

УДК 616-092.9:616.314.17-008.1

## РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ ПЕРЕБІГУ ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПАРОДОНТИТІ

**Шнайдер С.А.**

*Одеський національний медичний університет*

*Ключові слова: пародонтит, нестабільність геному, запалення*

### **Вступ**

Патоморфоз хронічного генералізованого пародонтиту є однією з причин невирішеності проблеми профілактики і лікування захворювання. Порушення перебігу захворювання, його резистентності до лікування пов'язують з епігенетичні розладами спричиненими дією несприятливих факторів довкілля [1]. Різні за походженням стрессорні фактори порушують регуляцію експресії генів, що спричиняє дизрегуляційні зміни метаболізму в тканинах, поділ, диференціювання клітин [2, 3]. Так, у тварин з радіаційно-індукованою нестабільністю зменшується резистентність тканин пародонту при відтворенні експериментального пародонтиту [4]. При наявності нестабільності геному, може порушуватись функціонування генів відповідальних за біосинтез цитокінів, що в свою чергу спричинятиме зміни перебігу запалення [5, 6], але ці дані фрагментарні і потребують подальших досліджень. Нині відсутні дані про зрушення цитокінового профілю при хронічному пародонтиті у ссавців, у яких діагностується нестабільність геному, що унеможливує остаточне розуміння патоморфозу захворювання, розробку методів його лікування.

**Мета роботи:** в експериментальних умовах дослідити перебіг запалення при пародонтиті у тварин з радіаційно-індукованою нестабільністю геному

### **Матеріал та методи дослідження**

Експериментальні дослідження проведені на 98 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар, у відповідності до науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин і роботи з ними та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються

для експериментальних та наукових цілей».

Тварин розподілили на дві рівні групи: I) нащадки інтактних тварин, II) нащадки g-опромінених щурів. У щурів моделювали хронічний генералізований пародонтит за допомогою моделі зниженої жувальної функції. Тварини знаходились на пас-топодібному раціоні харчування, с нормою 65 г на добу протягом 30 днів [7].

Для отримання потомства g-опромінених щурів, самців та самок перед спарюванням піддавали фракціонованому g-опроміненню на гамматерапевтичній установці АГАТ-Р по 0,1 Гр кожні 72 години до досягнення сумарної дози 1,0 Гр. Наявність у тварин, отриманих від g- опромінених щурів, нестабільності геному з'ясовували за допомогою мікроядерного тесту [8, 9]. Другу експериментальну групу формували лише з тварин у яких діагностовано радіаційно-індуковану нестабільність геному.

Вміст цитокінів визначали в супернатантах гомогенатів тканин слизової оболонки ясен. Підготовку проб для дослідження проводили за Orikawa та співавт., 2010 [10]. Відсепаровували ділянку слизової оболонки ясен, вимірювали масу наважки, гомогенізували в 0,5 мл буферного розчину, який містить 10 мкмоль Tris-HCl (pH 7,5), 150 мкмоль NaCl, EDTA (pH 8,0), 1 % NP-40S (nonyl phenoxy polyethoxy ethanol), 1 мкмоль Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мкмоль PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) (Sigma-Aldrich, USA), "Protease inhibitor cocktail" (Sigma-Aldrich, USA). Після гомогенізації проби центрифугували при 3000 обертів/хв протягом 15 хвилин для отримання супернатантів тканин. В супернатантах визначали вміст інтерлейкінів 1, 6, 10 (ІЛ-1b, ІЛ-6, ІЛ-10), фактору некрозу пухлин - а

(ФНП-а), трансформуючого фактору росту - b (ТФР-b) з використанням стандартних наборів для імуноферментного аналізу RAT IL-1b, 6, 10; Rat TNF-alpha та Rat TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit (R&D System, USA). Визначення проводили на імуноферментному аналізаторі "УНИПЛАН" (ЗАО "Пикон", Росія).

Відмінності вмісту цитокінів в різних групах дослідних тварин оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу. В разі, якщо нульова гіпотеза відкидалась для подальшого аналізу використовували критерій Ньюмена-Кейлса [11].

### Результати дослідження та їх обговорення

В результаті проведених досліджень з'ясовані особливості змін вмісту прозапальних та протизапальних цитокінів в тканинах пародонту при відтворенні пародонтиту у нащадків інтактних (контрольна група) і g-опромінених щурів (дослідна група). Так, зростання вмісту прозапальних цитокінів у тварин дослідної групи спостерігали на 14-ту добу експерименту, але зростання було менш виразне, ніж у тварин контрольної групи (табл. 1). На 14-ту добу

експерименту у тварин дослідної групи в тканинах слизової оболонки ясен містилося на 33,5 % більше ІЛ-1, але на 21- та 30-ту добу менше на 36,3 і 17,4 % відповідно. У тварин контрольної групи вміст ІЛ-1 відновлювався до рівня інтактних тварин на 37-у добу експерименту, у тварин дослідної групи на тридцять. Отримані дані корелюють з виявленим раніш клінічними особливостями перебігу експериментального пародонтиту. У нащадків g-опромінених тварин раніше, ніж у нащадків інтактних тварин виникають порушення гістотопографії пародонту при моделюванні захворювання [12].

Аналогічні кількісно та за напрямком відмінності між тваринами контрольної і дослідної групи спостерігали і при визначенні вмісту ФНП-а. На 14-ту добу експерименту вміст ФНП-а в тканинах слизової оболонки ясен тварин дослідної групи перевищував показники контрольної групи на 91,7 %, але вже на 21-шу добу був меншим на 20,1 %, на 30-ту – на 36,8 %. Відновлення вмісту ФНП-а до рівня інтактних тварин відбувалося у тварин дослідної групи на 37-у добу експерименту.

Таблиця 1

Динаміка вмісту цитокінів в тканинах пародонту при хронічному пародонтиті

( $M \pm m$ ,  $n = 7$ , пикограм / г тканин)

| Група | Доба спостереження | Інтерлейкін 1                 | Інтерлейкін 6                 | Інтерлейкін 10                | ФНП-α                         | ТФР-β                         |
|-------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| I     | інтактні           | 45,1 ± 2,11                   | 53,4 ± 2,56                   | 43,2 ± 1,94                   | 25,1 ± 1,23                   | 53,6 ± 2,14                   |
|       | 7                  | 46,1 ± 2,21                   | 54,2 ± 2,49                   | 43,2 ± 1,87                   | 25,6 ± 1,26                   | 54,5 ± 2,24                   |
|       | 14                 | 46,3 ± 1,99                   | 54,1 ± 2,33                   | 42,8 ± 1,95                   | 25,2 ± 1,34                   | 51,4 ± 2,16                   |
|       | 21                 | 89,9 ± 4,12 <sup>*1,2</sup>   | 56,3 ± 2,38                   | 67,4 ± 2,77 <sup>*1,2</sup>   | 57,8 ± 2,43 <sup>*1,2</sup>   | 61,4 ± 2,87 <sup>*1,2</sup>   |
|       | 30                 | 55,8 ± 2,22 <sup>*1,2</sup>   | 67,4 ± 2,61 <sup>*1,2</sup>   | 91,3 ± 3,82 <sup>*1,2</sup>   | 51,3 ± 1,49 <sup>*1,2</sup>   | 98,7 ± 4,23 <sup>*1,2</sup>   |
|       | 37                 | 46,8 ± 1,95 <sup>*2</sup>     | 54,1 ± 2,34 <sup>*2</sup>     | 78,5 ± 3,11 <sup>*1,2</sup>   | 41,8 ± 1,56 <sup>*1,2</sup>   | 99,7 ± 4,15 <sup>*1</sup>     |
|       | 44                 | 46,5 ± 2,01                   | 54,4 ± 2,61                   | 44,1 ± 2,21 <sup>*2</sup>     | 25,3 ± 1,13 <sup>*2</sup>     | 54,2 ± 2,34 <sup>*2</sup>     |
| II    | інтактні           | 44,9 ± 2,15                   | 53,8 ± 2,41                   | 42,8 ± 1,82                   | 25,6 ± 1,21                   | 53,8 ± 2,24                   |
|       | 7                  | 45,3 ± 2,14                   | 54,2 ± 2,37                   | 42,9 ± 1,93                   | 25,1 ± 1,24                   | 53,6 ± 2,13                   |
|       | 14                 | 61,8 ± 2,51 <sup>*1,2,3</sup> | 62,1 ± 3,12 <sup>*1,2,3</sup> | 49,8 ± 1,87 <sup>*1,2,3</sup> | 48,3 ± 1,41 <sup>*1,2,3</sup> | 53,8 ± 2,14                   |
|       | 21                 | 57,3 ± 2,15 <sup>*1,3</sup>   | 64,3 ± 3,11 <sup>*1,3</sup>   | 53,2 ± 1,75 <sup>*1,3</sup>   | 46,2 ± 1,21 <sup>*1,3</sup>   | 62,9 ± 2,17 <sup>*1,2</sup>   |
|       | 30                 | 46,1 ± 2,07 <sup>*2,3</sup>   | 67,2 ± 3,09 <sup>*1</sup>     | 68,2 ± 2,61 <sup>*1,2</sup>   | 32,4 ± 1,17 <sup>*1,2,3</sup> | 69,4 ± 2,41 <sup>*1,2,3</sup> |
|       | 37                 | 46,9 ± 2,01                   | 69,4 ± 3,18 <sup>*1,3</sup>   | 67,5 ± 2,43 <sup>*1,3</sup>   | 26,1 ± 1,09 <sup>*2,3</sup>   | 72,3 ± 2,87 <sup>*1,3</sup>   |
|       | 44                 | 46,4 ± 2,03                   | 70,3 ± 3,12 <sup>*1,3</sup>   | 68,1 ± 2,73 <sup>*1,3</sup>   | 25,9 ± 1,07                   | 75,8 ± 2,93 <sup>*1,3</sup>   |

Примітки:

\*1 –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами;

\*2 –  $p < 0,05$  порівняно з попереднім строком спостереження;

\*3 –  $p < 0,05$  порівняно з щурами, отриманими від інтактних тварин.

У тварин контрольної групи вміст ІЛ-6 зростав на 21-шу добу експерименту і відновлювався до показників інтактних тварин на 37-у добу спостереження. На відміну від тварин контрольної групи, у щурів дослідної групи зростання вмісту ІЛ-6 спостерігали вже на 14-ту добу експерименту. Відновлення його вмісту до показників інтактних тварин не відбувалося і на 44 добу спостереження, тобто через 14 діб після припинення відтворення пародонтиту.

Менший вміст прозапальних цитокінів в тканинах слизової оболонки ясен при відтворенні пародонтиту може свідчити про гіпоергічну запальну реакцію. В сукупності з відсутністю відновлення вмісту ІЛ-6 до показників інтактних тварин протягом 14 діб після завершення моделювання пародонтиту це свідчить про тривалий перебіг запалення, можливість розвитку його хронічної форми. Останнє може пояснювати спостерігаєме зменшення тривалості ремісії між загостреннями пародонтиту [13].

У тварин дослідної групи відрізнялась і динаміка змін вмісту протизапальних цитокінів. Так вміст ІЛ-10 був меншим, ніж у тварин контрольної групи на 21, 1, 25,5, 14 % відповідно на 21, 30 та 37-у добу експерименту. У тварин контрольної групи вміст ІЛ-10 відновлювався до показників інтактних тварин на 44-ту добу експерименту, у щурів дослідної групи перевищував показники інтактних тварин на 54,4 %. Слід також зазначити, що кількісно зростання вмісту ІЛ-10 у тварин дослідної групи було меншим, ніж у тварин контрольної групи. Так, максимальне переважаєння вмісту ІЛ-10 в тканинах слизової оболонки ясен щурів контрольної групи над показниками інтактних тварин спостерігали на 30-у добу – в 2,1 рази, у тварин дослідної групи: на 30-ту добу – на 59,3 %. Аналогічні зрушення вмісту ТФР- $\beta$  відбувалися у тварин контрольної і дослідної групи. У тварин дослідної групи не відбувалося відновлення вмісту ТФР- $\beta$  до рівня інтактних тварин на 44-ту добу експерименту. Максимальне переважаєння показників інтактних тварин

– на 40,9 % спостерігали на 44-ту добу спостереження; у тварин контрольної групи – на 86 % “ на 37-у добу спостереження. Таким чином менший вміст протизапальних цитокінів може спричиняти затримку відновлення тканин після завершення моделювання пародонтиту внаслідок чого створюються умови для подальшого прогресування захворювання.

### Висновки

У тварин з радіаційно-індукованою нестабільністю геному порушується баланс між прозапальними та протизапальними цитокінами в тканинах слизової оболонки ясен при відтворенні хронічного пародонтиту, що спричиняє більш тривалий перебіг запалення в тканинах пародонтиту і створює передумови для прогресування захворювання.

**Перспективи подальших досліджень:** необхідно розробити патогенетично обґрунтовані схеми профілактики генералізованого пародонтиту при його радіаційно-індукованому патоморфозі.

### Література

1. Barros S.P. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease / Barros S.P., Offenbacher S. // J. Dent. Res. - 2009. - № 5. - P. 400-408.
2. Aypar U. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? / Aypar U., Morgan W.F., Baulch J.E. // Int J Radiat Biol. – 2011. – № 2. – P. 179-191.
3. Jeggo P. The role of the DNA damage response mechanisms after low-dose radiation exposure and a consideration of potentially sensitive individuals / Jeggo P. // Radiat. Res. - 2010. - № 6. - P. 825-832.
4. Шнайдер С.А. Роль радіаційно-індукованої нестабільності геному в патоморфозі хронічного пародонтиту / С.А. Шнайдер, В.О. Ульянов // Актуальні проблеми транспортної медицини. - 2010. - № 4. - С. 89-93.
5. Gomez R.S. Epigenetics and periodontal

- disease: future perspectives // Gomez R.S., Dutra W.O., Moreira P.R. // *Inflamm. Res.* - 2009. - № 10. - P. 625-629.
6. Wilson A.G. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases / Wilson A.G. // *J. Periodontol.* - 2008. - Vol. 79, Suppl. 8. - P. 1514-1519.
  7. Воскресенский О.Н. Доклиническое изучение средств профилактики и лечения пародонтита (пародонтопротекторов). Методические рекомендации / О.Н. Воскресенский. - К.: Авиценна, 2002. - 16 с.
  8. Сычева Л.П. Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств факторов окружающей среды / Л.П. Сычева, В.С. Журков, Ю.А. Рахманин // *Гигиена и санитария.* - 2003. - № 6. - С. 87-90.
  9. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells / Thomas P., Wu J., Dhillon V., Fenech M. // *Mutagenesis.* - 2011. - № 1. - P. 69-76.
  10. 3Z-360, a novel therapeutic agent for pancreatic cancer, prevents up-regulation of ephrin B1 gene expression and phosphorylation of NR2B via suppression of interleukin-1 I production in a cancer-induced pain model in mice / Orikawa Y., Kato H., Seto K. et al. // *Mol. Pain.* - 2010. - Vol. 6 : 72. Published online 2010 October 28. doi: 10.1186/1744-8069-6-72. - Режим доступа до журнала: <http://www.molecularpain.com/content/6/1/72>.
  11. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. - М.: Практика, 1998. - 459 с.
  12. Шнайдер С.А. Особенности течения хронического генерализованного пародонтита у потомства g-облученных животных / С.А. Шнайдер, В.А. Ульянов // *Вестник гигиены и эпидемиологии.* - 2010. - № 1. - С. 175-179.
  13. Kцnig J. Periodontal health in Europe:

future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services – position paper 1 / Kцnig J., Holtfreter B., Kocher T. // *Eur. J. Dent. Educ.* - 2010. - Vol. 14, Suppl 1. - P. 4-24.

#### Резюме

#### РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТЕЧЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ

*Шнайдер С.А.*

В работе исследованы особенности течения экспериментального хронического пародонтита у животных с радиационно-индуцированной нестабильностью генома соматических клеток. У животных с нестабильностью генома нарушается баланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами в тканях слизистой оболочки десны при моделировании пародонтита, что способствует прогрессированию заболевания.

*Ключевые слова: пародонтит, нестабильность генома, воспаление*

#### Summary

#### RADIATION-INDUCED VIOLATION OF INFLAMMATION IN MODEL OF PERIODONTITIS

*Shnayder S.A.*

The features of clinical outcomes of experimental chronic periodontitis in animals with radiation-induced genome instability of somatic cells were investigated. It was set violation in balance between proinflammatory and antiinflammatory cytokines in gingival mucosa tissue in animals with genome instability in experimental periodontitis. It promote to progress of disease.

*Key words: periodontitis, genome instability, inflammation.*

*Впервые поступила в редакцию 11.05.2011 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*