

Gorokhivsky V. N., Schnaider S. A., Tkachenko E. K. Modeling of structural and functional disorders of connective tissue of periodontal rats. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(7):1238-1246. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1163673>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/5242>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Authors 2017;

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: 01.07.2017. Revised: 02.07.2017. Accepted: 31.07.2017.

MODELING OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DISORDERS OF CONNECTIVE TISSUE OF PERIODONTAL RATS

V. N. Gorokhivsky, S. A. Schnaider, E. K. Tkachenko

State Institution «Institute of stomatology and maxilla-facial surgery National Academy
of Medical Sciences of Ukraine»

Astract

The purpose is to study the structural and functional state of the connective tissue of the periodontal rats under the conditions of periodontitis modeling by the administration of lidase.

The experiment was carried out on 13 female rats 1 month age. 1st group - intact (5 individuals). In Group 2, rats were modeled on experimental periodontitis. The duration of the experiment was 55 days.

As a result of subgingival injection of lidase, an experimental model of periodontitis was reproduced, which caused structural and functional disruption of the connective tissue of periodontium in rats.

Key words: lidase, parodontitis model, glycosaminoglycans, hydroxyproline, collagen, periodontal tissues, rats.

МОДЕЛИРОВАНИЕ НАРУШЕНИЙ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПАРОДОНТА КРЫС

В. Н. Гороховский, д. мед. н., С. А. Шнайдер, д. мед. н.,
Е. К. Ткаченко, к. биол. н.

Государственное учреждение "Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины"

Реферат

Цель – изучить нарушения структурно-функционального состояния соединительной ткани пародонта крыс в условиях моделирования пародонтита путем введения лидазы.

Материалы и методы. Опыт проведен на 13 крысах-самках 1-мес. возраста. 1-я группа – интактная (5 особей). Во 2-й группе 8 крысам моделировали экспериментальный пародонтит. Длительность опыта составила 55 дней.

Результаты исследований: В результате поддесневого введения лидазы была воспроизведена экспериментальная модель пародонтита, вызвавшая нарушения структурно-функционального состояния соединительной ткани пародонта крыс.

Ключевые слова: лидаза, модель пародонтита, гликозаминогликаны, оксипролин, коллаген, ткани пародонта, крысы.

Воспалительные заболевания пародонта приводят к деградации соединительной ткани (СТ) десны и разрушению кости альвеолярного отростка.

Межклеточный матрикс (МКМ) соединительной ткани формируется тремя важными компонентами – гелеобразующей средой, коллагеновыми и эластиновыми волокнами.

Гелеобразующая среда состоит из многочисленных полисахаридных цепей гликозаминогликанов (ГАГ), из которых основными являются 6 типов: гиалуроновая кислота (ГК), гепаринсульфат, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, гепарин, дерматансульфат.

ГАГ синтезируются фибробластами и характеризуются интенсивным метаболизмом. Например, период полужизни гиалуроновой кислоты – 2-4 дня. Патология ГАГ состоит в нарушениях синтеза, распада или того и другого.

Синтез ГАГ и протеогликанов всегда предшествует синтезу коллагена [1]. Коллаген в отсутствие ГАГ представляет собой гомогенную массу, в присутствии хондроитинсульфата имеет четкую исчерченность, характерную для коллагеновых волокон [2].

Кислые ГАГ (ГК, гепарин, хондроитинсульфат) участвуют в трофической функции СТ, в процессах регенерации и роста тканей.

В пародонте кислые ГАГ располагаются в стенках сосудов по ходу пучков коллагеновых волокон, в большей степени собираясь в области циркулярной связки зуба. Нейтральные ГАГ (гликоген) обнаруживаются в эпителии десны.

В последнее время ГАГ отводят важную роль в защитной функции эпителия десны, особенно в предотвращении проникновения инфекции и токсинов в подлежащую ткань. Тканевая гиалуронидаза, которая вырабатывается микроорганизмами, вызывает нарушения связи ГК с белком, в результате чего резко повышается проницаемость СТ с утратой ею барьерных свойств.

Таким образом, ГАГ обеспечивают защиту тканей пародонта от действия бактериальных и токсических элементов.

Препарат лидаза содержит фермент гиалуронидазу.

Цель исследования – изучить нарушения структурно-функционального состояния соединительной ткани пародонта крыс в условиях моделирования пародонтита путем введения лидазы (гиалуронидазы).

Материалы и методы

Опыт проведен на 13 крысах-самках 1-мес. возраста линии Вистар стадного разведения. 1-я группа – интактная (5 особей). Во 2-й группе 8 крысам моделировали патологию пародонта введением под десну раствора лидазы (ПрАТ «Биофарма», Киев, Украина) в дозе 6,4 ЕД по 0,1 мл в четырех участках челюстей четыре раза в продолжении эксперимента. Длительность опыта составила 55 дней, после чего крыс забивали тотальным кровопусканием из сосудов сердца под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Отделив десну, выделяли челюсти и подвергали их морфометрическому исследованию [3]. Объектами биохимических исследований служили десна и кость альвеолярного отростка крыс.

Состояние соединительной ткани оценивали по состоянию коллагена – определение оксипролина [4], гликозаминогликанов (ГАГ) [5] в тканях пародонта. Уровень ПОЛ определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА) [6].

Оценивали активность антиоксидантных ферментов: каталазы [7], и глутатион-пероксидазы (ГПО) [8].

Для оценки состояния тканей крыс определяли биохимические показатели унифицированными методами, используя коммерческие наборы реактивов: активность кислой и щелочной фосфатаз (ЩФ), содержание кальция (Ca^{2+}), фосфора, цинка (Zn^{2+}), магния (Mg^{2+}) Все наборы производства DAC-SpectroMed, Молдова.

Результаты исследований обрабатывали общепринятыми методами с определением t-критериев достоверности различий по Стьюденту.

Результаты исследований

Введение раствора лидазы под десну крысы переносили удовлетворительно. Прирост массы тела интактных крыс за 55 дней эксперимента составил: $160 \pm 4,3$ г против $49,8 \pm 2,5$ г ($p < 0,001$). В то же время наблюдалось снижение массы тела крыс при моделировании пародонтита: $160 \pm 4,3$ г по сравнению с интактной группой: $241 \pm 4,0$ г ($p < 0,001$).

При моделировании пародонтита с помощью поддесневого введения лидазы (гиалуронидазы) уровень ГАГ в десне крыс существенно не изменялся (табл.1). Под действием лидазы изменялось состояние коллагена в тканях пародонта крыс, определяемое по содержанию свободного, связанного и общего оксипролина. Так, уровень свободного оксипролина в десне снижался в 1,7 раза ($p = 0,05$; табл. 1); общего оксипролина – на 19 % ($p = 0,002$). Содержание связанного оксипролина достоверно не изменялось (табл. 1).

В кости альвеолярного отростка выявлена частичная деградация гликозаминогликанов (снижение их уровня на 17%; $p = 0,10$; табл. 1). В результате действия лидазы в данном объекте исследования снижалось содержание свободного оксипролина на 16 % по сравнению с интактной группой ($p = 0,04$). Уровень общего оксипролина достоверно не изменялся (табл.1).

При недостатке цинка снижается его ингибирующий эффект в отношении коллагеназ и желатиназ десен (MMP-2 и MMP-9) [9]. Содержание Zn^{2+} в десне при моделировании пародонтита снижалось в 1,3 раза ($p = 0,009$; табл.1).

При дефиците магния происходит активация гиалуронидазы [10]. В десне крыс под влиянием лидазы уровень Mg^{2+} снижался на 33% ($p < 0,001$; табл. 1). В костной ткани пародонта содержание Mg^{2+} снижалось на 13 % (тенденция; $p = 0,10$).

Таблица 1

Показатели состояния межклеточного матрикса соединительной ткани пародонта крыс при моделировании пародонтита ($M \pm m$; p)

| Исследуемые показатели | Группы животных | |
|--|------------------------------|-------------------------|
| | интактная | модель пародонтита |
| | десна | |
| Содержание: ГАГ (мг/г) | 2,40±0,11 | 2,49±0,14 |
| оксипролина (мкмоль/г) | | |
| свободного | 7,76±1,23 | 4,46±0,68 p=0,05 |
| связанного | 5,29±1,03 | 5,88±1,37 |
| общего | 12,9±0,27 | 10,4±0,50 p=0,002 |
| Содержание: Zn ²⁺ (мкмоль/г) | 2,22±0,13 | 1,67±0,030 p=0,009 |
| Mg ²⁺ (ммоль/г) | 0,030±0,00080 | 0,020±0,0013 p<0,001 |
| | кость альвеолярного отростка | |
| Содержание: ГАГ (мг/г) | 2,47±0,17 | 2,05±0,19 p=0,10 |
| оксипролина (мкмоль/г) | | |
| свободного | 4,35±0,14 | 3,65±0,28 p=0,04 |
| связанного | 8,35±1,78 | 8,59±0,75 |
| общего | 12,7±1,64 | 12,2±0,34 |
| Содержание: Mg ²⁺ (ммоль/г) | 0,16±0,0095 | 0,14±0,0050 p=0,10 |

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

При моделировании пародонтита активность щелочной фосфатазы в кости альвеолярного отростка снижалась в 1,7 раза (тенденция; p=0,11; табл.2); содержание Ca²⁺ – вдвое (p<0,001), фосфора – в 2,2 раза (p=0,03), что говорит о значительном нарушении минерального обмена в костной ткани пародонта крыс под действием лидазы (гиалуронидазы).

Показатели резорбции и состояние минерального обмена в костной ткани пародонта крыс при моделировании пародонтита ($M \pm m$; p)

| Исследуемые показатели | Группы животных | |
|---|-----------------|-------------------------|
| | интактная | модель пародонтита |
| Показатели резорбции костной ткани пародонта(%) нижняя челюсть | 30,1±2,49 | 36,4±1,00 p=0,04 |
| | верхняя челюсть | 27,3±0,85 p=0,03 |
| Активность: ЩФ (нмоль/с·г) | 0,54±0,052 | 0,40±0,064 p=0,11 |
| Содержание: Ca ²⁺ (ммоль/г) | 0,040±0,0029 | 0,020±0,0021 p<0,001 |
| Фосфор (ммоль/г) | 0,024±0,0055 | 0,011±0,00036 p=0,03 |

Вполне правомочны в связи с этим показатели резорбции кости альвеолярного отростка. Так, на нижней челюсти резорбция костной ткани пародонта усиливалась на 21 % ($p=0,04$); на верхней - на 23 % ($p=0,03$; 100 % в интактной группе; табл. 2).

В результате моделирования пародонтита в десне в 3,3 раза увеличивалась активность провоспалительного фермента кислой фосфатазы: $5,00 \pm 1,32$ мкмоль/с·г по сравнению с интактной группой: $1,50 \pm 0,00$ мкмоль/с·г ($p=0,005$).

Под влиянием лидазы в десне и кости альвеолярного отростка усиливались процессы ПОЛ. Содержание МДА увеличивалось в десне на 40 % ($p=0,05$; табл. 3). Активность глутатион-пероксидазы при этом снижалась в 2,4 раза ($p<0,001$).

В костной ткани пародонта содержание МДА увеличивалось на 16 % ($p=0,06$; табл. 3). Увеличение активности глутатион-пероксидазы в данном объекте исследования на 16% ($p<0,001$) предположительно носило индуктивный характер в ответ на значительное увеличение концентрации перекисных продуктов. Активность другого антиоксидантного фермента каталазы в кости альвеолярного отростка снижалась в 1,6 раза ($p<0,001$) по сравнению с данными интактной группы.

Содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в тканях пародонта крыс при моделировании пародонтита ($M \pm m$; p)

| Исследуемые показатели | Группы животных | |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|
| | интактная | модель пародонтита |
| Содержание: МДА (нмоль/г) | десна | |
| | 18,7±3,40 | 26,1±1,06 p=0,05 |
| Активность: каталазы (мкат/г) | 27,7±5,46 | 34,0±10,2 |
| ГПО (мкмоль/с·г) | 217±0,46 | 89,3±20,4 p<0,001 |
| Содержание: МДА (нмоль/г) | кость альвеолярного отростка | |
| | 0,79±0,061 | 0,92±0,020 p=0,06 |
| Активность: каталазы (мкат/г) | 17,0±0,52 | 10,4±0,68 p<0,001 |
| ГПО (мкмоль/с·г) | 80,1±1,89 | 92,9±1,55 p<0,001 |

Выводы

1. В результате поддесневого введения лидазы (гиалуронидазы) была воспроизведена модель пародонтита, вызвавшая значительные нарушения структурно-функционального состояния соединительной ткани пародонта – гелеобразующей среды (частичная деградация ГАГ) и коллагена (снижение содержания оксипролина в тканях пародонта).

2. Подтверждением воспроизведения модели пародонтита явилось усиление резорбции костных структур пародонта крыс.

3. В тканях пародонта под влиянием лидазы усиливались перекисные процессы при недостаточном функционировании системы антиоксидантной защиты.

Литература

1. Слуцкий Л. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина.:1969: 375 .

2. Серов В. Соединительная ткань. М.: Медицина.:1981: 312.

3. Николаева А.В. Влияние некоторых нейротропных средств на состояние тканей при раздражении верхнего шейного симпатического узла: Автореф. дис. канд. мед. наук. Харьков.: 1967: 29.
4. Шараев П. Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. Лаб. дело.: 1981, 5: 283-285.
5. Метод определения гликазаминогликанов в биологических жидкостях. / [П. Шараев, В. Пешков, Н. Соловьева, Т. Широкова, Н. Зворыгина, А. Солопаев, Н. Алексеева]. Лаб. дело: 1987, 5: 330-332.
6. Владимиров Ю.А. , Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука.: 1972: 230.
7. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. Королюк., Д. Иванова, И. Майорова. Лабораторное дело: 1988, 1: 16-18.
8. А.С.922637 СССР. МКИ 01 33/48. Способ определения активности глутатион-пероксидазы в биологических тканях / В. Пахомова, Н. Козлянина, Г. Крюкова. Оpubл. 25.04.82, Бюл. №15: 2.
9. A.de Souza. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. Dental Materials: 2000, 16 (2): 103-108.
10. Effects of magnesium on the production of extracellular matrix metalloproteinases in culture rat vascular smooth muscle cells. / [Yue H., Lee G., Shimizu H., Uzui H., Mitsuke Y., Ueda T.] . Atherosclerosis.: 2003, 166 (2) : 271-277.

References

1. Sluckij L. Bioximija normalnoj i patologicheski izmenennoj soedinitelnoj tkani. L.: Medicina.:1969: 375. (in Russian)
2. Serov V. Soedinitelnaya tkan. M.: Medicina.:1981: 312. (in Russian)
3. Nikolaeva A.V. Vliyanie nekotoryx nejrotroponyx sredstv na sostoyanie tkanej pri razdrazhenii verxnego shejnogo simpaticeskogo uzla: Avtoref. dis. kand. med. nauk. Xarkov.: 1967: 29. (in Russian)
4. Sharaev P. N. Metod opredeleniya svobodnogo i svyazannogo oksiprolina v syvorotke krovi. Lab. delo.: 1981, 5: 283-285. (in Russian)
5. Metod opredeleniya glikazaminoglikanov v biologicheskix zhidkostyax. / [P. Sharaev, V. Peshkov, N. Soloveva, T. Shirokova, N. Zvorygina, A. Solopaev, N. Alekseeva]. Lab. delo: 1987, 5: 330-332. (in Russian)

6. Vladimirov Yu.A. , Archakov A. I. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskix membranax. M.: Nauka.: 1972: 230. (in Russian)
7. Korolyuk M. A. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy / M. Korolyuk., D. Ivanova, I. Majorova. Laboratornoe delo: 1988, 1: 16-18. (in Russian)
8. A.S.922637 SSSR. MKI 01 33/48. Sposob opredeleniya aktivnosti glutation-peroksidazy v biologicheskix tkanyax / V. Paxomova, N. Kozlyanina, G. Kryukova. Opubl. 25.04.82, Byul. №15: 2. (in Russian)
9. A.de Souza. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. Dental Materials: 2000, 16 (2): 103-108.
10. Effects of magnesium on the production of extracellular matrix metalloproteinases in culture rat vascular smooth muscle cells. / [Yue H., Lee G., Shimizu H., Uzui H., Mitsuke Y., Ueda T.] . Atherosclerosis.: 2003, 166 (2) : 271-277.