

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ

УДК:616.311.2+616.314.17+616.314.19)-002+616.71-007.234)-092.4/.9-08-074/-076

*О.І. Годована*

### ГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ВІДРОСТКА НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ НА ТЛІ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗУ І ПАРОДОНТИТУ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

#### Актуальність.

За останні десятиліття зросла кількість наукових праць, автори яких обґрунтовують імовірний кореляційний зв'язок між низкою показників, які характеризують первинний системний остеопороз/остеопенію і резорбцію кісткової тканини альвеолярного відростка як фундаментальної частини пародонтального комплексу [1; 2]. Проте, незважаючи на зусилля практичних лікарів-стоматологів і науковців, поширеність та інтенсивність генералізованого пародонтиту продовжує зростати [3; 4].

Установлено, що структуру тканин пародонта підтримують глікозаміноглікани (ГАГ) екстрацелюлярного матриксу. Завдяки своїм фізико-хімічним властивостям, зокрема здатності утворювати протеогліканові агрегати, глікозаміноглікани здатні забезпечувати численні функції сполучної тканини: 1) трофічну - активний обмін речовин між кров'ю і тканинами; 2) бар'єрну - захист від зовнішніх подразників (модулювання функціонального стану фагоцитів та імунокомпетентних клітин); 3) пластичну - регенерація і заміщення дефектів (взаємодія з рецепторами клітинної поверхні та стимуляція міграції фібробластів і клітинної проліферації) [5].

У процесі виникнення та перебігу патологічного процесу в пародонті ферменти бета-глюкуронідаза, гіалуронідаза, бета-N-ацетилгексозамінідаза та хондроїтинсульфатаза беруть активну участь у розщепленні кислих глікозаміногліканів і глікопротеїнів міжклітинної речовини, мембран клітин пародонта, а відтак - у руйнуванні циркулярної зв'язки і кісткової тканини пародонта в цілому. Для оптимізації процесів остеогенезу запропоновано низку фармакологічних препаратів, які впливають на метаболізм кісткової тканини, підвищують функціональну активність остеобластів, збільшують їхню кількість, сприяють продукуванню колагену, а також інгібують утворення по-

передників остеокластів, а відтак - і самих остеокластів [6]. Актуальними є пошук шляхів і розробка лікувальних схем, які включають фармакологічні середники, здатні гальмувати резорбційні процеси кісткової тканини і проявляти пародонтопротекторну дію.

**Метою роботи** було гістологічне та гістохімічне вивчення кісткової тканини нижньої щелепи, хребця хвостового відділу та стегнової кістки щурів, у яких попередньо змодельовано системний остеопороз і пародонтит. У порівняльному аспекті вивчали вплив на кісткову тканину різних остеотропних препаратів, зокрема створених на основі ГАГ.

#### Матеріал і методи дослідження.

Експериментальні дослідження проводили у віварії ЛНМУ імені Данила Галицького на 30 білих статевозрілих нелінійних щурах-самках, маса яких становила 320-350 г. У 25 тварин моделювання патологічного процесу (системного остеопорозу і пародонтиту) проводили впродовж 2-х місяців шляхом додавання в раціон Трилону Б ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Sigma) [7]. Додатково в порожнині рота навколо шийок зубів гострим екскаватором травмували тканину ясен.

Згідно з розробленою схемою досліду група №1 включала 5 здорових тварин (контрольна група), група №2 - 5 тварин, яких після 2-місячного моделювання патологічного процесу виводили з експерименту для вивчення патологічних змін у кістках скелета. Група №3 - 5 тварин, яким після моделювання патологічного процесу для фармакологічної корекції давали препарат "Остеогенон" («Pierre Fabre Medicament Production», Франція) - оссеїн-гідроксиапатитний комплекс з розрахунку 0,126 мг/кг добової дози людини на одну тварину. У групі №4 - 5 тварин отримували препарат "Вітурум® Остеомаг" ("Unipharm Inc.", США) на основі кальцію, вітаміну D<sub>3</sub> та мінералів із розрахунку 0,185 мг/кг на одну тварину. Тварини групи №5

(n=5) отримували препарат «Бівалос<sup>®</sup>» («Les Laboratoires Servier Industrie», Франція) на основі стронцію ранелату з розрахунку 0,125 мг/кг на одну тварину, а в групі №6 — 5 тварин отримували препарат «Терафлекс<sup>®</sup>» («Contract Pharmacal Corporation», «Bayer Consumer Care AG», США/Швейцарія) на основі ГАГ (глюкозаміну гідрохлориду та натрію хондроїтину сульфату) з розрахунку 0,094 мг/кг на одну тварину. Дози обраних препаратів для тварин визначали з урахуванням коефіцієнта видової стійкості, виходячи з добової дози для людини [8]. Тривалість експерименту складала 4 місяці (2 місяці — моделювання патологічного процесу; наступні 2 місяці — лікування). Забір матеріалу (нижня щелепа, хребець хвостового відділу та стегнова кістка) здійснювали після виведення тварин з експерименту збільшенням дози ефірного наркозу.

Вилучені кістки (нижня щелепа, хребець, стегно) фіксували в розчині Буена. Декальцинацію кісток проводили у 2% розчині азотної кислоти [9]. Зневоднення здійснювали за допомогою етилового спирту зростаючої концентрації, після чого матеріал заливали в парафін. Гістозрізи товщиною 7-10 мкм виготовляли на санному мікротомі. Фарбування проводили гематоксиліном Ерліха та еозином. Глікоген та основні ГАГ ідентифікували за допомогою PAS-реакції за Мак-Манусом [10], а кислі ГАГ — альціановим синім за Стідманом [11]. Гістологічні препарати та фотореєстрацію здійснювали методом світлової мікроскопії з використанням мікроскопа «Leica DM-2500» та фотокамери «Leica DFC 450C» (Switzerland) [12]. Середні показники рівня кислих і основних ГАГ оцінювали за бальною шкалою: мала кількість - 5-40%, середня (помірна) кількість - 41-80%, велика кількість - 81-100%.

Досліди з тваринами виконували із дотриманням міжнародних норм Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes, Страсбург, 1986) [13] відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених I Національним конгресом із біоетики (Київ, 2001). Протокол дослідження (№7 від 24 вересня 2012 року) був схвалений комісією з питань біоетики ЛНМУ ім. Данила Галицького.

### Результати дослідження та їх обговорення.

За результатами дослідження встановлено, що дія остеотропних препаратів різного спрямування має різнонаправлену дію на скелетні кістки (нижня щелепа, хребець хвостового відділу та стегнова кістка). Розподіл кислих та основних ГАГ у різних кістках також відбувався з певними особливостями. У нормі (група №1) у кістках скелета мала кількість PAS-позитивних речовин відповідала відсутності ознак запального процесу. Малопомітне відкладання основних ГАГ (7,94%) за відсутності

кислих ГАГ, імовірно, було свідченням нормально-го перебігу моделювання кісткової тканини. При патологічному стані — системному остеопорозі та пародонтиті в групі №2 на тлі порушення організації всіх структурних компонентів кісткової тканини, зокрема змін на рівні компактної та губчастої речовини, в усіх досліджуваних кістках рівень основних ГАГ різко зростав (71,74%) та з'являлася невелика кількість резервних кислих ГАГ (15,49%), як реакція організму на ушкодження.

При аналізі кісток групи №3, тварини якої отримували «Остеогенон», найвищий рівень кислих ГАГ, що брали участь у репарації тканин, виявлено в стегнових кістках (67,34%). Натомість найменша їх кількість простежувалася в нижній щелепі (20,27%) (рис. 1).

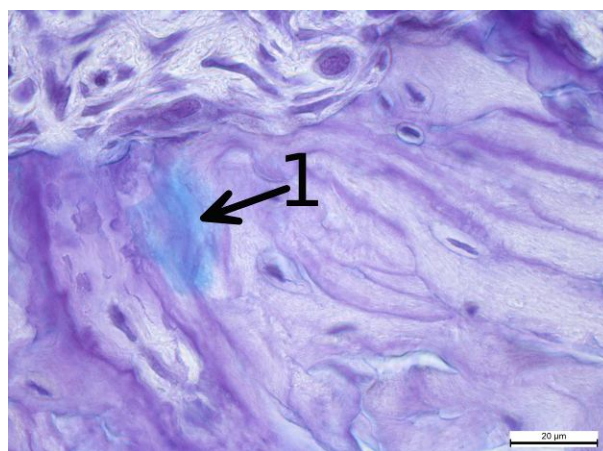


Рис. 1. Помірне відкладання кислих ГАГ (1) у ділянці деструктивних змін кісткової тканини нижньої щелепи. Альціановий синій за Стідманом  $\times 1000$

На відміну від групи №3, що отримувала «Остеогенон», уживання тваринами групи №4 препарату «Вітрум<sup>®</sup>Остеомаг» приводило до низької концентрації кислих ГАГ у стегнових кістках (15,54%), тоді як цей препарат потенціював їхнє суттєве зростання в хребцях хвостового відділу (69,49%). У щелепних кістках основні ГАГ домінували (64,35%) над малою кількістю кислих ГАГ (15,85%) (рис. 2).

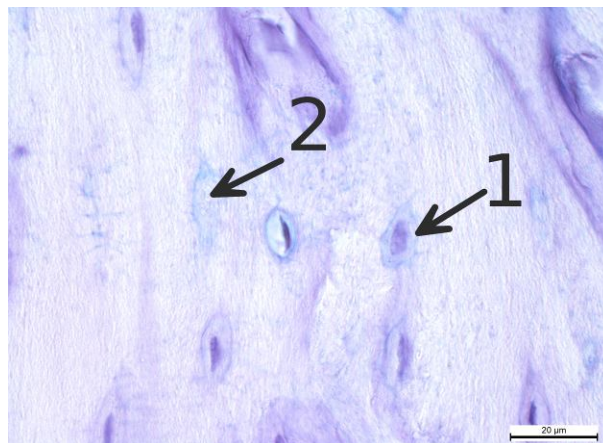


Рис. 2. Мала кількість кислих ГАГ у внутрішній стінці остеоцитарних лакун (1). Поодинокі зерна кислих ГАГ (2) у цитоплазмі та відростках остеоцитів кісткової тканини нижньої щелепи. Альціановий синій за Стідманом  $\times 1000$

У тварин групи №5 при вживанні препарату



“Бівалос®” у кістковій тканині хребців простежено одночасне збільшення кількості основних (73,72%) та кислих (58,35%) ГАГ. Стегнова кістка і нижня щелепа продемонстрували малу кількість кислих ГАГ (15,70%) (рис. 3) на тлі помірної кількості основних ГАГ (60,64%). Через два місяці лікування цим препаратом у компактній кістці альвеолярного відростка нижньої щелепи проглядалися численні вогнища резорбції у вигляді овальних новоутворених лакун. Кісткові балки губчастої кістки були потоншені та деформовані.

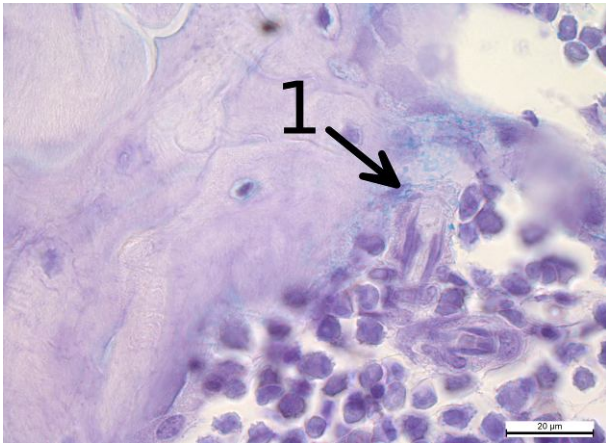


Рис. 3. Мала кількість зерен кислих ГАГ (1) у ділянках деструкції кісткової тканини нижньої щелепи. Альціановий синій за Стідманом x 1000

У групі №6, тварини якої отримували “Терафлекс®”, у кістковій тканині хребців простежувався найвищий рівень кислих ГАГ (75,47%), у той час як у стегновій кістці — 51,26%. На відміну від попередніх підгруп у щелепних кістках групи № 6 виявлено найвищий рівень кислих ГАГ (59,76%) (рис. 4) на тлі прискореного перебігу регенераційних процесів (рис. 5), що свідчило про доцільність і високу ефективність застосування препарату “Терафлекс” у тварин зі змодельованим пародонтизом та системним остеопорозом.

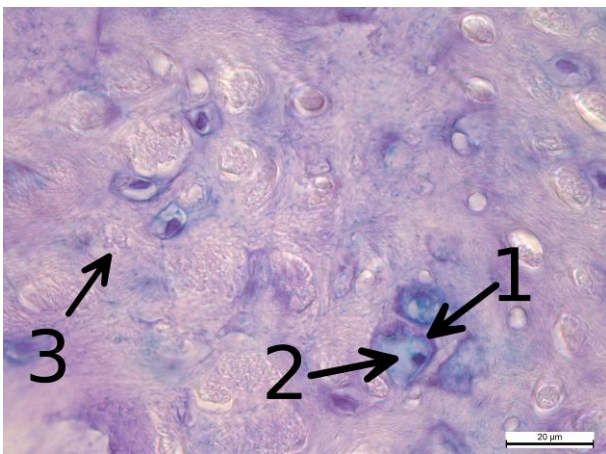


Рис. 4. Нагромадження кислих ГАГ у внутрішній стінці остеоцитарних лакун (1), у цитоплазмі остеоцитів (2) та у відростках остеоцитів (3) у ділянках репаративної регенерації альвеолярного відростка нижньої щелепи. Альціановий синій за Стідманом x 1000

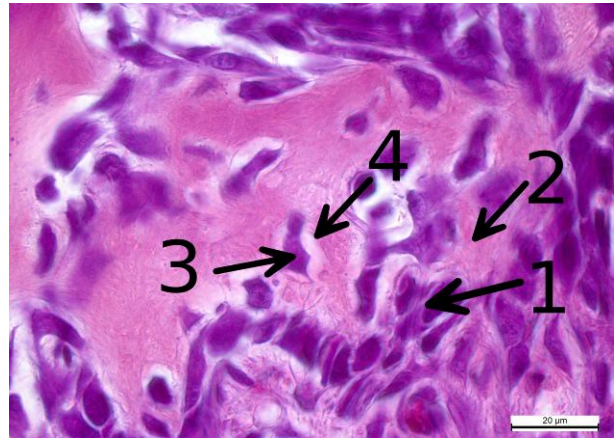


Рис. 5. Велика кількість активних остеобластів (1) на поверхні кісткової тканини нижньої щелепи (2). Новоутворені остеоцити (3) в остеоцитарних лакунках (4). Гематоксилін-еозин x 1000

Серед інших особливостей проведеної фармакологічної корекції патологічного процесу встановлено, що в досліджуваних зразках тварин, які отримували “Остеогенон”, “Вітрум®Остеомаг” та “Бівалос®”, простежувалася поява невеликих мікротріщин у кістковій тканині нижньої щелепи, стегновій кістці та хребцях (рис. 6), тоді як препарат “Бівалос®” спричиняв розвиток глибоких мікротріщин саме в стегнових кістках тварин.

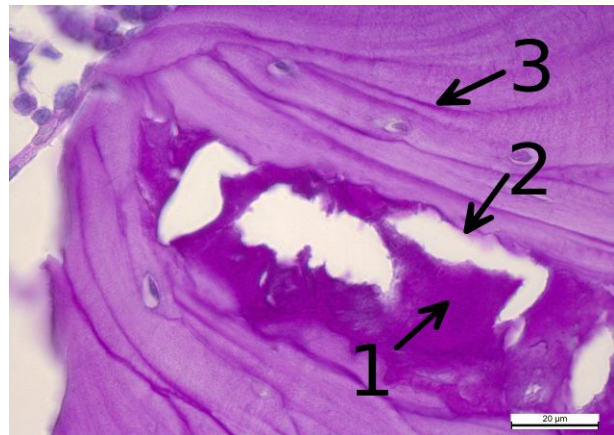


Рис. 6. Нагромадження PAS-позитивних речовин (1) у ділянках мікротріщин (2). Неоднорідне нагромадження основних ГАГ у цементних лініях (3). PAS-реакція за Мак-Манусом x 1000

Це явище отримало своє підтвердження в літературних джерелах, де клінічні роботи демонстрували появу незвичайних та низькоенергетичних, з атиповою локалізацією (підвертлюжні та діафізарні) переломів стегнової кістки в пацієнтів, які вживали різні остеотропні препарати, в тому числі й бісфосфонати, упродовж 5–10 років. Серед цих пацієнтів були й такі, в яких не визначався остеопороз за денситометричними критеріями [14]. Імовірно, що основна гіпотеза про патофізіологію атипових переломів стегнової кістки вказує на те, що жорстке і тривале пригнічення резорбції кісткової тканини може призводити до накопичення в кістках мікрошкоджень і розвитку “неспроможності” кісткової тканини в місцях максимального навантаження, зокрема в підвертлюжних або діафізарних відділах стегна [15]. Можна припустити, що поява таких мікротріщин у щелепних кіст-

ках підгруп №3, №4 і №5 свідчить про їх належність до групи кісток, які теж сприймають підвищене навантаження. Слід зауважити, що у тварин групи №6, які вживали препарат на основі ГАГ «Терафлекс®», подібних мікротріщин у досліджуваних кістках не виявлено.

### Висновок.

Таким чином, експериментальні дані дозволили встановити, що на тлі патологічного процесу використання препарату «Терафлекс®» продемонструвало найвиразнішу позитивну динаміку в усіх кісткових структурах. Зокрема, в зразках кістки альвеолярного відростка нижньої щелепи ділянки руйнування були відсутніми, а рівень кислих ГАГ був найвищим.

### Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані дозволяють рекомендувати «Терафлекс®» для включення в схему комплексного лікування пацієнтів із пародонтитом різних ступенів тяжкості на тлі системного остеопорозу/остеопенії.

### Література

1. Дмитриева Л.А. Состояние тканей пародонта у пациентов с системным остеопорозом / Л.А. Дмитриева, В.Г. Атрушкевич, У.А. Пихлак // Стоматология. – 2006. - №5. – С. 17-19.
2. Мазур І.П. Порушення кісткового метаболізму у хворих на генералізований пародонтит (Клініко-експериментальне дослідження. Частина 3) / І.П. Мазур // Імплантологія Пародонтологія Остеологія. – 2012. - №2(26). – С.70-74.
3. Белоклицкая Г.Ф. Пародонтологический статус людей пожилого и старческого возраста / Г.Ф. Белоклицкая, Э.М. Павленко // Современная стоматология. - 2013. - №2. - С. 117-119.
4. Кулыгина В.Н. Результаты исследования распространенности и структуры заболеваний пародонта у лиц молодого возраста / В.Н. Кулыгина, Мохаммад Аль Мохаммад, Л.Л. Козлова // Український стоматологічний альманах. - 2013. - №5. - С. 29-31.
5. Ларионов Е.В. Роль сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) в физиологии и патофизиологии тканей пародонта / Е.В. Ларионов, Т.А. Глыбина // Стоматология сегодня. – 2007. - № 2(62). – С. 52-53.
6. Машенко И.С. Научно-практическое обоснование различных видов остеотропной терапии, используемой в комплексном лечении генерализованного пародонтита / И.С. Машенко, А.А. Гударьян // Современная стоматология. – 2005. - №2. – С. 64-67.
7. Пат. 2070031 С1 Россия А61К6/02 Способ лечения генерализованного пародонтита / Вишняк Г.Н., Григоров Ю.Г., Поворознюк В.В. [и др.] (РФ). - №93035895/14; заявл. 12.07.93; опубл. 10.12.96; ФИПС – 1996.
8. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком. ; за ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Видавничий дім «Авіцена», 2001 – 528 с.
9. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой. – 2-е изд., перераб. и доп. / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
10. Лупа Х. Основы гистохимии ; пер. с нем. под ред. Н.Т. Райхлина. – М.: Мир, 1980. - 342 с.
11. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 422 с.
12. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника: руководство / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
13. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 квітня 1996 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (міжнародний документ Ради Європи). – Режим доступу до документа: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
14. Girgis C.M. Bisphosphonate use and femoral fractures in older women / C.M. Girgis, M.J. Seibel // JAMA. — 2011. — Vol. 305. — P. 2068-2074.
15. Schilcher J. Incidence of stress fractures of the femoral shaft in woman treated with bisphosphonate / J. Schilcher, P. Aspenberg // Acta Orthop. - 2009. - Vol.80(4). - P. 413-415.

Стаття надійшла  
18.02.2016 р.

### Резюме

Обговорюються результати гістохімічного дослідження глікозаміногліканів кісток експериментальних тварин (альвеолярного відростка нижньої щелепи, хребця хвостового відділу, стегнової кістки) в нормі, після моделювання системного остеопорозу і пародонтиту та після їх фармакологічної корекції препаратами загальної дії «Остеогенон», «Вітрум®Остеомаг», «Бівалос®» та «Терафлекс®». Установлено, що дія остеотропних препаратів різного спрямування має різнонаправлену дію на скелетні кістки. Разом з тим, у щелепних кістках тварин, яким давали «Терафлекс®», виявлено найвищий рівень кислих глікозаміногліканів на тлі прискореного перебігу регенераційних процесів, що свідчило про доцільність і високу ефективність застосування препарату «Терафлекс®» у тварин зі змодельованим пародонтитом і системним остеопорозом.

**Ключові слова:** глікозаміноглікани, експеримент, щури, кісткова тканина, остеопороз, пародонтит.

### Резюме

Целью исследования являлась гистохимическая оценка гликозаминогликанов костей экспериментальных животных (альвеолярного отростка нижней челюсти, позвонка хвостового отдела, бедренной кости) в норме, после моделирования системного остеопороза и пародонтита, а также после их фармакологической коррекции препаратами общего действия «Остеогенон», «Витрум®Остеомаг», «Бивалос®» и «Терафлекс®». Результаты исследования засвидетельствовали разнонаправленное воздействие данных остеотропных препаратов на костную ткань скелета. В костной ткани альвеолярного отростка нижней челюсти животных, принимающих «Терафлекс®», определяли самый высокий уровень кислых гликозаминогликанов на фоне ускоренного течения регенерационных процессов, что было доказательством эффективности применения препарата «Терафлекс®» после моделирования пародонтита и системного остеопороза.

**Ключевые слова:** гликозаминогликаны, эксперимент, крысы, костная ткань, остеопороз, пародонтит.

UDC: 616.311.2+616.314.17+616.314.19)-002+616.71-007.234)-092.4/9-08-074/-076

## **HISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF GLYCOSAMINOGLYCANS OF THE MANDIBULAR ALVEOLAR PROCESS IN PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS AND PERIODONTITIS**

**Hodovana O.I.**

Danylo Galician Lviv National Medical University

### **Summary**

The current issue of this study is to search for the ways and elaboration of treatment schemes, which include pharmacological means, capable of inhibiting processes of bone tissue resorption, and which show periodontium-protective action.

The aim of the research was histological and histochemical investigation of the mandibular bone tissue, caudal vertebra and femur of rats with prior modeling of systemic osteoporosis and periodontitis. Influence of osteotropic medications, "Osteogenon" "Vitrum® Osteomag", "Bivalos®" and "Teraflex®" on bone tissue was studied in comparative aspect. Glycogen and basic glycosaminoglycans (GAGs) were identified by means of PAS-reaction after MacManus, and acid GAGs – by alcian blue after Stidman.

It has been established that the action of different osteotropic medicines has various influences on skeletal bones. In the norm (group №1) low level of PAS-positive substances in skeletal bones showed absence of signs of the inflammatory process. Slight deposit of basic GAGs (7.94%) with the absence of acid GAGs, most likely, was the evidence of a normal course of bone tissue modeling. In pathological process – systemic osteoporosis and periodontitis in group №2 in impairment of organization of all structural components of bone tissue, particularly modifications of compact and spongy substance, the level of basic GAGs drastically increased (71.74%) and slight amount of reserved acid GAGs (15.49%) appeared in all examined bones as a body's reaction to damage.

Having analyzed bones of group №3, animals of which received "Osteogenon", the highest level of acid GAGs, involved in tissue reparation, was detected in femurs (67.34%). At the same time, the lowest level was observed in mandibular bone (20.27%).

Unlike group №3, which received "Osteogenon", use of medication "Vitrum® Osteomag" by animals of group №4 resulted in low concentration of acid GAGs in femurs (15.54%), while this medication potentiated their significant growth in caudal vertebrae (69.49%). In jawbones basic GAGs dominated (64.35%) over low amount of acid GAGs (15.85%).

In animals from group №5, which used medication "Bivalos®", simultaneous increase in amount of basic (73.72%) and acid (58.35%) GAGs was observed in bone tissue of the vertebrae. Femur and mandible showed low amount of acid GAGs (15.70%) and moderate amount of basic GAGs (60.64%). In 2 months' treatment with this medication, numerous foci of resorption in the form of oval newly formed lacunae were seen in compact bone of the alveolar process in the mandible.

Trabeculae of spongy bone were thin and deformed.

In group №6, animals of which received "Teraflex®" (glucosamine hydrochloride and sodium chondroitin sulfate), the highest level of acid GAGs (75.47%) was observed in bone tissue of vertebrae, while in femur it was 51.26%. Unlike previous subgroups, the highest level of acid GAGs (59.76%) was revealed in jawbones of group №6 in accelerated course of regeneration processes, which proved the expediency and high efficacy of medication "Teraflex®", used for animals with modeled periodontitis and systemic osteoporosis.

Among other peculiarities of conducted pharmacological correction of pathological process, it was established that appearance of micro fissures in bone tissue of the mandible, femur and vertebrae was observed in examined samples of animals, which received "Osteogenon" "Vitrum® Osteomag", "Bivalos®" and "Teraflex®".

Thus, the obtained data enable to recommend medication on the basis of GAG "Teraflex®" for inclusion to scheme of complex treatment of patients with periodontitis with various degrees of severity in systemic osteoporosis/osteopenia.

**Key words:** glycosaminoglycans, experiment, rats, bone tissue, osteoporosis, periodontitis.