткани

пародонта возрастало содержание NO_x) и окислительных процессов (увеличивался уровень ТБК-активных продуктов и окислительно-модифицированных белков, подавлялась антиоксидантная система). У крыс, у которых воспаление пародонта моделировали на фоне стрептозотоцинового сахарного диабета, окислительные процессы были значительно более выражены, чем у животных без диабета. Применение селективного ингибитора iNOS аминоганидина достоверно предупреждало явления оксидативного и нитрооксидативного стресса у животных с пародонтитом на фоне диабета.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, диабет, окислительные процессы, аминоганидин.

H. B. Kolodnytska, V. M. Koropchuk, M. M. Korda
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

PATHOGENETIC GROUNDING OF iNOS INHIBITION EXPEDIENCY IN THE INFLAMMATION OF PARODONTAL TISSUES ON THE BACKGROUND OF DIABETES MELLITUS

Summary

The effect of 1 type diabetes mellitus on the course of lipopolysaccharide inflammation of parodontal tissues in rats was studied. Lipopolysaccharide parodontitis was accompanied by activation of iNOS (the NO_x level in blood and parodontal tissue was increased) and oxidative processes (levels of TBA-active products and oxidative modified proteins were increased, antioxidant system was suppressed). In rats with parodontal inflammation modeled on the background of streptozotocin induced diabetes oxidative processes were more significantly pronounced than in animals without diabetes. The use of selective inhibitor of iNOS aminoguanidine markedly prevented the oxidative and nitrooxidative stress in animals with parodontitis on the background of diabetes mellitus.

KEY WORDS: parodontitis, diabetes mellitus oxidative processes, aminoguanidine.

Отримано 05.12.12

Адреса для листування: Г. Б. Колодницька, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.