

УДК 616.31

ББК 56.6

О-68

Ордян Лева Леонидович, клинический ординатор кафедры ортопедической стоматологии ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Росздрава;

Попков Виктор Леонидович, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры ортопедической стоматологии ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Росздрава; т.: 8928 427-00-31;

Сукоян Галина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории гипоксии и биоэнергетики ГУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН (г. Москва);

Галенко-Ярошевский Павел Александрович, доктор медицинских наук, профессор, чл.- корр. РАМН, зав. кафедрой фармакологии ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Росздрава; т.: 8.928 429-21-22.

КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ЦИТОФЛАВИНОМ ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ПАРОДОНТИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

(рецензирована)

Показано, что улучшение стоматологического статуса и снижение пародонтального индекса с $3,45 \pm 0,08$ до $1,56 \pm 0,06$ баллов при генерализованном пародонтите на фоне курсового введения цитофлавина сопровождается нормализацией биоэнергетических процессов в ткани пародонта и уменьшением окислительного стресса. Улучшение метаболических процессов подтверждается повышением содержания АТФ и активности сукцинатдегидрогеназы, сукцинат-убихинон-редуктазы и НАДН-убихинон-редуктазы. Нормализация окислительного гомеостаза документируется снижением уровня оксида азота, перекиси водорода и снижением интенсивности свободнорадикального сигнала в спектре ЭПР. Нормализация под воздействием цитофлавина свободно-радикальных процессов играет важную роль в улучшении функция эндотелия и поддержании на высоком уровне сосудистого эндотелиального фактора, и, следовательно, улучшения процессов микроциркуляции в ткани пародонта.

Ключевые слова: пародонтит, окислительный стресс, стоматологический статус, система энергетического обеспечения пародонта, цитофлавин

Ordyan Leva Leonidovich, attending physician of the chair of orthopedic dentistry of Kuban State Medical University, of Russian Public Health;

Popkov Victor Leonidovich, Doctor of Medicine, professor, professor of the chair of orthopedic dentistry of Kuban State Medical University, of Russian Public Health, tel.: 89284270031;

Sukoyan Galina Victorovna, Doctor of Medicine, professor, leading scientific researcher of laboratory of hypoxia and bioenergetics of State establishment Scientific Reseach Institute of general pathology and pathophysiology of Russian Academy of Medicine (Moscow);

Galenko-Yaroshevskiy Pavel Alexandrovich, Doctor of Medicine, professor member correspondent of Russian Academy of Medicine, head of the chair of pharmacology of Kuban State Medical University, of Russian Public Health, tel.: 89284292122.

CORRECTION OF METABOLIC MALFUNCTION, OXIDATIVE STRESS AND ENDOTHELIAL MALFUNCTION WITH CYTOFLAVIN WITH GENERALIZED PERIODONTITIS IN EXPERIMENT

It is indicated that improving of stomatological status and periodontal index decrease from $3,45 \pm 0,08$ up to $1,56 \pm 0,06$ points by generalized periodontitis on the background of course introduction of cytoflavin is accompanied by normalization of bioenergetic processes in paradontic tissues and reduction of oxidative process. Improving of metabolic processe confirms rise of ATP concentration and activity of succinatedehydrogenase and succinate-ubiquinone-reductase. Normalization of oxidative homeostasis is

documented with reduction of nitrogen oxide level, hydrogen peroxide and decrease of intensity of free radical signal in specter of electron spin resonance. Normalization of free radical processes cytoflavin influence plays an important part in improving of endothelium factor, and consequently improving of processes of microcirculation in periodontal tissues.

Keywords: periodontitis, oxidative process, stomatological status, system energetic supply of periodont, cytoflavin.

Профилактические и гигиенические мероприятия, медикаментозная терапия не позволяют достаточно быстро купировать заболевания пародонта, которые протекают с периодами ремиссий и обострений, часто значительно нарушая функции зубочелюстной системы из-за резорбции костной ткани и повреждая удерживающий аппарат зубов [12]. Важная роль в патогенезе генерализованного пародонтита (ГП) принадлежит нарушению трофики (метаболизма и морфологии) пародонта, связанные с ухудшением микроциркуляции функционального и органического характера, дисбалансом нервной и гормональной регуляции, иммунокомпетентных и барьерных систем [5, 12, 15]. В результате возникает гипоксия тканей пародонта, влекущая активацию процессов свободнорадикального окисления (СРО), повышается уровень перекисного окисления фосфолипидов (ПОЛ) клеточных мембран с деструкцией последних и гибелью клеток пародонта с высвобождением эндогенных токсинов [5, 6]. Активация СРО в покровно-эпителиальном пласте и более глубоких структурах пародонта может стать одним из факторов, угнетающих резистентность последнего к неблагоприятным воздействиям, что создаёт условия для практически беспрепятственного распространения воспалительного процесса. В связи с этим целью настоящей работы было исследование эффективности воздействия антигипоксическим и антиоксидантным препаратом цитофлавином [1] на состояние систем энергетического обеспечения и соотношение прооксиданты/антиоксиданты при ГП в эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 30 крысах обоего пола в соответствии со статьей 11-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), а также Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Животные получали обычный полноценный общевиварный рацион и воду *ad libitum*. ГП воспроизводили путем наложения лигатур в области фронтальных зубов с контролем развития пародонтита, как описано в работах [8, 13]. Контролем служил материал от интактных крыс ($n = 10$) соответствующего возраста, находившихся в виварии в тех же условиях и на том же рационе, что и опытные животные. Все животные после воспроизведения пародонтита были рандомизированы на 2 группы, контрольную и основную. Животным контрольной группы ($n = 10$) на 30-й день после воспроизведения пародонтита внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в том же объеме, что и цитофлавин в основной группе ($n = 10$). Цитофлавин, содержащий 20 мг инозина, 10 мг никотинамида, 2 мг рибофлавина и 100 мг сукцината, вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг (в пересчете на сукцинат) 2 раза в сутки. Фармакологическую эффективность цитофлавина изучали через 10 дней введения. В гомогенатах десны (мягкие ткани), которые получали путем растирания с толченым стеклом замороженной навески ткани в 0,9% растворе NaCl, pH 7,2 (при температуре +2 - 3°C) с последующим центрифугированием при 2500 g при + 40°C в течение 15 минут, определяли маркеры биоэнергетического статуса (содержание внутриклеточного АТФ, активность сукцинат-убихинон-редуктазной и НАДН-убихинон-редуктазной систем, содержание цитохрома C, лактата и пирувата [2, 4]), состояние системы оксиданты/прооксиданты (определяли содержание супероксидного аниона (O_2^-) по измерению ингибирования восстановления цитохрома C супероксиддисмутазой (СОД); скорость образования H_2O_2 с использованием флуоресцентного метода и малонового диальдегида (МДА) [2, 3]) и функции эндотелиальной системы по содержанию эндотелина-1 с использованием тест-системы R&D Systems for Human Endothelin-1 Immunoassay (Великобритания) и сосудистого эндотелиального фактора роста с использованием тест-системы VEGFELISA kit (Quantikine human VEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.). Для регистрации спектров ЭПР на радиоспектрометре РЭ-1307 (РФ) непосредственно после эфтаназии животных образцы ткани пародонта быстро помещали и измельчали в жидком азоте

(-196⁰C). ЭПР сигналы прооксидантной (интенсивность свободно-радикального сигнала и его полуширину, NO и появление сигнала метгемоглобина (MetHb) $g = 6,0$) и антиоксидантной (церулоплазмина ($g = 2,05$), Fe³⁺-трансферрина ($g = 4,3$), железо-серных центров (FeS) ($g = 1,94$)) систем анализировали как описано [9]. Для определения содержания свободного оксида азота в гомогенатах пародонта использовали спин-ловушку - 1 М раствор диэтилдитиокарбамата натрия (в дозе 500 мг/кг) Fe²⁺-цитрат (50 мг FeSO₄ + 6H₂O + 250 мг цитратнатрия) [10]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цитофлавин при моделированном пародонтите у крыс не оказывает цитотоксического воздействия на клетки ткани пародонта и повышает их пролиферативную активность в интактных условиях [7]. На 41-й день исследования у животных с пародонтитом под воздействием введения цитофлавина в дозе 100 мг/кг массы в течение 10 дней уменьшается гиперемия и отечность слизистой оболочки десен, гипертрофированность межзубных сосочков в области резцов, уменьшается количество серозно-гнойного экссудата из пародонтальных карманов, а также снижается кровоточивость десен, отмечается уплотнение десневого края с уменьшением пародонтальных карманов. Пародонтальный индекс (ПИ) снизился с $3,45 \pm 0,08$ до $1,56 \pm 0,06$ баллов, что указывает на улучшение стоматологического статуса.

Улучшение стоматологического статуса на фоне применения цитофлавина сопровождается повышением содержания АТФ в гомогенатах десны на 17%, содержание пирувата и лактата практически до нормального уровня, однако без достоверного сдвига в содержании фермента дыхательной цепи митохондрий цитохрома C (табл.). Соотношение лактат/пируват при ГП существенно не изменяется, а под воздействием цитофлавина снижается на 29% (табл.). Одновременно под влиянием цитофлавина имеет место повышение активности СДГ гомогенатов десны, тогда как при пародонтите отмечается подавление активности СДГ, что может лежать в основе нарушения цикла трикарбоновых кислот при гипоксически-воспалительных поражениях пародонта. Изменение активности СДГ может считаться чувствительным маркером воспалительно-гипоксического поражения ткани десны и тесно взаимосвязано с нормализацией уровня рибофлавина. Таким образом, под воздействием цитофлавина в гомогенатах ткани пародонта происходит, по-видимому, активация аэробных гликолитических реакций, на что указывает сдвиг соотношения лактат/пируват в сторону пирувата при одновременном возрастании активности СДГ и отсутствии изменений в содержании цитохрома C (восстановлении дыхательной цепи митохондрий).

При анализе ЭПР-сигналов ткани пародонта интенсивность свободнорадикального сигнала возрастает на 61% , а полуширина сигнала уменьшается на 39%. Эти изменения в спектре ЭПР при ГП на фоне снижения содержания цитохрома C и развития дефицита АТФ, указывают на нарушения в дыхательной цепи митохондрий и гиперпродукцию активных метаболитов кислорода, нарушение целостности мембранных структур. В пользу нарушения целостности мембран и инактивацию стероидогенеза говорит и установленное в работе возрастание ПОЛ (повышается уровень МДА на 15%), а также появление ЭПР-сигнала метгемоглобина.

Под воздействием курсового применения цитофлавина интенсивность свободно радикального сигнала и его полуширина приближаются к нормальным значениям (табл.). Возрастание при ГП интенсивности сигнала FeS-центров НАДН дегидрогеназы, свидетельствующие об увеличении доли убисемихинонов в суммарном свободнорадикальном сигнале, нарушении цепи электронного транспорта митохондрий на участке НАДН-убихинон-редуктазы, совпадают с данными биохимических исследований. Под влиянием цитофлавина активность НАДН-убихинон-редуктазы возрастает по сравнению с контрольной группой на 23%, как и интенсивность сигнала FeS-центров (табл.).

Оптимизация под влиянием цитофлавина при ГП метаболических процессов ведет к снижению скорости образования перекиси водорода на 15% и NO – на 14%, однако скорость генерации супероксидного аниона остается повышенной. Активация синтеза NO рассматривается как адаптационная реакция, направленная на повышение энергопродукции в митохондриях. Отмечается снижение интенсивности ЭПР-сигналов окисленного церулоплазмина (при пародонтите увеличивается на 12%), и увеличение интенсивности ЭПР-сигнала Fe³⁺-трансферрина (возрастает на 28%, однако не достигает уровня в нормальной ткани пародонта), что является показателем

торможения генерации свободных радикалов, замедления процессов ПОЛ и активации активности антиоксидантных ферментов. Известно, что экспрессия трансферрина регулируется посредством взаимодействия HIF-1 α (hipoxia inducible factor) - индуцированного IRP (airon responsive protein) и IRE (iron responsive element), обеспечивающего активацию экспрессии гена трансферрина по NO-зависимому механизму [12, 14, 15]. Следовательно, стимулирующее действие цитофлавина на Fe³⁺-трансферрин обусловлено регуляцией этим препаратом окислительного гомеостаза организма и активности NO.

Таблица 1 - Действие цитофлавина на показатели энергетического метаболизма, оксидативного стресса и эндотелиальной дисфункции при ГП в эксперименте

Показатель	Контроль	Генерализованный пародонтит	
		без лечения	+ цитофлавин
Содержание нитрозотиолов, мкмоль/г белка	16,6 \pm 0,5	23,1 \pm 0,8*	20,2 \pm 0,8*
Скорость генерации O ₂ ⁻ , мкмоль/мг белка·мин	2,65 \pm 0,21	7,59 \pm 0,46**	7,08 \pm 0,25**
H ₂ O ₂ , мкмоль/л · мин	1,59 \pm 0,14	5,55 \pm 0,23**	4,73 \pm 0,21**
Свободные радикалы			
Интенсивность сигнала	24,0 \pm 0,9	15,4 \pm 0,7**	20,5 \pm 1,0*#
Полуширина сигнала	7,0 \pm 0,3	4,3 \pm 0,3**	5,0 \pm 0,1**##
FeS	36,1 \pm 1,8	32,1 \pm 1,4*	36,1 \pm 1,6
FeS-NO	5,3 \pm 0,2	6,6 \pm 0,4*	6,3 \pm 0,3*
Оксисленный церуплазмин	21,1 \pm 0,4	23,7 \pm 0,4*	20,6 \pm 0,7#
МДА, мкмоль/г вл.ткани	39,5 \pm 1,9	45,3 \pm 1,7*	41,6 \pm 1,6#
АТФ, мкмоль/г вл.ткани	1,56 \pm 0,09	1,28 \pm 0,04*	1,50 \pm 0,11#
Цитохром С, нмоль/г вл. ткани	8,7 \pm 0,3	6,6 \pm 0,3**	6,7 \pm 0,2**
Лактат, ммоль/г вл. ткани	1,08 \pm 0,14	1,22 \pm 0,08	1,16 \pm 0,06
Пируват, ммоль/г вл. ткани	0,072 \pm 0,008	0,065 \pm 0,006	0,083 \pm 0,002
Лактат/пируват	20 \pm 4	22 \pm 3	14 \pm 1*#
Рибофлавин, мкг/г вл.ткани	0,40 \pm 0,03	0,34 \pm 0,03	0,39 \pm 0,04
НАДН-убихинон-редуктаза, мкмоль/(мг белка \times мин)	24 \pm 1	18 \pm 1*	22 \pm 1#
Сукцинат-убихинон-редукт-аза, мкмоль/(мг белка \times мин)	1,24 \pm 0,06	0,89 \pm 0,04*	1,23 \pm 0,09#
Сукцинатдегидрогеназа, нМоль /мг белка	61 \pm 2	52 \pm 2*	62 \pm 4#
Эндотелин-1, фг/мг белка	1,32 \pm 0,08	2,58 \pm 0,27**	1,85 \pm 0,06*#
Эндотелиальный фактор роста, фг/мг белка	81 \pm 1	149 \pm 16**	141 \pm 19*

Примечание: сравнение различий средних: * - сравнение с контролем, # - с состоянием генерализованного пародонтита, один знак – p<0,05, два – p<0,01, три – p<0,001.

Нормализация окислительного гомеостаза под влиянием цитофлавина, по-видимому, лежит в основе улучшения функции эндотелиальной системы (содержание вазоконстрикторного эндотелина 1 уменьшается на 28% при высоком поддержании на высоком уровне эндотелиального сосудистого фактора роста (табл.).

С позиций молекулярной фармакологии применение цитофлавина при ГП с сопутствующей тканевой гипоксией, повышение энергетического потенциала клетки, стимулирование клеточного дыхания, процессов утилизации кислорода тканями, способствует регуляции базальных клеточных реакций и свободнорадикальных процессов на системном уровне, что обуславливает применение цитофлавина в качестве лечебного средства для коррекции метаболических процессов при ГП.

Литература:

1. Цитофлавин как препарат эффективной коррекции метаболических расстройств при гипоксии различного генеза / М.К. Бизенкова [и др.] // Успехи современ. естествознания. 2006. № 4. С. 28 – 29.
2. Эффективность сочетанного применения СОД и реамберина при ишемии кожи / В.П. Галенко-Ярошевский [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 142, № 12. С. 663 - 665.
3. Антинекротический и антиоксидантный эффекты супероксиддисмутазы при ишемии кожи / В.П. Галенко-Ярошевский [и др.] // Там же. № 10. С. 430 - 432.
4. Протекторное действие реамберина на функциональную активность митохондрий в условиях ишемии кожи / В.П. Галенко-Ярошевский [и др.] // Там же. 2005. Т. 140, №10. С. 436-439.
5. Горбачева И.А., Кирсанов А.И., Орехова Л.Ю. Общесоматические аспекты патогенеза и лечения генерализованного пародонтита // Стоматология. 2001. № 1. С. 26 - 34.
6. Антиоксидантная терапия в комплексном лечении пародонтита / П.В. Иванов [и др.] // Фундаментальные исследования. 2008. № 11. С. 23 - 27.
7. Ордян Л.Л., Попков В.Л., Галенко-Ярошевский П.А. Влияние цитофлавина на течение экспериментального пародонтита у крыс // Инновационные направления в теории и практике стоматологии: сб. науч. тр. / Кубан. гос. мед ун-т. Краснодар: Советская Кубань, 2009. С. 98 – 104.
8. Патоморфологическая характеристика лечебного эффекта рексода и реамберина при обострении хронического генерализованного пародонтита / Л.В. Попкова [и др.] // Пародонтология. 2009. № 1 (50). С. 66 – 75.
9. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В. Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии. М.: Энергоатомиздат, 1989. 229 с.
10. Beltran B., Mathur A., Duchon M.R., et al. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. 97: 14602 – 14607.
11. Chapple I.L.C., Milward M.R., Dietrich Th. The Prevalence of Inflammatory Periodontitis Is Negatively Associated with Serum Antioxidant Concentrations // J. Nutr. 2007. 137: 657 – 664.
12. Golub L.M., Payne J.B., Reinhardt R.A., Niema G. Systemic Diseases Co-induce (Not Just Exacerbate) Periodontitis. A Hypothetical «Two-hit» Model J. Dent Res. 2006. 85(2):102 - 105.
13. Keles G. C., et al. Determination of systemically and locally induced periodontal defects in rats. Indian J. Med. Res. 2005. 121, 176 – 84.
14. Kendal H. K., Marshall R. I., Bartold P.M. Nitric oxide and tissue destruction // Oral Dis. 2001. Jan. 7 (1): 2 - 10.
15. Lappin D.F., Kjeldsen M et al. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. // J. Periodontal Res. 2000. Dec. 35 (6): 360 - 373.