

Механизмы нарушений свободнорадикальных процессов в тканях пародонта крыс в условиях экспериментального пародонтита и разработка методов их коррекции

Елена Всеволодовна Хмиль, Лилия Ивановна Ляшенко, Наталия Валентиновна Янко, Дмитрий Александрович Хмиль, Людмила Фёдоровна Каськова

ВДНЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Полтава

Khmil E.V., Lyshenko L.I., Yanko N.V., Khmil D.A., Kaskova L.F.

Alteration mechanisms of oxidative stress at periodontal tissues of rats in a simulated periodontitis and elaborate methods of their correction

РЕЗЮМЕ

Введение. Одним из механизмов активации перекисного окисления липидов является экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS), являющейся одним из факторов патогенеза пародонтита.

Цель. В эксперименте на 50 половозрелых белых крысах обоих полов линии Вистар исследована роль изоформ NO-синтазы в механизмах нарушений свободнорадикальных процессов в тканях пародонта крыс при экспериментальном пародонтите.

Материалы и методы. Пародонтит у крыс вызывался высокоуглеводной диетой с большим количеством жиров. Крысам в условиях экспериментального пародонтита вводили 7-нитроиндазол (селективный ингибитор нейрональной NO-синтазы), аминогуанидин (селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы) и L-аргинин (субстрат NO-синтазной реакции). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате мягких тканей пародонта определяли по содержанию ТБК-активных продуктов (тиобарбитураты) до и после 1,5-часовой инкубации. Активность антиоксидантной системы (АО) оценивали по приросту ТБК-активных продуктов за

время полуторачасовой инкубации в железо-аскорбатном буферном растворе, а также по степени активности АО ферментов - супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Результаты. Повышение активности нейрональной NOS (nNOS) в условиях активного течения пародонтита значительно ограничивает активацию перекисного окисления липидов в тканях пародонта, снижает антиоксидантный потенциал, но при этом уменьшает активность каталазы. Функциональная активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) способствует активации в тканях пародонта свободнорадикальных процессов, снижает АО потенциал. Показано, что L-аргинин в условиях МС эффективно восстанавливает АО процессы в тканях пародонта, что предположительно может дать позитивный результат при комплексном лечении воспалительно-дистрофических заболеваний тканей пародонта и МС в целом.

Выводы. Полученные результаты обосновывают целесообразность клинического исследования применения средств, влияющих на активность изоформ NO-синтазы (в лекарственных формах для местного и системного применения) с целью предупреждения и коррекции повреждения тканей пародонта в условиях метаболического синдрома.

Ключевые слова: метаболический синдром, NO-синтаза, пародонтит, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

ABSTRACT

Background. One of the peroxidation stress mechanisms is inducible NO synthase (iNOS) expression involved in the pathogenesis of periodontitis.

Objective. To assess the influence of isoform NO synthase (NOS) on alteration mechanisms of oxidative stress at periodontal tissues of 50 mature rats in a simulated periodontitis (SP).

Material and methods. A SP at rats was induced by a high-carbohydrate, high-fat (HCHF) diet. Treated SP rat groups were intragastrically administered with selective neuronal NOS

(nNOS) inhibitor 7-nitroindazole, selective inducible NOS (iNOS) inhibitor aminoguanidine, and nitric oxide synthase substrate L-arginine. Oxidative stress level in the homogenated soft periodontal tissues was evaluated by TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) level before and after 1,5 hours of incubation. Antioxidant response was evaluated by the increase in concentration of TBARS for incubation, and by antioxidant enzyme activity – superoxide dismutase and catalase.

Results. nNOS activity increase in a SP considerably limits oxidative stress activation at periodontal tissues, decreases antioxidant response, but heightens catalase activity. iNOS functional activity stimulates oxidative stress at periodontal tissues of rats, decreases antioxidant response. L-arginine in a MS effectively repaired antioxidant response at periodontal tissues that probably will give positive result at complex treatment of periodontitis and MS generally.

Conclusions. In the near future, the appropriate regulation of NO activity by using NOS-active agents may provide a novel strategy for the periodontal disease prevention and correction in a MS.

Key words: metabolic syndrome, NO-synthase, periodontitis, oxidative stress, antioxidant response elements.

У большинства больных с признаками метаболического синдрома (МС) достаточно широко распространены воспалительно-дистрофические заболевания тканей пародонта [1,3]. Некоторые авторы считают целесообразным рассматривать пародонтит как один из компонентов МС. Известно, что заболевания пародонта имеют много общих факторов риска с МС: гипергликемия, ожирение, дислипидемия и артериальная гипертензия. Хотя причинно-следственная связь между пародонтитом и большинством из указанных причинных факторов ещё полностью не доказана, но их

модификация значительно влияет на возникновение и развитие заболеваний пародонта [1].

Структура тканей пародонта довольно чувствительна к дефициту или избытку оксида азота (NO), который образуется при участии различных изоформ NO-синтазы (NOS), ферментативных реакций восстановления нитрит-ионов и нитритредуктазы [2].

В патогенезе пародонтита ведущую роль играет эндотелиальная дисфункция, связанная с уменьшением активности эндотелиальной NOS (eNOS) и провоспалительной активации индуцибельной NOS (iNOS) с последующей избыточной продукцией NO, которая проявляет цитотоксические свойства [3]. Известно, что активация iNOS сопровождается усилением выработки активных форм кислорода (АФК), в частности, супероксиданион-радикала и инициацией свободнорадикального некролиза [4]. Избыточная продукция NO и $\cdot O_2^-$ создает условия для образования высокотоксичного пероксинитрита.

Однако роль компонентов системы NO в инициации свободнорадикальных процессов в тканях пародонта в условиях развития пародонтита недостаточно изучена. Детальное изучение этого вопроса позволит значительно расширить использование новых методов и средств для профилактики и лечения воспалительных заболеваний тканей пародонта. Поэтому целью нашей работы было исследование влияния изоформ NO-синтазы на механизмы нарушений свободнорадикальных процессов в тканях пародонта крыс в условиях экспериментального пародонтита.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 50 белых крысах обоих полов линии Вистар весом 180-230 г в 5 сериях опытов. При работе с животными придерживались требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте и других научных целях»(№23,

18.03.1986). Комиссией по биоэтике ВДНЗУ «УМСА» (протокол № 116, 04.06.2014) нарушений морально-этических норм при проведении научно-исследовательской работы не обнаружено. В первой серии необходимые показатели изучали у интактных животных (контрольная серия). Во второй - после моделирования пародонтита. В третьей, четвертой и пятой сериях - на фоне экспериментального пародонтита животным вводили селективный ингибитор nNOS 7-нитроиндазол (7-NI), селективный ингибитор iNOS-аминогуанидин и субстрат NO-синтазной реакции - L-аргинин соответственно. Для моделирования пародонтита грызунам в течение двух месяцев назначали 20% водный раствор фруктозы для питья и диету, содержащую: рафинированную пшеничную муку - 45%; сухое обезжиренное коровье молоко - 20%; крахмал - 10%; столовый маргарин (с составом жиров 82%) - 20%; перекисленное подсолнечное масло - 4%; натрия хлорид - 1%. 7-NI («Sigma», США) назначали в дозе 30 мг/кг [5], аминогуанидин («Sigma», США) - 20 мг/кг [6], L-аргинин («Kyowa Hakko Kogyo Co LTD», Япония) - 500 мг/кг [7].

Все соединения вводили в виде растворов внутривнутрибрюшинно 2 раза в неделю в течение периода воспроизведения пародонтита. Объектами исследования были мягкие ткани пародонта.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате мягких тканей пародонта определяли по содержанию ТБК-активных продуктов до и после 1,5-часовой инкубации [8]. Активность антиоксидантной системы (АО) оценивали по приросту ТБК-активных продуктов за время полуторачасовой инкубации в железо-аскорбатном буферном растворе, а также по степени активности АО ферментов - супероксиддисмутазы и каталазы [8]. Полученные результаты обрабатывали вариационно-статистическим методом, рассчитывая значение t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. После введения фруктозы с питьевой водой и назначения «диеты западного типа» в течение двух месяцев у крыс развивалось значительное нарушение обмена веществ, характерное для метаболического синдрома (снижение толерантности к глюкозе, висцеральное ожирение, дислиппротеинемия, системный воспалительный ответ в тканях пародонта). Воспроизведение нами пародонтита вызвало существенные изменения прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза в тканях пародонта животных. Так, концентрация ТБК-реактантов выросла на 69,6% ($p < 0,01$), что указывает на активацию процессов ПОЛ в тканях пародонта.

За время инкубации в железо-аскорбатном буферном растворе увеличился прирост концентрации ТБК-реактантов на 69,9% ($p < 0,001$) по сравнению с данными интактной группы, что указывает на существенное снижение АО потенциала. Это так же подтверждалось уменьшением активности АО ферментов в тканях пародонта. Активность каталазы при этом снизилась на 38,5% ($p < 0,05$), СОД - на 37,5% ($p < 0,02$).

На состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в значительной степени влияла функциональная активность NOS. Так, введение селективного ингибитора nNOS 7-NI достоверно повысило содержание ТБК-реактантов в тканях пародонта на 15,5% ($p < 0,01$). В этих условиях нами так же зафиксирован прирост концентрации ТБК-реактантов за время инкубации в прооксидантном буферном растворе на 13,0%, ($p < 0,02$), по сравнению с данными интактной группы, что указывает на снижение АО потенциала. Однако при внесении 7-NI повышается активность каталазы на 43,5% ($p < 0,05$) по сравнению с данными животных второй серии.

Таким образом, NO, который генерируется nNOS, имеет неоднозначное влияние на показатели активности АО системы. С одной стороны, он выполняет сигнальную функцию, которая поддерживает АО потенциал и ограничивает интенсификацию ПОЛ.

С другой стороны, NO снижает активность каталазы в тканях пародонта. Считается, что снижение активности последней может быть связано со связыванием этого фермента с продуктом метаболизма нитратов - NO и образованием менее активной феррикаталазы-NO [9].

Введение селективного ингибитора iNOS амингуанидина в условиях воспроизведения МС, наоборот, снизило концентрацию ТБК-реактантов в пародонте на 38,5% ($p < 0,01$) по сравнению с данными второй серии. Это свидетельствует о том, что именно активность iNOS внесла существенный вклад в интенсификацию процессов ПОЛ. При этом применение амингуанидина снизило прирост концентрации ТБК-реактантов за время инкубации в железо-аскорбатном буферном растворе на 39,1% ($p < 0,001$) по сравнению с данными второй серии. Это непосредственно указывает на взаимосвязь развития АО недостаточности с функционированием iNOS и обнаруживает прямое протекторное действие её ингибитора амингуанидина.

Полученные результаты также подтверждаются повышением активности АО потенциала на фоне введения амингуанидина: активность СОД возросла на 46,7% ($p < 0,05$), каталазы - на 58,9% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с данными второй серии.

Разнонаправленные эффекты NO, которые вырабатываются nNOS и iNOS можно объяснить наличием функциональной компарментализации и характеристиками места его образования. Известно, например, что конститутивные NOS связаны с плазматическими мембранами. Гидрофобный и липофильный характер NO способствует его компарментализации в липидном слое и защищает от реакции с гидрофильным супероксидом, предупреждая тем самым образование высокоактивного пероксинитрита. В то же время, внутри липидного слоя NO легко реагирует с липидными пероксидными радикалами [10].

Введение животным L-аргинина при пародонтите значительно уменьшает концентрацию ТБК-реактантов в гомогенате тканей пародонта и снижает их прирост за время инкубации на 32,8% ($p < 0,01$) по сравнению с данными второй серии. Это, безусловно, предупреждает разъединение переноса электронов в оксигеназных ферментах, из-за чего кислород становится единственным акцептором электронов и препятствует образованию АФК [11].

Выводы. Таким образом, нами установлено, что при воспроизведении экспериментального пародонтита на фоне МС происходит активация свободнорадикальных процессов в тканях пародонта, снижение АО потенциала с угнетением активности АО ферментов в тканях пародонта.

Функциональная активность индуцибельной NO-синтазы (iNOS) способствует активации в тканях пародонта свободнорадикальных процессов, снижает АО потенциал, подавляет активность АО ферментов (СОД, каталазы). Повышение же активности нейрональной NOS (nNOS) в условиях активного течения пародонтита значительно ограничивает активацию перекисного окисления липидов в тканях пародонта, снижает антиоксидантный потенциал, но при этом уменьшает активность каталазы. Введение животным L-аргинина на фоне моделирования пародонтита восстанавливает АО процессы в тканях пародонта, что может дать положительный эффект при лечении воспалительно-дистрофических заболеваний тканей пародонта и МС в целом.

Полученные результаты обосновывают целесообразность клинического изучения эффективности использования средств, влияющих на активность изоформ NO-синтазы (в лекарственных формах для местного и системного применения), с целью предупреждения и коррекции повреждения тканей пародонта в условиях метаболического синдрома.

Литература

1. **Романенко И.Г., Крючков Д.Ю.:** Генерализованный пародонтит и метаболический синдром. Единство патогенетических механизмов развития. Кримський терапевтичний журнал 2011, 1, 60 - 67.
2. **Костенко В.О., Єлінська А.М., Ляшенко Л.І., Нагорняк І.В., Стасюк О.А.:** Роль слинних залоз у механізмах ауторегуляції рівня оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушень. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії 2013, 13(2), 10 - 14.
3. **Pakdeechote P., Bunbupha S., Kukongviriyapan U., Prachaney P., Khrisanapant W., Kukongviriyapan V.:** Asiatic acid alleviates hemodynamic and metabolic alterations via restoring eNOS/iNOS expression, oxidative stress, and inflammation in diet-induced metabolic syndrome rats. *Nutrients* 2014, 6(1), 355 - 370.
4. **Yamagishi S., Matsui T.:** Nitric oxide, a Janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy - Friend or foe? *Pharmacol Res* 2011, 64(3), 187-194.
5. **Laude K., Favre J., Thuillez C., Richard V.:** NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection. *Am J Physiol Heart. Circ. Physiol* 2003, 284(6), H2053 - H2060.
6. **Takeuchi K., Hatazawa R., Tanigami M., Tanaka A., Ohno R., Yokota A.:** Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sci* 2007, 80(4), 329 - 336.
7. **Дробінська О., Остапченко Л., Цирюк О., Фалалєєва Т., Овчарик Т.:** Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном. Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна 2004, 38, 201 - 204.

8. **Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та інші:** Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині (Ред. І.П. Кайдашев). Полтава, Полімет, 2003, 320с.

9. **Kim Y.S., Han S.:** Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase. *Biol Chem* 2000, 381(12), 1269 - 1271.

10. **Trostchansky A., Möller M.N., Bartesaghi S., Botti H., Denicola A., Radi R., Rubbo H.:** Nitric Oxide, Second Edition: Biology and Pathobiology, New York, Science Press, 2009, 27-60.

11. **Roe N.D., Ren J.:** Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol* 2012, 57(5 – 6), 168 -172.

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ: Наталия В.Янко

ул.Шевченко,23,

36024, г.Полтава, Украина, ВДНЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», кафедра детской терапевтической стоматологии с профилактикой стоматологических заболеваний,

+380958417309, latned@ukr.net.