

А.Н. Елинская, В.А. Костенко

Українська медичинська стоматологічна академія, Полтава

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА
В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА КРЫС ПРИ МЕСТНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ДЕСНЫ
НА ФОНЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОГО СИСТЕМНОГО
ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА**

e-mail: kostenko11111@rambler.ru

В эксперименте на 40 белых крысах линии Вистар исследованы показатели окислительно-нитрозативного стресса в тканях пародонта в условиях действия на десну местного патогенного фактора (5% раствора гидроксида натрия) при моделировании системного воспалительного ответа (СВО). Последний моделировали путем внутрибрюшинного введения липополисахарида *Salmonella typhi* (пирогенал) в дозе 0,4 мкг/кг массы в течение 1-й недели 3 раза, в течение следующих 7-ми недель – 1 раз в неделю. Показано, что воспроизведение СВО сопровождается увеличением в тканях пародонта продукции супероксидного анион-радикала (O_2^-), дисрегуляцией цикла оксида азота с одновременной активацией его NO-синтазой (NOS) и нитрат / нитритредуктазной составляющих, увеличением концентрации пероксинитрит-ионов. Нанесение щелочи на десну повышает в тканях продукцию O_2^- и активность NOS без нарушения функционирования цикла оксида азота (NO) и увеличения содержания пероксинитрит-ионов. Аппликация на десну 5% раствора гидроксида натрия на фоне СВО вызывает увеличение в тканях пародонта генерации O_2^- НАДН- и НАДФН-зависимыми источниками, дисрегуляцию цикла NO с повышением концентрации пероксинитрит-ионов, которые превосходят таковые при отдельном влиянии системного и местного факторов.

Ключевые слова: системный воспалительный ответ, острый гингивит, окислительно-нитрозативный стресс, пародонт.

Работа является фрагментом НИР «Роль активных форм кислорода, системы оксида азота и транскрипционных факторов в механизмах патологического системогенеза», № государственной регистрации 0114U004941.

Известно, что эффекты местных патогенных факторов считаются недостаточными для развития тяжелых воспалительных заболеваний пародонта. К нарушению структуры и функции пародонта приводит ряд соматических заболеваний, патогенез которых включает системный воспалительный ответ (СВО) [10]. Молекулярным триггером последнего может быть длительная активация определенных транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, STAT-3), вследствие чего экспрессируются гены ряда белков-индукторов окислительно-нитрозативного стресса (ОНС) [11]. Ранее нами сообщалось, что воспроизведение экспериментального СВО сопровождается развитием декомпенсированного пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в тканях пародонта, деполимеризацией коллагена, протеогликанов и сиалогликопротеинов с признаками избыточной резорбции альвеолярных отростков челюстей [12].

Большинство метаболических нарушений, обусловленных ОНС, тесно переплетается с ведущими патогенетическими звеньями развития, прогрессирования и хронизации воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта [9]. В этих условиях можно ожидать изменений резистентности пародонтальных тканей к действию местных агрессивных факторов, что важно для разработки методов предупреждения и лечения заболеваний пародонта при развитии СВО.

Целью работы была оценка показателей ОНС в тканях пародонта в условиях действия на десну местного патогенного фактора при моделировании липополисахарид-индуцированного СВО.

Материал и методы исследования. Исследования были проведены на 40 белых крысах линии Вистар массой 180-220 г, распределённых на 4 группы: первая включала интактных животных (контрольная), вторая – после моделирования СВО, третья – после нанесения на десну местного повреждающего агента (щелочи), в четвертой – аппликацию последней проводили на фоне моделирования СВО.

СВО моделировали путем внутрибрюшинного введения липополисахарида (ЛПС) *Salmonella typhi* (препарат «Пирогенал», фирма «Медгамал», Россия) в дозе 0,4 мкг/кг массы в течение 1-й недели 3 раза, в течение следующих 7-ми недель – 1 раз в неделю [12]. В качестве местного патогенного фактора за 7 дней до забоя на десну наносили 5% раствор гидроксида натрия (NaOH) путем орошения в течение 10 с (модель острого гингивита). Крыс декапитировали под эфирным наркозом согласно принципов биомедицинской этики.

Образование супероксидного анион-радикала (O_2^-) оценивали спектрофотометрически при проведении теста с нитросиним тетразолием в гомогенате тканей с индукторами в виде НАДН, НАДФН и пирогенала для оценки продукции O_2^- соответственно НАДН-зависимой (митохондриальной) и НАДФН-зависимыми (микросомальной и NOS) электронно-транспортными цепями (ЭТЦ), а также НАДФН-оксидазой лейкоцитов [6]. Суммарную активность NO-синтазы (NOS) определяли по разнице концентрации нитрит-ионов до и после инкубации гомогената в среде, содержащей L-аргинин и НАДФН [1]. Активность нитрат- и нитритредуктаз (НАР и НИР) определяли по разнице концентрации нитрит- и нитрат-ионов до и после инкубации гомогената в присутствии НАДН [1]. Концентрацию пероксинитрита (Пн) в гомогенате оценивали спектрофотометрически по поглощению на длине волны 355 нм [1].

Статистические расчеты проводили с использованием программы "StatisticSoft 6.0". Для проверки распределения на нормальность применяли расчет критерия Шапиро-Уилка. Если данные соответствовали нормальному распределению, то для их сравнения использовали критерий t Стьюдента для независимых выборок. В случае, когда ряды данных не подлежали нормальному распределению, статистическую обработку осуществляли с использованием непараметрического метода – теста Мана-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение. Моделирование СВО сопровождалось существенными изменениями продукции O_2^- в тканях пародонта (табл. 1). Так, его выработка НАДФН-зависимыми ЭТЦ повышалась на 38,3% ($p<0,01$), а дыхательной цепью митохондрий – на 40,5% ($p<0,01$). Генерация O_2^- НАДФН-оксидазой лейкоцитов также возрастала – на 32,9% ($p<0,01$).

Таблица 1

Продукция супероксидного анион-радикала в тканях пародонта при введении различных индукторов в условиях действия местного и системного пародонтопатогенных факторов, нмоль / с · г гомогената ($M_{\pm m}$, $n=40$)

Группы опытов	Введение индукторов генерации супероксидного анион-радикала		
	НАДФН	НАДН	Пирогенал
Интактные животные	12,47±0,87	15,41±1,08	1,58±0,12
Системное введение ЛПС	17,25±0,66 *	21,65±1,01 *	2,10±0,09 *
Местная аппликация NaOH	15,93±0,74 *	21,32±1,49 *	2,05±0,08 *
Аппликация NaOH на фоне СВО	20,53±0,37 **/**/**	27,33±1,39 **/**/**	2,77±0,09 **/**/**

Примечание (в табл. 1-2): * – $p<0,05$ при сравнении с данными интактных крыс; ** – второй группы, *** – третьей группы.

Аппликация на десну 5%-го раствора NaOH увеличивала на 7-й день после воздействия продукцию O_2^- НАДФН-зависимыми и НАДН-зависимыми ЭТЦ – на 27,7% ($p<0,02$) и 38,4% ($p<0,02$), соответственно. Выработка O_2^- НАДФН-оксидазой лейкоцитов возрастала на 29,7% ($p<0,02$).

Через 7 дней после воздействие щелочи на десну на фоне моделирования СВО продукция O_2^- в тканях пародонта всеми исследуемыми источниками значительно повышалась. Так, генерация O_2^- НАДФН-зависимыми ЭТЦ превышала результаты второй и третьей групп на 19,0% ($p<0,01$) и 28,9% ($p<0,001$), соответственно. Выработка O_2^- дыхательной цепью митохондрий превосходила данные приведенных групп на 26,2% ($p<0,02$) и 28,2% ($p<0,02$), а НАДФН-оксидазой лейкоцитов – на 31,9% ($p<0,001$) и 35,1% ($p<0,001$).

По данным литературы, гиперпродукция O_2^- при провоспалительной гиперцитокинемии обеспечивается НАДФН-зависимыми ЭТЦ в реакциях микросомального окисления (при участии цитохрома P-450) [5] и собственно NOS, которая в разобщенном состоянии способна переключаться с продукции NO на O_2^- [8]. При введении бактериального ЛПС в организм млекопитающих закономерно увеличивается генерация O_2^- НАДФН-оксидазой лейкоцитов [3]. Кроме ЛПС, эффективными стимуляторами выработки O_2^- являются провоспалительные цитокины, синтез которых зависит от активации NF- κ B [11].

Однако, наибольшее количество O_2^- генерируется вследствие 1-электронного восстановления O_2 на уровне митохондриальных ферментных комплексов: НАДН – убихиноноксидоредуктаза, убихинол – цитохром с оксидоредуктаза и цитохром b-c1 [4]. Этот процесс также ускоряется при активации NF- κ B [11]. На его интенсивность в тканях пародонта влияет концентрация цитотоксических концентрация NO и Пн [9].

Воспроизведение СВО сопровождалось значительным увеличением концентрации активных форм азота (АФА) в тканях пародонта (табл. 2). Суммарная активность NOS повышалась

на 145,0% ($p < 0,001$), активність НАР / НИР – на 36,3% ($p < 0,01$) і 34,4% ($p < 0,05$), відповідно. Концентрація Пн-іонів зростала на 30,1% ($p < 0,01$).

Таблиця 2

Показатели нитрозативного стресса в тканях пародонта в условиях действия местного и системного пародонтопатогенных факторов (M±m, n=40)

Группы опытов	NOS, мкмоль (NO ₂ ⁻)/мин·г·белка	НАР, мкмоль/мин·г белка	НИР, мкмоль /мин·г белка	Концентрация Пн-ионов, мкмоль/г гомогената
Интактные животные	4,20±0,22	11,98±0,88	3,43±0,25	0,83±0,04
Системное введение ЛПС	10,32±0,50 *	16,33±0,74 *	4,61±0,39 *	1,08±0,05 *
Местная аппликация NaOH	6,83±0,43 *	13,03±1,02	3,54±0,30	0,87±0,10
Аппликация NaOH на фоне СВО	12,24±0,45 */**/**	22,56±0,54 */**/**	5,15±0,32 */**	1,42±0,07 */**/**

Столь существенному возрастанию продукции последнего, кроме отмеченного нами роста выработки O₂⁻, очевидно, способствует нарушение механизма ауторегуляции физиологической концентрации NO в тканях – цикла оксида азота [7]. Это подтверждается одновременным увеличением активности НАР / НИР и NO-синтазы его составляющих, что закономерно увеличивает образование АФА.

Моделирование острого гингивита путём аппликация на десну 5%-го раствора NaOH увеличивала на 7-й день после воздействия суммарную активность NOS на 62,6% ($p < 0,001$), однако существенно не влияла на активность НАР / НИР и концентрацию Пн-ионов.

На 7-е сутки после воздействия щелочи на десну на фоне моделирования СВО активность NOS превышала результаты второй и третьей групп на 18,6% ($p < 0,05$) и 79,2% ($p < 0,001$), соответственно. Активность НАР превосходила данные приведенных групп на 38,2% ($p < 0,001$) и 73,1% ($p < 0,001$), а НИР – на 45,5% ($p < 0,01$) результат третьей группы. Концентрация Пн-ионов превышала результаты второй и третьей групп на 31,5% ($p < 0,01$) и 63,2% ($p < 0,01$), соответственно.

Согласно полученным результатам, моделирование СВО создает условия для более интенсивной продукции активных форм кислорода и азота (O₂⁻, цитотоксических концентрация NO, Пн) в тканях пародонта при их местном поражении химическим агентом. Это сопровождается выявленной нами ранее ещё большей активацией ПОЛ и истощением АО потенциала [12]. Следствием этого может быть развитие хронического пародонтита с инволюцией пародонта, беспрепятственной генерализацией воспалительного процесса, деструкцией элементов внеклеточного матрикса и резорбцией альвеолярного отростка челюстей [2, 9].

Вывод

Аппликация на десну 5% раствора гидроксида натрия на фоне системного воспалительного ответа вызывает увеличение в тканях пародонта продукции супероксидного анион-радикала НАДН- и НАДФН-зависимыми источниками, способствует дисрегуляции цикла оксида азота и повышению концентрации пероксинитрит-ионов, что превосходит таковые при отдельном влиянии указанного системного и местного факторов.

Список литературы

1. Akimov O Ye, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. Ukr Biochem J. 2016; 88(6):70–5.
2. Ambili R, Janam P. A critique on nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 3: The key transcription factors in periodontal pathogenesis. J Indian Soc Periodontol. 2017 Sep-Oct; 21(5): 350–356.
3. Cachat J, Deffert C, Hugues S, Krause KH. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. Clin Sci (Lond). 2015 May 1;128(10):635–48.
4. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Adv Exp Med Biol. 2012;748:145–69.
5. Im SC, Waskell L. The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5). Arch Biochem Biophys. 2011 Mar 1;507(1):144–53.
6. Kostenko VO, Tsebrzhins'kii OI. Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material. Fiziol Zh. 2000; 46(5):56–62. [Ukrainian].
7. Kostenko VO., Solovyeva NV., Kovalenko OV. Mechanisms of nitric oxide autoregulation in mammals and their disturbances in pathologic processes. Aktual'ni trubl'm suh'sn'i m'dts'h: Visn Ukr'ins'k'i m'd st'm'tl' k'd'm'i. 2011; 11(3):150–4. [Ukrainian].
8. Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. Curr Pharm Des. 2014;20(22):3548–53.
9. Lyashenko LI, Kostenko VO. NF-κB-mediated influence of NO-synthases on free radical processes in the periodontal tissues under modeled metabolic syndrome. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visn Ukrayins'koyi med stomatol akademiyi. 2014; 14(2):140–3. [Ukrainian].
10. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N. Host response mechanisms in periodontal diseases. J Appl Oral Sci. 2015 May-Jun;23(3):329–55.
11. Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, Shao-Cong Sun. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017; 2: 17023.

12. Yelins'ka AM, Kostenko VO. Lipid peroxidation and antioxidant protection in periodontal tissues under the action of local pathogenic factor on gums in rats exposed to modeled systemic inflammatory response. *Problemy ekologii ta medytsyny*. 2017; 21(5-6):62-4.

Реферати

ПОКАЗНИКИ ОКИСНО-НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ У ТКАНИНАХ ПАРОДОНТА ЩУРІВ ПРИ МІСЦЕВОМУ УШКОДЖЕННІ ЯСЕН НА ТЛІ ЛІПОПОЛІСАХАРИД-ІНДУКОВАНОЇ СИСТЕМНОЇ ЗАПАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ

Сліньська А.М., Костенко В.О.

В експерименті на 40 білих щурах досліджено показники окисно-нітрозативного стресу в тканинах пародонта за умов дії на ясна місцевого патогенного фактора (5% розчину гідроксиду натрію) при моделюванні системної запальної відповіді (СЗВ). Останню моделювали шляхом внутрішньочеревного введення ліпополісахариду *Salmonella typhi* (пірогенал) у дозі 0,4 мкг/кг маси протягом 1-го тижня 3 рази, протягом наступних 7-ми тижнів – 1 раз у тиждень. Показано, що відтворення СЗВ супроводжується збільшенням у тканинах пародонта продукції супероксидного аніон-радикала ($\cdot O_2^-$), дизрегуляцією циклу оксиду азоту з одночасною активацією його NO-синтазної (NOS) і нітрат / нітритредуктазної складових, збільшенням концентрації пероксинітрит-йонів. Нанесення лугу на ясна підвищує в тканинах продукцію $\cdot O_2^-$ і активність NOS без порушення функціонування циклу оксиду азоту (NO) і збільшення вмісту пероксинітрит-йонів. Аплікація на ясна 5% розчину гідроксиду натрію на тлі СЗВ викликає збільшення в тканинах пародонта генерації $\cdot O_2^-$ НАДН- і НАДФН-залежними джерелами, дизрегуляцію циклу NO з підвищенням концентрації пероксинітрит-йонів, що перевершує такі при окремому впливі зазначених системного і місцевого чинників.

Ключові слова: системна запальна відповідь, гострий гінгівіт, окислювально-нітрозативного стрес, пародонт.

Стаття надійшла 5.06.18 р.

INDICATORS OF OXIDATIVE-NITROSATIVE STRESS IN PERIODONTAL TISSUES OF RATS EXPOSED TO LOCAL IRRITATION OF GUMS DURING LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

Yelinska A.M., Kostenko V.O.

The study carried out on 40 white rats was aimed at assessing the indices of oxidative-nitrosative stress in periodontal tissues under the condition of combined effect of both local and systemic factors. Local irritation of the gums was induced by the local pathogenic factor (5% sodium hydroxide solution) during the simulation of systemic inflammatory response (SIR) induced by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide *Salmonella typhi* (pyrogenal) in a dose of 0.4 μ g/kg of weight 3 times during the first week, and once a week for the following 7 weeks. It has been shown that simulation of SIR is accompanied by an increase in the production of superoxide anion-radical ($\cdot O_2^-$) in periodontal tissues, by the dysregulation of the nitrogen oxide cycle with the simultaneous activation of its NO-synthase (NOS) and nitrate / nitrite reductase components, as well as by the increase in peroxynitrite ion concentration. The application of alkali onto the gum increases the $\cdot O_2^-$ production and the activity of NOS without disturbing the functioning of the nitric oxide (NO) cycle and increasing in the peroxynitrite ion content in the tissues. The application of 5% sodium hydroxide solution onto the gums against the background of SIR results in an increase in $\cdot O_2^-$ generation by NADH- and NADPH-dependent sources in periodontal tissues, the dysregulation of the NO cycle with the increase in peroxynitrite ion concentration that exceeds relevant indices obtained at separate action of these systemic and local factors.

Key words: systemic inflammatory response, acute gingivitis, oxidative-nitrosative stress, periodontium.

Рецензент Єрошенко Г.А.

DOI 10.26724/2079-8334-2019-3-69-187-190

UDC 611.24-06:616.45-001.1/3-026.374-036.11]-018-092.9:616-08

G.A. Yeroshenko, M.M. Koptev, S.M. Bilash, K.V. Shevchenko, A.I. Yachmin
Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

RESTRUCTURING OF RAT LUNGS IN ACUTE IMMOBILIZATION STRESS AND ITS CORRECTION

e-mail: gala_umsa@ukr.net

Currently, the search for advanced effective and safe methods of preventing and treatment of stress disorders is one of the priority tasks of medical science. The paper was aimed at the morphological study of the corrective effect of torasemide on rat lungs in experimental acute immobilization stress compared to the stress-protective effect of mexidol. Taking into account the norms of bioethics, the study was involved 30 mature albino male rats. Group I (controls) (n=10) involved animals, exposed to stress without correction; Group II (n=10) involved rats, exposed to stress after administration of mexidol; Group III (n=10) involved rats, exposed to stress that was corrected with torasemide. Correction with pharmacological drugs, especially torasemide, reduces stress effect on the lungs. Histologically, torasemide contributes to retention of the epithelial lining integrity, local visualization of intra-alveolar erythrocytes, and plethora in the capillaries of the interalveolar septa. In the epithelial lining of the bronchi, desquamation of individual cells was sometimes observed. The findings of the study have shown that torasemide has a pronounced stress-protective effect on the lung tissue, which is more powerful than correction with mexidol.

Key words: lungs, stress, correction, torasemide, mexidol, morphology.

The work is a fragment of the research project "Regularities of morphogenesis of organs, tissues and neurovascular formations in normal conditions, pathology and under the effect of exogenous factors", state registration No. 0118U004457.

Notwithstanding the long-time history of stress existence and continuous search for novel solutions, the problem of stress remains extremely relevant for the medical and scientific community to date. The issue on finding and choosing the advanced effective and safe methods of the prevention and treatment of stress disorders is one of the priorities for medical investigators [2, 3, 5, 6, 8, 9, 13, 14]. Studies conducted at the Ukrainian Medical Stomatological Academy show that acute immobilization stress causes structural changes