

УДК: 616.314-089.87-06-02:616.379-008.64]-092.9

Ганчев К.С., Абрамов А.В.

ІНДУЦИБЕЛЬНА СИНТАЗА МОНООКСИДУ АЗОТУ - ЇЇ РОЛЬ У ФОРМУВАННІ ПОСТЕКСТРАКЦІЙНИХ УСКЛАДНЕНЬ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Запорізький державний медичний університет

Мікроангіопатія, гіперглікемія, імунодефіцит, гіпосалівація, нейротрофічні розлади, що розвиваються при цукровому діабеті, стають у хворих патогенетичними чинниками розвитку захворювань порожнини рота та формування ускладнень при хірургічних втручаннях. Метою дослідження було встановити особливості змін показників експресії індуктибельної синтази монооксиду азоту у тканинах пародонту щурів із експериментальним стрептозотоциновим діабетом у різні періоди (1-а, 7-а та 14 доба) після екстракції першого нижнього моляру. Проведення експериментального дослідження на 120 щурах дозволило встановити, що екстракція зубу у контрольних тварин призводить до поступового збільшення показників експресії iNOS у пародонті з 1-ї до 7-ї доби. На 14-ту добу показники експресії iNOS знижуються, але залишаються достовірно вищими, чим до екстракції. Експериментальний цукровий діабет призводить до суттєвого збільшення «фонові» експресії iNOS. Видалення у них зубу супроводжується масивним «лавиноподібним» збільшенням вмісту та концентрації iNOS в тканинах пародонту з 1-ї до 7-ї доби після екстракційного періоду із підтриманням високої експресії ізоформи та її розповсюдженістю у пародонті до 14-ї доби.

Ключові слова: індуктибельна синтаза монооксиду азоту, постекстракційні ускладнення, експериментальний цукровий діабет, щури.

За частотою та тяжкістю клінічних проявів з боку тканин пародонту цукровий діабет (ЦД), безумовно, займає особливе місце. Сьогодні вже жоден стоматолог не може сказати, що ЦД – це проблема виключно ендокринологічна, тому що у 100 % хворих він впливає на стан зубощелепної системи [1]. Мікроангіопатія, гіперглікемія, імунодефіцит, гіпосалівація, нейротрофічні розлади, що розвиваються при ЦД, стають у хворих патогенетичними чинниками розвитку захворювань порожнини рота та формування ускладнень при хірургічних втручаннях [2,3,4]. У хворих на ЦД відмічено зниження витривалості пародонту із розвитком діабетичної пародонтопатії, прогресує остеопороз, зменшується здатність до регенерації кісткової тканини, формуються запальні зміни слизової оболонки [4,5]. Вже через декілька місяців після виявлення ЦД практично всі пацієнти мають ознаки пародонтиту [6]. Зміни в пародонті є ранніми симптомами ЦД, описані випадки, коли вперше діагноз ЦД встановлював стоматолог після обстеження порожнини рота [7]. Всі ці проблеми хворих на ЦД стають складною перепоною при плануванні стоматологічних хірургічних маніпуляцій. Більш того, швидке прогресування запальних процесів, порушення місцевого імунітету, дистрофічні розлади, стають важливим підґрунтям формування тяжких ускладнень [7,8]. Розуміння патогенетичних механізмів їх формування надасть можливість знизити ризик розвитку ускладнень та розробити патогенетично обґрунтовані методи лікування. Саме тому метою дослідження було встановити особливості змін показників експресії індуктибельної синтази монооксиду азоту у тканинах пародонту щурів із експериментальним стрептозотоциновим діабетом у різні періоди (1-, 7- та 14-а доба) після екстракції першого нижнього моляру.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальну частину дослідження ви-

конували в суворій відповідності з національними «Спільними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з директивою Ради 2010/63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року по захисту тварин, що використовують для наукових цілей (Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). Протокол дослідження погоджено з локальним етичним комітетом. Експериментальні дослідження були проведені на 120 щурах-самцях лінії Wistar, віком 8-10 місяців, розподілених на вісім груп по 15 тварин у кожній:

– група «Контроль-0» – інтактні щури без екстракції зубу.

– «Контроль-1» тварини, яким було проведено екстракцію першого нижнього моляру під тіопенталовим наркозом (доза 40 мг/кг) із додатковою місцевою інфільтраційною анестезією убітезином. Виводили тварин з експерименту на першу добу після екстракції під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг ваги, внутрішньочеревинно).

– «Контроль-7» та «Контроль-14», проводилась аналогічна екстракція зубу, з експерименту виводили тварин відповідно на сьому та чотирнадцяту добу.

– «Діабет-0» - щури, яким моделювали експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) введенням внутрішньочеревинно одноразово стрептозотину (SIGMA Chemical, США) в дозі 50 мг/кг, розчиненого у 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН 4,5) ex tempore [9]. З експерименту тварин виводили через 21 добу (концентрація глюкози 17-20 ммоль/л), екстракцію зубу не проводили.

– «Діабет-1», «Діабет-7» та «Діабет-14» – щури, яким після індукції ЕЦД на 21-у добу було проведено екстракцію першого нижнього моляру праворуч за попередньо описаним методом.

Тварин виводили з експерименту відповідно на першу, сьому та чотирнадцяту добу після екстракції зубу.

Об'єктом дослідження у щурів була тканина пародонту нижньої щелепи праворуч. Після стандартної гістологічної підготовки фрагментів пародонту їх фіксували у парапластових блоках. На ротаційному мікротомі Microm-325 (Microm Corp., Germany) готували серійні зрізи тканин пародонту товщиною 5 мкм. Для дослідження експресії iNOS де парафіновані та регідратовані зрізи пародонту інкубували з мишиними моноклональними антитілами до iNOS, кон'югованими із FITC (Santa Cruz biotechnology, inc.), у розведенні 1:200. Вивчення зрізів пародонту проводили в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм за допомогою світлофільтру 38HE з високою емісією (Carl Zeiss, Germany) на мікроскопі AxioScope (Carl Zeiss, Germany). Під час аналізу зображення в інтерактивному режимі виділяли зони зі статистично значущою флуоресценцією. Показниками експресії iNOS були: вміст матеріалу, імунореактивного (IPM) до неї ($Од_{if}$), концентрація IPM у 1 мкм² зрізу ($Од_{if}/мкм^2$) та питома

площа розподілу IPM (%). Дослідженню підлягали не менше ніж 70 полів зору з кожної серії.

Всі статистичні обчислення проводилися в табличному процесорі Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., USA). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення достовірності відмінностей результатів досліджень у експериментальних і контрольних груп щурів проводили обчислювання коефіцієнту Ст'юдента (t), після чого визначали ймовірність відмінності вибірок (p) і довірчий інтервал середньої за таблицями розподілу Ст'юдента. Достовірними вважали значення, для яких $p_{st} < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Аналіз показників експресії iNOS у щурів контрольних груп показав, що вже на 1-у добу після екстракції зубу у тканинах пародонту відбувається суттєве збільшення вмісту, концентрації та питомої площі IPM до ізоформи ферменту відповідно на 47,4 % ($p_{st} < 0,05$); 51,7 % ($p_{st} < 0,05$) та 47,7 % ($p_{st} < 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Показники експресії індуцибельної NOS у пародонті щурів експериментальних груп (M±m)

Групи, n=15		Вміст IPM до iNOS, $Од_{if}$	Концентрація IPM до iNOS, $Од_{if}/мкм^2$	Питома площа IPM до iNOS, %
Без екстракції	Контроль-0	106,82 ± 5,84	11,76 ± 0,43	43,44 ± 0,91
	Діабет-0	187,14 ± 14,32^{2,3}	22,16 ± 2,41^{2,3}	52,49 ± 1,15³
1-доба після екстракції	Контроль-1	157,41 ± 6,72 ¹	17,84 ± 1,16 ¹	64,17 ± 1,37 ¹
	Діабет-1	320,29 ± 26,94^{2,3}	36,79 ± 3,64^{2,3}	61,39 ± 1,31³
7-доба після екстракції	Контроль-7	183,64 ± 9,21 ¹	22,57 ± 1,98 ¹	72,21 ± 1,24 ¹
	Діабет-7	423,05 ± 16,09^{2,3}	47,72 ± 2,14^{2,3}	71,4 ± 1,06³
14-доба після екстракції	Контроль-14	137,36 ± 8,76 ¹	12,44 ± 0,65 ¹	54,33 ± 1,02 ¹
	Діабет-14	364,99 ± 21,75^{2,3}	49,24 ± 3,33²	68,13 ± 1,45²

Примітки: 1. (¹) – достовірна різниця показників контрольних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи із попереднім строком екстракції;

2. (²) – достовірна різниця показників груп із ЕЦД ($p_{st} < 0,05$) відносно показників контрольної групи відповідного строку екстракції;

3. (³) – достовірна різниця показників груп із експериментальним цукровим діабетом ($p_{st} < 0,05$) відносно показників щурів із ЕЦД попереднього строку екстракції.

На 7-му добу після екстракційного періоду у контрольних щурів спостерігалось подальше прогресування підвищення показників експресії iNOS, при цьому вміст IPM збільшився на 17 % ($p_{st} < 0,05$), його концентрація – на 26,5 % ($p_{st} < 0,05$), питома площа – на 12,5 % ($p_{st} < 0,05$) (див. табл. 1).

На 14-ту добу після екстракційного періоду була відмічена зворотна динаміка: всі досліджувані показники експресії ізоформи ферменту у порівнянні із показниками 7-ї доби зменшувалися на 33,6% ($p_{st} < 0,05$) – вміст IPM, на 81,4 % ($p_{st} < 0,05$) – концентрація та на 32,9 % ($p_{st} < 0,05$) питома площа розподілу ферменту, що свідчить про зниження гостроти запального процесу та може розглядатися, як перехід альтеративної та ексудативної стадій запалення у проліферативну. Однак необхідно відмітити, що незважаючи на факт зменшення показників експресії iNOS у порівнянні із показниками попереднього терміну спостереження – 7-ї доби, вміст IPM до ферменту та його питома площа залишалися відповідно більшими на 28,5 % ($p_{st} < 0,05$) й 25 % ($p_{st} < 0,05$),

чим у пародонті тварин інтактної групи без екстракції зубу (див. табл. 1). Цей факт доводить, що активність запального процесу після екстракції зубу до 14-ї доби хоча і знижується, але не завершується і може свідчити про «довгострокові» репаративні перебудови у тканинах пародонту.

Дослідження експресії iNOS у тканинах пародонту щурів із ЕЦД показало, що у тварин без хірургічних маніпуляцій (екстракції зубу) всі досліджувані показники перевищували значення інтактних тварин на 75 % ($p_{st} < 0,05$) – вмісту IPM, на 88,4 % ($p_{st} < 0,05$) – його концентрації, та питомої площі – на 20,8 % ($p_{st} < 0,05$). Встановлений факт може свідчити про наявність «прихованого» запального процесу, через який відбувається збільшений синтез індуцибельної ізоформи ферменту та її поширеність у тканинах пародонту.

Видалення зубу у тварин із змодельованим ЕЦД призвело вже на 1-у добу до значного збільшення вмісту та концентрації IPM до iNOS більш ніж у 2 рази ($p_{st} < 0,05$), однак відносна площа IPM достовірно не відрізнялася від показника до проведення екстракції «Діабет-0» так і

у порівнянні із показниками відповідної групи «Контролю-1» (див. табл. 1). На 7-у добу після екстракції у щурів із ЕЦД, порівняно із відповідним «Контролем-7», було відмічено прогресування підвищення експресії iNOS: ще у 2 рази ($p_{st}<0,05$) збільшувалися вміст та концентрація IPM без суттєвих змін відносно площі. На 14-у добу у порівнянні із «Контролем-14» було встановлено значне збільшення всіх досліджуваних показників: вмісту IPM до iNOS у 2,7 рази ($p_{st}<0,05$), концентрації – у 4 рази ($p_{st}<0,05$) та на 25 % ($p_{st}<0,05$) питомої площі. У порівнянні із попереднім строком після екстракційного періоду – 7-ю добою - спостерігалось деяке зменшення вмісту IPM на 16 % ($p_{st}<0,05$), при цьому концентрація та відносна площа IPM до iNOS достовірно не відрізнялися від порівняльних показників (див. табл. 1).

Аналіз показників експресії індукцибельної ізоформи ферменту NOS показав, що у тварин із ЕЦД спостерігається висока «фонова» концентрація, вміст та розповсюдженість ферменту у тканинах пародонту. Проведення в них хірургічного втручання, в нашому експерименті це видалення зубу, на 1-7-у добу після екстракції призвело до лавиноподібного збільшення синтезу iNOS більш ніж у 2 рази у порівнянні із групою тварин з ЕЦД без екстракції, та практично у 4 рази порівняно із «Контролем-0» (див. табл. 1). Слід також відмітити, що очікуваного зниження показників експресії iNOS у щурів з ЕЦД на 14-й день, яку спостерігали у щурів контрольної групи відповідного строку, не відбулося. Більш того, виявився факт збільшення питомої площі IPM до iNOS на 14-у добу на 25 % ($p_{st}<0,05$) у порівнянні із відповідним контролем, тому що у попередні строки після екстракції (1-а та 7-а доба) цей показник достовірно не змінювався (див. табл. 1). Є припущення, що саме цей факт свідчить про розвиток вторинної альтерації у тварин із ЕЦД та стає важливим патогенетичним ланцюгом формування пізніх ускладнень: відстроєних кровотеч, альвеоліту, абсцедуванню, флегмоні, остеомієліту нижньощелепної кістки [7].

Так численні експериментальні дослідження та клінічні спостереження дозволили встановити, що надмірна активація iNOS викликає синтез високих концентрацій оксиду азоту, які впливають цитотоксично стимулюючи апоптоз та некроз [10,11], гальмують проліферацію [12] і міграцію [13] гладком'язових клітин, пригнічують синтез позаклітинного матриксу [14], надають потужну антітромбогенну дію, знижують транскрипцію протизапального ядерного фактора (NF- κ B) [15, 16], блокують експресію адгезивних молекул ендотелію (VCAM-1, E-селектин, MCP) [16] і хемотаксичних пептидів моноцитів [16], зменшують прилипання, інфільтрацію, агрегацію нейтрофілів і моноцитів [17], що і може грати патогенетичну роль у розвитку перерахованих вище ускладнень екстракції зуба у хворих на цукровий діабет.

Висновки

Екстракція зубу у контрольних щурів призводить до поступового збільшення показників експресії iNOS у пародонті з 1-ї до 7-ї доби. На 14-ту добу показники експресії iNOS знижуються, але залишаються достовірно вищими, чим до екстракції. ЕЦД призводить до суттєвого збільшення «фонові» експресії iNOS у тканинах пародонту. Видалення зубу щурам із ЕЦД призводить до масивного «лавиноподібного» збільшення вмісту та концентрації iNOS в тканинах пародонту з 1-ї до 7-ї доби після екстракційного періоду із підтриманням високої експресії ізоформи та її розповсюдженості у пародонті до 14-ї доби.

Література

1. Біда В.І Зміни в тканинах пародонта у хворих на цукровий діабет / В.І. Біда, С.М. Германчук // Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія»: Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2017. – Т. 17, Вип. 1 (57). – С. 288-292.
2. Schallhorn R. A. Understanding the Inter-relationship Between Periodontitis and Diabetes: Current Evidence and Clinical Implications / R. A. Schallhorn // Compend. Contin. Educ. Dent. - 2016. - Vol. 37, № 6. - P. 368-370.
3. Hong M. Prevalence and risk factors of periodontitis among adults with or without diabetes mellitus / M. Hong, H. Y. Kim, H. Seok [et al.] // Korean J. Intern. Med. - 2016. - Vol. 31, № 5. - P. 910-919.
4. Numabe Y. The relationship between diabetes and periodontal disease / Y. Numabe // Nihon Rinsho. - 2016. - Vol. 74, suppl. 2. - P. 477-481.
5. Керимов Р. А. Заболевания пародонта у больных сахарным диабетом и методы их лечения / Р. А. Керимов // Клини. стоматология. - 2011. - № 1. - С. 70-71.
6. Зоман Х. А. Сахарный диабет и заболевания пародонта - изучая взаимосвязь / Х. А. Зоман // Лечащий врач. - 2014. - № 3. - С. 6-8.
7. Абрамов А.В. Зависимость постэкстракционных осложнений от степени тяжести экспериментального сахарного диабета / А.В. Абрамов, К.С. Ганчев // Актуальні проблеми сучасної медицини : вісник Укр. мед. стоматолог. акад. : наук.-практ. журн. – 2014. – Т. 14, вип. 3 (47). – С. 180-184.
8. Сомова Л.М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова // Вестник ДВО РАН. – 2006. – №6. – С. 7-80.
9. Колесник Ю.М. Нейроэндокринные и иммунные механизмы развития сахарного диабета / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов // Патология. – 2005. – Т. 2, №3. – С. 20-23.
10. Мойбенко О.О., Зміни системи оксиду азоту при гострій ішемії та реперфузії міокарда / О.О. Мойбенко, М.Я. Юзьков, А.В. Коцюрба [та ін.] // Фізіологічний журнал. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 3-11.
11. Раевский К. С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы // Бюл. эксперимент. биологии и медицины.– 1997.– Т. 123.– №5.– С. 484-490.
12. Goligorsky M.S. A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction / M.S. Goligorsky [et al.] // Acta Physiol. Scand. – 2000. – Vol. 168, № 1. – P. 33-40.
13. Стокле Ж.-К. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов / Ж.-К. Стокле, Б. Мюлле, Р. Андрианци-тохайна, А. Клещев // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 976-983.
14. Ambrose J.A. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction / J.A. Ambrose, M.A. Tannenbaum, D. Alexopoulos [et al.] // J. Amer. Coll. Cardiol. – 1988. – Vol. 92. – P. 657-671.
15. Allison A. B. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease / A. B. Allison, B. H. Frank // American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – Vol. 73, №4. – P. 673-686.
16. Boger R.H. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease / R.H. Boger, S.M. Bode-Boger, W.Thiele [et al.] // Circulation. – 1997. – Vol. 95. – P. 2068-2074.
17. Cooke J.P. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease / J.P. Cooke, V.J. Dzau // Ann Rev Med. - 1997. – Vol.48. – P. 489-509.

Реферат

ИНДУЦИБЕЛЬНАЯ СИНТАЗА МОНООКСИДА АЗОТА – ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ПОСТЭКСТРАКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Ганчев К.С., Абрамов А.В.

Ключевые слова: индуцибельная синтаза монооксида азота, постэкстракционные осложнения, экспериментальный сахарный диабет, крысы.

Микроангиопатия, гипергликемия, иммунодефицит, гипосаливация, нейротрофические нарушения, которые развиваются при сахарном диабете, становятся у больных патогенетическими причинами заболеваемости ротовой полости и формирования осложнений при хирургических вмешательствах. Целью исследования было установить особенности изменений показателей экспрессии индуцибельной синтазы монооксида азота в тканях пародонта крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом в разные периоды (1-й, 7-й и 14-й день) после экстракции первого нижнего моляра. Проведение экспериментального исследования на 120 крысах позволило установить, что экстракция зуба у контрольных животных приводит к постепенному увеличению показателей экспрессии iNOS в пародонте с 1-го по 7-й день. На 14-й день показатели экспрессии iNOS снижаются, но остаются достоверно более высокими, чем до экстракции. Экспериментальный сахарный диабет приводит к значительному увеличению «фоновой» экспрессии iNOS. Удаление у них зуба сопровождается массивным «лавиноподобным» увеличением содержания и концентрации iNOS в тканях пародонта с 1-го по 7-й день послеэкстракционного периода с поддержанием высокой экспрессии изоформы и ее распространенности в пародонте до 14 дня.

Summary

The role of inducible nitric oxide synthase in the development of tooth extraction complications in experimental diabetes mellitus.

Authors: Assistant of Surgical and Propedeutic Dentistry Department Ganchev Kyrylo Serhiiiovych; Professor of Pathophysiology Department Dr.Sci. Abramov Andriy Volodymyrovich.

Microangiopathy, hyperglycemia, immunodeficiency, hyposalivation, neurotrophic disorders which develop in the course of diabetes mellitus make a basis for diseases of oral cavity and complications after surgical operations. The aim of research was to establish the peculiarities of inducible nitric oxide synthase expression in the rats with experimental diabetes mellitus. We measured the indices of inducible nitric oxide synthase expression in the periodontal tissue at the 1st, 7th and 14th day after mandibular 1st molar extraction. Experimental research on 120 rats shows that tooth extraction in control animals leads to gradual increase of iNOS expression indices in periodontum from the 1st to 7th day. By the 14th day indices of iNOS expression decrease, but still remain reliably higher than before the extraction. Experimental diabetes mellitus manifests with significant increase of basal iNOS expression. Tooth extraction in these animals is accompanied by massive increase of iNOS content and concentration in periodontal tissues from the 1st to 7th day of post-extraction period. High expression and distribution of iNOS isoform maintain in periodontal tissue up to 14th day.