

Nikolaeva A. V. Разработка модели экспериментального пародонтита у крыс в условиях действия антагониста витамина К = The development of the experimental model of periodontitis of rats in conditions of the action of the antagonist of vitamin K. Journal of Education, Health and Sport. 2015;5(11):151-158. ISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.33658> <http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%2811%29%3A151-158> <https://pbn.nauka.gov.pl/works/668269>
Formerly Journal of Health Sciences. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011–2014
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.
Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.
Zgodnie z informacją MNiSW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.
The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).
© The Author (s) 2015;
This article is published with open access at License Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 05.09.2015. Revised 05.10.2015. Accepted: 10.11.2015.

УДК: [616.314.7-008.1-02(086.48)+615.015.23+577.16]:599.323.4

UDC: [616.314.7-008.1-02(086.48)+615.015.23+577.16]:599.323.4

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРОДОНТИТА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ АНТАГОНИСТА ВИТАМИНА К

THE DEVELOPMENT OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF PERIODONTITIS OF RATS IN CONDITIONS OF THE ACTION OF THE ANTAGONIST OF VITAMIN K

A. B. Николаева

A. V. Nikolaeva

**Государственное учреждение «Институт стоматологии Национальной Академии
Медицинских Наук Украины»**

SE «The Institute of Stomatology National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Реферат

В опытах на 14 белых крысах-самцах была воспроизведена экспериментальная модель пародонтита с помощью варфарина. Под действием варфарина разрушался коллаген десны, снижалось содержание гликозаминогликанов в кости альвеолярного отростка, увеличивался уровень содержания сиаловых кислот в сыворотке крови крыс. Антагонист витамина К вызывал усиление резорбции костных структур пародонта, в слизистой оболочке полости рта увеличивалась активность провоспалительного фермента – кислой фосфатазы, а также содержание МДА в кости альвеолярного отростка. В соединительной ткани собственной пластинки СОПР отмечалось наличие умеренно выраженных реактивных изменений под влиянием варфарина.

Ключевые слова: варфарин, антагонист витамина К, межклеточный матрикс, коллаген, гликозаминогликаны, провоспалительный фермент, резорбция костной ткани пародонта, белые крысы.

A. V. Nikolaeva

SE «The Institute of Stomatology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

THE DEVELOPMENT OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF PERIODONTITIS OF RATS IN CONDITIONS OF THE ACTION OF THE ANTAGONIST OF VITAMIN K

The Aim of the study was the development of experimental model of the periodontitis at rats, similar to the human periodontitis by using the antagonist of the vitamin K - warfarin.

Materials and methods. The experiment was conducted on 14 white male rats (2 groups), which were kept on a standard diet of the vivarium. The first group of rats was intact (6 animals). In the second group was simulated an experimental parodontitis in 8 rats that received the antagonist of the vitamin K - warfarin - the anticoagulant of indirect action in a dose of 1 mg / kg body weight of rats. The experiment lasted 50 days.

Results and conclusions. Under the action of warfarin began the degradation of the MKM of periodontal, as evidenced by: the destruction of collagen of gum, downward trend of the GAG of periodontal bone structure, increasing the level of sialic acids in the blood serum. Antagonist caused an increased of resorption of alveolar bone; increased the activity of proinflammatory enzyme - acid phosphatase in the gums and oral mucosa, and the MDA content in the alveolar bone. At the connective tissue of the lamina propria of the oral mucosa was noted the presence of moderately severe reactive changes under the influence of the antagonist of the vitamin K.

Key words: warfarin, vitamin K antagonist, extracellular matrix, collagen, glycosaminoglycans, a proinflammatory enzyme, periodontal bone resorption, white rats.

А. В. Николаева

**Государственное учреждение «Институт стоматологии Национальной Академии
Медицинских Наук Украины»**

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРОДОНТИТА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ АНТАГОНИСТА ВИТАМИНА К

Важнейшим витамином для нормального функционирования соединительной ткани (СТ) является витамин К, который увеличивает содержание гликозаминогликанов (ГАГ), восстанавливает обмен коллагена в различных видах СТ [1]. В условиях алиментарного К-авитаминоза у крыс наблюдается отек СТ, кожи, нарушения дифференцировки фибробластов, разрыхляются коллагеновые и эластиновые волокна. Длительное введение антагониста витамина К – неодикумарина, угнетает активность фермента глюкозаминсинтетазы (КФ.5.3.1.19), который катализирует образование глюкозамин-6-фосфата, необходимого для синтеза гексозаминосодержащих биополимеров СТ.

Все вышеизложенное предопределило использование антагониста витамина К для моделирования нарушений метаболизма межклеточного матрикса слизистой оболочки полости рта (СОПР) и пародонта крыс.

Цель исследования – разработка модели экспериментального пародонтита у крыс, аналогичная пародонтиту человека с помощью антагониста витамина К – варфарина.

Материалы и методы. Белые крысы-самцы были взяты в опыт в 1,5 -2-х мес. возрасте и содержались на стандартном рационе вивария. Интактную группу составили 6 особей (1 группа). Во 2-ой группе моделировали экспериментальный пародонтит у 8 крыс, которые получали антагонист витамина К – варфарин (производства «Никомед Дания АпС», Дания) – антикоагулянт непрямого действия в дозе 1 мг/кг массы тела крыс через день в продолжении 50 дней. Известно, что варфарин блокирует синтез

викасол-зависимых факторов свертывания крови в печени, а именно: факторов II, VII, IX и X. В отличие от антикоагулянтов прямого действия оказывает эффект не сразу, а медленно и продолжительно, обладает кумулятивными свойствами. Крыс выводили из опыта путем тотального кровопускания из сердца, проводимого под наркозом (тиопентал натрия 40 мг/кг). Предварительно отделив десну и слизистую оболочку щеки (СОЩ), вычленили верхние и нижние челюсти, выделяли печень. Объектами биохимических исследований служили сыворотка крови, надосадочная жидкость гомогенатов печени и кости альвеолярного отростка (50 мг/мл), десны и СОЩ (25 мг/мл). Надосадочную жидкость получали путем центрифугирования в центрифуге РС-6 в течении 15 минут при 3000 об/мин при температуре +4°C. Состояние СТ оценивали по содержанию сиаловых кислот в сыворотке крови с помощью набора (ЭкоСервис, РФ – сер. 0910), состояние коллагена – по содержанию оксипролина (связанного, свободного и общего) [2], гликозаминогликанов (ГАГ) в тканях пародонта [3]. Для оценки состояния тканей крыс определяли биохимические показатели унифицированными методами, используя коммерческие наборы реактивов: содержание магния (производства DAC-SpectroMed, Молдова – сер. 22/100); общий белок (производства DAC-SpectroMed, Молдова – сер. 61/250). Уровень процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) тиобарбитуровым методом [4]. Состояние физиологической антиоксидантной системы оценивали по активности глутатион-пероксидазы (ГПО) [5] и каталазы [6]. Активность кислой фосфатазы (КФ) определяли методом Bessay et.al в модификации А. П. Левицкого с соавт. [7].

После окончания опыта кусочки СОЩ иссекали, фиксировали в формалине и заключали в парафин. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван Гизону и проводили дифференцированную окраску клеточных ядер по методу А.Н.Яцковского [8]. Полученные препараты использовали для обзорных морфологических исследований, обращая внимание на изменения в структуре СТ. Для этого анализировали общую картину СТ, оценивали особенности ее клеточного состава и компонентов межклеточного матрикса (МКМ). Для оценки состояния сосудов микроциркуляторного русла (МЦР) соединительной ткани СОЩ определяли морфометрический показатель – коэффициент стеноза сосудов (КСС).

Результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами с определением критериев достоверности различий по Стьюденту.

Результаты исследования. Влияние антагониста витамина К варфарина на протяжении 50 дней крысы переносили нормально. Об этом свидетельствовал прирост массы тела: $258 \pm 4,4$ г против $133 \pm 3,8$ г ($p < 0,001$). Экспериментальный К-авитаминоз вызвал значительное снижение содержания свободного и связанного оксипролина в десне крыс по сравнению с данными интактных групп ($p < 0,001$; $p = 0,003$, соответственно; табл.1).

Содержание оксипролина и ГАГ в тканях ротовой полости крыс под действием варфарина (M±m; p)

Показатели	Группы животных	
	Интактная	Модель
десна		
Содержание оксипролина (мкмоль/г)		
свободного	4,68±0,67	0,28±0,070 p<0,001
связанного	4,76±0,87	0,28±0,14 p=0,003
общего	8,19±0,68	0,57±0,17 p<0,001
Содержание ГАГ (мг/г)	6,76±0,0044	7,50±0,17
СОЩ		
Содержание ГАГ (мг/г)	5,45±0,22	5,20±0,070
кость альвеолярного отростка		
Содержание ГАГ (мг/г)	21,1±0,41	18,0±1,65 p=0,09

Примечание. В табл. 1-3 показатель достоверности p рассчитан по сравнению с интактной группой.

Под действием варфарина содержание ГАГ в слизистой оболочке полости рта крыс существенно не изменялось. В то же время в кости альвеолярного отростка содержание ГАГ снижалось на 15 % (тенденция; p=0,09; табл.1) по сравнению с интактной группой. Варфарин в сыворотке крови увеличивал содержание сиаловых кислот на 31 %: 2,34±0,18 ммоль/л против 1,79±0,27 ммоль/л в интактной группе (тенденция; p=0,10), что свидетельствовало об усилении воспалительных явлений в тканях. Известно, что сиаловые кислоты, являющиеся производными нейраминовой кислоты, образуются под действием нейраминидазы при распаде гликопротеинов МКМ.

Пероральное введение крысам варфарина значительно усиливало резорбцию костных структур пародонта. Так, на 28 % (p=0,005) усиливалась резорбция кости альвеолярного отростка нижней челюсти крыс: 39,4±2,1 % против 30,7±1,5 %; на 24 % (p=0,02) – на верхней челюсти : 27,6±1,6 % против 22,2±0,9 % по сравнению с данными интактных групп, принятых за 100 %. Полученный факт вполне объясним в связи с усилением в костной ткани пародонта активности КФ (рН 4,8) в 3 раза (тенденция; p=0,10; табл.2), т.к. этот фермент является маркерным для остеокластов.

Активность кислой фосфатазы в тканях ротовой полости крыс под действием варфарина (M±m; p)

Группы животных	Активность КФ (рН 4,8) (мкмоль/с·г)		
	СОЩ	десна	кость альвеолярного отростка
Интактная	1,08±0,20	3,51±1,27	1,01±0,45
Модель	2,36±0,16 p=0,001	7,74±1,60 p=0,06	2,98±1,06 p=0,10

О воспалительных явлениях в слизистой оболочке полости рта крыс под влиянием варфарина свидетельствовало увеличение активности КФ в 2,2 раза в десне и СОЩ крыс (p=0,06;0,001; табл. 2). Таким образом, активация КФ говорит об усилении катаболических процессов в костных структурах пародонта, а также об усилившейся деградации МКМ десны и СОЩ под влиянием варфарина при активации кислых гидролаз.

Под действием варфарина в сыворотке крови животных достоверно (p=0,001) увеличивалась концентрация Mg^{2+} , что говорит, вероятно, о его «вымывании» из тканей: 35,0±0,37 ммоль/л против 31,8±0,51 ммоль/л.

Концентрация растворимого неколлагенового белка под влиянием варфарина снижалась в печени экспериментальных животных в 5,5 раза (p=0,005): 0,28±0,050 мг/г против 1,55±0,33 мг/г в интактной группе. В кости альвеолярного отростка снижение концентрации растворимого белка составило 37 %: 0,17±0,088 мг/г против 0,27±0,089 мг/г; в десне – 31 %: 0,22±0,051 мг/г против 0,32±0,094 мг/г в интактной группе.

К-авитаминоз вызвал существенное усиление процессов ПОЛ, о чем судили по увеличению содержания МДА (табл.3). Варфарин увеличивал содержание МДА в печени в 1,6 раза (p=0,003). Усиление процессов ПОЛ под влиянием варфарина наблюдалось в тканях ротовой полости: в СОЩ – в 1,8 раза (p=0,007), в кости альвеолярного отростка – в 2,3 раза (p<0,001, табл. 3). Антагонист витамина К вызвал значительное снижение активности антиоксидантных ферментов: в десне активность каталазы снижалась в 1,6 раза (p=0,02); в СОЩ активность глутатион-пероксидазы – в 3 раза (p=0,06); в кости альвеолярного отростка – в 4,4 раза (p<0,001; табл. 3).

Содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в тканях крыс под действием варфарина ($M \pm m$; p)

Показатели	Группы животных	
	Интактная	Модель
печень		
Содержание МДА (нмоль/г)	95,0±6,79	153±10,8 p=0,003
СОЩ		
Содержание МДА (нмоль/г)	3,08±0,45	5,58±0,53 p=0,007
Активность ГПО (мкмоль/с·г)	39,7±10,3	12,9±7,13 p=0,06
десна		
Содержание МДА (нмоль/г)	19,3±2,24	18,1±1,05
Активность каталазы (мкат/г)	33,1±1,16	20,4±4,07 p=0,02
кость альвеолярного отростка		
Содержание МДА (нмоль/г)	5,70±0,60	13,1±0,65 p<0,001
Активность ГПО (мкмоль/с·г)	28,3±0,47	6,49±3,02 p<0,001

При цитоморфологических исследованиях волокнистой СТ собственной пластинки СОЩ было установлено, что она представлена рыхлой сетью коллагеновых волокон. Между волокнами располагались клеточные элементы и мелкие кровеносные сосуды. Клеточный состав представлен фибробластами и фиброцитами. Местами отмечались небольшие скопления лимфоцитов. Кровеносные сосуды были умеренно расширены, клетки в их стенке не имели видимых признаков набухания. Периваскулярный отек внешне не был выражен. Подобную картину, но с признаками более рыхлой структуры имела СТ подслизистой оболочки, а также межмышечные прослойки в мышечной оболочке. Они имели более редкую сеть волокон, меньшее количество клеточных элементов.

При моделировании пародонтита с помощью варфарина в рыхлой волокнистой СТ собственной пластинки СОЩ наблюдалась умеренно выраженная отечность. Коллагеновые волокна были утолщены, они образовывали четко выраженную сеть, в ячейках которой располагались клеточные элементы. Кроме клеток фибробластического ряда лимфоциты встречались чаще, чем в интактной группе. Большинство этих клеток наблюдались рядом с кровеносными сосудами, что наглядно демонстрировало источник их миграции. Стенки кровеносных сосудов МЦР были утолщены в основном за счет набухания присутствующих здесь клеток и волокон. Просвет сосудов внешне выглядел суженным. Несмотря на это, морфометрические показатели КСС свидетельствовали о его незначительном увеличении под действием варфарина, что не нашло статистического подтверждения и может рассматриваться как тенденция: $3,3 \pm 0,39$ усл.ед. против $3,1 \pm 0,29$ усл.ед. в интактной группе.

Выводы:

Таким образом, судя по данным биохимических исследований с помощью варфарина была воспроизведена экспериментальная модель пародонтита. Антагонист

витамина К вызывал активацию остеокластов и, как следствие, усиление резорбции костных структур пародонта. Помимо остеорезорбции, в мягких тканях пародонта имел место фактор воспаления: увеличение активности КФ в десне и СОЩ, а также содержания МДА в кости альвеолярного отростка крыс. О деградации МКМ пародонта под действием варфарина свидетельствовало: 1) разрушение коллагена десны; 2) тенденции снижения уровня ГАГ в костных структурах пародонта. Усиление катаболических процессов МКМ на уровне организма подтвердили данные об увеличении уровня сиаловых кислот под действием варфарина.

В результате проведенных цитоморфологических исследований было отмечено наличие умеренно выраженных реактивных изменений в СТ собственной пластинки СОПР крыс под влиянием антагониста витамина К.

Список литературы:

1. Шараев П. Н. Роль витамина К в обмене биополимеров соединительной ткани (обзор) / П. Шараев // Вопр. мед. химии. – 1983. – №1. – С. 13-17.
2. Шараев П. Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови / П. Шараев. // Лаб. дело. – 1981. – 5. – С. 283-285.
3. Метод определения гликазаминогликанов в биологических жидкостях / П. Шараев, В. Пешков, Н. Соловьева [и др.] // Лаб. дело. – 1987. – 5. – С. 330-332.
4. Стальная И.Д. Метод определения диеновых конъюгаций ненасыщенных высших жирных кислот / И. Стальная, Т. Гаришвили // Современные методы биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М. – 1977. – С.63-64.
5. А.С.922637 СССР. МКИ 01 33/48. Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях / В. Пахомова, Н.Козлянина, Г. Крюкова. – Оpubл. 25.04.82, Бюл. №15. – 2 с.
6. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М. Королюк., Д. Иванова, И. Майорова // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-18.
7. Левицкий А.П. Сравнительная оценка трёх методов определения активности фосфатаз слюны человека / А. Левицкий, А. Марченко, Т. Рыбак // Лаб. дело. – 1972. – №10. – С. 624-625.
8. Яцковский А.Н. Оценка активности клеточных ядер / А.Н. Яцковский // Архив АГЭ. – 1987. – №1. – С.76-79.

REFERENCES:

1. Sharaev P. N. *The role of vitamin K in the metabolism connective tissue of biopolymers.* Vopr. med. khimii, 1983;1:13 – 17.
2. Sharaev P. N. *Method for the determination of free and bound hydroxyproline in the blood serum.* Laboratory work, 1981;5:283 – 285.
3. Sharaev P., Peshkov V., Solov'eva N., Shirokova T., Zvorygina N., Solopaev A., Alekseeva N. *Method for determining glycosaminoglycans in biological fluids.* Laboratory work, 1987; 5: 330-332.
4. Stal'naya I. D., Garishvili T. *Metod opredeleniya dienovykh konjugacij nenasyshennykh vysshikh zhirnykh kislot* [Method for determination of conjugated diene unsaturated higher fatty acids]. *Sovremennye metody biokhimii.* Moskow, 1977:63–64.
5. Pakhomova V., Kozlyanina N., Kryukova G. *Sposob opredeleniya aktivnosti glutation-peroksidazy v biologicheskikh tkanyakh* A.S.922637 SSSR. MКИ 01 33/48. Opubl. 25.04.82, Byulleten' №15. – 2 s.
6. Korolyuk M. A., Ivanova D., Mayorova I. *The method for determining the activity of catalase.* Laboratornoe delo, 1988;1:16–18.

7. Levickij A., Marchenko A., Rybak T. *Comparative evaluation of two methods for determining the activity of phosphatases of human saliva*. *Laboratornoe delo*, 1972;10:624–625.

8. Yatskovskiy A.N. *Evaluation of the activity of the cell nuclei*. *Arkhiv AGE*, 1987;1:76–79.