

УДК 616.314-089.23+616.379-008.64
DOI 10.32782/2226-2008-2022-3-3

П. Д. Рожко, М. В. Розуменко

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЗАХОДІВ У РАЗІ МОДЕЛЮВАННЯ У ЩУРІВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ І ВСТАНОВЛЕННЯ ІМПЛАНТАТІВ

Одеський національний медичний університет, м. Одеса, Україна

УДК 616.314-089.23+616.379-008.64

П. Д. Рожко, М. В. Розуменко

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНИХ ЗАХОДІВ У РАЗІ МОДЕЛЮВАННЯ У ЩУРІВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ І ВСТАНОВЛЕННЯ ІМПЛАНТАТІВ

Одеський національний медичний університет, м. Одеса, Україна

Запропонована схема лікувально-профілактичних заходів, що включала препарати біологічно активних речовин рослинного походження, які регулюють вуглеводний обмін, що підсилюють імунітет і резистентність у порожнині рота, нормалізують кістковий метаболізм і підвищують неспецифічну резистентність, які проводилися у щурів на тлі моделювання, нормалізації у них судинної картини мікроциркуляторного русла, до зниження активності апоптотичних процесів, зменшення запальних процесів м'яких і твердих тканин ротової порожнини, зниження активності резорбційних процесів у твердих тканинах.

Ключові слова: лікувально-профілактичний комплекс, щури, кістковий метаболізм, цукровий діабет, запальні процеси.

UDC 616.314-089.23+616.379-008.64

P. D. Rozhko, M. V. Rozumenko

EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC AND PREVENTIVE MEASURES IN THE MODELING OF DIABETES IN RATS AND INSTALLATION OF IMPLANTS

Odesa National Medical University, Odesa, Ukraine

The proposed scheme of therapeutic and prophylactic measures, which included preparations of biologically active substances of plant origin, regulating carbohydrate metabolism, enhancing immunity and resistance in the oral cavity, normalizing bone metabolism and increasing nonspecific resistance, which were carried out in rats on the background of modeling diabetes mellitus and dental implantation, led to normalization of microvasculature, to a decrease in the activity of apoptotic processes, to a decrease in inflammatory processes in the soft and hard tissues of the oral cavity, to a decrease in the activity of resorption processes in hard tissues.

Key words: treatment and prevention complex, rats, bone metabolism, diabetes mellitus, inflammatory processes.

У разі цукрового діабету (ЦД) в організмі мають місце порушення жирового і вуглеводного обміну, кісткового метаболізму, судинні порушення, що призводять до запально-дистрофічних процесів, у тому числі і в порожнині рота, що істотно може впливати і на процес ортопедичного лікування пацієнтів з використанням імплантатів [1; 2]. Епідеміологічні дослідження засвідчили, що періодонтит частіше виникає у хворих з некомпенсованим цукровим діабетом, ніж у здорових добровольців, що може розглядатись як ускладнення цукрового діабету. Насправді, цукровий діабет і періодонтит є одними з найбільш поширених хронічних захворювань, які асоціюються зі збільшенням ризику серцево-судинних захворювань [3; 4]. Встановлено, що ризик періімплантатів спостерігається у хворих із низькою щільністю кісткової тканини і підтверджується розбалансуванням процесів ремоделювання (у хворих з остеопорозом маркер резорбції кісткової тканини значно і достовірно збільшується на тлі незначного зменшення вмісту маркера формування кісткової тканини), що, своєю чергою, призводить до дезінтеграції імплантатів у хворих цієї групи [5]. Згідно з дослідженнями, вміст у крові вітаміну D статистично значущо корелює з успішністю остеointegraції в пацієнтів з генералізованим пародонтитом; пацієнти з генералі-

зованим пародонтитом та дефіцитом вітаміну D мають вищу кровотечу у разі зондування і втрати кісткової тканини навколо імплантату порівняно з пацієнтами без дефіциту вітаміну D [6]. Тому важливою проблемою сучасної стоматології залишається розробка лікувально-профілактичних засобів, що можуть покращити ефективність дентальної імплантації на тлі порушень метаболічних порушень, зокрема гіперглікемії.

Метою цієї роботи була оцінка впливу розроблених лікувально-профілактичних заходів на морфологічні порушення в порожнині рота щурів у разі моделювання у них ЦД 2 типу та встановлення імплантатів.

Матеріали та методи. В експерименті використовували самок білих щурів лінії Вістар стадного розведення віком 10 місяців масою 230 ± 38 г (6 щурів-інтактна група, 6 щурів – модель «ЦД 2 типу+імплантат+ЛПК»).

Відтворення ЦД 2 типу у щурів здійснювали за допомогою внутрішньом'язового введення протаміну сульфату («Merck», Німеччина) у дозі 18 мг/кг щодня, двічі на день протягом 5 днів та після двох днів перерви ще протягом наступних 5 днів.

Всім тваринам дослідної групи під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) фіксували імплантат. За допомогою фігурного бору діаметром 1 мм на верхній щелепі в точці на відстані 1,5 мм від молярів із заходом на акулову кістку на 1–1,5 мм відстані робили канал глибиною 2 мм під кутом 120° до площини молярів і вкручували

ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

імплантат діаметром 1,2 мм та довжиною 4 мм (використовується у стоматології як анкер).

Лікувально-профілактичні заходи у щурів починали проводити з першого дня моделювання ЦД 2 типу. ЛПК, що вводився тваринам, включав із розрахунку на 1 кг маси тіла: комплекс біологічно активних речовин рослинного походження «ОІСК ультра» (150 мг/кг), який регулює вуглеводний обмін; фітоконцентрат «Імунікум» (5 крапель/кг) – адаптоген, що посилює імунітет та резистентність у порожнині рота; «Селен + Цинк актив» (25 мг/кг – 0,9 мг/кг цинку та 4,5 мкг/кг селену) – препарат антиоксидантного та остеотропного характеру дії; «Алфавіт» – вітамінно-мінеральний комплекс, що нормалізує кістковий метаболізм і підвищує неспецифічну резистентність. Місцево у вигляді зрошення використовували «Екстракт гінкгобілоби та виноградних кісточок», що регулює мікробіоценоз, покращує кровообіг у яснах та зменшує запалення (1/10 з водою). Зрошення ротової порожнини щурів проводилося 1 раз на добу вранці за 30 хв. до годування.

Тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг), після чого проводилися морфологічні дослідження.

У досліджуваних групах тварин вивчалися особливості стану мікроциркуляторного русла, стан кісткової тканини, особливості перебігу репаративних процесів у тканинах ясен та кісткових тканинах [7].

Препаровані тканини фіксувалися у 10% розчині формаліну з подальшими рутинними методами знежирення та дегідратації. У ході подальшого етапу експерименту були підготовлені зрізи завтовшки 5×10^{-6} м та застосовані кілька видів забарвлення для виявлення особливостей тканин ротової порожнини шляхом проведення мікроскопії.

Забарвлення гематоксиліном та еозином використовувалося в цьому випадку для вивчення стану структур ротової порожнини, мікроархітекtonіки тканин, визначення особливостей клітинного складу, взаєморозташування різних клітин, волокон, васкуляризації тканини. Крім того, такий спосіб фарбування допомагає ідентифікувати не тільки кількісний склад клітин, особливості їх локації, але і їх якість. Забарвлення по ван Гізону використовувалося для виявлення особливостей будови елементів сполучної тканини, визначення особливостей патологічного процесу. З цією ж метою використовувалося модифіковане забарвлення по Маллорі, що дозволяє визначити взаєморозташування колагенових, еластичних та ретикулярних волокон та міжклітинної речовини. Забарвлення по Рего використовувалося для виявлення зон ішемії, що важливо для розуміння особливостей васкуляризації.

Імуногістохімічне дослідження проводилося постановкою непрямой імунопероксидазної реакції з моноклональними антитілами до VEGF (моноклональний фактор росту ендотелію судин), VAX (моноклональний активатор апоптозу) фірми Thermo scientific. Реакцію візуалізували за допомогою набору Ultra Vision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific) з дофарбуванням ядер гематоксиліном Майєра.

Мікропрепарати вивчалися за допомогою мікроскопа «Olimpus BX-41» з об'єктивами x4, x100, x200, x400, результати піддавалися подальшій обробці програмою «Olimpus DP-soft version 3.2». Для кожного мікропрепарату морфометрична обробка проводилася на 30 полях зору.

Ступінь експресії рецепторів VEGF і VAX оцінювали напівкількісним методом, вважаючи реакцію в 1 бал негативною, 2 бали – слабопозитивною (1%–10%), 3 бали – помірнопозитивною (11%–20%) та 4 бали сильнопозитивною (>21%).

Результати та обговорення. У інтактних тварин слизова оболонка була блідо-рожевою, вологою, чистою, без крововиливів, у разі торкання шпателем не кровоточила. Ротова порожнина на більшому своєму проміжку була покрита багатошаровим плоским неороговуючим епітелієм і лише в ділянці маргінальної та альвеолярної поверхні ясен визначалися ділянки ороговіючого епітелію. Всі шари епітеліального пласта виражені достатньою мірою, межі між ними чіткі, добре візуалізуються. Процеси кератинізації виражені незначною мірою. Ознак занурювального зростання епітелію у тварин досліджуваної групи немає. Власна платівка була представлена еластичними волокнами без ознак їх деструктивних змін. Запальні інфільтрати практично були відсутні. Важливим показником відсутності шкідливого фактора була слабопозитивна реакція на активатор апоптозу VAX. Слід зазначити, що ці клітинні елементи були розташовані одинично, не утворювали скупчень і інфільтратів. Діаметр артеріол у цій підгрупі становив $22,68 \pm 0,54 \times 10^{-6}$ м, прекапілярних артеріол $13,03 \pm 1,02 \times 10^{-6}$ м, капілярів $7,65 \pm 0,47 \times 10^{-6}$ м, посткапілярних венул $27,44 \pm 1,00 \times 10^{-6}$ м і венул $47,03 \pm 0,31 \times 10^{-6}$ м (в інтактній групі $38,80 \pm 1,88 \times 10^{-6}$ м). У разі постановки пероксидазної реакції до VEGF встановлено, що патерною експресією рецепторів цього білка виступають цитоплазма, клітинна мембрана та складники міжклітинного матриксу. Відбулася повнокровність судин мікроциркуляторного русла. Кістково-деструктивні процеси були виражені.

Під час дослідження групи тварин, у яких моделювали ЦД 2 типу з подальшим встановленням імплантатів та проведенням лікувально-профілактичних заходів, спостерігалася незначна блідість слизової оболонки порожнини рота, зберігалася деяка її ранимість у разі торкання шпателем. Однак визначалися лише поодинокі фокуси ерозивних дефектів, невеликі ділянки петехіальних крововиливів. Слизова оболонка порожнини рота була покрита багатошаровим плоским неороговуючим епітелієм, у ділянці ясен – ороговіючим.

Під час вивчення гістологічних препаратів, пофарбованих гематоксиліном та еозином, спостерігалася нерівномірне потовщення епітеліального пласта. Явлення гіперкератозу були виражені меншою мірою, ніж у щурів у разі відсутності лікувально-профілактичних заходів (рис. 1).

При цьому спостерігалися такі морфологічні відмінності в ротовій порожнині щурів порівняно з групою щурів, які ЛПК не отримували. Клітини зернистого шару в цьому випадку були дещо меншими за

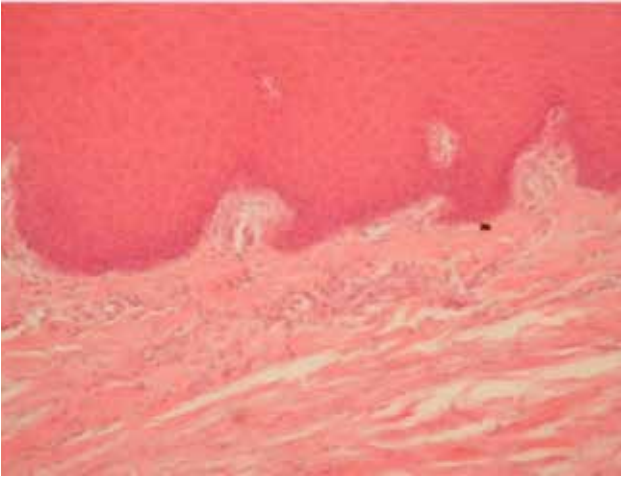


Рис. 1. Зона різкого потовщення епітеліального пласта

Помірно виражені явища акантозу. Забарвлення гематоксиліном та еозином x200

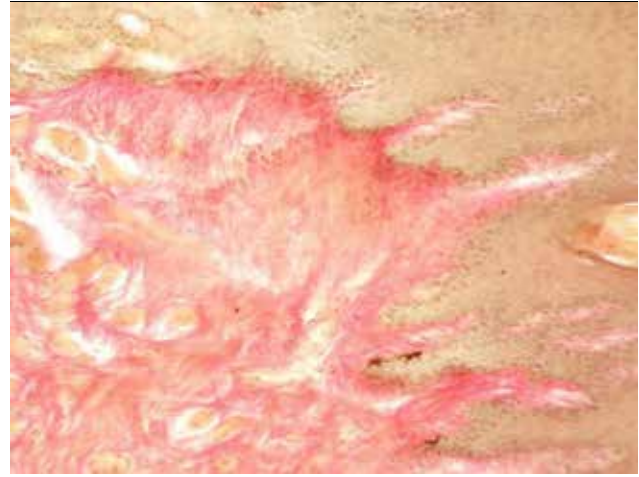


Рис. 2. Епітелій та власна платівка слизової

Сполучна тканина власної платівки представлена як еластичними волокнами, так і колагеновими волокнами, частина з яких з ознаками гіалінізації. Помірно виражені явища акантозу. Забарвлення за ван Гізоном. x200.

розмірами, зерна місцями зливалися і субтотально заповнювали клітину. Тенденції до паралельної орієнтації клітин немає. Під час дослідження слизової оболонки тварин цієї групи клітини шипуватого шару виглядали сплюсненими. У цитоплазмі містилися вакуолі, які досягають великих розмірів, що відтісняють ядро на периферію. Цитоплазма клітин була базофільна, ядра були гіперхромні. Слабопозитивна PAS-реакція була більш виражена в шипуватому шарі.

Наявні ознаки, характерні для дистрофічних і проліферативних процесів, хоча вони були виражені значно меншою мірою, ніж у тварин, які не отримували ЛПК. Так, дистрофічні процеси візуалізувалися в ділянці зубояснової кишені і виявлялися витончення шипуватого і рогового шару на тлі збільшення рогового шару. Проліферативні процеси були зумовлені насамперед шипуватим і зернистим шаром і меншою мірою проліферацією базального шару. Власна платівка містила акантотичні тяжі, що були добре виражені. Ретикулярні волокна також були виражені, не розволончені, звивисті, рідко анастомозували між собою, утворювали мережу. Склеротичні процеси були помірковано виражені (рис. 2).

Власна платівка містила невелику кількість запальних інфільтратів. Вони були представлені різноманітністю клітинних елементів, найчастішими серед яких були лімфоцити, базофілі тканини, макрофаги. Слід зазначити вибірково локалізацію зазначених інфільтратів переважно в ділянці периваскулярного простору та базальної мембрани. Базальна мембрана була потовщена, гомогенна. Також у периваскулярному просторі спостерігалися поодинокі фібробласти. Колагенові волокна були розташовані пучками, фуксинофільні, подекуди траплялися поодинокі лізовані фрагментовані елементи. Ретикулярні волокна сітчастого шару були грубі, розгалужені, рідко анастомозуючі між собою. Загалом сполучнотканинні елементи такої групи представлені переважно зрілими волокнами.

У разі постановки ІДГ-реакції до активатора апоптозу ВАХ відзначалося зниження до $1,04 \pm 0,13$ ум. од., що достовірно наближалось до показників тварин інтактної групи.

Судини мікроциркуляторного русла були виражені достатньою мірою і анастомозували між собою. Подекуди визначалися новостворені капіляри, що утворюють мережу. Водночас подекуди траплялися поодинокі суджені судини. Більшість судин характеризувалася підвищеним кровонаповненням. Ендотеліоцити судин мали велику округлу форму. Ядро було світле, розташовувалося у центрі клітини, цитоплазма була базофільна. Процеси десквамації ендотелію не визначалися. Загалом нині процеси ангиогенезу були активні, про що свідчить невисока експресія VEGF – $1,05 \pm 0,09$ умов. од., що відповідає показнику інтактної групи.

Патологічні процеси, викликані застосуванням імплантатів та моделюванням цукрового діабету, значно меншою мірою були виражені порівняно з групою щурів, де лікувально-профілактичні заходи були відсутні. Запальні інфільтрати були незначними, розташовувалися в ділянці периваскулярного простору, також супроводжували судини, в деяких з яких виявлялися ознаки набухання мукоїдного.

Під час проведення морфометричних досліджень було встановлено, що діаметр артеріол у цій підгрупі становив $21,01 \pm 1,87 \times 10^{-6}$ м, прекапілярних артеріол $12,54 \pm 0,62 \times 10^{-6}$ м, капілярів $7,11 \pm 0,41 \times 10^{-6}$ м, посткапілярних венул $29,52 \pm 0,65 \times 10^{-6}$ м, венул $40,31 \pm 1,54 \times 10^{-6}$ м.

Губчаста кісткова тканина тварин, які отримували ЛПК, була представлена трабекулярною мережею. Трабекули були добре виражені, зокрема і поперечні, часто анастомозували між собою. Подекуди на їхній поверхні визначалися поодинокі ділянки запалень. Процеси резорбції платівок було виражено мінімально (рис. 3).

Основними клітинними елементами у щурів, які отримували ЛПК, були остецити, які розташовувалися в лакунах, повністю повторюючи їхню форму.



Рис. 3. Слабовиражені процеси резорбції у періодонтальному просторі

Модифіковане забарвлення Маллорі, збільшення x200.

З урахуванням вираженості цитоплазматичних відростків, що анастомозували між собою, можна було судити про достатній рівень обмінних процесів у кістковій тканині на тлі лікування. На деяких ділянках тканини

візуалізувалися поодинокі запальні елементи, які переважно локалізувалися в ділянці судин та були представлені лімфоцитами, плазмоцитами, базофілами, одиничними макрофагами, опасистими клітинами.

Пластинчаста кісткова тканина у щурів, що отримували ЛПК, була представлена остеонами з добре вираженим Гаверсовим каналом, який займав центральне положення. Судини в основному були повнокровними, іноді траплялися дилатовані судини з мікротромбами в їхньому просвіті. Деструктивні зміни у структурі остеонів не спостерігалися. Меншою мірою деструктивні зміни торкалися колагенових волокон у складі аморфної речовини, які розташовувалися пучками, в деяких ділянках спостерігалися волокна з одиничними ознаками фрагментації, лізису. Кількість ретикулярних волокон було значно меншою, ніж колагенових, вони були покручені за формою, анастомозували між собою.

Висновки. Запропонована схема лікувально-профілактичних заходів на тлі моделювання ЦД та встановлення імплантів привела у щурів до нормалізації порушеної судинної картини мікроциркуляторного русла, до зниження активності апоптотичних процесів, до зменшення запальних процесів м'яких і твердих тканин ротової порожнини та до зниження активності резорбції.

Діаметр	Контрольна група, n=6	Експериментальна група, n=6
артеріол	22,68±0,54x10-6м	21,01±1,87x10-6м
прекапілярних артеріол	13,03±1,02x10-6м	12,54±0,62x10-6м
капілярів	7,65±0,47x10-6м	7,11±0,41x10-6м
посткапілярних венул	27,44±1,00 x10-6м	29,52±0,65x10-6м
венул	47,03 ± 0,31 x10-6м	40,31±1,54x10-6м, P=0,002; CI=3,22...10,22

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Zhang Zhanwei, Ji Chonghao, Wang Daobin, Wang Maoshan, Song Dawei, Xu Xina. The burden of diabetes on the soft tissue seal surrounding the dental implants. *Frontiers in Physiology*. 2023;14: article 1136973.
- Lv Xiaolei, Zou Lilin, Zhang Xiaomeng, Zhang Xin, Lai Hongchang. Effects of diabetes/hyperglycemia on peri-implant biomarkers and clinical and radiographic outcomes in patients with dental implant restorations: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*. 2022; 33(12):1183–1198.
- Nibali Luigi, Gkraniias Nikolaos, Mainas Giuseppe, Di Pino Antonino. Periodontitis and implant complications in diabetes. *Periodontology*. 2000; 90(1):88–105.
- He Qingqing, Mu Zhixiang, Shrestha Annie, Wang Chao, Wang Si, Tang Han, Li Yihan, Song Jinlin, Ji Ping, Huang Yuanding. Development of a rat model for type 2 diabetes mellitus peri-implantitis: A preliminary study. *Oral Diseases*. 2022; 28(7):1936–1946.
- Prots GB. Biochemical markers of bone remodeling in predicting the results of dental implantation. Therapeutics named after Professor M.M. Berezhnytskyi. 2021; 2(1):22–26 (in Ukrainian).
- Savchuk OV, Krasnov VYu, Yurzhenko AV, Azodi Far S. Forecasting the success of dental implantation in patients with dentition defects against the background of chronic generalized periodontitis. *Modern dentistry*. 2021; 5:64–67 (in Ukrainian).
- Clinical laboratory diagnostics. / LE Lapovets, GB Lebed, OO Yastremska et al., 2021 (in Ukrainian).

Надійшла до редакції 06.12.2022 р.

Прийнята до друку 17.12.2022 р.

Електронна адреса для листування marinarozumenko@gmail.com