

ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПЕГІЛЬОВАНОЇ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ПРИ ПАРОДОНТИТІ

Метою роботи було дослідити ефективність супероксиддисмутази, іммобілізованої на поліетиленгліколі, у формі апікацій на ясна при ліпополісахаридному запаленні тканин пародонта на фоні супутнього інсулінозалежного цукрового діабету. Дослідження проведено на білих щурах, яким у слизову оболонку ясен вводили ліпополісахарид. Цукровий діабет викликали стрептозоцином. Корекцію проводили шляхом апікацій на ясна розчину пегільованої супероксиддисмутази. Ліпополісахаридний пародонтит на фоні цукрового діабету супроводжувався значним зростанням у тканинах пародонта і крові вмісту NO_x , ТБК-активних продуктів та окисномодифікованих білків, пригніченням активності супероксиддисмутази, каталази, зниженням вмісту відновленого глутатіону, церулоплазмину і загальної антиоксидантної активності. Апікації на ясна пегільованої супероксиддисмутази значно зменшували явища оксидативного і нітрооксидативного стресу в пародонті й крові щурів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пародонтит, цукровий діабет, оксидативний та нітрооксидативний стрес, пегільована супероксиддисмутаза.

ВСТУП. За даними епідеміологічних досліджень, в останні роки спостерігається тенденція до зростання частоти захворювань пародонта серед населення різних регіонів світу. Поширеність пародонтиту в Україні становить 80 %, а в близько 100 % осіб віком понад 40 років виявляють патологічні зміни в тканинах ясен. Така висока поширеність пародонтитів, відсутність ефективних методів діагностики, профілактики та лікування, а також їх тісний взаємозв'язок із соматичною патологією загострюють актуальність цієї проблеми. Обширні дані підтверджують, що важливим фактором ризику запальних захворювань ротової порожнини є цукровий діабет [13–15]. Раніше нами було показано, що важливу роль у патогенезі викликаного ендотоксином грамнегативної мікрофлори пародонтиту, який розвивається на фоні інсулінозалежного цукрового діабету, відіграє оксидативний та нітрооксидативний стрес [3]. Тому для корекції доцільно застосовувати засоби, які були б здатні ефективно гальмувати реакції гіперпероксидації. Особливої уваги в цьому відношенні заслуговує фермент супероксиддисмутаза, яка здатна блокувати реакції вільнорадикального окиснення ще на стадії ініціації. Одним із шляхів підвищення ефективності лікарських препаратів білкової структури є хімічна модифікація їх молекули, що полягає у фізико-хімічній трансформації, яка досягається з'єднанням нативної молекули з поліетиленгліколем (ПЕГ). Даний процес з'єднання нативної

молекули лікарської форми з ПЕГ отримав назву "пегілювання". Подібна хімічна модифікація фармакологічних препаратів пептидної структури адресно направлена на поліпшення їх переносимості, зниження імуногенності, збільшення періоду їх напівжиття і, як наслідок, на значне підвищення якості проведеного лікування. Можна передбачити, що місцеве використання пегільованої форми супероксиддисмутази при пародонтиті мало б дати виражений позитивний ефект, проте даних про таку форму терапії запальних захворювань пародонта в літературі не виявлено.

Метою даної роботи було дослідити в експерименті ефективність місцевого застосування пегільованої форми супероксиддисмутази (ПЕГ-СОД) у вигляді апікацій при ліпополісахаридному пародонтиті, що розвивався на фоні цукрового діабету.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 40 безпородних щурах-самцях масою 150–180 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Усіх тварин поділили на 5 груп: 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 стрептозоцину в дозі 45 мг/кг; 4-та – тварини, в яких моделювали пародонтит і цукровий діабет;

5-та – щури з пародонтитом на фоні цукрового діабету, яким щодня протягом 7 днів проводили 10-хвилинну аплікацію на ясна пегільованої супероксиддисмутази (10 мг/мл). Для підтвердження цукрового діабету в крові щурів у динаміці визначали вміст глюкози за допомогою портативного глюкометра. На 8-му добу від початку введення ЛПС і на 31-шу добу з моменту введення стрептозотоцину щурів, рівень глюкози в яких був у межах 12–18 ммоль/л, декапітували під тіопенталовим наркозом. Після евтаназії щурів відокремлювали м'які тканини пародонта, з яких виготовляли гомогенати на 0,05 трис-буфері (рН=7,4). Усі маніпуляції з тканинами проводили на холоді. У гомогенаті тканин пародонта і крові визначали рівень нітратів та нітритів (NO_x) [10], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [1], окисно-модифікованих білків (ОМБ) [6], активність антиоксидних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) [9] і каталази (КТ) [5] та вміст відновленого глутатіону (ГSH) [12]. У плазмі крові також визначали вміст церулоплазміну (ЦП) [2] і загальну антиоксидну активність (ЗАА) [11].

Експерименти проведено з дотриманням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

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. Як свідчать дані, наведені в таблиці, ендотоксин грамнегативної мікрофлори ліпополісахарид викликав явища оксидативного і нітрооксидативного стресу в експериментальних тварин (вміст ТБК-активних продуктів як у плазмі крові, так і в тканині пародонта достовірно зріс, відповідно, в 1,2 і 1,4 раза; вміст у тканинах пародонта 2,4-динітрофенілгідразонів, що визначалися при 310 нм (відображає концентрацію альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру), підвищився в 1,7 раза порівняно зі здоровими тваринами, а таких, що визначалися при 430 нм (альдегідо- і кетонпохідні основного характеру), зріс в 2,1 раза; рівень нітритів і нітратів у крові й тканинах пародонта збільшився в 1,4 раза). Ураження пародонта ЛПС також супроводжувалося порушеннями функціонального стану антиоксидної системи (активність СОД зменшилася в тканинах ясен більше ніж в 1,5 раза, вміст ГSH знизився в 1,6 раза).

Особливо активізувалися вільнорадикальні процеси в тканинах пародонта за умов, коли

токсична дія ліпополісахариду відбувалася на фоні цукрового діабету. В цієї групи тварин, порівняно з інтактними щурами, активність процесів ліпопероксидації зросла в 1,5 раза в крові та в 1,7 раза у тканинах пародонта. Концентрація модифікованих вільними радикалами білків під впливом ЛПС і стрептозотоцину підвищилася більше як у 3 рази в крові й понад 2,5 раза в яснах щурів. Вміст нітритів і нітратів у крові зріс в 1,6 раза, а в тканинах ясен – в 1,9 раза. Вміст ГSH і ЦП у плазмі крові зменшився в 1,4 раза, а загальна антиоксидна активність плазми – більше ніж в 1,5 раза. Різко знизилась активність СОД (у 2,3 раза) і вміст ГSH у пародонті (в 1,8 раза).

Отже, можемо стверджувати, що оксидативний і нітрооксидативний стрес є тими фундаментальними механізмами, що відіграють провідну роль у патогенезі пародонтиту, викликаного ліпополісахаридом. До такого висновку дійшли й інші автори, які показали, що при пародонтиті відбуваються виражені порушення функціонального стану системи антиоксидного захисту в біологічних рідинях ротової порожнини [4, 7]. Явища гіперактивності окиснювальних процесів у пародонті особливо посилюються, коли токсини грамнегативної мікрофлори діють на фоні інсулінозалежного цукрового діабету.

Зважаючи на вищенаведені факти, логічно припустити, що застосування середників, здатних гальмувати вільнорадикальні процеси, могло б бути патогенетично обґрунтованим і ефективним методом лікування пародонтитів. Одним із найпотужніших антиоксидних ферментів в організмі є супероксиддисмутаза. З таблиці видно, що використання аплікацій пегільованої форми СОД протягом 7-ми днів призвело до достовірного (в 1,4 раза) зниження активності реакцій ліпопероксидації в пародонті порівняно з групою тварин з пародонтитом на фоні діабету, а також до пригнічення в 1,6–1,7 раза окисної модифікації білків у тканинах ясен. Деяко меншою мірою (в 1,3 раза) застосування ПЕГ-СОД викликало зменшення вмісту продуктів ліпопероксидації та окисної модифікації білків у плазмі крові. Законірно, що під впливом проведеної корекції активність ендогенної СОД у тканинах пародонта підвищилася в 1,6 раза. Спостерігалось також деяке покращення інших показників антиоксидної системи. Так, достовірно (в 1,4 раза) зросли вміст відновленого глутатіону й активність каталази у пародонті тварин 5-ї групи порівняно з відповідними показниками в щурів 4-ї групи. У плазмі крові під впливом ПЕГ-СОД також достовірно збільшувався вміст відновленого глутатіону.

Таблиця – Вплив місцевого застосування пегільованої супероксиддисмутази на вираження оксидативного і нітрооксидативного стресу при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні цукрового діабету ($M \pm m$; $n=8$)

Показник	Група тварин				
	Показник				
	контроль	ЛПС	стрептозо-тоцин	ЛПС+стрептозоцин	ЛПС+стрептозоцин+ПЕГ-СОД
Плазма крові					
NO _x , ммоль/л	2,64±0,12	3,60±0,15*	2,45±0,15	4,27±0,20*#	3,59±0,14*§
ТБК-АП, мкмоль/л	46,78±2,24	56,90±2,45*	59,70±3,20*	72,39± 5,02*#	55,06± 2,05§
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	0,80±0,05	0,88±0,06	1,80±0,12*	2,35± 0,18*#	2,20± 0,15*#
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	0,55±0,03	0,80±0,07*	1,30±0,09*	2,08±0,15*#	1,56±0,10*#§
КТ, мкат/л	0,47±0,02	0,60±0,03*	0,52±0,03	0,67±0,04*	0,58±0,04
ЦП, г/л	0,28±0,01	0,20±0,04	0,24±0,03	0,20±0,02*	0,25±0,01
GSH, ммоль/л	2,90±0,10	2,75±0,25	2,02±0,14*	2,12±0,17*	2,70±0,10§
ЗАА, % гальмування утворення ТБК-АП	54,30±3,12	45,30±2,10	47,35±3,18	35,32± 2,15*#	42,20± 2,16*
Тканини пародонта					
NO _x , ммоль/кг	0,92±0,07	1,28±0,08*	0,98±0,06	1,74±0,11*#	1,34±0,09*§
ТБК-АП, мкмоль/кг	2,63±0,16	3,80±0,15*	2,81±0,25	4,54±0,21*#	3,30±0,20§
ОМБ ₃₁₀ , мкмоль/мг білка	3,70±0,22	6,35± 0,42*	4,10±0,35	9,40±0,50*#	5,45±0,40*§
ОМБ ₄₃₀ , мкмоль/мг білка	2,85±0,19	5,84±0,45*	2,95±0,18	8,35±0,62*#	5,20±0,42*#§
СОД, од.	0,23±0,01	0,15±0,01*	0,20±0,009	0,10±0,008*#	0,16±0,009*§
КТ, мкат/мг білка	1,07±0,08	1,25±0,15	0,95±0,06	0,59±0,02*#	0,85±0,06§
GSH, ммоль/кг	175,27±9,58	110,70±8,18*	150,20±8,50	97,73±5,18*	135,70±8,10*§

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контрольною групою тварин; # – зміни достовірні порівняно з групою тварин з пародонтитом; § – зміни достовірні порівняно з групою тварин з пародонтитом і цукровим діабетом.

При запальному процесі у тканинах ясен спостерігається постійний вміст високоактивної індукцибельної синтази оксиду азоту, що сприяє збільшенню синтезу NO в пародонті [8]. До активації індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) можуть призвести різні фактори, в тому числі й збільшення кількості вільних радикалів кисню в клітині. Очевидно, саме цим фактом можна пояснити отриманий нами ефект зниження загального вмісту нітритів і нітратів у пародонті й крові під впливом ПЕГ-СОД. СОД, перехоплюючи супероксиданіон-радикали, запобігає ініціації ланцюга ліпопероксидації, тим самим попереджуючи гіперактивацію iNOS і надмірну продукцію NO в тканинах пародонта. Таким чином, можемо стверджувати, що використання пегільованої СОД у формі апікацій на ясна щурів, яким

вводили ЛПС на фоні цукрового діабету, призводить до зменшення явищ нітрооксидативного стресу в тканинах пародонта.

ВИСНОВКИ. 1. Токсин грамнегативної мікрофлори ліпополісахарид викликає оксидативний і нітрооксидативний стрес у тканинах пародонта. Інтенсивність продукції радикалів кисню та азоту суттєво підвищується на фоні інсулінозалежного цукрового діабету.

2. Застосування апікацій пегільованої форми супероксиддисмутази на ясна призводить до часткової нормалізації ліпопероксидних процесів, реакцій утворення оксиду азоту і функціонального стану антиоксидної системи у тканинах пародонта тварин з ліпополісахаридним пародонтитом і цукровим діабетом.

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. Колодницька Г. Б. Перебіг ліпополісахаридного запалення ясен при інсулінозалежному цукровому діабеті / Г. Б. Колодницька, М. М. Корда // Мед. хімія. – 2011. – 13, № 3. – С. 91–96.

4. 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.
5. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
6. Мещишен І. Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові /

І. Ф. Мешишен // Буковинський мед. вісн. – 1998. – 2, № 1. – С. 156–158.

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. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.

13. 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.

14. 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.

15. 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. Колодницкая, М. М. Корда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЕГИЛИРОВАННОЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

Резюме

Целью работы было исследовать эффективность пегилированной формы супероксиддисмутазы в форме аппликаций на десна при липополисахаридном воспалении тканей пародонта на фоне сопутствующего инсулинозависимого сахарного диабета. Исследование проведено на белых крысах, которым в слизистую оболочку десен вводили липополисахарид. Сахарный диабет вызывали стрептозотоцином. Коррекцию проводили путем аппликаций на десна раствора супероксиддисмутазы, иммобилизованной на полиэтиленгликоле. Липополисахаридный пародонтит на фоне сахарного диабета сопровождался значительным ростом в тканях пародонта и крови содержания NO_x , ТБК-активных продуктов и окислительно-модифицированных белков, угнетением активности супероксиддисмутазы, каталазы, снижением содержания восстановленного глутатиона, церулоплазмينا и общей антиоксидантной активности. Аппликации на десна пегилированной супероксиддисмутазы значительно уменьшали явления оксидативного и нитрооксидативного стресса в пародонте и крови крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, сахарный диабет, оксидативный и нитрооксидативный стресс, пегилированная супероксиддисмутаза.

Н. В. Kolodnytska, M. M. Korda

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY

PATHOGENETIC SUBSTANTIATION OF LOCAL ADMINISTRATION OF PEGYLATED SUPEROXIDE DISMUTASE AT PARODONTITIS

Summary

The aim of the study was to investigate the efficiency of superoxide dismutase, immobilized on polyethylene glycol, in the form of applications to gums in lipopolysaccharide inflammation of periodontal tissue with concomitant insulin dependent diabetes mellitus. Lipopolysaccharide was injected into the mucous of the gums of white rats. Diabetes was caused by streptozotocin. Correction was achieved by application of pegylated superoxide dismutase to the gums. Lipopolysaccharide parodontitis with concomitant diabetes was accompanied with significant increase of NO_x , TBA-active products and oxidation-modified proteins levels, inhibition of superoxide dismutase and catalase activities, decrease of the content of reduced glutathione, ceruloplasmin and total antioxidant activity in the periodontal tissues and blood. Applications to gums of the pegylated superoxide dismutase markedly reduced the oxidative and nitrooxidative stress in periodontium tissues and blood of rats.

KEY WORDS: parodontitis, diabetes, oxidative and nitrooxidative stress, pegylated superoxide dismutase.

Отримано 10.02.12

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