

## МОДЕЛЮВАННЯ ПАТОЛОГІЇ ПАРОДОНТА У ЩУРІВ В УМОВАХ ТОКСИЧНОЇ ЕСТРОГЕННОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

ДУ «Інститут стоматології АМН України», Одеса

Відомі різні способи моделювання змін у пародонті тварин, що відображають структурно-функціональні зрушення, характерні для пародонтиту людини. Сьогодні вже не викликає сумнівів концепція молекулярних механізмів ушкоджень пародонта процесами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) при зниженому рівні функціонування фізіологічної антиоксидантної системи (ФАС) [1]. Пародонтит часто прогресує в постклімактеричному періоді, що, окрім вікового зниження активності ФАС, зумовлено недостатністю естрогенних гормонів і подальшими порушеннями регуляції метаболізму кісткової тканини. Естрогени утворюються у тваринному організмі за участі цитохрому P450-ароматази (або естрогенсинтази, КФ 1.14.1) — ферменту, що каталізує перетворення тестостерону в естрадіол й андростендіону в естрон. Фермент локалізований, головним чином, у мікросомах клітин яєчників, але також синтезується естрагонадно у жировій тканині матки, молочних залозах та у деяких інших тканинах. Вивчення естрогенної недостатності (ЕН), відтворене за допомогою оваріоектомії, і проведені нами раніше дослідження [2] виявили активацію процесів ПОЛ у печінці та тенденцію до посилення в альвеолярній кістці щелеп. При цьому значної резорбції кісткової тканини пародонта у цих тварин ми не спостерігали.

**Метою** цього дослідження стало моделювання експериментальної патології пародонта у щурів, аналогічне пародонтиту людини, за допомогою

хронічного введення Клотримазолу — інгібітора цитохрому P450-ароматази.

### Матеріали та методи дослідження

Досліди проведені на 18 щурах-самках 1,5-місячного віку, які отримували раціон віварію. Інтактна група складалася з 8 щурів. Естрогенну недостатність у 10 щурів відтворювали пероральним введенням Клотримазолу (КЛ) (Clotrimazole, Polfa, Poznan S.A.) 5 раз на тиждень дозою 0,1 мг/кг маси тіла щурів протягом 60 днів. Дифеніл-(2-хлорфеніл-1-імідазолід)-метан (активна компонента клотримазолу) є одним із представників групи імідазолних інгібіторів цитохрому P450-ароматази. Таблетки 0,1 г суспендували в 50 мл 96° етанолу. Вихідний розчин перед вживанням розводили водою у співвідношенні 1 : 3. Після завершення дослідів щурів виводили з експерименту тотальним кровопусканням із серця під наркозом (тіопентал натрію дозою 40 мг/кг). Відокремивши слизову оболонку порожнини рота (СОПР), виділяли щелепи і піддавали їх морфометричному дослідженню з метою визначення резорбції кісткової тканини пародонта [3], а також брали органи. Об'єкти біохімічних досліджень: сироватка крові, головний мозок, СОПР, альвеолярна та стегнова кістки, матка, яєчники. У головному мозку, матці та яєчниках щурів визначали активність P450-ароматази (нмоль/хв на 1 мг білка) [4]. У сироватці крові щурів визначали сумарний вміст естрогенів. У сироватці крові та кіст-

ковій тканині досліджували активність лужної фосфатази (ЛФ) [5]. Визначення неорганічного фосфору проводили згідно з методом [6]; визначення кальцію — уніфікованим методом. Активність кислої фосфатази (КФ) та ЛФ визначали у сироватці крові, СОПР і кістковій тканині за методом [5]. Процеси ПОЛ оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) [7] і малонового діальдегіду (МДА) [8]. Рівень ФАС оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД) [9], каталази [10] і глутатіон-пероксидази (ГПО) [11].

Результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію вірогідності відмінностей за Стьюдентом.

### Результати дослідження та їх обговорення

Хронічне введення КЛ щури переносили без помітних проявів інтоксикації. Зовнішній вигляд шкірних покривів й обволосіння в межах норми. Маса тіла щурів перед забоем у групі, яка отримувала КЛ, становила: (191,0±8,0) г проти (93,0±5,2) г (P<0,001). Встановлено, що активність ароматази в матці (1,30±0,08; P<0,001) і яєчниках (42,0±0,52; P<0,001) щурів-самок, які отримували КЛ, була зниженою порівняно з інтактною групою: (5,43±0,12) і (8,60±0,70) відповідно. У головному мозку також спостерігалось істотне зниження активності цього ферменту: 0,50±0,07 (P<0,001) проти 1,20±0,10 в інтактній групі. Отже, КЛ інгібує ароматазну активність не лише в тканинах-мішенях (матка і яєчники), але



і в інших тканинах, що містять цей фермент. Сумарний вміст естрогенів у сироватці крові щурів-самок становив: у інтактних тварин — (38,3±1,5) нг/мл; у модельній групі — (13,2±0,8) нг/г (P<0,001).

Надходження, депонування та виведення кальцію і фосфору регулюється системою, в якій важливу роль відіграють паратгормон (ПТГ), кальцитонін і 1,25-діоксивітамін D3 (кальцитриол). Клітини прищитоподібних залоз, які продукують ПТГ, високочутливі до зміни концентрації кальцію у крові. У сироватці крові щурів виявлена тенденція (P=0,08) до зниження вмісту кальцію й істотне збільшення (P=0,02) вмісту фосфору, можливо, унаслідок токсичного впливу КЛ на нирки, оскільки гіперфосфатемія трапляється при хронічній нирковій недостатності (табл. 1). Зниження рівня кальцію в сироватці крові самок, пов'язане з ЕН, викликало посилення активності ПТГ і стимуляцію остеорезорбтивних процесів за участі кальцитриолу. Хронічне введення КЛ протягом 60 днів

привело до посилення резорбції кістки альвеолярного відростку нижньої щелепи щурів на 17,3 % (від 100 % у інтактній групі; P=0,014; табл. 2). Показники резорбції альвеолярної кістки верхньої щелепи відносно інтактної групи не змінювалися. Іншим, не менш важливим механізмом посилення резорбтивних процесів виявилася, ймовірно, активація остеобластів через усунення прямого інгібуючого впливу на них естрогенів [12].

Найважливішим показником мінерального обміну є ЛФ — фермент, локалізований у кістковій тканині, головним чином, у мембранах остеобластів. Активність ЛФ у кістковій тканині та сироватці крові залежить від інтенсивності їх функціонування.

При естрогенній недостатності активність ЛФ в альвеолярній кістці знижувалася в 2,3 рази (P=0,013) порівняно з інтактною групою, що свідчить про порушення процесів мінералізації у даному об'єкті дослідження. Вміст кальцію в альвеолярній кістці вірогідно не змі-

нювався; вміст фосфору збільшувався в 1,3 рази (P=0,09). При моделюванні пародонтиту вміст кальцію й активність ЛФ у стегновій кістці не зазнали істотних змін; вміст фосфору збільшувався в 1,9 рази (P=0,005).

У процесах остеорезорбції бере участь лізосомальний апарат клітини. Кисла фосфатаза — фермент, локалізований у лізосомах остеокластів, який здійснює розщеплення органічних ефірів фосфорної кислоти у кислому середовищі. В альвеолярній кістці активність КФ збільшувалася в 7,2 рази, що свідчить про посилення катболічних процесів у тканинах пародонта. Хронічна інтоксикація КЛ викликала вірогідне збільшення даного прозапального ферменту у сироватці крові та слизовій оболонці порожнини рота щурів (у 1,8 і 3,9 рази відповідно). У стегновій кістці активність КФ знижувалася в 1,5 рази (P=0,05; табл. 3).

Певний вклад у порушення лізосом і звільнення лізосомальних ферментів вносять процеси ПОЛ. Лізосоми, які нагромаджують продукти ПОЛ, ушкоджую-

Таблиця 1

Стан мінерального обміну в сироватці крові та кістковій тканині щурів в умовах естрогенної недостатності, M±m

Група тварин	Сироватка крові			Альвеолярна кістка			Стегнова кістка		
	Активність ЛФ, нмоль/(с·л)	Вміст кальцію, ммоль/л	Вміст фосфору, ммоль/л	Активність ЛФ, нмоль/(с·г)	Вміст кальцію, ммоль/г	Вміст фосфору, ммоль/г	Активність ЛФ, нмоль/(с·г)	Вміст кальцію, ммоль/г	Вміст фосфору, ммоль/г
Інтактна	780±38	4,93±0,13	1,04±0,11	4,37±0,82	1,30±0,07	1,17±0,14	2,12±0,31	1,56±0,11	0,78±0,06
Модель	897±100	4,28±0,31 P=0,08	1,51±0,13 P=0,02	1,88±0,15 P=0,013	1,23±0,29	1,51±0,09 P=0,09	2,60±0,57	1,54±0,09	1,51±0,43 P=0,005

Таблиця 2

Показники резорбції кістки альвеолярного відростка щурів під дією Клотримазолу, M±m

Група тварин	Показники резорбції, %	
	Верхня щелепа	Нижня щелепа
Інтактна	36,3±2,6	41,7±1,8
Модель	37,7±2,1	48,9±1,9 P=0,014

Таблиця 3

Активність кислої фосфатази в сироватці крові (нмоль/(с·см<sup>3</sup>)) і тканинах щурів (нмоль/(с·г)) в умовах естрогенної недостатності, M±m

Група тварин	Сироватка крові	Слизова оболонка порожнини рота	Альвеолярна кістка	Стегнова кістка
Інтактна	110,0±18,8	0,83±0,14	0,47±0,06	1,17±0,10
Модель	201,0±38,6 P=0,02	3,22±0,36 P<0,001	3,37±0,56 P<0,001	0,79±0,12 P=0,05



Таблиця 4

**Вміст продуктів ПОЛ і активність ферментів ФАС у кістковій тканині щурів в умовах естрогенної недостатності, М±m**

Показники	Альвеолярна кістка		Стегнова кістка	
	Інтактна група	Модель	Інтактна група	Модель
ПОЛ				
ДК, мкмоль/г	7,82±0,32	17,05±0,27 P<0,001	4,36±0,32	4,32±0,32
МДА, нмоль/г	7,96±1,50	18,20±2,45 P=0,007	28,10±1,92	24,10±4,04
ФАС				
СОД, ум. од./г	1,68±0,039	1,03±0,13 P=0,10	0,091±0,052	0,71±0,21 P=0,03
Каталаза, мкат/г	24,4±8,4	12,9±3,3	64,4±21,9	77,3±25,7
ГПО, нмоль/(с·г)	52,20±5,32	40,60±2,55 P=0,08	45,40±7,27	62,00±5,98 P=0,10

ються, звільнюючи ферменти, що призводить до руйнування субклітинних структур. В альвеолярній кістці при моделюванні пародонтиту вміст ДК і МДА збільшився в 2,2 разу (табл. 4). У стегновій кістці дані показники не зазнали істотних змін. Під впливом КЛ в альвеолярній кістці активність СОД знижувалася в 1,6 разу, активність ГПО — в 1,3 разу (P=0,10; P=0,08 відповідно). У стегновій кістці, навпаки, активність СОД вірогідно збільшувалася (P=0,03).

Проведені дослідження свідчать про те, що естрогени є важливим фактором метаболізму кісткової тканини, а їх недостатність сприяє посиленню резорбції альвеолярної кістки у відносно короткі терміни експерименту. Відтворена нами експериментальна патологія пародонтиту у щурів, аналогічна пародонтиту людини, внаслідок недостатності відтворення в них естрогенів. Під впливом КЛ — інгібітора цитохрому P450-ароматази — в альвеолярній кістці порушувалися процеси мінералізації, посилювалася резорбція та запальні явища в слизовій оболонці порожнини рота. Відсутність паралелізму в метаболічних змінах альвеолярної та стегнової кісток, а також відмін-

ностей рівня резорбції альвеолярної кістки верхньої та нижньої щелепи вказують на неоднорідність механізмів пародонтитогенезу в цих об'єктах дослідження.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Воскресенский О. Н. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе пародонтита / О. Н. Воскресенский, Е. К. Ткаченко // *Стоматология*. — 1991. — № 4. — С. 5-10.
2. Исследование защитных эффектов филлохинона и гормональных форм витамина D при экспериментальной патологии пародонта / Е. К. Ткаченко, А. А. Сокольников, В. Я. Скиба [и др.] // *Материалы науч.-практ. конф., посв. 65-летию ОНИИС*. — Одесса, 1993. — С. 40-44.
3. Николаева А. В. Влияние некоторых нейротропных средств на состояние тканей при раздражении верхнего шейного симпатического узла : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. В. Николаева. — Харьков, 1967. — 29 с.
4. Ясинская И. М. Влияние восстановителей-антиоксидантов на активность ароматазы шейки матки крыс *in vitro* / И. М. Ясинская // *Український біохімічний журнал*. — 2000. — Т. 72, № 2. — С. 47-50.
5. Левицкий А. П. Сравнительная оценка трех методов определения активности фосфатаз слюны человека / А. П. Левицкий, А. И. Марченко, Т. Л. Рыбак // *Лабораторное дело*. — 1973. — № 10. — С. 624-625.
6. Леонтьев В. К. Биохимические методы исследования в клинической

и экспериментальной стоматологии : метод. рекомендации / В. К. Леонтьев, Ю. А. Петрович. — Омск, 1976. — 93 с.

7. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // *Современные методы в биохимии* / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили ; под ред. В. И. Ореховича. — М. : Медицина, 1977. — С. 63-64.

8. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии* / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили ; под ред. В. И. Ореховича. — М. : Медицина, 1977. — С. 66-68.

9. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, Й. Чаба, Й. Сеней // *Лабораторное дело*. — 1985. — № 1. — С. 678-681.

10. Метод определения активности каталазы / М. А. Корольюк, Д. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лабораторное дело*. — 1988. — № 1. — С. 16-18.

11. А. с. 922637 СССР. МКИ 01 33/48 Способ определения активности глутатионпероксидазы в биологических тканях / В. А. Пахомова, Н. П. Козлянина, Г. Н. Крюкова (СССР). — Оpubл. 25.04.82, Бюл. № 15. — 2 с.

12. Human grant cell tumors of the bone (osteoclasts) are estrogen target cells / M. J. Ourosler, L. Pederson, L. Fitzpatrick [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. — 1994. — Vol. 91. — P. 5227-5231.

