

Stupak E. P. Дисбиотические процессы в тканях полости рта крыс при экспериментальном сахарном диабете = Dysbiotic processes in rats oral cavity tissues in experimental diabetes mellitus. Journal of Education, Health and Sport. 2016;6(10):44-52. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.159682> <http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/3924>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 755 (23.12.2015).
755 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2016;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, 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/4.0/>) 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/4.0/>) 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: 02.09.2016. Revised 24.09.2016. Accepted: 08.10.2016.

УДК 616.731+612.045

ДИСБИОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНЯХ ПОЛОСТИ РТА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Е. П. Ступак

ВГУУ «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

Резюме

Введение крысам аллоксана, протаминасульфата, сахарозы или липополисахарида вызывает развитие дисбиоза в тканях полости рта.

Ключевые слова: сахарный диабет, гипергликемия, липополисахарид, дисбиоз, ротовая полость.

DYSBIOTIC PROCESSES IN RATS ORAL CAVITY TISSUES IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

E. P. Stupak

HSEI «Ukrainian medical Stomatological Academy», Poltava

Summary

Aim: Determine the development of dysbiosis in the tissues of the oral cavity of rats with diabetes mellitus of the 1st, 2nd type, with a sugar load and under the influence of lipopolysaccharide (LPS).

Materials and Methods: Diabetes type 1 was induced by alloxan (119 mg / kg, single dose), diabetes type 2 - using protamine sulphate (18 mg / kg / peritoneum within 10 days). Sugar load

was conducted by the consumption of drinking water with sucrose (5%). Systemic endotoxemia was reproduced with LPS (6.6 mg / kg / intramuscularly, within 5 days). In the tissues of the oral cavity (cheek, tongue, gums) was determined urease and lysozyme activity, dysbiosis rate was calculated by the ratio of urease and lysozyme relative activities.

Results: In diabetes of 1st and 2nd type under sugar load and after LPS administration in buccal mucosa and tongue is increased urease activity and reduced lysozyme activity, which leads to a significant increase in the degree of dysbiosis (in 7-27 times).

Conclusion: Leading pathogenetic link of diabetes - dysbiosis may occur under the influence of hyperglycemia, and as a result of systemic endotoxemia. This circumstance dictates the need for anti dysbiotic prophylaxis and therapy of diabetogenic complications in the oral cavity tissues.

Keywords: diabetes mellitus, hyperglycemia, lipopolysaccharide, dysbiosis, oral cavity.

Введение

Роль микробного фактора в патогенезе сахарного диабета подтверждена многочисленными исследованиями последнего времени [1-4]. Имеются убедительные данные о роли микробов полости рта в развитии осложнений сахарного диабета [5-9] и стоматогенной эндотоксинемии в патогенезе неинфекционных заболеваний [10, 11]. Наиболее важным патогенным фактором в развитии осложнений сахарного диабета остается кишечный эндотоксин (липополисахарид) [12,13].

В то же время до сих пор господствует мнение, что решающую роль в патогенезе большинства осложнений сахарного диабета играет глюкозотоксичность [14, 15].

Целью настоящего исследования стало сравнительное определение действия на ткани полости рта сахарного диабета 1-го и 2-го типов, сахарной нагрузки и липополисахарида (ЛПС). Состояние тканей полости рта оценивали по уровню фермента уреазы, который является показателем микробного обсеменения [16], по активности лизоцима (маркер неспецифического иммунитета) [17] и по степени дисбиоза, определяемой по методу А. П. Левицкого [18].

Материалы и методы исследования

Эксперименты были проведены на 50 белых крысах линии Вистар (самцы, 6 месяцев, средняя живая масса 250 ± 15 г), которые были распределены в 5 равных групп: 1-ая – интактные, 2-ая получала в течение 14 дней питьевую воду, содержащую 5 % сахарозы, 3-ья – с СД 1 типа, который воспроизводили путем введения в/мышечно раствора аллоксана (производитель НПФ «Синбиас», Украина) в дозе 119 мг/кг живой массы однократно. Эвтаназию крыс осуществляли на 21-й день. 4-ая – с СД 2 типа, который воспроизводили по методу [19] путем в/мышечного введения протамина сульфата в дозе 18 мг/кг ежедневно в

течение 10 дней. Эвтаназию крыс осуществляли на 14-й день опыта. 5-ая получала ЛПС (препарат «Пирогенал» фирмы «Медгамал», Россия) в дозе 6,6 мкг/кг, который вводили в/мышечно в течение 5 дней. Эвтаназию осуществляли на 7-й день.

Во всех группах умерщвление животных осуществляли под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. У животных иссекали слизистую щеки, языка и десну, в гомогенатах которых определяли активность уреазы по гидролизу мочевины и определению аммиака с помощью реактива Несслера [16], активность лизоцима бактериолитическим методом [17] и по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима рассчитывали степень дисбиоза по Левицкому [18].

Статобработку результатов осуществляли в соответствии с указаниями [20].

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты определения активности уреазы в тканях полости рта крыс всех экспериментальных групп. Из этих данных видно, что в слизистой оболочке щеки и языка во всех случаях достоверно возрастает активность уреазы (в 2-3 раза), свидетельствующая о росте микробной обсемененности этих тканей при диабете, при гипергликемии и системной эндотоксинеми. Десна, в отличие от слизистой щеки и языка, существенно не изменяет уровень уреазы, за исключением СД 2 типа, при котором он возрастает в 2,6 раза.

Таблица 1

Влияние сахарной нагрузки, экспериментальных диабетов 1-го и 2-го типов и ЛПС на активность уреазы в тканях полости рта ($M \pm m$, $n=10$)

№№ пп	Группы	Уреазы, мк-кат/кг		
		щека	язык	десна
1	Интактные	2,14±0,39	0,73±0,06	2,65±0,32
2	Сахарная нагрузка	4,51±0,64 p<0,01	3,78±0,56 p<0,001	4,05±0,68 p>0,05
3	СД 1 типа	6,48±0,62 p<0,01	4,06±0,61 p<0,01	2,85±0,25 p>0,3
4	СД 2 типа	5,57±0,51 p<0,01	4,50±0,35 p<0,01	7,05±0,78 p<0,01
5	ЛПС	6,14±0,34 p<0,01	3,86±0,42 p<0,01	2,80±0,78 p>0,5

Примечание: p – в сравнении с гр. 1.

В таблице 2 представлены результаты определения активности лизоцима. Видно, что в слизистых оболочках щеки и языка во всех случаях достоверно и весьма значительно (в 2-8 раз) снижается активность лизоцима, свидетельствующая о существенном снижении уровня неспецифического иммунитета при диабете, гипергликемии, системной эндотоксинемии.

Как и в случае с уреазой, десна крыс оказалась весьма устойчивой к действию патогенных факторов диабета, поскольку изменения активности лизоцима были недостоверны.

В таблице 3 представлены результаты определения степени дисбиоза по Левицкому в тканях полости рта. Из этих данных видно, что при диабете, сахарной нагрузке и системной эндотоксинемии в тканях полости рта развивается дисбиоз, обусловленный значительным снижением уровня неспецифического иммунитета и, как следствие, увеличением микробной обсемененности. В большей степени это наблюдается в слизистой языка. Как и следовало ожидать, наиболее устойчивой к действию дисбиотических факторов оказалась десна.

Таблица 2

Влияние сахарной нагрузки, экспериментальных диабетов 1-го и 2-го типов (СД1 и СД2) и ЛПС на активность лизоцима в тканях полости рта ($M \pm m$, $n=10$)

№№ пп	Группы	Лизоцим, ед/кг		
		щека	язык	десна
1	Интактные	270±34	43±7	210±27
2	Сахарная нагрузка	60±28 p<0,001	14±8 p<0,05	182±65 p>0,5
3	СД1	113±45 p<0,05	12±6 p<0,05	103±67 p>0,05
4	СД2	80±27 p<0,001	9±5 p<0,01	186±60 p>0,3
5	ЛПС	35±17 p<0,001	12±6 p<0,01	210±67 p=1

Примечание: p – в сравнении с гр. 1.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что при экспериментальном сахарном диабете как 1-го, так и 2-го типа в тканях полости рта развивается дисбиоз, более выраженный при диабете 2-го типа. Из трех исследованных тканей полости рта наиболее высокая степень дисбиоза наблюдается в слизистой языка, превышая аналогичный показатель в слизистой щеки в 2-3 раза, а в десне в 5-7 раз.

Возможно, это обусловлено очень низким уровнем лизоцима в слизистой языка (ниже в 6,3 раза по сравнению со слизистой щеки).

Остается непонятной высокая устойчивость десны к дисбиотическим факторам, в частности, к сахарной нагрузке и действию ЛПС. При сравнении степени дисбиоза в десне крыс с диабетом 1-го и 2-го типов видно, что эта ткань в большей степени поражается при диабете 2 типа: микробная обсемененность выше в 2,5 раза ($p < 0,01$) и степень дисбиоза выше в 1,8 раза ($p < 0,01$).

Таблица 3

Влияние сахарной нагрузки, экспериментальных диабетов 1-го и 2-го типов (СД1 и СД2) и ЛПС на степень дисбиоза в тканях полости рта ($M \pm m$, $n=10$)

№№ пп	Группы	Степень дисбиоза, ед.		
		щека	язык	десна
1	Интактные	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
2	Сахарная нагрузка	9,1±0,4 $p < 0,001$	16,8±1,2 $p < 0,001$	2,7±0,2 $p < 0,05$
3	СД1	7,3±0,6 $p < 0,001$	19,6±2,8 $p < 0,001$	2,9±0,3 $p < 0,05$
4	СД2	8,1±0,9 $p < 0,001$	27,6±3,9 $p < 0,001$	5,0±0,6 $p < 0,01$
5	ЛПС	22,0±3,8 $p < 0,001$	18,5±3,0 $p < 0,001$	2,4±0,3 $p < 0,05$

Примечание: p – в сравнении с гр. 1.

Что касается механизма развития дисбиотических явлений в тканях полости рта при диабете, то в этом могут участвовать и гипергликемия (глюкозотоксичность), о чем свидетельствует снижение уровня лизоцима и повышение уровня уреазы у крыс после сахарной нагрузки, и микробная эндотоксинемия, о чем свидетельствуют аналогичные изменения лизоцима и уреазы после введения ЛПС.

Вытекающий из этих результатов практический вывод состоит в том, что независимо от типа диабета и особенностей его патогенеза, необходимо проведение антидисбиотической профилактики и терапии, поскольку системный дисбиоз ответственен за развитие диабетогенных осложнений, в том числе и в тканях полости рта.

Литература

1. Патогенетическая роль дисбактериоза в развитии осложнений сахарного диабета I типа у детей / Г. Н. Розанова, Д. А. Воеводин, М. А. Степина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – т. 133, № 2. – С. 196-198.
2. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the bio-buoding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? / S. Brugman, F. A. Klat-ter, J. T. J. Visser [et al.] // Diabetologia. – 2006. – v. 49, № 9. – P. 2105-2108.
3. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes / N. Van der Werf, F. G. Kroese, J. Rozing [et al.] // Diabetes Metab. Res. Rev. – 2007. – v. 23, № 3. – P. 169-183.
4. Савченко І. П. Корекція порушень кишкового мікробіоценозу в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу / І. П. Савченко // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2015. – № 2 (66). – С. 31-33.
5. Мащенко І. С. Характер клінічних, мікробіологічних та імунологічних порушень у хворих на генералізований пародонтит при цукровому діабеті 2 типу / І. С. Мащенко, О. О. Гудар'ян // Новини стоматології. – 2007. – № 2 (51). – С. 22-28.
Mashchenko I.S., Gudarian A.A. The nature of the clinical, microbiological and immunolog-ical disorders in patients with generalized periodontitis in diabetes type 2. Novunu stomatology. 2007; 2 (51): 22-28.
6. Скрипников П. Н. Особенности микробиоценоза слизистой оболочки полости рта у больных сахарным диабетом 2 типа и атеросклерозом, его коррекция антиоксидантами / П. Н. Скрипников, О. Г. Суковач // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 2. – С. 134-137.
7. Ткаченко П. І. Стан імунологічної резистентності у хворих на цукровий діабет 2 типу, які потребують хірургічної санації порожнини рота / П. І. Ткаченко, М. П. Митченко. – Український стоматологічний альманах. – 2009. – № 5. – С. 19-23.
8. Развитие дисбиоза и воспаления в слизистой оболочке полости рта крыс при аллоксановом диабете / О. А. Макаренко, А. В. Скиба, В. Я. Скиба [и др.] // Вісник стоматології. – 2012. – № 2 (79). – С. 6-7.
9. Ковальов Є. В. Клініко-мікробіологічне обґрунтування значення відновлення мікробіоценозу порожнини рота в лікуванні хворих на кандидозний стоматит на тлі цукрового діабету I типу / Є. В. Ковальов, І. Я. Марченко, З. Ю. Назаренко // Український стоматологічний альманах. – 2013. – № 5. – С. 26-28.
10. Левицкий А. П. Стоматогенная эндотоксинемия / А. П. Левицкий // Журнал НАМН України. – 2013. – т. 19, № 4. – С. 490-493.

11. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on serum interleukin-1 beta and C-reactive protein levels in rats / S. Vardar-Sengul, N. Buduneli, F. Buduneli [et al.] // *J. Periodontol.* – 2006. – v. 77, № 4. – P. 657-663.

12. Wang X. Endotoxins: structure, function and recognition / X. Wang, P. Quinn. – *Series: Subcellular Biochemistry.* – v. 53. – 2010: Springer. – 415 p.

13. Гордиенко А. И. Уровни сывороточных антител к липополисахаридам энтеробактерий и их взаимосвязи с концентрацией С-реактивного протеина в крови больных сахарным диабетом / А. И. Гордиенко // *Ukrainian Biochemical Journal.* – 2015. – v. 87, № 3. – P. 98-106.

14. Александровский Я. А. Молекулярные механизмы развития диабетических осложнений. Обзор / Я. А. Александровский // *Биохимия.* – 1998. – т. 63, в. 11. – С. 1470-1479.

15. Ефимов А. С. Актуальные проблемы клинической диабетологии / А. С. Ефимов // *Медицинский всевіт.* – 2002. – т. 2, № 1-2. – С. 72-76.

16. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.]. – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 22 с.

17. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

18. Патент на корисну модель, Україна 43140, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А. П., Деньга О. В., Селіванська І. О. [та ін.]. – Опубл. 10.08.2009, Бюл. № 15.

19. Ульянов А. М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов // *Вопросы медицинской химии.* – 2000. – т. 46, № 2. – С. 149-154.

20. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ «Статистика» / О. Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2002.

References

1. Rozanova G. N., Voevodin D. A., Stepina M. A. [et al.]. The pathogenetic role of dysbiosis in diabetes mellitus type I complications development among children. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsyny.* 2012; 133(2): 196-198.

2. Brugman S., Klatter F. A., Visser J. T. J. [et al.]. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the bio-bred diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia.* 2006; 49(9): 2105-2108.

3. Van der Werf N., Kroese F. G., Rozing J. [et al.]. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2007; 23(3): 169-183.
4. Savchenko I. P. Correction of intestinal microbiocenosis in patients with diabetes type 2. *Mizhnarodnyj endokrynologichnyj zhurnal.* 2015; 2(66): 31-33.
5. Mashchenko I.S., Gudarian A.A. The nature of the clinical, microbiological and immunological disorders in patients with generalized periodontitis in diabetes type 2. *Novunu stomatology.* 2007; 2 (51): 22-28.
6. Skripnikov P. N., Sukovach O. G. Features of microbiocenosis oral cavity mucosa in patients with type 2 diabetes and atherosclerosis and its antioxidants correction. *Visnyk problem biologii' i medycyny.* 2007; 2: 134-137.
7. Tkachenko P. I., Mytchenok M. P. State of immunological resistance in patients with type 2 diabetes who require surgical oral cavity sanitation. *Ukrai'ns'kyj stomatologichnyj al'manah.* 2009; 5: 19-23.
8. Makarenko O. A., Skiba A. V., Skiba V. Ya. [et al.]. The development of dysbiosis and inflammation in the oral cavity mucosa of rats with alloxan diabetes. *Visnyk stomatologii'.* 2012; 2(79): 6-7.
9. Koval'ov Je. V., Marchenko I. Ja., Nazarenko Z. Ju. Clinical and microbiological justification of oral cavity microbiocenosis regeneration in the treatment of candidiasis patients with diabetes mellitus type I. *Ukrai'ns'kyj stomatologichnyj al'manah.* 2013; 5: 26-28.
10. Levitsky A. P. Stomatogenic endotoxemia. *Zhurnal NAMN Ukrainy.* 2013; 19(4): 490-493.
11. Vardar-Sengul S., Buduneli N., Buduneli F. [et al.]. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on serum interleukin-1 beta and C-reactive protein levels in rats. *J. Periodontol.* 2006; 77(4): 657-663.
12. Wang X., Quinn P. Endotoxins: structure, function and recognition. *Seria: Subcellular Biochemistry.* 2010; 53: Springer: 415.
13. Gordienko A. I. The levels of serum antibodies to lipopolysaccharides of Enterobacteriaceae and their relationship with the concentration of C-reactive protein in the blood of patients with diabetes. *Ukrainian Biochemical Journal.* 2015; 87(3): 98-106.
14. Aleksandrovskiy Ya. A. Molecular mechanisms of diabetic complications development. *Review. Biokhimiya.* 1998; 63(11): 1470-1479.
15. Efimov A. S. Actual problems of clinical diabetology. *Medychnyj vsesvit.* 2002; 2(1-2): 72-76.
16. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Selivanskaya I. A. [i dr.]. Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skringa pro- i prebiotikov: metodicheskie rekomendatsii

[Enzymatic methods for determination of oral dysbiosis for screening pro- and prebiotics: method guidelines]. Kiev, GFC, 2007: 22.

17. Levitsky A. P. Lizotsym vmesto antibiotikov [Lysozyme instead of antibiotics]. Odessa, KP OGT, 2005:74.

18. Levitsky A. P., Denga O. V., Selivanskaya I. A. [ta in.]. The method of estimation of the degree of dysbiosis (dysbacteriosis) of organs and tissues. Patent of Ukraine 43140. IPC (2009) G01N 33/48. Application number u 200815092. Date of filling: 26.12.2008. Publ.: 10.08.2009. Bul. № 15.

19. Ulyanov A. M., Tarasov Yu. A. The insular system of animals at chronic deficiency of heparin. Voprosy meditsinskoy khimii. 2000; 46(2): 149-154.

20. Rebrova O. Yu. Statisticheskiy analiz meditsynskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh program "Statistika" [Statistical analysis of medical data. Application of the software package "Statistics"]. Moskva, Media Sfera, 2002.