

УДК 616.314.18-002.4-031.81:17-002.3-007.17-02-092

Г. Б. Колодницька<sup>1</sup>  
 М. І. Калинський<sup>2</sup>  
 М. М. Корда<sup>1</sup>

Тернопільський державний медичний  
 університет ім. І.Я. Горбачевського,  
 Тернопіль, Україна<sup>1</sup>  
 Мюрейський державний університет,  
 Кентуккі, США<sup>2</sup>

**Ключові слова:** пародонтит,  
 цукровий діабет, лікопід.

## ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ЛІКОПІДУ ПРИ ПАРОДОНТИТІ НА ФОНІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

**Резюме.** Вивчено ефективність імуномодулятора лікопіду при ліпополісахаридному запаленні тканин пародонту на фоні супутнього інсулінозалежного цукрового діабету. Дослідження проведено на білих щурах, у яких моделювали пародонтит шляхом введення в тканини ясен бактеріального ліпополісахариду. Цукровий діабет викликали шляхом одноразового введення стрептозотоцину в дозі 45 мг/кг. Інтрагастральне введення лікопіду протягом 14 діб достовірно попереджувало продукцію прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$  і ІЛ-1 $\beta$ ), запобігало гіперактивації синтази оксиду азоту і підвищенню активності реакції окиснювальної модифікації білків у тканинах пародонту і пригнічувало деструктивні процеси в сполучній тканині (інтенсивність розпаду глікопротеїнів і протеогліканів та катаболізму колагену) у щурів з пародонтитом на фоні цукрового діабету. Зроблено висновок, що блокування продукції прозапальних цитокінів за допомогою лікопіду може бути перспективним методом лікування хворих на пародонтит, що розвивається на фоні супутнього цукрового діабету.

### Вступ

Запальні захворювання пародонту є однією з найбільш актуальних проблем стоматології [8, 15]. Основним етіологічним фактором пародонтиту вважаються грамнегативні анаеробні мікроорганізми, головним компонентом зовнішніх мембран яких є ліпополісахарид (ЛПС), що здатний індукувати сильну відповідь імунної системи.

Цукровий діабет за своїм соціальним і медичним значенням займає одне з провідних місць у загальній структурі захворюваності. Ряд даних літератури вказують, що цукровий діабет є вагомим фактором ризику розвитку запальних захворювань ротової порожнини [11, 12, 14].

Відомо, що важливу роль у розвитку запалення, зокрема, шляхом стимуляції індукцибельної форми синтази оксиду азоту (iNOS), відіграють інтерлейкіни [9, 10]. Було показано, що розлади продукції про- і антизапальних цитокінів мають місце також і при діабеті [7]. Надмірне утворення NO, що відбувається при стимуляції iNOS прозапальними цитокінами та ендотоксинами патогенної мікрофлори ротової порожнини, призводить до нітрооксидативного стресу, який, разом з активацією процесів ліпопероксидації і окиснювальної модифікації білків може викликати посилену дезінтеграцію компонентів сполучної ткани-

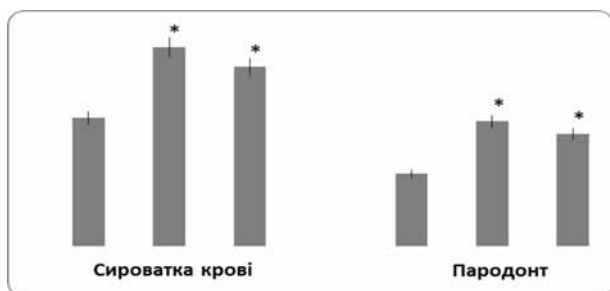
ни, що і зумовлює прогресування розвитку пародонтиту. Очевидно, що стратегія лікування запалення пародонту, поєднаного з діабетом, повинна будуватися з урахуванням вищенаведених патогенетичних механізмів. Логічно впливає, що потенційним позитивним ефектом у цьому випадку повинні володіти засоби, які б коригували гіперпродукцію прозапальних цитокінів у відповідь на дію ендотоксинів грамнегативної мікрофлори. Відомо, що імуномодулюючий препарат лікопід здатний викликати зниження біологічної активності прозапальних цитокінів. Даних про можливість використання лікопіду при запальних захворюваннях пародонту ми не виявили.

### Мета дослідження

Дослідити можливість корекції основних патогенетичних механізмів розвитку пародонтиту на фоні діабету за допомогою імуномодулятора лікопіду.

### Матеріал і методи

В експерименті використано 30 безпородних щурів-самців масою 160-180 г. Всіх тварин розподілили на 4 групи: 1-а – контроль (інтактні щури); 2-а – щури з пародонтитом на фоні цукрового діабету. У тварин цієї групи викликали цукровий діабет шляхом одноразового внутрішньочеревно-

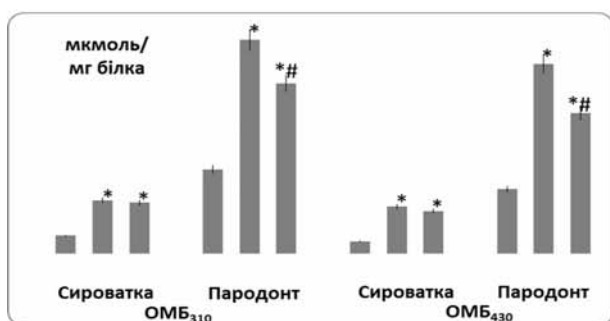


**Рис. 1.** Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові (мкмоль/л) і тканинах пародонта ( $\times 10^{-1}$  мкмоль/кг) щурів із ліпополісахаридним пародонтитом на фоні цукрового діабету при застосуванні лікопіду.

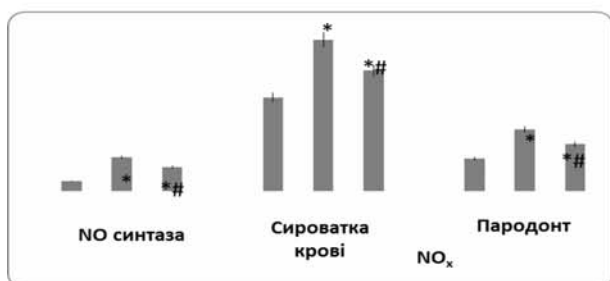
**Примітка.** Тут і в наступних рисунках цього розділу:

\* - зміни достовірні порівняно з показниками інтактних тварин; # - зміни достовірні порівняно з показниками тварин із пародонтитом на фоні цукрового діабету.

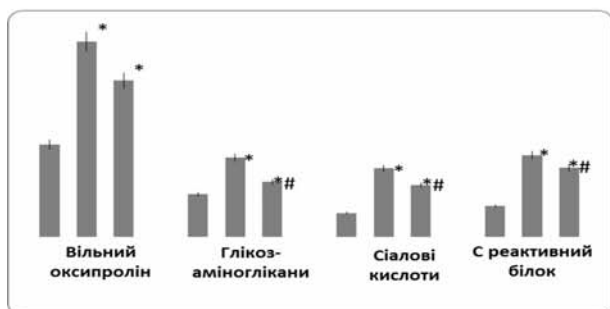
1 - контрольні щурі; 2 - тварини з пародонтитом на фоні цукрового діабету; 3 - тварини з пародонтитом на фоні цукрового діабету при застосуванні лікопіду



**Рис. 2.** Вміст окиснено модифікованих білків в сироватці крові (мкмоль/мг білка) і тканинах пародонта (мкмоль/мг білка) щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні цукрового діабету при застосуванні лікопіду



**Рис. 3.** Загальна активність NO синтази в тканинах пародонта (нмоль/мг білка $\times$ хв) і вміст нітратів і нітритів у сироватці крові (ммоль/л) і тканинах пародонта (ммоль/кг) щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні цукрового діабету при застосуванні лікопіду



**Рис. 4.** Вміст вільного оксипроліну (мкмоль/л), глікозаміногліканів ( $\times 10$  мкмоль/л), сіалових кислот (ммоль/л) і С-реактивного білка (мг/л) в сироватці крові щурів з ліпополісахаридним пародонтитом на фоні цукрового діабету при застосуванні лікопіду

го введення стрептозоцину в дозі 45 мг/кг. Починаючи з 30-ї доби після ін'єкції стрептозоцину тваринам протягом двох тижнів через день вводили в тканини ясен по 40 мікролітрів (1 мг/мл) ліпополісахариду E. Coli (ЛПС). Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози. В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози 12–18 ммоль/л; 3-а – щурі з пародонтитом на фоні діабету, яким, починаючи з 30-ї доби експерименту, паралельно з ЛПС щоденно протягом 14 діб вводили інтрагастрально імуномодулятор лікопід у дозі 0,5 мг/кг. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом на 15 добу від початку введення ЛПС і лікопіду. Для досліджень використовували гомогенат тканин пародонту та сироватку крові. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) в тканинах визначали за методом [2], окиснено-модифікованих білків (ОМБ) – за методом [1]. Сумарну активність NO синтази в тканині пародонту визначали за методом [13], загальний вміст нітратів і нітритів у сироватці крові і пародонті – за методом [6]. Визначення вмісту глікозаміногліканів у сироватці крові проводили за методом [4], вмісту вільного оксипроліну - за методом [5], вмісту сіалових кислот - за методом Гесса [3]. Для визначення вмісту С-реактивного білка у сироватці крові використовували метод латексаглютинації «СРБ-латекс-тест» за допомогою діагностичних наборів «Согма» (Польща). Для визначення рівня цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10) у сироватці використовували імуноферментний аналіз (набір реактивів фірми Vector Best, Новосибірськ, Росія). Абсорбцію проб вимірювали на апараті “Stat Fax Plus” відповідно до протоколу виробника.

Результати виражали як середнє $\pm$ SEM із 10 експериментів. Зміни  $P < 0.05$  розглядалися як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і критерій t Стьюдента.

### Обговорення результатів дослідження

На рисунку 1 показано вплив лікопіду на вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові і тканинах ясен щурів із пародонтитом і цукровим діабетом. Як можна побачити з наведених діаграм, корекція лікопідом не призвела до вираженого зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації у тканинах тварин з пародонтитом на фоні цукрового діабету, хоча тенденція до такого зниження і спостерігалася.

На рисунку 2 показано як застосування лікопіду впливає на вміст окиснено-модифікованих білків у сироватці крові із пародонти щурів з пародонтитом і цукровим діабетом. Як можна побачи-

ти, у коригованих тварин вміст у сироватці крові альдегідо- і кетонпохідних амінокислот як нейтрального, так і основного характеру не відрізнявся достовірно відносно групи уражених тварин без корекції. Отже, можемо стверджувати, що імунomodulatory не впливає ефективно на рівень окиснено-модифікованих білків у сироватці крові щурів із пародонтитом на фоні цукрового діабету.

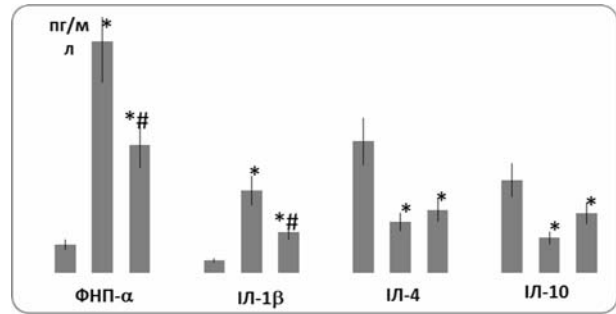
На відміну від сироватки крові, у тканинах пародонту інтрагастральне введення лікопіду виявилось ефективним в плані попередження вільнорадикального модифікування білків (рис. 2). Зокрема, при застосуванні імунomodulatory терапії показник вмісту альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру становив  $7,48 \pm 0,31$  мкмоль/мг білка, що було достовірно нижче (в 1,3 раза), ніж у некоригованих тварин, а показник рівня альдегідо- і кетонпохідних основного характеру -  $6,20 \pm 0,32$  мкмоль/мг білка, що також було достовірно нижче (в 1,3 раза), ніж у тварин, яким корекція не проводилася. Варто відмітити, що в обох випадках корекція не попереджувала повністю процеси окисної модифікації білків у пародонті і відповідні величини все ще залишалися достовірно підвищеними порівняно зі здоровими тваринами.

Оскільки в процесах запалення важливу роль відіграє фермент NO синтаза, зокрема, гіперекспресія індукцибельної форми даного ферменту під впливом цитокінів, було цікаво дослідити як імунomodulatory терапія впливає на функціонування системи оксиду азоту при пародонтиті на фоні цукрового діабету. З діаграм, наведених на рисунку 3 видно, що загальна активність NO синтази достовірно знижувалася порівняно з некоригованими тваринами при введенні лікопіду ( $0,68 \pm 0,03$  проти  $0,95 \pm 0,09$  нмоль/мг білка\*хв).

Практично пропорційно зі зміною активності NO синтази змінювався вміст нітратів і нітритів у сироватці і пародонті уражених щурів, яким проводили корекцію. При застосуванні лікопіду рівень  $\text{NO}_x$  в сироватці знизився до  $3,40 \pm 0,20$  ммоль/л, що було достовірно нижче, ніж у тварин, яким препарат не вводили. У тканинах пародонту лікованих імунomodulatory щурів вміст  $\text{NO}_x$  також знижувався достовірно і становив  $1,32 \pm 0,09$  ммоль/кг (рис. 3).

Отже, можемо констатувати, що терапія пародонтиту на фоні діабету імунomodulatory лікопідом позитивно відображається на показниках активності загальної NO синтази і вмісту нітратів і нітритів в сироватці крові і тканинах пародонту.

На рисунку 4 показано результати впливу лікопіду на основні показники, що характеризують стан сполучної тканини в уражених щурів. Як можна побачити, імунomodulatory суттєво не впливав на активність колагенлізу, про що свід-



**Рис. 5.** Вміст цитокінів (ФНП-α і ІЛ-1β:  $\times 10$  пг/мл; ІЛ-4 і ІЛ-10: пг/мл) у сироватці крові щурів із ліпололісахаридним пародонтитом на фоні цукрового діабету при застосуванні пегільованої супероксиддисмутази і лікопіду

чать недостовірні зміни вмісту вільного оксипроліну в лікованих тварин. На відміну від колагенлізу, імунomodulatory терапія призвела до пригнічення інтенсивності деструкції протеогліканів у щурів із поєднаною патологією (вміст глікозаміногліканів достовірно зменшувався (в 1,4 раза) порівняно зі щурами, яким корекція не проводилася). Ступінь деструкції інших важливих білків сполучної тканини – глікопротеїнів – у щурів з пародонтитом і діабетом також суттєво змінювався під впливом імунomodulatory (вміст сіалових кислот у сироватці становив  $7,10 \pm 0,51$  ммоль/л, що було на 25 % менше ( $P < 0,05$ ), ніж у некоригованих тварин). Про те, що імунomodulatory лікопід здатен пригнічувати запалення при пародонтиті на фоні діабету свідчить той факт, що даний препарат достовірно знижував рівень в крові чутливого індикатора ушкодження тканин при запаленнях і інфекціях – С-реактивного білка. У III групи щурів цей показник становив  $9,50 \pm 0,55$  мг/л, що було на 16 % менше ( $P < 0,05$ ), ніж у тварин II групи.

Відомо, що лікопід пригнічує утворення прозапальних цитокінів. Тому цікаво було дослідити вплив даного препарату на вміст про- і антизапальних цитокінів у крові тварин із пародонтитом на фоні діабету. Як видно з результатів, наведених на рисунку 5, введення лікопіду протягом 14 діб призвело до достовірного зниження (в 1,8 раза) рівня прозапального ФНП-α в сироватці крові щурів із поєднаною патологією (до  $160,4 \pm 15,5$  пг/мл). Рівень ще одного прозапального цитокіну ІЛ-1β, який різко зростає у сироватці щурів із пародонтитом на фоні діабету, також знижувався достовірно (в 2,0 рази) під впливом імунomodulatory терапії (до  $50,8 \pm 10,2$  пг/мл).

При використанні з метою корекції лікопіду спостерігалось деяке поліпшення показників антизапальних цитокінів (ІЛ-4 і ІЛ-10) у сироватці щурів з пародонтитом і діабетом, проте в обох випадках зміни виявилися недостовірними.

Отже, інтрагастральне введення лікопіду частково знижує продукцію прозапальних цитокінів

при ліпополісахаридному пародонтиті на фоні цукрового діабету. Очевидно, що саме це стало причиною зменшення активності NO синтази і вмісту метаболітів оксиду азоту в тканинах. Таке зниження інтенсивності нітрооксидативного стресу під впливом імуномодулюючої терапії, вірогідно, спричинило пригнічення активності процесів окиснювальної модифікації білків у тканинах пародонту і, як наслідок, призвело до зменшення інтенсивності реакцій дезінтеграції компонентів сполучної тканини.

### Висновок

Застосування імуномодулятора лікопіду частково пригнічує продукцію прозапальних цитокінів - ФНП- $\alpha$  і ІЛ-1 $\beta$ , запобігає розвитку оксидативного та нітрооксидативного стресу і позитивно відображається на стані сполучної тканини в щурів із діабетом, в яких викликали запалення пародонта ендотоксином грамнегативної мікрофлори ліпополісахаридом. Можна припустити, що лікопід може бути перспективним методом лікування хворих на пародонтит, що розвивається на фоні супутнього цукрового діабету.

### Перспективи подальших досліджень

У подальшому дослідження будуть спрямовані на вивчення комбінованого методу лікування хворих на пародонтит, що розвивається на фоні супутнього цукрового діабету, який буде складатись з комбінації «СОД+Аміногуанідин+Лікопід».

**Література.** 1. Мещишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен // Бук. мед. вісник. - 1998. - № 1. - С. 156-158. 2. 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. 3. Колб В. Г. Клиническая Биохимия / В. Г. Колб, В. С. Камышников - Минск : Ураджай, 1976. - 145 с. 4. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.И. Соловьева [и др.] // Лаб. дело. - 1987. - № 5. - С. 330-332. 5. Тетянец С.С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С.С. Тетянец // Лаб. дело. - 1985. - № 1. - С. 61-62. 6. 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 and other] // Anal. Biochem. - 2000. - 281. - P. 223-229. 7. Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients / [A. Al-Shukaili, S. Al-Ghafri, S. Al-Marhoobi and other] // Int. J. Endocrinol. - 2013. - 2013. - P. 1-7. 8. Clinical review: Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis / L. Nibali, N. Tatarakis, I. Needleman [and other] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2013. - 98, N 3. - P. - 913-920. 9. Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells / N. Rizzo, N. Bevilacqua, L. Guida [and other] // Cytokine. - 2012. - 60, N 1. - P. 197-204. 10. Expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\beta$ , and iNOS in pregnant women with periodontal disease / Otenio C.C., Fonseca L., Martins M.F. // Genet. Mol. Res. 2012. 911, N 4. P. 4468-4478. 11. Levine R.S. Obesity, diabetes and periodontitis - a triangular relationship? / R.S. Levine // Br. Dent. J. - 2013. - 215, N 1. - P. 35-39. 12. Leite R.S. Oral health and type 2 diabetes / R.S. Leite, N.M. Marlow, J.K. Fernandes // Am. J. Med. Sci. - 2013. - 345, N 4. - P. 271-273. 13. N-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from

L-arginine / [D. Stuehr, N. Kwon, C. Nathan, O. Griffiths] // J. Biol. Chem. - 1991. - 266. - P. 6259-6263. 14. Periodontal disease and diabetes / [A. Bascones-Martinez, S. Arias-Herrera, E. Criado-Sobrado and other] // Adv. Exp. Med. Biol. - 2012. - 771. - P. 76-87. 15. Periodontitis among adult populations in the Arab World / L.S. Al-Harhi, M.P. Cullinan, J.W. Leichter [and other] // Int. Dent. J. - 2013. - 63, N 1. - P. 7-11.

### ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ЛИКОПИДА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

*Г.Б. Колодницкая, Н.И. Калинин, М.М. Корда*

**Резюме.** Изучена эффективность иммуномодулятора ликопида при липополисахаридном воспалении тканей пародонта на фоне сопутствующего инсулинозависимого сахарного диабета. Исследование проведено на белых крысах, у которых моделировали пародонтит путем введения в ткани десен бактериального липополисахарида. Сахарный диабет вызывали путем однократного введения стрептозоцина в дозе 45 мг/кг. Интрагастральное введение ликопида в течение 14 суток достоверно предупреждало продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ ), предотвращало гиперактивацию синтазы оксида азота и повышение активности реакций окислительной модификации белков в тканях пародонта, а также угнетало деструктивные процессы в соединительной ткани (интенсивность распада гликопротеинов и протеогликанов и катаболизма коллагена) у крыс с пародонтитом на фоне сахарного диабета. Сделан вывод, что блокирование продукции провоспалительных цитокинов с помощью ликопида может быть перспективным методом лечения больных пародонтитом, развивающимся на фоне сопутствующего сахарного диабета.

**Ключевые слова:** пародонтит, сахарный диабет, ликопид.

### USING THE PROINFLAMMATORY CYTOKINES LIKOPID INHIBITOR IN PERIODONTITIS AGAINST A BACKGROUND OF DIABETES MELLITUS

*H.B. Kolodnytska, M.I. Kalinski, M.M. Korda*

**Abstract.** The purpose of the present work was to study the effect of immunomodulator Licopid in lipopolysaccharide inflammation of the periodontal tissues against a background of the insulin-dependent diabetes mellitus. The study was conducted on white rats. Periodontitis was induced by the bacterial lipopolysaccharide injection into the gingival tissue. Diabetes was induced by a single injection of streptozotocin in the dose of 45 mg/kg. Intragastric administration of Licopid for 14 days significantly prevented the production of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), precluded the hyperactivation of nitric oxide synthase activity and the increase of proteins oxidative modification in periodontal tissues, as well as depressed the destructive processes in the connective tissue (intensity of the glycoproteins and proteoglycans decomposition, and catabolism of collagen) in rats with periodontitis and diabetes mellitus. A conclusion was has been drawn that blockage of proinflammatory cytokines production by Licopid might be a promising method of treatment of patients with periodontal disease developed against a background of the the concomitant diabetes mellitus.

**Key words:** periodontitis, diabetes mellitus, Licopid.

**I.Y. Horbachevsky Ternopil State Medical University,  
Ternopil, Ukraine<sup>1</sup>**

**Murray State University, KY 42071, USA<sup>2</sup>**

*Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №3 (45). - P.75-78.*

*Надійшла до редакції 03.09.2013  
Рецензент – проф. Г.І.Ходоровський*

*© Г.Б. Колодницкая, М.І. Калинин, М.М. Корда, 2013*