

Оценка ферментных систем десны на фоне применения милдроната при экспериментальном пародонтите

С.В. СИРАК*, д. м. н., профессор, зав. кафедрой
Е.В. ЩЕТИНИН**, д. м. н., профессор, зав. кафедрой
Н.И. БЫКОВА***, доцент
А.Г. ТАРАБРИНА*, ассистент
Р.Г. РОМАНЕНКО*, ассистент

**Кафедра стоматологии
***Кафедра патологической физиологии

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

***Кафедра детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Краснодар

Evaluation of enzyme systems gums on a background of application of mildronate in experimental periodontitis

S.V. SIRAK, E.V. SHCHETININ, N.I. BYKOVA, A.G. TARABRINA, R.G. ROMANENKO

Резюме

Представлен гистохимический анализ состояния ферментных систем десны при экспериментальном пародонтите при использовании милдроната. Установлено, что через 10–20 суток после окончания формирования модели пародонтита у крыс на фоне системного применения милдроната в тканях десны повышается активность щелочной и кислой фосфатаз, липоамиддегидрогеназы и неспецифической АS-эстеразы, а активность лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы уменьшается. В более поздние сроки (40–60 суток) использование препарата почти не меняет активность кислой и щелочной фосфатаз. В отличие от контроля, в поздние сроки развития пародонтита, милдронат снижает активность лактатдегидрогеназы, липоамиддегидрогеназы и неспецифической АS-эстеразы, причем наиболее значительным является уменьшение активности изоанзимных фракций лактатдегидрогеназы-3 и АS-эстеразы-1.

Ключевые слова: пародонтит, ферменты, милдронат, эксперимент.

Abstract

A histochemical analysis of the state of enzyme systems of the gum in experimental periodontitis with the use of mildronate were presented. 10–20 days after the formation of the periodontitis model in rats, the activity of alkaline and acid phosphatases, lipamide dehydrogenase and nonspecific AS-esterase increases in the background of systemic application of mildronate in the gingival tissues, and the activity of lactate dehydrogenase and succinate dehydrogenase decreases. In later terms (40–60 days), the use of the drug almost does not change the activity of acidic and alkaline phosphatases. In contrast to the control, in the late period of periodontitis development, mildronate reduces the activity of lactate dehydrogenase, lipamide dehydrogenase and nonspecific AS-esterase, the most significant being a decrease in the activity of the isoenzyme fractions of lactate dehydrogenase-3 and AS-esterase-1.

Key words: periodontitis, enzymes, mildronate, experiment.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Увеличение числа больных с воспалением тканей пародонта с преобладанием в их структуре генерализованных форм гингивита и пародонтита заставляет искать новые подходы в профилактике, лечении и реабилитации пациентов [1, 2]. Воспалительные и воспалительно-деструктивные заболевания пародонта чаще протекают на фоне коморбидной патологии, что отягощает состояние пациентов, способствует потере зубов, появлению очагов

хронической инфекции в полости рта, микробной сенсибилизации и другим расстройствам [5, 6, 13]. Заболевание особенно опасно в пожилом возрасте, на фоне снижения общей реактивности организма, зачастую при прогрессирующей потере плотности костной ткани и снижении метаболизма в тканях пародонта [7, 8, 15].

Известно, что патологические процессы в органах и тканях развиваются при изменении ферментных систем клетки [11, 14]. Пародонтит, затрагивающий различные

структурные компоненты тканей ротовой полости, не является исключением [3, 4]. Оптимизация энергетической и пластической функции клеток пародонта априори должна лежать в основе развития, течения и исходов пародонтита [12]. В литературе встречаются пока лишь единичные работы, посвященные анализу микроциркуляторных изменений в слизистой оболочке полости рта при использовании метаболических средств, в частности, милдроната без гистохимического и биохимического анализа тканей в динамике развития патологии пародонта [9, 10]. Вместе с тем, такая оценка должна быть полезна для формирования сопроводительной терапии метаболическими препаратами при разных формах пародонтита и при разной степени коморбидности.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния милдроната на состояние ферментных систем десны крыс в различные сроки после формирования модели экспериментального пародонтита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 90 белых беспородных крысах-самцах с исходным весом 150–160 г, разделенных на основную и контрольную группы по 40 животных в каждой, а также группу интактных крыс (10 особей).

В первой части исследования для создания экспериментальной модели пародонтита всем животным основной и контрольной групп создавали дисбактериоз ротовой полости путем внутримышечного введения линкомицина гидрохлорида дозой 30 мг на 100 грамм веса животного. Затем проводили локальное поражение десен и тканей преддверия рта аппликацией суспензии пчелиного яда в дозе 2 мг на 100 грамм веса животного. Далее животных помещали в общую клетку при площади 0,015 м² на особь. В течение всего времени моделирования (30 суток) к стандартному рациону питания крыс добавляли подсолнечное масло в количестве 2 мл на одного животного, которое нагревали в присутствии 2% сульфата меди в течение 24 часов до достижения перекисного числа выше 40 ед.

После окончания первой части исследования и формирования у животных основной и контрольной групп пародонтита, в основной группе крысам ежедневно внутрибрюшинно вводили милдронат (Мельдоний) один раз в сутки (вечером) из расчета 10 мг милдроната на 100 г веса животного, в контрольной группе крысам внутрибрюшинно вводили эквивалентный объем 0,9% физиологического раствора.

Питьевая вода и пища животных не содержала милдроната. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфира на 10, 20, 40, 60-е сутки после начала второй части эксперимента. Объектом исследования служили биоптаты межзубных десневых сосочков с боковых отделов верхней и нижней челюстей. Для получения данных о состоянии ферментативных систем тканей пародонта в норме исследовали мягкие ткани десен, взятых по вышеописанной методике у 10 интактных животных.

Выделенные ткани после фиксации в 10% растворе нейтрального формалина в течение 7 суток декальцинировали в 12% растворе азотной кислоты и заливали в целлоидин. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по методу Ван-Гизон, по Маллори и Массону.

В полученных биоптатах десневых межзубных сосочков исследовали щелочную и кислую фосфатазы по Burstone, сукцинатдегидрогеназу, лактатдегидрогеназу (всего пять фракций), липоамиддегидрогеназу по Nachlas, нафтил-AS-D-хлорацетат-эстеразу (неспецифическая AS-эстераза) по Seligman и Nachlas (2001), всего четыре фракции. Кроме этого, определяли изоэнзимные фракции лактатдегидрогеназы и AS-эстеразы с помощью электрофореза на агаре по методу Wienie R. (1997). Наряду с гистохимическими и электрофоретическими анализами проводили морфологические исследования на ретикулярные волокна. Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики по Фишеру-Стьюденту в программе Primer of Biostatistics 4.03 для Windows. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Все оперативные вмешательства проводились под общим наркозом (Zoletil 50), с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о «Защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1986), в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434–2009), международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003), «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011) и положительным заключением этического комитета в условиях специализированного вивария на базе ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет». Научно-исследовательская работа проведена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на научные исследования и разработки по теме «Направленная регенерация тканей пародонта в условиях экспериментального остеопороза».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ гистохимических данных о состоянии групп ферментов тканей пародонта позволил условно разделить сроки наблюдения в ходе моделирования пародонтита на ранний (10–20 суток) и поздний (40–60 суток) этапы, что соответствует пародонтиту легкой и средней степени тяжести соответственно.

В ранние сроки наблюдения (10–20 суток) активность щелочной и кислой фосфатаз в основной группе животных оказалась значительно повышенной. Чаще всего щелочная фосфатаза обнаруживалась в участках молодой грануляционной ткани, в эндотелии кровеносных сосудов и отчасти в базальном слое эпителия слизистой оболочки. В отличие от щелочной, кислая фосфатаза к данному сроку наблюдения локализовалась в макрофагах, фибробластах и фиброцитах. Активность таких окислительно-восстановительных ферментов, как лактатдегидрогеназа и сукцинатдегидрогеназа, к сроку наблюдения 10 суток была снижена в участках около кровеносных сосудов и относительно сохранена в эпителиальных клетках. К сроку наблюдения 20 суток отмечалось общее увеличение липоамиддегидрогеназы (фермент класса оксидоредуктаз,

катализирующий реакцию восстановления амидолипоевой кислоты в амид-дегидролипоевую кислоту, принимает участие в энергетическом обмене клетки), а также значительное увеличение активности AS-эстеразы в молодых клетках. Поскольку активность нафтил-AS-D-хлорацетат-эстеразы (AS-эстеразы) наиболее выражена при начальном воспалении в клетках гранулоцитарного ряда и, как правило, практически отсутствует в клеточных элементах моноцитарного и лимфоцитарного ряда, обнаруженное увеличение активности данного фермента в биоптатах основной группы, начиная с 10 суток эксперимента, следует рассматривать как объективный показатель интенсификации обменных процессов в клетках пародонта при использовании милдроната.

В более поздние сроки наблюдения (40–60 суток) активность щелочной фосфатазы в основной группе также увеличена по сравнению с контрольной группой, но в меньшей степени, чем в начальном периоде (10–20 суток). Щелочная фосфатаза локализовалась в сосудистом эндотелии и зрелых соединительнотканых элементах слизистой оболочки. Активность кислой фосфатазы к данному сроку наблюдения находится в границах нормы, в то время как активность окислительно-восстановительных ферментов — лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, липоамиддегидрогеназы в десневых сосочках резко снижена (табл. 1). Даже активность AS-эстеразы, весьма высокая в сроки 10–20 суток (рис. 1а), к более поздним срокам наблюдения (40–60 суток) снижается до минимума (рис. 1б).

В гомогенатах тканей пародонта проведено электрофоретическое исследование изоэнзимных фракций лактатдегидрогеназы и AS-эстеразы, что позволило дать более точную количественную и качественную характеристику установленным ранее изменений ферментного состава.

Изоэнзимы лактатдегидрогеназы и AS-эстеразы в сроки наблюдения 40–60 суток отличаются от нормы уже не только количественно, но и качественно, что находит выражение в исчезновении некоторых фракций, обнаруженных в тканях пародонта у всех интактных животных.

В основной группе к сроку наблюдения 10–20 суток содержание лактатдегидрогеназы-1 и лактатдегидрогеназы-3 статистически достоверно уменьшено по сравнению с контролем ($p < 0,05$), в эти сроки обнаруживаются все пять фракций. При более поздних сроках опыта наблюдается не только значительное уменьшение фракции лактатдегидрогеназы-1, но и полное исчезновение изоэнзимной фракции лактатдегидрогеназы-3 (рис. 2а). Аналогичным образом в сроки наблюдения 10–20 суток фракции AS-эстеразы-1 и AS-эстеразы-2 резко повышаются как по сравнению с контролем, так и по сравнению с более поздними сроками эксперимента — 40–60 суток (данные статистически достоверны, $p < 0,05$). Фракция AS-эстеразы-1 к данному сроку наблюдения не выявляется (рис. 2б).

На этом фоне плавное увеличение активности щелочной фосфатазы в сроки наблюдения 10–20 и 40–60 суток можно объяснить ролью этого фермента в синтезе фибриллярных белков и минеральном обмене костей. Кислая фосфатаза в нормальных условиях содержится в лизосомах клеток и в зависимости от физиологического состояния тканей может быть связана с фагоцитозом или с лизисом (что имеет место в начале воспалительного процесса), с пролиферацией или с дифференциацией тканей. Изменения активности лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы указывают на локальную гипоксию тканей пародонта, усиливающуюся в более поздней стадии заболевания и охватывающую весь десневой сосочек. Повышение активности AS-эстеразы, обнаруженное в основной группе в ранние сроки наблюдения (10–20 суток) связано с усилением пролиферативных процессов в молодой грануляционной ткани. При прогрессировании патологического процесса и фиброзировании тканей (40 суток), а также при переходе заболевания в стадию ремиссии (60 суток) активность этого фермента резко уменьшается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнонаправленное изменение активности липоамиддегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в тканях пародонта на ранних сроках экспериментального пародонтита

Таблица 1. Активность ферментов тканей пародонта в различные сроки наблюдения после формирования модели пародонтита

Исследуемые ферменты	Сроки наблюдения				
	Основная группа		Контрольная группа		Интактные животные
	10–20	40–60	10–20	40–60	
Щелочная фосфатаза	++++	+++	+++	+++	++
Кислая фосфатаза	++++	+++	+++	++	+++
Липоамиддегидрогеназа	++++	++	+++	+++	++
Лактатдегидрогеназа	++	+	+	+	++
Сукцинатдегидрогеназа	++	+	+	+	+++
AS-эстераза*	++++	+	++	++	++

* ++++ - максимальное значение активности фермента; + - минимальное значение активности фермента

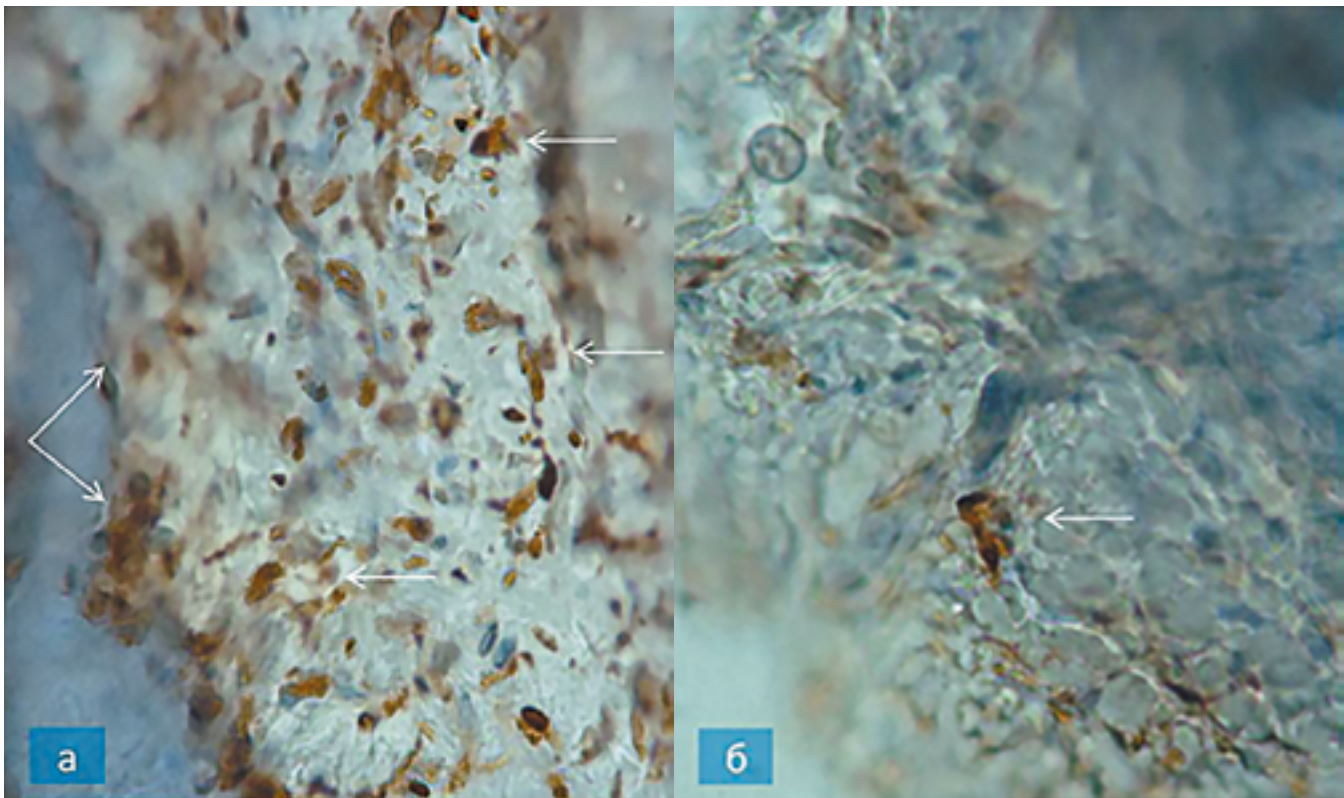


Рис. 1. Микропрепараты. Биоптаты тканей пародонта основной группы на 10-е (а) и 60-е (б) сутки эксперимента. Экспрессия нафтил-AS-D-хлорацетат-эстеразы (неспецифической AS-эстеразы), отмечено стрелками. Гистохимическая реакция по S. Seligman и K. Nachlas. Продукт реакции коричневого цвета. Ок. 10, об. 40

свидетельствует о дискоординации окислительно-восстановительных процессов в этот период заболевания. Выявленную в основной группе активность нафтил-AS-D-хлорацетат-эстеразы (AS-эстеразы) следует рассматривать как объективный показатель интенсификации обменных процессов в клетках пародонта на фоне системного использования милдроната, особенно на ранних сроках заболевания (от 10 до 20 суток). На более поздних сроках

(40–60 суток) применение милдроната уже в меньшей степени способствует количественным и качественным изменениям активности ферментов окислительно-восстановительной цепи и фосфорного обмена, что может быть связано с потенцированием пролиферативных процессов на этапе реконвалесценции за счет аутоферментных систем организма.

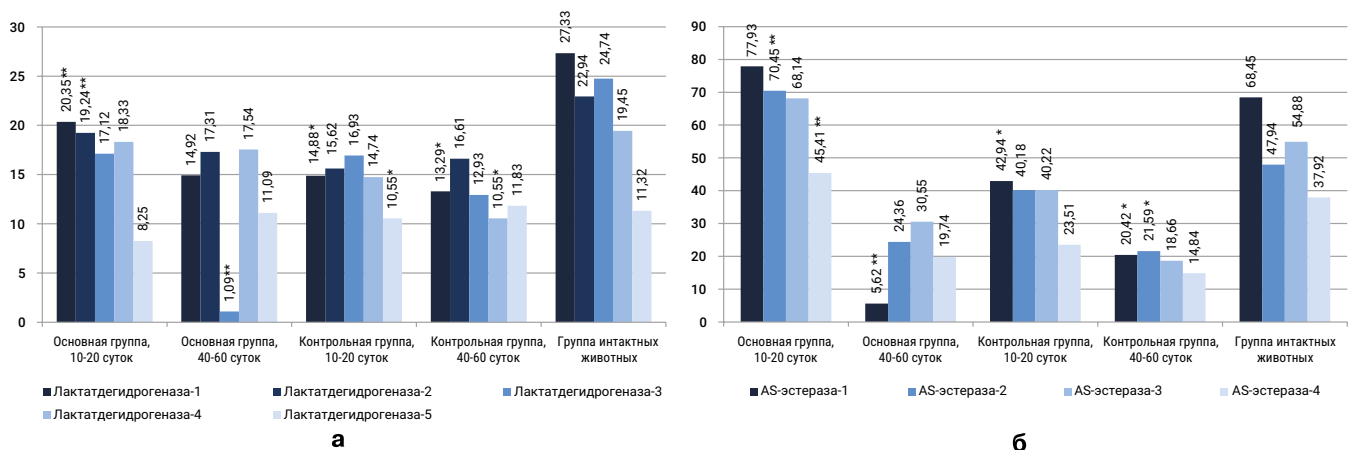


Рис. 2. Относительная активность фракций лактатдегидрогеназы (а) и AS-эстеразы (б) в исследуемых группах в различные сроки наблюдения. а — относительная активность изоэнзимных фракций лактатдегидрогеназы-1, 2, 3, 4 и 5; б — относительная активность изоэнзимных фракций AS-эстеразы-1, 2, 3 и 4

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич К. Г., Дмитриева Л. А., Теблочева Л. М., Почтаренко В. А., Ерохин А. И. и др. Пародонтит. XXI век / под ред. О. О. Янушевича, Л. А. Дмитриевой, З. Э. Ревазовой. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
2. Gurevich K. G., Dmitrieva L. A., Tebloeva L. M., Pochtarenko V. A., Erohin A. I. i dr. Parodontit. XXI vek / pod red. O. O. Janushevicha, L. A. Dmitrievoy, Z. Je. Revazovoj. — M.: GEOTAR-Media, 2016.
3. Иорданишвили А. К., Слугина А. Г., Балин Д. В., Сериков А. А. Возрастные особенности распространенности хронических периапикальных очагов одонтогенной инфекции у взрослых людей // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2015. № 2. С. 23–28.
4. Iordanishvili A. K., Slugina A. G., Balin D. V., Serikov A. A. Vozrastnye osobennosti rasprostranennosti hronicheskikh periapikal'nykh ochagov odontogennoj infekcii u vzroslykh ljudej // Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e». 2015. № 2. S. 23–28.
5. Орехова Л. Ю., Левин М. Я., Сафронов Б. Н. Соотношение гуморальных и клеточных аутоиммунных процессов при воспалительных заболеваниях пародонта // Пародонтология. 1997. № 4. С. 14.
6. Orekhova L. Ju., Levin M. Ja., Safronov B. N. Sootnoshenie gumoral'nykh i kletochnykh autoimmunnykh processov pri vospalitel'nykh zabolevaniyakh parodonta // Parodontologija. 1997. № 4. S. 14.
7. Орехова Л. Ю., Бубнова Л. Н., Глазанова Т. В., Розанов Н. Н. Роль изменений в системе иммунитета при заболеваниях тканей пародонта // Пародонтология. 1999. № 1. С. 27.
8. Orekhova L. Ju., Bubnova L. N., Glazanova T. V., Rozanov N. N. Rol' izmenenij v sisteme immuniteta pri zabolevaniyakh tkanej parodonta // Parodontologija. 1999. № 1. S. 27.
9. Орехова Л. Ю., Жаворонкова М. Д., Суборова Т. Н. Современные технологии бактериологического исследования пародонтальных пространств // Пародонтология. 2013. Т. 18. № 2. С. 9–13.
10. Orekhova L. Ju., Zhavoronkova M. D., Suborova T. N. Sovremennye tehnologii bakteriologicheskogo issledovaniya parodontal'nykh prostranstv // Parodontologija. 2013. T. 18. № 2. S. 9–13.
11. Пьянзина А. В., Герасименко М. Ю. Микроциркуляторные эффекты курсового применения флюктуофореза у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней тяжести // Стоматология. 2013. Т. 92. № 4. С. 34–36.
12. P'janzina A. V., Gerasimenko M. Ju. Mikroциркуляторные efekty kursovogo primeneniya fljukufoforeza u pacientov s hronicheskim generalizovannym parodontitom srednej tjazhesti // Stomatologija. 2013. T. 92. № 4. S. 34–36.
13. Сычева Ю. А., Горбачева И. А., Орехова Л. Ю., Егорова Л. П., Попов Д. А. Особенности микроциркуляторного русла у больных гипертонической болезнью с воспалительными заболеваниями пародонта // Пародонтология. 2017. Т. 22. № 2 (83). С. 17–20.
14. Sycheva Ju. A., Gorbacheva I. A., Orekhova L. Ju., Egorova L. P., Popov D. A. Osobennosti mikroциркуляторного rusla u bol'nykh gipertonicheskoy bolezni'ju s vospalitel'nyimi zabolevaniyami parodonta // Parodontologija. 2017. T. 22. № 2 (83). S. 17–20.
15. Шавлохова Д. Т. Хронические гингивиты, осложненные амилоидозом, и влияние триметилгидразиния в сочетании с азитромицином на клиническую картину // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. 2009. Т. 11. № 4. С. 343.
16. Shavlokhova D. T. Hronicheskie gingivity, oslozhnennnye amiloidozom, i vlijanie trimetilgidrazinija v sochetanii s azitromicinom na klinicheskuyu kartinu // Zhurnal nauchnykh statej Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke. 2009. T. 11. № 4. S. 343.
17. An Y., Xue P., Wang Q., Liu W., Zhang Y., Jin Y. Increased autophagy is required to protect periodontal ligament stem cells from apoptosis in inflammatory microenvironment // Journal of Clinical Periodontology. 2016. T. 43. № 7. С. 618–625.
18. Figuero E., Gargna-Gargallo M., Herrera D., Nybrega D. F., Tenu-ta L. M. A., Carvalho J. C. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review // Journal of Clinical Periodontology. 2017. T. 44. С. S116–S134.
19. Khajuria D. K., Karasik D., Patil O. N., Razdan R. Development and evaluation of novel biodegradable chitosan based metformin intrapocket dental film for the management of periodontitis and alveolar bone loss in a rat model // Archives of Oral Biology. 2018. T. 85. С. 120–129.
20. Messori M. R., Oliveira L. F. F., Sordi C. G., Alves A. J. N., Furlaneto F. A. C., Pereira L. J., Foureaux R., Napimoga M. H., Nagata M. J. H., Ervolino E. Favourable effects of bacillus subtilis and bacillus licheniformis on experimental periodontitis in rats // Archives of Oral Biology. 2016. T. 66. С. 108–119.
21. Sirak S. W., Entschladen F., Shchetinin E. W., Grimm W. D. Low-level laser irradiation (810 nm) with toluidinblue photosensitizer promotes proliferation and differentiation of human oral fibroblasts evaluated in vitro // Journal of Clinical Periodontology. 2015. T. 42. № S17. С. 328a–328.
22. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future // Periodontology 2000. 2017. № 75 (1). P. 7–23. — doi: 10.1111/prd.12221.
23. Sousa V., Needleman I., Donos N., Farias B., Petrie A., Spratt D., Mardas N. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients // Clinical Oral Implants Research. 2016. T. 27. № 7. С. 787–844.

Поступила 27.03.2018

Координаты для связи с авторами:
355014, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310
E-mail: sergejsirak@yandex.ru

WWW.DENTODAY.RU