

## БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПАРОДОНТА КРЫС ПРИ МЕСТНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ДЕСНЫ НА ФОНЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОГО СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

Елинская А. Н. (*patofiziolog@umsa.edu.ua*), Гришко Ю. М., Костенко В. А.  
Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская  
стоматологическая академия», Полтава, Украина

*Цель:* оценка биохимических показателей соединительной ткани пародонта крыс (коллагена, протеогликанов, гликопротеинов) при местном повреждении десны на фоне липополисахарид-индуцированного системного воспалительного ответа (СВО).

*Материал и методы.* В эксперименте на 40 белых крысах линии Вистар оценивали концентрацию продуктов коллагенолиза (свободного оксипролина), деполимеризации протеогликанов (гликозаминогликанов, ГАГ) и сиалогликопротеинов (N-ацетилнейраминовой кислоты, NANA) в мягких тканях пародонта (десна, периодонтальная связка) и костной ткани альвеолярного отростка.

*Результаты.* Выявлено, что аппликация на десну 5% раствора гидроксида натрия на фоне СВО, индуцированного внутрибрюшинным введением липополисахарида *Salmonella typhi* (пирогенала) в дозе 0,4 мкг/кг массы трёхкратно в течение 1 недели и в течение следующих 7 недель – 1 раз в неделю – существенно увеличивает концентрацию свободного оксипролина, ГАГ и NANA в мягких и костной тканях пародонта, превышающую таковую при отдельном влиянии щёлочи и бактериального липополисахарида.

*Выводы.* Нанесение на десну местного повреждающего агента (раствора гидроксида натрия) в количестве, которое в обычных условиях не оказывает существенного гистолитического действия, на фоне липополисахарид-индуцированного СВО значительно усиливает в тканях пародонта реакции коллагенолиза, деполимеризации протеогликанов и сиалогликопротеинов в мягких и костной тканях пародонта.

**Ключевые слова:** системный воспалительный ответ, острый гингивит, биополимеры.

### Введение

Известно, что основу соединительной ткани (СТ) составляет межклеточный матрикс, основными компонентами которого являются белки и полисахариды, образующие комплексы (протеогликаны, гликопротеины и др.). Протеогликаны зрелой СТ пародонта содержат в основном сульфатированные гликозаминогликаны (ГАГ) – хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматансульфат, гепарансульфат и кератансульфат [1]. Они обеспечивают стабилизацию и цементирование волокнистых структур, предохраняют клетки от проникновения микроорганизмов и их токсинов, регулируют водно-солевой обмен в тканях, участвуют в межклеточной сигнализации и регуляции активности факторов роста, в том числе и фактора роста фибробластов [1-3]. Среди волокнистых структур преобладают коллагеновые волокна. Межклеточный матрикс альвеолярной кости состоит на 90% из коллагена I типа. Другие биополимеры, главным образом протеогликаны, составляют 5% от общей массы. Протеогликаны декорин и бигликан и входящие в их состав сульфатированные ГАГ (хондроитинсульфат, дерматансульфат) играют важную роль в формировании костной ткани альвеолярного отростка [1].

Важным звеном патогенеза воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта является деполимеризация биополимеров СТ и нарушение их ресинтеза [2, 4, 5]. С одной стороны, этому способствует выработка патогенными микроорганизмами экзотоксинов и гисто-

литических ферментов (гиалуронидазы, хондроитинсульфатазы, протеаз, глюкуронидазы, коллагеназы), что вызывает деполимеризацию коллагена, протеогликанов и гликопротеинов [4]. С другой стороны, деструкция СТ связана с эндогенной активацией матриксных металлопротеиназ (ММП), плазмина, реакции сериновых протеиназ полиморфно-ядерных лейкоцитов и их фагоцитарной активности в ответ на выработку провоспалительных цитокинов [2, 4]. Эти механизмы обеспечивают разрушение тканей пародонта также при действии местных неинфекционных повреждающих агентов и при общих нарушениях в организме (нейрогенных, кардиоваскулярных, иммунных, эндокринных и метаболических). Так, к нарушениям структуры и функции пародонта приводит ряд соматических заболеваний, патогенез которых включает системный воспалительный ответ (СВО) [6-8]. Предполагается роль некоторых транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, STAT-3 и др.) как связующего звена между системной патологией и заболеваниями пародонта [8, 9].

Однако совместное влияние местного и общего патогенных агентов на состояние СТ пародонта исследовано недостаточно. В этих условиях можно ожидать изменения резистентности тканей пародонта к действию локальных раздражителей, следствием чего может быть агрессивный характер воспалительного процесса или же его хронизация.

**Целью** работы была оценка биохимических показателей СТ пародонта крыс (коллагена, про-

теогликанов, гликопротеинов) при местном повреждении десны на фоне липополисахарид-индуцированного СВО.

**Материал и методы**

Исследования были проведены на 40 белых крысах линии Вистар массой 180-220 г, распределённых на 4 группы: 1-я включала интактных животных (контрольная), 2-я – после моделирования СВО, 3-я – после нанесения на десну местного повреждающего агента (щелочи), 4-я – аппликацию последней проводили на фоне моделирования СВО.

СВО воспроизводили путем внутрибрюшинного введения липополисахарида (ЛПС) *Salmonella typhi* (препарат «Пирогенал», фирма «Медгамал», Россия) в дозе 0,4 мкг/кг массы трёхкратно в течение 1 недели и в течение следующих 7 недель – 1 раз в неделю [10]. 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. Комиссией по вопросам биомедицинской этики Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия» (протокол № 162 от 22.02.2018) нарушений морально-этических норм при проведении научно-исследовательской работы не выявлено. Объектами исследования были мягкие ткани пародонта (десна, периодонтальная связка) и костная ткань альвеолярного отростка.

Уровень деполимеризации коллагена, протеогликанов и сиалогликопротеинов оценивали по содержанию их мономеров – свободного оксипролина [11], ГАГ [12] и N-ацетилнейраминовой кислоты (NANA) [13], соответственно.

Статистические расчеты проводили с использованием программы "StatisticSoft 6.0". Для проверки распределения на нормальность применяли расчет критерия Шапиро-Уилка. Если данные соответствовали нормальному распределению, 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 Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение**

Моделирование СВО сопровождалось существенными изменениями концентрации мономеров биополимеров СТ как в мягких, так и костной тканях пародонта (табл.). Так, в его мягких тканях содержание свободного оксипролина, ГАГ и NANA увеличивалось на 66,2% (p<0,01), 66,8% (p<0,05) и 62,9% (p<0,001), соответственно, а в ткани альвеолярного отростка – на 69,9% (p<0,001), 72,4% (p<0,02) и 115,0% (p<0,01), соответственно, что свидетельствует об активации коллагенолиза, деполимеризации протеогликанов и сиалогликопротеинов.

Такие изменения связывают с выработкой активированными нейтрофилами и макрофагами, а также некоторыми другими клетками пародонта (эпителиоцитами десен, фибробластами, эндотелиоцитами, плазматическими клетками), ММП (коллагеназы, желатиназы, матрилизина, стромелизина) [2, 4]. Этому способствует продукция ряда провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли α (ФНО-α), интерлейкинов (ИЛ) 1 и 6). Так, ФНО-α и ИЛ-1β стимулируют секрецию ММП 3, 8 и 9 фибробластами десны. Коллагенолитическая активность в тканях пародонта обеспечивается преимущественно ММП-8 [4].

Деструкция биополимеров СТ также может быть связана с развитием окислительно-нитрозативного стресса в тканях пародонта, что вызывает окислительную модификацию белков и углеводов или же индуцирует выработку гистолитических ферментов вследствие активации редокс-чувствительных транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, STAT-3 и др.) [8, 9]. NF-κB-зависимые процессы, связанные с активатором рецептора NF-κB (RANK), его лигандом (RANKL) и ошибочным рецептором остеопротегерином, являются важными регуляторами резорбтивной активности остеокластов [4], что также может быть дополнительным звеном деструктивного процесса в костной ткани пародонта.

Ранее нами показано, что воспроизведение ЛПС-индуцированного СВО сопровождается увеличением продукции супероксидного анион-радикала в мягких тканях пародонта митохондриальной и НАДФН-зависимыми электронно-транспортными цепями микросом и NO-синтазы, а также НАДФН-оксидазой лейкоцитов [10]. Выявлены нарушения механизма ауторегуляции физиологической концентрации NO в тканях пародонта, что приводит к одновременному увеличению образования NO посредством

**Таблица** – Показатели деполимеризации биополимеров СТ десны и периодонтальной связки при действии местного и системного пародонтопатогенных факторов (M+m)

Группы опытов	Свободный оксипролин, мкмоль/г		Гликозаминогликаны, мкмоль/г		N-ацетилнейраминовая кислота, мкмоль/г	
	Мягкие ткани	Костная ткань	Мягкие ткани	Костная ткань	Мягкие ткани	Костная ткань
Интактные животные	4,08 ±0,48	3,06 ±0,28	1,93 ±0,34	1,70 ±0,30	4,56 ±0,17	2,01 ±0,35
Системное введение ЛПС	6,78 ±0,35 *	5,20 ±0,19 *	3,22 ±0,34 *	2,93 ±0,22 *	7,43 ±0,33 *	4,33 ±0,37 *
Местная аппликация NaOH	4,58 ±0,45	2,62 ±0,37	2,13 ±0,34	1,88 ±0,20	5,34 ±0,37	2,62 ±0,37
Аппликация NaOH на фоне СВО	9,02 ±0,43 ***	7,12 ±0,10 ***	4,14 ±0,25 ***	3,74 ±0,19 ***	10,87 ±0,35 ***	6,62 ±0,23 ***

Примечание: \* – p<0,05 при сравнении с данными интактных крыс;

\* – 2-й группы, \*\*\* – 3-й группы

НО-синтазного и нитрат/нитрит-редуктазного механизма с последующим развитием окислительно-нитрозативного стресса с увеличением концентрации пероксинитрита и активацией пероксидного окисления липидов [14].

В литературе подчеркивается, что активация гистолитических ферментов является важным механизмом хронизации воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта [2].

Действительно, моделирование острого гингивита путём аппликации на десну 5% раствора NaOH на 7-й день после воздействия не оказывало существенного влияния на изучаемые показатели в мягких и костной тканях пародонта.

На 7-е сутки после воздействия щелочи на десну на фоне моделирования СВО концентрация свободного оксипролина превышала результаты во 2-й и в 3-й группах на 33,0% ( $p < 0,01$ ) и 96,9% ( $p < 0,001$ ) в мягких тканях пародонта, и на 36,9% ( $p < 0,001$ ) и 101,0% ( $p < 0,001$ ) в ткани альвеолярного отростка. Содержание ГАГ в мягких тканях пародонта было выше соответствующего значения в третьей группе на 94,4% ( $p < 0,01$ ), а в костной ткани – на 27,6% ( $p < 0,05$ ) и 98,9% ( $p < 0,001$ ) превосходило соответствующие результаты во 2-й и в 3-й группах. Концентрация NANA превышала результаты 2-й и 3-й групп

на 46,3% ( $p < 0,001$ ) и 103,0% ( $p < 0,001$ ) в мягких тканях пародонта, на 52,9% ( $p < 0,001$ ) и 152,0% ( $p < 0,001$ ) в ткани альвеолярного отростка.

Согласно полученным результатам, моделирование СВО создает условия для более интенсивной дезорганизации СТ пародонта при их местном поражении химическим агентом. Это сопровождается выявленной нами активацией процесса деполимеризации коллагена, протеогликанов и гликопротеинов, что существенно усиливается в условиях окислительно-нитрозативного стресса, связанного с активацией NF-κB [8]. Следствием этого может быть агрессивное течение пародонтита с инволюцией пародонта, беспрепятственной генерализацией воспалительного процесса и резорбцией альвеолярного отростка челюстей [15, 16].

Таким образом, нанесение на десну местного повреждающего агента (щёлочи) в количестве, которое в обычных условиях не оказывает существенного гистолитического действия, на фоне липополисахарид-индуцированного системного воспалительного ответа значительно усиливает в тканях пародонта реакции коллагенолиза, деполимеризации протеогликанов и сиалогликопротеинов в мягких и костной тканях пародонта.

### Литература

1. Ларионов, Е. В. Роль сульфатированных гликозаминогликанов (сГАГ) в физиологии и патофизиологии тканей пародонта / Е. В. Ларионов, Т. А. Глыбина // *Стоматология сегодня*. – 2007. – № 2. – С. 52-53.
2. Pisoschi, C. Growth factors and connective tissue homeostasis in periodontal disease / C. Pisoschi, C. Stanculescu, M. Banita // *Pathogenesis and treatment of periodontitis* / ed.: N. Buduneli. – London : InTech, 2012. – P. 55-80. – doi: 10.5772/33669.
3. Островский, О. В. Биохимия полости рта : учебное пособие / О. В. Островский, В. А. Храмов, Т. А. Попова ; под ред. О. В. Островского. – Волгоград : ВолГМУ, 2010. – 184 с.
4. Host response mechanisms in periodontal diseases / N. Silva [et al.] // *J. Appl. Oral Sci.* – 2015. – Vol. 23, № 3. – P. 329-355. – doi: 10.1590/1678-775720140259.
5. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease: review / A. Cecic [et al.] // *Periodontology 2000*. – 2014. – Vol. 64, № 1. – P. 57-80. – doi: 10.1111/prd.12002.
6. Проданчук, А. І. Захворювання пародонта і соматична патологія / А. І. Проданчук, І. Д. Кіюн, М. О. Кройтор // *Буковинський медичний вісник*. – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 164-168.
7. Gurav, A. N. The association of periodontitis and metabolic syndrome / A. N. Gurav // *Den. Res. J. (Isfahan)*. – 2014. – Vol. 11, № 1. – P. 1-10.
8. Ляшенко, Л. І. Роль транскрипційного ядерного фактора κB у механізмах порушень вільнорадикальних процесів і дезорганізації сполучної тканини пародонта за умов експериментального метаболічного синдрому / Л. І. Ляшенко, С. В. Денисенко, В. О. Костенко // *Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії*. – 2014. – Т. 14, № 1. – С. 97-100.
9. Ambili, R. A critique on nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription 3: The key transcription factors in periodontal pathogenesis

- / R. Ambili, P. Janam // *J. Indian Soc. Periodontol.* – 2017. – Vol. 21, № 5. – P. 350-356. – doi: 10.4103/jisp.jisp\_301\_16.
10. Yelinska, A. M. Sources of production of reactive oxygen and nitrogen species in tissues of periodontium and salivary glands of rats under modeled systemic inflammation / A. M. Yelinska, O. O. Shvaykovska, V. O. Kostenko // *Проблеми екології та медицини*. – 2017. – Т. 21, № 3-4. – P. 51-54.
11. Тетянец, С. С. Метод определения свободного оксипролина в сыворотке крови / С. С. Тетянец // *Лабораторное дело*. – 1985. – № 1. – С. 61-62.
12. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П. Н. Шараев [и др.] // *Лабораторное дело*. – 1987. – № 5. – С. 330-332.
13. Беркало, Л. В. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва ; за ред. І. П. Кайдашева. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
14. Yelinska, A. M. 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 / A. M. Yelinska, V. O. Kostenko // *Проблеми екології та медицини*. – 2017. – Т. 21, № 5-6. – С. 62-64.
15. Тарасенко, Л. М. Стресс и пародонт / Л. М. Тарасенко, Т. А. Петрушанко. – Полтава, 1999. – 189 с.
16. Слінська, А. М. Механізми дезорганізації сполучної тканини пародонта щурів за умов системного запалення / А. М. Слінська, В. О. Костенко // *Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії*. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 175-177.

### References

1. Larionov EV, Glybina TA. Rol sulfatirovannykh glikozaminoglikanov (sGAG) v fiziologii i patofiziologii tkanei parodonta [The role of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) in the physiology and pathophysiology of peri-

- odontal tissues]. *Stomatologiya segodnia*. 2007;(2):52-53. (Russian).
2. Pisoschi C, Stanculescu C, Banita M. Growth factors and connective tissue homeostasis in periodontal disease. In: Buduneli N, editor. *Pathogenesis and treatment of periodontitis*. London: InTech; 2012. p. 55-80. doi: 10.5772/33669.
  3. Ostrovskii OV, Khramov VA, Popova TA; Ostrovskii OV, editor. *Biokhimiia polosti rta [Biochemistry of the oral cavity]*. Volgograd: VolGMU; 2010. 184 p. (Russian).
  4. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernandez M, Gamonal J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J. Appl. Oral Sci.* 2015;23(3):329-355. doi: 10.1590/1678-775720140259.
  5. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):57-80. doi: 10.1111/prd.12002.
  6. Prodanchuk AI, Kiiun ID, Kroitor MO. Zakhvoriuvannia parodonta i somatichna patologiya [Periodontopathy and somatic pathology]. *Bukovinskii medichnii visnik [Bukovinian Medical Herald Journal]*. 2012;16(2):164-168. (Ukrainian).
  7. Gurav AN. The association of periodontitis and metabolic syndrome. *Den. Res. J. (Isfahan)*. 2014 Jan;11(1):1-10.
  8. Liashenko LI, Denisenko SV, Kostenko VO. Rol transkrypciynogo jadernogo faktora  $\kappa B$  u mehanizmah porushen vilnoradykalnyh procesiv i dezorganizacii spoluchnoi tkanyny parodonta za umov eksperymentalnogo metabolichnogo syndromu [Role of transcription nuclear factor  $\kappa B$  in mechanisms of free radical processes impairment and connective tissue disorganization in periodontium under modeled metabolic syndrome]. *Aktualni problemy suchasnoi medycyny. Visnyk Ukrainskoi medychnoi stomatologichnoi akademii [Actual Problems of the Modern Medicine]*. 2014;14(1):97-100. (Ukrainian).
  9. 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;21(5):350-356. doi: 10.4103/jisp.jisp\_301\_16.
  10. Yelinska AM, Shvaykovska OO, Kostenko VO. Sources of production of reactive oxygen and nitrogen species in tissues of periodontium and salivary glands of rats under modeled systemic inflammation. *Problemy ekologiy ta medycyny [The Medical and Ecological Problems]*. 2017;21(3-4):51-54.
  11. Tetyanets SS. Metod opredeleniya svobodnogo oksiprolina v syvorotke krovi [Method for the determination of free hydroxyproline in serum]. *Laboratornoe delo*. 1985;1:61-2. (Russian).
  12. Sharaev PN, Pishkov VN, Solovyeva NI, Shirokova TJu, Solovyeva TV, Zvorygina NG, Solopaev AA, Alekseeva NK. Metod opredeleniya glikozaminoglikanov v biologicheskikh zhidkostyah [Method for the determination of glycosaminoglycans in biological fluids]. *Laboratornoe delo*. 1987;5:330-332. (Russian).
  13. Berkalo LV, Bobovych OV, Bobrova NO; Kajdashev IP, editor. *Metody klinichnyh ta eksperymentalnyh doslidzen v medycyni [Methods of clinical and experimental research in medicine]*. Poltava: Polimet; 2003. 320 p. (Ukrainian).
  14. Yelinska 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 ekologiy ta medycyny [The Medical and Ecological Problems]*. 2017;21(5-6):62-64.
  15. Tarasenko LM, Petrushanko TA. Stress i parodont [Stress and periodontium]. Poltava; 1999. 189 p. (Russian).
  16. Yelinska AM, Kostenko VO. Mehanizmy dezorganizacii spoluchnoi tkanyny parodonta shhuriv za umov systemnogo zapalennja [Mechanisms of connective tissue disruption in periodontium rats during systemic inflammation]. *Aktualni problemy suchasnoi medycyny. Visnyk Ukrainskoi medychnoi stomatologichnoi akademii [Actual Problems of the Modern Medicine]*. 2018;18(1):175-177. (Ukrainian).

## BIOCHEMICAL INDICATORS OF CONNECTIVE TISSUE IN RAT PERIODONTIUM IN LOCAL GUM DAMAGE UNDER LIPOPOLISACCHARIDE-INDUCED SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

Yelinskaya A. N., Grishko Yu. M., Kostenko V. A.

Higher State Educational Institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Ukraine

**Objectives:** To assess the biochemical indicators of the connective tissue of rat periodontium (collagen, proteoglycans, glycoproteins) in local gum damage associated with lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response (SIR).

**Material and methods:** The experiment involving 40 white Wistar rats was designed to evaluate the concentration of products of collagenolysis (free hydroxyproline), and the depolymerization of proteoglycans (glycosaminoglycans, GAG) and sialoglycoproteins (N-acetylneuraminic acid, NANA) in soft tissues of the periodontium (gum, periodontal ligament) and bone tissue of the alveolar process.

**Results.** It has been found out that the application of 5% sodium hydroxide solution onto the gums during SIR induced by intraperitoneal injection of *Salmonella typhi* lipopolysaccharide (pyrogenal) in a dose of 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of weight three times during the 1st week and once a week for the next 7 weeks significantly increases the concentration of free hydroxyproline, GAG and NANA in the soft and bone periodontal tissues, exceeding that of a separate effect produced by alkali and bacterial lipopolysaccharide.

**Conclusions.** The application of a local damaging agent (sodium hydroxide solution) to the gums in amount that in normal conditions does not produce any significant histological effect, can significantly enhance collagenolysis, depolymerization of proteoglycans and sialoglycoproteins in the soft and bone periodontal tissues in the presence of lipopolysaccharide-induced systemic inflammatory response.

**Keywords:** systemic inflammatory response, acute gingivitis, connective tissue biopolymers, collagen, proteoglycans, glycoproteins, parodontium.