

ПЕРЕБІГ ЛІПОПОЛІСАХАРИДНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЯСЕН ПРИ ІНСУЛІНОЗАЛЕЖНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Метою роботи було дослідити, як супутній інсулінозалежний цукровий діабет впливає на перебіг ліпополісахаридного запалення тканин пародонта. Дослідження проведено на білих щурах, яким у слизову оболонку ясен вводили ліпополісахарид. Цукровий діабет викликали стрептозотоцином. Ліпополісахаридне запалення тканин ясен супроводжувалося оксидативним та нітрооксидативним стресом (у тканинах пародонта і крові зростав вміст NO_x , ТБК-активних продуктів та окисномодифікованих білків). Активність супероксиддисмутази знижувалася в тканинах пародонта, активність каталази суттєво не змінювалася в пародонті й дещо підвищувалася у плазмі крові, а вміст церулоплазміну зменшувався в крові. Спостерігалось також суттєве зменшення вмісту відновленого глутатіону в обох тканинах. Загальна антиоксидантна активність крові мала виражену тенденцію до зниження. У тварин з пародонтитом, що розвивався на фоні цукрового діабету, явища оксидативного та нітрооксидативного стресу були значно більш вираженими, ніж у щурів, яким стрептозотоцин не вводили. Також при поєднаній патології достовірно сильніше погіршувалися показники антиоксидантної системи. Розуміння патогенезу запалення тканин пародонта, асоційованого з цукровим діабетом, необхідне для розробки правильних профілактичних і терапевтичних методів у таких пацієнтів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: запалення тканин ясен, цукровий діабет, оксидативний та нітрооксидативний стрес.

ВСТУП. Запальні захворювання тканин пародонта є однією з найважливіших проблем сучасної стоматології. Понад 50 % дорослого населення Європи мають симптоми гінгівіту, 35 % – тієї або іншої форми пародонтиту. Доведено взаємозв'язки між захворюваннями пародонта і соматичною патологією. Одне з провідних місць у патології людини за своїм соціальним і медичним значенням займає цукровий діабет, що характеризується неухильною тенденцією до зростання захворюваності, тяжкістю лікування і серйозним прогнозом. Літературні дані підтверджують, що цукровий діабет є фактором ризику запальних захворювань ротової порожнини [6, 12, 15, 19-21]. Механізми, що лежать в основі впливу діабету на патогенез гінгівіту чи пародонтиту, особливості перебігу поєднаної патології, можливості корекції порушень метаболізму на сьогодні все ще потребують детальнішого вивчення. Крім того, існують прямі й непрямі докази, які підтримують концепцію, що пародонтна інфекція негативно впливає на глікемічний контроль у людей з діабетом [16-18]. Відомо, що основну пародонтопатогенну роль відіграють анаеробні грамнегативні мікроорганізми. Дослідження вмісту пародонтальних

© Г. Б. Колодницька, М. М. Корда, 2011.

кишень показало переважання в них саме анаеробної мікрофлори. Усе вищенаведене визначає актуальність дослідження патогенетичних аспектів розвитку запальних захворювань пародонта, асоційованих з цукровим діабетом. Перебіг будь-яких запальних захворювань, у тому числі й тканин пародонта, тісно пов'язаний з порушеннями захисних систем організму, зокрема системи імунного й антиоксидантного захисту, а також з розвитком оксидативного та нітрооксидативного стресу. Тому оцінка стану імунної та антиоксидантної систем, процесів вільнорадикального окиснення і системи оксиду азоту набуває важливого значення як у вивченні механізмів формування, так і в розробці методів лікування запалення тканин пародонта на фоні цукрового діабету.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті біохімічні механізми розвитку запалення в тканинах ясен, викликаного токсинами грамнегативної мікрофлори, при стрептозотоциновому діабеті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 32 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартній дієті. Всіх тварин поділили на 4 групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – тварини, в яких

викликали запалення тканин ясен (щоденно протягом 7 днів вводили в слизову оболонку ясен по 20 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду *E. Coli* (ЛПС)); 3-тя – щури, в яких викликали інсулінозалежний цукровий діабет шляхом одноразового внутрішньочеревного введення стрептозотоцину в дозі 45 мг/кг; 4-та – ліпополісахарид+стрептозотин. Для підтвердження цукрового діабету в цільній крові щурів у динаміці визначали вміст глюкози за допомогою портативного глюкометра. На 7-му добу від початку введення ліпополісахариду і на 30-ту добу з моменту введення стрептозотоцину тварин, рівень глюкози в яких був у межах 12–18 ммоль/л, декапітували під тіопенталовим наркозом. У гомогенаті тканин пародонта та крові визначали рівень нітратів і нітритів (NO_x) [10], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1] та окисномодифікованих білків (ОМБ) [5], активність антиоксидних ферментів супероксиддисмутази (СОД) [9], каталази (КТ) [4] та вміст відновленого глутатіону (GSH) [13]. У плазмі крові також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидну активність (ЗАА) [11].

Результати виражали як середнє+SEM з 8 експериментів. Зміни $p < 0,05$ розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для оцінки інтенсивності процесів ліпопероксидації ми визначали вміст у тканинах речовин радикальної деградації ліпідів – ТБК-активних продуктів. Надмірне утворення вільних радикалів призводить також до окисної модифікації білків. Про інтенсивність даного процесу судили за вмістом у плазмі крові альдегідо- і кетоніохідних, що утворюються при дії активних радикалів на амінокислотні залишки в молекулах білків. Як видно з таблиці, введення в слизову ясен ЛПС протягом 7 днів призводило до достовірного зростання вмісту ТБК-активних продуктів як у плазмі крові (в 1,2 раза), так і в тканині пародонта (в 1,4 раза). Активність ліпопероксидних реакцій була підвищеною також у крові тварин, в яких моделювали інсулінозалежний діабет. Введення щурам ЛПС викликало окисну модифікацію як нейтральних, так і лужних амінокислот. Через 7 днів після початку введення ЛПС вміст у тканинах пародонта 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетоніохідних нейтрального характеру), підвищився в 1,7 раза порівняно зі здоровими тваринами, а таких, що визнача-

лися при 430 нм (альдегідо- і кетоніохідні основного характеру), зріс в 2,1 раза. У плазмі крові достовірно збільшувався тільки показник вмісту альдегідо- і кетоніохідних основного характеру. Разом із тим, у щурів зі стрептозотоциновим діабетом окисна модифікація білків була особливо виражена в плазмі крові (вміст ОМБ_{310} і ОМБ_{430} зростав, відповідно, у 2,3 і 2,4 раза), а в тканинах пародонта зміни вмісту окисномодифікованих білків виявилися недостовірними. Проте найбільшою мірою явища оксидативного стресу проявилися в щурів, у яких моделювали ліпополісахаридне запалення ясен на фоні цукрового діабету. В цієї групи тварин, порівняно з інтактними щурами, активність процесів ліпопероксидації зростала в 1,5 раза в крові та в 1,7 раза в тканинах пародонта. Концентрація модифікованих вільними радикалами білків під впливом ЛПС і стрептозотоцину підвищувалася більше як у 3 рази в крові й понад у 2,5 раза в яснах щурів.

Отже, можемо 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 в умовах, коли токсична дія ліпополісахариду відбувається на тлі інсулінозалежного цукрового діабету.

Дослідження останніх років у сфері патологічної фізіології і біохімії переконливо довели, що в організмі широкий спектр біорегуляторної дії проявляє оксид азоту. Відомо, що при запальному процесі у тканинах ясен спостерігається постійний вміст високоактивної індукцибельної синтази оксиду азоту, що сприяє збільшенню синтезу NO в пародонті [8]. Як випливає з результатів, наведених у таблиці, введення в слизову ясен ЛПС підвищувало вміст нітритів і нітратів у крові й тканинах пародонта в 1,4 раза. Сам стрептозотин не викликав зростання вмісту NO_x у досліджуваних тканинах, проте моделювання ліпополісахаридного запалення ясен на фоні цукрового діабету спричиняло різке збільшення продукції оксиду азоту (вміст нітритів і нітратів у крові зріс в 1,6 раза, а в тканинах ясен – в 1,9 раза). У цьому контексті можна припустити, що порушення обміну NO , поряд з оксидативним стресом, є однією з ключових ланок в патогенетичних побудовах у тварин із запальними процесами ясен, що перебігають на фоні цукрового діабету. Індукцибельна NO -синтаза не відрізняється постійним вмістом у клітинах, а синтезується при патологічних станах, зокрема під впливом бактеріальних ліпополісахаридів.

харидів, ендотоксинів, цитокінів та інших факторів, що активують також процеси вільнорадикального окиснення. Надмірне утворення NO, що має місце при стимуляції iNOS ендотоксинами мікрофлори, призводить до посиленого утворення пероксинітриту і, як наслідок, до нітрооксидативного стресу. NO також може виконувати корисну функцію при пародонтиті, виступаючи неспецифічним фактором захисту від бактерій. Вироблення макрофагами NO при пародонтиті сприяє разом з іншими радикалами реакціям фагоцитозу. Першорядну роль у продукуванні NO через стимуляцію індукцибельної NO-синтази відіграють ясенні нейтрофіли і фібробласти [14]. Дефіцит NO сприяє розмноженню збудників у тканинах пародонта, що супроводжується обтяженням патологічного процесу і його хронізацією.

Було також показано, що при пародонтиті відбуваються виражені порушення системи антиоксидного захисту в біологічних рідинах ротової порожнини [3, 7]. З метою дослідження впливу ЛПС і стрептозотоцину на функціональний стан антиоксидної системи ми визначали активність каталази і супероксиддисмутази, вміст церулоплазміну і відновленого глутатіону та загальну антиоксидну активність плазми крові. Як показали результати наших експериментів, ураження пародонта токсином грамнегативної мікрофлори супроводжувалось глибокими порушеннями антиоксидної системи. Так, на 7-му добу після введення токсину

активність одного з основних антиоксидних ферментів організму – СОД, що відповідає за знешкодження супероксиданіонрадикала і тим самим блокує ланцюг ліпопероксидації ще на стадії ініціації, зменшилася в тканинах ясен більше ніж в 1,5 раза. Активність КТ достовірно не змінювалася у цієї групи тварин, а вміст ГSH знижувався в 1,6 раза. Необхідно відмітити, що цукровий діабет не супроводжувався достовірними змінами показників антиоксидної системи у тканинах пародонта. У плазмі крові після введення ЛПС активність КТ неочікувано підвищувалася (в 1,3 раза), вміст ЦП і ГSH у крові, а також загальна антиоксидна активність плазми крові мали тенденцію до зниження. У щурів з діабетом мало місце достовірне зменшення тільки концентрації відновленого глутатіону в плазмі крові. У тканинах пародонта сам стрептозотцин не викликав суттєвих змін досліджуваних показників антиоксидної системи. Максимальні зміни показників функціонування антиоксидної системи зафіксовано у тварин з ліпополісахаридним запаленням на тлі цукрового діабету. В цьому випадку вміст ГSH і ЦП у плазмі крові зменшувалася в 1,4 раза, а загальна антиоксидна активність плазми – більше ніж в 1,5 раза. Разом із тим, активність КТ у крові зростала в 1,4 раза. Різко знижувались активність СОД (у 2,3 раза) і вміст ГSH у пародонті (в 1,8 раза). Таким чином, можна дійти висновку, що оксидативний стрес, який відіграє фундамен-

Таблиця – Показники оксидативного і нітрооксидативного стресу в плазмі крові й тканинах пародонта щурів з ліпосахаридним запаленням пародонта на фоні цукрового діабету

Показник	Група тварин			
	Показник			
	Контроль	ЛПС	Стрептозотцин	ЛПС+стрептозотцин
Плазма крові				
NO _x , ммоль/л	2,64±0,12	3,60±0,15*	2,45±0,15	4,27±0,20*#
ТБК-АП, мкмоль/л	46,78±2,24	56,90±2,45*	59,70±3,20*	72,39±5,02*#
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	0,80±0,05	0,88±0,06	1,80±0,12*	2,35±0,18*#
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	0,55±0,03	0,80±0,07*	1,30±0,09*	2,08±0,15*#
КТ, мкат/л	0,47±0,02	0,60±0,03*	0,52±0,03	0,67±0,04*
ЦП, г/л	0,28±0,01	0,20±0,04	0,24±0,03	0,20±0,02*
ГSH, ммоль/л	2,90±0,10	2,75±0,25	2,02±0,14*	2,12±0,17*
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	54,30±3,12	45,30±2,10	47,35±3,18	35,32±2,15*#
Тканини пародонта				
NO _x , ммоль/кг	0,92±0,07	1,28±0,08*	0,98±0,06	1,74±0,11*#
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,63±0,16	3,80±0,15*	2,81±0,25	4,54±0,21*#
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	3,70 ± 0,22	6,35 ± 0,42*	4,10 ± 0,35	9,40 ± 0,50*#
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	2,85 ± 0,19	5,84 ± 0,45*	2,95 ± 0,18	8,35 ± 0,62*#
СОД, од.	0,23±0,01	0,15±0,01*	0,20±0,009	0,10±0,008*#
КТ, мкат/мг білка	1,07±0,08	1,25±0,15	0,95±0,06	0,59±0,02*#
ГSH, ммоль/кг	175,27±9,58	110,70±8,18*	150,20±8,50	97,73±5,18*

Примітка. * – різниця достовірна порівняно з контролем; # – різниця достовірна порівняно з групою тварин, яким вводили ліпополісахарид.

тальну роль у патогенезі запальних захворювань тканин ясен, що виникають під впливом токсинів грамнегативної мікрофлори на фоні інсулінозалежного цукрового діабету, великою мірою детермінується порушеннями функціонування системи антиоксидного захисту організму.

ВИСНОВОК. У патогенезі запалення тканин ясен, викликаного токсином грамнегативної мікрофлори ліпополісахаридом, важлива роль належить оксидативному та нітрооксидативному стресу. Перебіг ліпополісахаридного запалення суттєво погіршується при інсулінозалежному цукровому діабеті.

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. Мохорт О. М. Особенности комплексного лечения генерализованного пародонтита у больных на сахарный диабет : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук / О. М. Мохорт. – К., 2000. – 19 с.
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. Чайковська І. В. Роль порушень метаболізму оксиду азоту в патогенезі генералізованого пародонтиту / І. В. Чайковська // Арх. клін. експерим. мед. – 2008. – 17(2). – С. 226–228.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Diabetes mellitus as a risk factor for periodontitis / F. Cairo, R. Rotundo, G. Frazzingaro [et al.] // Minerva. Stomatol. – 2001. – 50(9-10). – P. 321–330.
13. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.
14. Evaluation of the activity of leukocytes during experimental periodontitis in the monkey / G. Gagnot, J. F. Michel, E. Legall [et al.] // J. Biol. Buccale. – 1988. – 16(1). – P. 25–30.
15. Feher D. Neurogenic inflammation of gingivomucosal tissue in streptozotocin-diabetic rat / D. Feher, A. Gyorffi, A. Fazekas // Arch. Physiol. Biochem. – 2001. – 109(3). – P. 230–233.
16. Garofalo G. S. Relationships between diabetes mellitus and periodontal disease: current knowledges and therapeutic prospects / G. S. Garofalo // Clin. Ter. – 2008. – 159(2). – P. 97–104.
17. Herring M. E. ah Periodontal disease and control of diabetes mellitus / M. E. Herring, S. K. Sh // J. Am. Osteopath. Assoc. – 2006. – 106(7). – P. 416–421.
18. Nagata T. Relationship between diabetes and periodontal disease / T. Nagata // Clin. Calcium. – 2009. – 19(9). – P. 1291–1298.
19. Pathogenic aspects of the periodontal disease associated to diabetes mellitus / C. Alves, J. Andion, M. Brandao, R. Menezes // Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. – 2007. – 51(7). – P. 1050–1057.
20. 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.
21. 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.

ТЕЧЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЕСЕН ПРИ ИНСУЛИНОЗАВИСИМОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Резюме

Целью работы было исследовать, как сопутствующий инсулинозависимый сахарный диабет влияет на течение липополисахаридного воспаления тканей пародонта. Исследование проведено на белых крысах, которым в слизистую оболочку десен вводили липополисахарид. Сахарный диабет вызывали стрептозоточином. Липополисахаридное воспаление тканей десен сопровождалось оксидативным и нитрооксидативным стрессом (в тканях пародонта и крови возрастало содержание NO_x , ТБК-активных продуктов и окислительно-модифицированных белков). Активность супероксиддисмутазы снижалась в тканях пародонта, активность каталазы существенно не менялась в пародонте и несколько повышалась в плазме крови, а содержание церулоплазмينا уменьшалось в крови. Наблюдалось также существенное уменьшение содержания восстановленного глутатиона в обеих тканях. Общая антиоксидантная активность крови имела выраженную тенденцию к снижению. У животных с пародонтитом, который развивался на фоне сахарного диабета, явления оксидативного и нитрооксидативного стресса были значительно более выражены, чем у крыс, которым стрептозоточин не вводили. Также при сочетанной патологии достоверно сильнее ухудшались показатели антиоксидантной системы. Понимание патогенеза воспаления тканей пародонта, ассоциированного с сахарным диабетом, необходимо для разработки правильных профилактических и терапевтических методов у таких пациентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: воспаление тканей десен, сахарный диабет, оксидативный и нитрооксидативный стресс.

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

PECULIARITIES OF LIPOPOLYSACCHARIDE INFLAMMATION OF GUMS AT INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Summary

The aim of the study was to investigate how insulin dependent diabetes mellitus affects the lipopolysaccharide inflammation of periodontal tissue. The study was conducted on white rats. Lipopolysaccharide was injected into the mucous of the gums. Diabetes was caused by streptozotocin. Lipopolysaccharide inflammation of gum tissue was accompanied by oxidative and nitrooxidative stress (the content of NO_x , TBA-active products and oxidative-modified proteins in periodontal tissues and blood was increased). Superoxide dismutase activity decreased in the periodontal tissues, catalase activity did not change significantly in periodontium and slightly increased in plasma, and ceruloplasmin level decreased in the blood. There was also a significant decrease in reduced glutathione content in both tissues. Total antioxidant activity of blood had a pronounced downward trend. In animals with periodontitis, which developed on the background of diabetes, the oxidative and nitrooxidative stress was much more pronounced than in rats without streptozotocin. Also, in combined pathology the parameters of antioxidant system deteriorated much more noticeable. Understanding of the pathogenesis of periodontal tissue inflammation associated with diabetes is necessary for the development of appropriate preventive and therapeutic methods in such patients.

KEY WORDS: inflammation of gum tissue, diabetes mellitus, oxidative and nitrooxidative stress.

Отримано 05.09.11

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