

УДК 577.1:616-001.17

Черемісіна В. Ф., Жемела О.Д., Гученко Г.П.

СТАН ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ПАРОДОНТА У КРОЛІВ ПРИ ГІДРОКОРТИЗОНОВОМУ ПАРОДОНТИТІ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків

В статті приведено результати вивчення стану перекисного окиснення ліпідів та активності ферментних систем при гідрокортизонавому пародонтиті у кролів, як в сироватці крові, так і в гомогенаті пародонта нижньої щелепи. У випадку збільшеного надходження ксенобіотиків, виснаження депо антиоксидантів, незбалансованого харчування та інших негативних факторів виникає окисний стрес, що характеризується порушенням прооксидантного та антиоксидантного балансу, з перевагою першого та розвитком оксидативних ушкоджень. Мета роботи – провести аналіз стану вільнорадикальних процесів при гідрокортизонавому пародонтиті у кролів. Матеріали та методи. Дослідження проводились на кролях породи Шиншилла з експериментальним пародонтитом. Результати досліджень. Виявлено однаправленність змін перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантних ферментних систем як в сироватці крові, так і в гомогенаті тканин нижньої щелепи пародонта. При дослідженні стану перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у сироватці крові спостерігали активацію перекисного окиснення ліпідів і зниження антиоксидантного захисту. Висновки. Підвищення активності процесів перекисного окиснення ліпідів має велике значення у патогенезі багатьох патологічних процесів, у тому числі і запальних уражень тканин пародонта. Зміни показників системи перекисного окиснення ліпідів є маркерами виразності запального процесу та ефективності лікування. При гідрокортизонавому пародонтиті у кролів відбувається активація перекисного окиснення ліпідів і зниження активності антиоксидантних ферментних систем. Зсуви вторинних продуктів ПОЛ, каталази та церулоплазміну підтверджують запальний характер патології пародонта у кролів.

Ключові слова: кролі, гідрокортизонавий пародонтит, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, каталаза, церулоплазмін, малоновий діальдегід.

Вільні кисневі радикали утворюються у всіх аеробних організмах під час фізіологічних та патологічних процесів. В еволюції вижили тільки ті організми, у яких сформувалась система захисту від вільнорадикальних впливів.

Біохіміками та біофізиками було встановлено, що окиснення органічних сполук – це послідовність вільнорадикальних реакцій. Хімічні основи супероксидного і гідроксильного радикалів були описані багато десятиків років тому радіаційними хіміками. Механізми перекисного окиснення ліпідів були з'ясовані спеціалістами гумової промисловості. Детальне вивчення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та ролі антиоксидантів було проведено хіміками харчової та полімерної промисловості. В 1954 році G. Gershman та N. Gilbert висунули гіпотезу, що більша частина пошкоджуючих ефектів підвищеного вмісту кисню у живих організмів може бути обумовлена вільними радикалами. Ще раніше, в 1939 році, із еритроцитів бика був виділений білок, який через свою локалізацію і вмісту міді був названий еритрокупреїном. Однак ця ідея та знахідки не привернули особливої уваги більшості біологів та медиків, поки в 1969 році J.M. McCord і I. Fridovich не виявили ферментативну природу еритрокупреїну і описали реакцію, яку він каталізував [1, 2, 15]. Цей фермент отримав назву супероксиддисмутаза. Вважається, що з цього часу вільнорадикальна патологія стала самостійним розділом медичної науки [3].

Практичним наслідком цієї області досліджень стало те, що був отриманий ефективний

інструмент впливу на вільнорадикальні реакції та перекисне окиснення ліпідів, що протікають в організмі. Цим інструментом виявилися високо- та низькомолекулярні антиоксиданти, що пригнічують реакції, в яких приймають участь вільні радикали. Зацікавленість до ролі вільних радикалів і процесів ПОЛ в нормальних, фізіологічних реакціях та патогенетичних механізмах хвороб людини неухильно підвищується. Перший пік зацікавлення до ролі цих процесів в біології та медицині припав на 60-70-і роки минулого століття. Після деякого спаду зацікавленість до цих проблем знову посилилася у другій половині 80-х років ХХ століття. Про це свідчить наступний факт. В 1986 році в журналі «Human Pathology» з'явилася редакційна стаття під символічною назвою «Return of the Radicals» («Повернення радикалів»). З тих пір інтенсивність медико-біологічних досліджень з приводу проблем вільнорадикальної патології та ПОЛ тільки підвищується.

Підвищення активності процесів ПОЛ відіграє велике значення у генезі багатьох патологічних процесів, у тому числі і запальних уражень тканин пародонта. Процеси окиснення та відновлення за нормальних умов збалансовані. У випадку збільшеного надходження ксенобіотиків, виснаження депо антиоксидантів, незбалансованого харчування та інших негативних факторів виникає окисний стрес, що характеризується порушенням прооксидантного та антиоксидантного балансу, з перевагою першого та розвитком оксидативних ушкоджень [4]. Зміни показників сис-

теми ПОЛ слугують маркерами виразності запального процесу та ефективності лікування [5].

Мета роботи

Провести аналіз стану вільнорадикальних процесів при гідрокортизоновому пародонтиті у кролів.

Матеріали та методи досліджень

Експериментальний пародонтит у кролів породи Шиншилла, масою 2,5-3,0 кг, відтворювали шляхом щоденних ін'єкцій 0,2 мл гідрокортизону ацетату (суспензія для ін'єкцій 2,5 %) в проміжок між різцями нижньої щелепи до появи вираженої клініки пародонтиту [6].

Тварин оглядали щоденно, звертаючи увагу на загальну рухливість, апетит, масу тіла, виділення із носу, слинотечу, рухливість нижніх різців.

Стан перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантної системи (АОС) оцінювали за концентрацією малонового діальдегіду (МДА), активністю церулоплазміну, каталази в сироватці крові і гомогенаті тканини та антиоксидантно-прооксидантним індексом (АПІ), який розраховували як відношення активності каталази до концентрації МДА [7]. Концентрацію МДА визначали за тіобарбітуровим методом [4, 5, 16]. Рівень церулоплазміну в сироватці крові встановлювали за методом Равіна з використанням як субстрату

парафенілєндіаміну [8]. Активність каталази визначали за методом за зменшенням вмісту перекису водню в інкубаційному середовищі.

Результати експериментів піддавали статичній обробці непараметричним методом за допомогою U-критерія Манна-Уїтні та використанням Excel [9]. Достовірними вважали результати при $p < 0,05$.

Експерименти проводили у відповідності з принципами «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються за експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986) та «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими 1 Національним конгресом з біоетики [10].

Результати та їх обговорення

При дослідженні стану ПОЛ та АОС у сироватці крові спостерігали активацію ПОЛ і зниження антиоксидантного захисту. Про це свідчить збільшення церулоплазміну в 1,9 рази та МДА в 1,6 рази порівняно з інтактним контролем. Відмічали також зниження показника АПІ в 3,4 рази, що також підтверджувало наявність запальних явищ при експериментальному гідрокортизоновому пародонтиті у кролів (табл. 1)

Таблиця 1
Показники ПОЛ та АОС в сироватці крові за умов гідрокортизонового пародонтиту у кролів ($X \pm S_x$, $n=6$)

Групи	Показники			
	Церулоплазмін, мг%	Каталаза, мккат/г	Вміст ТБК-реактивів, мкмоль/г	АПІ, ум.од.
Інтактні кролі	27,5±0,9	0,55±0,06	1,30±0,08	0,42±0,07
Кролі з гідрокортизоновим пародонтитом	52,6±0,9*	0,36±0,08*	2,1±0,07*	0,17±0,03*

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно з інтактною групою тварин

Обговорюючи зсуви, що відбувалися на рівні церулоплазміну в наших дослідженнях слід враховувати, що при окисному стресі дія ендогенних антиоксидантних ферментів може виявитися не ефективною в результаті інгібуючого впливу на їх активні центри перекисів жирних кислот і АФК. При цьому провідну роль у антиоксидантному захисті відіграють неферментативні антиоксиданти (вітаміни А, С, Е, глутатіон, убіхінон та ін.). Церулоплазмін є феррооксидазою, що належить до групи білків гострої фази запалення та бере участь у регуляції еритропоезу [6]. Окрім цього, він здатний інгібувати автоокиснення ліпідів, викликане неорганічним залізом, тобто виконує функцію антиоксиданта. Передбачається, що церулоплазмін перехоплює вільні радикали, відновлюючи за допомогою іонів міді супероксидний аніон-радикал і, таким чином, оберігає подібно супероксиддисмутазі (СОД) ліпідвмістні структури від пошкоджуючої дії вільних радикалів. Однак антиоксидантна активність церулоплазміну суттєво менша, ніж СОД. Він є поглиначем кисеньпохідних аніонних радикалів, що цир-

кують в судинному руслі, в той час як СОД – майже виключно внутрішньоклітинний фермент. Підвищення концентрації в сироватці крові при пародонтиті церулоплазміну свідчить, по-перше, про перерозподіл його в кровеносному руслі, що є компенсаторною реакцією, направленою на підтримку рівня АОС організму, а, по-друге, підтверджує наявність запальних явищ в групі кролів контрольної патології [11].

В наступному етапі експерименту ми досліджували стан ПОЛ в гомогенаті тканини нижньої щелепи пародонта та виявили ознаки виснаження АОС, зокрема, зниження активності каталази. Відомо, що каталаза є ферментом класу оксидоредуктаз, що розкладає перекис водню, який утворюється в процесі біологічного окиснення на воду та молекулярний кисень, а також окиснює при наявності перекису водню низькомолекулярні спирти та нітри.

Результати визначення показників ПОЛ в гомогенаті тканини нижньої щелепи представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Показники ПОЛ та АОС у гомогенаті тканини нижньої щелепи за умов гідрокортизонового пародонтиту ($X \pm S_x$, $n=6$)

Групи	Показники		
	Каталаза, мккат/г	Вміст ТБК-реактивів, мкмоль/г	АПІ, ум.од.
Інтактні кролі	1,72±0,09	0,64±0,09	2,69
Кролі з гідрокортизоновим пародонтитом	0,98±0,01*	2,40±0,02*	0,41*

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно з інтактною групою тварин.

Каталаза є одним із найважливіших антиоксидантних ферментів: одна молекула каталази здатна перетворити кілька мільйонів молекул перекису водню на воду і кисень за секунду [13].

Висновки

1. При гідрокортизоновому пародонтиті у кролів відбувається активація перекисного окиснення ліпідів і зниження активності антиоксидантних ферментних систем.

2. Виявлено однаправленність змін перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантних ферментних систем як в сироватці крові, так і в гомогенаті тканин нижньої щелепи пародонта.

3. Зсуви вторинних продуктів ПОЛ, каталази та церулоплазміну підтверджують запальний характер патології пародонта у кролів.

References

1. Armstrong D. Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2002. 186 p.
2. Bayburina G. Influence of free radical oxidation on level of corticosteroid receptors in livers of animals depending on initial sensitivity to hypoxia in dynamics of postresuscitation period. International Research Journal. 2018. 1(67):30–4.
3. Kantarci A. Animal models for periodontal regeneration and per implant responses. Periodontol. 2000. 1:66–82.
4. Marnett L. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat. 1999. 424(1-2):83–95.
5. Seto H, Okuda T, Takesue T. Reaction of Malonaldehyde with Nucleic Acid. Formation of Fluorescent Pyrimido[1,2-ajpurin-10(3H)-one Nucleosides. Bulletin of the Chemical Society of Japan. 1983. 56(6):1799–1802.
6. Berezniakova A. I. Stan nefermentnogo antyoksydantnogo gomeostazu u shhuriv z alergichnym dermatytom [Rats have the state of unenzymic antioxidant homeostasis with an allergodermia]. Fiziologichnyj zhurnal = Physiology magazine. 2014, 4(60): 50–5. (In Ukr.)

7. Gevkaljuk N. O. Dejaki pokaznyky stanu oksydantno-antyoksydantnoi' systemy pry grypoznomu stomatyti u ditej [Some indicators of the oxidation-antioxidant system in children with flu-like stomatitis]. Medychna himija = Medical chemistry. 2013, 2(15): 60–3. (In Ukr.)
8. Kamyshnykov V. S. Metody klynicheskoy laboratornoj dyagnostyky [Methods of clinical laboratory diagnostics]. M.: MEDpress-inform = The MEDpress-inform. 2013. 736 p. (In Russ.)
9. Kolesnikova L. I., Darenskaja M.A., Kolesnikov S.I. Svobodnoradikal'noe okislenie: vzgljad patofiziologa [Free-radical oxidation: look of physiopathology]. Bjulleten' sibirskoj medicyny = Bulletin of Siberian medicine. 2017, 4:16–29. (In Russ.)
10. Koroljuk M. A., Ivanova L. I., Majorova I. G. Metod opredelenija aktivnosti katalazy [Method for the determination of catalase activity]. Laboratornoe delo = Laboratory work. 1988, 1: 16–9. (In Russ.)
11. Lapach S. N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovanijah s ispol'zovaniem Exel [Statistical methods in biomedical research using Exel]. K.: MORION, 2000. 320 p. (In Russ.)
12. Levyckij A. P., Stupak E.P., Furdychko A.Y. Biohymicheskye yzmenenija v parodonte kryis s alloxanovym dyabetom u yh korrekcyja lyzocymom [Biochemical changes in the periodontium of rats with alloxan diabetes and their correction by lysozyme]. Aktual'ni problemy suchasnoi' medycyny: Visnyk ukrai'ns'koi' medychnoi' stomatologichnoi' akademii' = Actual problems of modern medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Stomatological Academy. 2013, 2 (42): 42–6. (In Russ.)
13. Mozgovaja L.A. Rol' citokinov v patogeneze vospalitel'nyh zabolevanij parodonta [The role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases]. Materialy Nauchnoj sessii 2007 goda (Perm') = Materials of the Scientific Session of 2007 (Perm). 2007. 81-2 p. (In Russ.)
14. Obshhie jeticheskie principy jeksperimentov na zhivotnyh: materialy I Nacional'nogo kongressa po biojetike [General ethical principles of experiments on animals: Proceedings of the I National Congress on Bioethics]. K.: NANU = K.: NASU. 2001. 16 p. (In Russ.)
15. Putilina F. E. Svobodno-radikal'noe okislenie: uchebno-metod [Free-radical oxidation: the teaching method]. Posobie. SPb.: Izd. SPb. un. = Allowance SPb.: Ed. SPb. Un. 2008. 161 p. (In Russ.)
16. Stal'naja I. D., Gorishvii T.D. Metod opredelenija malonovogo dial'degida s pomoshh'ju tiobarbiturovoj kisloty. Sovremennye metody v biohimii [Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. Modern methods in biochemistry]. M.: Medicina = M.: Medicine. 1977. 66–8 p. (In Russ.)

Реферат

СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПАРОДОНТА У КРОЛЕЙ ПРИ ГИДРОКОРТИЗОНОВОМ ПАРОДОНТИТЕ

Черемисина В. Ф., Жемела О.Д., Гученко Г.П.

Ключевые слова: кроли, гидрокортизоновый пародонтит, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, каталаза, церулоплазмин, малоновый диальдегид.

В статье приведены результаты изучения состояния перекисного окисления липидов и активности ферментных систем при гидрокортизоновом пародонтите у кролей, как в сыворотке крови, так и в гомогенате нижней челюсти пародонта. В случае увеличенного поступления ксенобиотиков, истощение депо антиоксидантов, несбалансированного питания и других негативных факторов возникает окислительный стресс, характеризующееся нарушением прооксидантного и антиоксидантного баланса, с преобладанием первого и развитием оксидативных повреждений. Цель работы - провести анализ состояния свободнорадикальных процессов при гидрокортизоновом пародонтите у кролей. Материалы и методы. Исследования проводились на кролях породы Шиншилла с экспериментальным пародонтитом. Результаты исследований. Выявлено однаправленность изменений перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантных ферментных систем как в сыворотке крови, так и в гомогенате тканей нижней челюсти пародонта. При исследовании состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в сыворотке крови наблюдали активацию перекисного окисления липидов и снижение антиоксидантной защиты. Выводы. Повышение активности процессов перекисного окисления липидов играют большое значение в патогенезе многих патологических процессов, в том числе и воспалительных поражений тканей пародонта. Изменения показателей перекисного окисления липи-

дов служат маркерами вираженості запального процесу та ефективності лікування. При гідрокортизоновому пародонтиті у кролів відбувається активація перекисного окислення ліпідів та зниження активності антиоксидантних ферментних систем. Сдвиги вторичних продуктів ПОЛ, каталази та церулоплазмина підтверджують запальний характер патології пародонта у кролів.

Summary

STATUS OF FREE-RADICAL PROCESSES AND ANTIOXIDANT PROTECTION SYSTEM OF THE PARODONTIUM CONNECTIVE TISSUE IN RABBITS WITH HYDROCORTISONE PERIODONTITIS

Cheremysna V.F., Jemela O.D., Gychenko G.P.

Key words: rabbits, hydrocortisone periodontitis, peroxide oxidation of lipids, antioxidant system, catalase, ceruloplasmin, malondialdehyde.

The article presents the results of studying the status of lipid peroxidation and the activity of enzyme systems in hydrocortisone periodontitis in rabbits, both in serum and in the periodontal mandibular homogenate. Increased intake of xenobiotics, depletion of depot antioxidants, unbalanced nutrition and other negative factors promotes the development of an oxidative stress characterized by impairing the prooxidant and antioxidant balance, and the development of oxidative damage. Object. To analyze the status of free-radical processes in hydrocortisone periodontitis in rabbits. Materials and methods. The research was conducted on Chinchilla breeds, which were subjected to modeled periodontitis. Results. Unidirectional changes of lipid peroxidation (LP) and antioxidant enzyme systems in both serum and mandibular periodontal tissue homogenate were found out. The study demonstrated the activation of lipid peroxidation and antioxidant defense in serum. Conclusions. Increase in the activity of lipid peroxidation processes plays an important role in the pathogenesis of numerous pathological processes, including inflammatory lesions of periodontal tissues. Changes in the indicators of the lipid peroxidation system serve as markers for identifying the severity of the inflammatory process and the effectiveness of the treatment. In hydrocortisone periodontitis in rabbits we observe the activation of lipid peroxidation and decrease in the activity of antioxidant enzyme systems. Shifts occurring in the secondary LP products, catalase and ceruloplasmin confirm the inflammatory nature of periodontium pathology in rabbits.