

Е. Г. Романенко, В. И. Мамчур, А. Э. Левых

Значение оксида азота в обеспечении трофической функции собственной пластинки десны при экспериментальном гастродуодените

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

Ключевые слова: оксид азота, гастродуоденит, трофическая функция

В последние годы значительно расширились представления о роли оксида азота (NO) и его метаболитов в различных физиологических и патологических процессах, в патогенезе различных заболеваний, в том числе полости рта и желудочно-кишечного тракта [2, 4, 7]. Доказана двойственная роль этого универсального эндогенного регулятора, способного оказывать как повреждающие, так и защитные воздействия на слизистую оболочку, которые во многом зависят от концентрации этого соединения. Оксид азота регулирует моторику пищеварительного тракта, желудочную секрецию, микроциркуляцию, стимулирует секрецию слизи и в физиологических условиях оказывает цитопротективное действие [3, 7]. Очевидно, подобное действие оксид азота должен оказывать на ткани полости рта, однако, в литературе эти данные освещены недостаточно и требуют дополнительного изучения. Каковы же клеточные мишени NO? Во-первых, это растворимая цитоплазматическая гуанилатциклаза, участвующая в образовании цГМФ. Во-вторых, важная молекулярная мишень для оксида азота – это белки, содержащие SH-группы. NO служит эффективным катализатором образования дисульфидных мостиков. Благодаря взаимодействию с SH-группами NO может регулировать такой важный для клетки процесс, как биосинтез белка [3]. Совокупность этих сведений позволяет предположить, что дефицит или избыток оксида азота может нарушать трофические процессы в тканях и снижать их регенераторный потенциал.

Цель исследования – изучение влияния оксида азота на трофическую функцию собственной пластинки десны при экспериментальном гастродуодените у крыс.

Материалы и методы. Модель хронического гастродуоденита воспроизводили на крысах обоего пола линии Вистар массой 70–90 г (22 животных). Контрольную группу составили 10 интактных животных. Лабораторным крысам в течение 40 дней вводили 50 % медицинскую желчь интрагастрально, 1 мл на 100 г веса животного один раз в сутки [12]. В контрольной группе крысам интрагастрально вводили стерильный физиологический раствор. При выполнении эксперимента придерживались рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных в соответствии с положениями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и научных целей». Животных содержали на обычном рационе в стандартных условиях вивария. Эвтаназию животных осуществляли под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг массы тела внутривентриально) путем тотального кровопускания из сердца. Гомогенаты десны получали растиранием с толченым стеклом навески ткани в 0,05М Трис-HCl буфере (pH 7,4) с последующим центрифугированием при 2500 g в течение 15 мин. Образование NO оценивали по суммарному уровню нитритов и нитратов (NO_x) в сыворотке крови спектрофотометрическим методом по реакции Грисса [13, 14] с предварительной конверсией нитратов в нитриты. Содержание белка в сыворотке крови и гомогенатах слизистой оболочки десны крыс

определяли биуретовым методом. Для морфологического исследования брали участки десны в области резцов и моляров верхней и нижней челюстей животных. Фиксацию препаратов проводили в течение суток в 10 % водном забуференном растворе формалина. С целью приготовления гистологических препаратов из фрагментов тканей были сделаны блоки стандартной величины с последующей проводкой тканей в этиловом спирте возрастающей концентрации и заливкой в парафин. Окраску препаратов проводили гематоксилином и эозином на предметных стеклах. Гистологические препараты оценивали методом световой микроскопии микроскопом Axioskop 40 (ZEISS). Морфометрический анализ осуществляли при помощи микроскопа, цветной видеокамеры и видеокарты для ввода изображения в компьютер. Компьютерную морфометрию осуществляли при помощи программ: Carl Zeiss AxioVs40 V4.6.3.0 и ImagePro Plus V 3.0.00.00. Морфометрическому анализу подвергали изображения, увеличенные в 100 раз. С помощью морфометрии определяли толщину эпителия и высоту сосочков собственной пластинки десны (мм).

Статистическую обработку данных проводили с использованием лицензионной программы STATISTICA 6.1. Определяли среднюю арифметическую величину (M), величину ошибки среднего (m), критерий значимости (t) Стьюдента, степень достоверности различий (p). Перед применением параметрических критериев проводили проверку гипотезы о нормальном законе распределения случайных величин посредством критерия Шапиро-Уилка.

Результаты и их обсуждение. Считается, что на ранних этапах развития воспаления в слизистых оболочках происходит повышение продукции NO, являющейся компенсаторным механизмом для обеспечения кровоснабжения и поддержания высокого уровня метаболизма в тканях за счет прямой вазодилатации. При прогрессировании заболевания происходит истощение источников синтеза NO (L-аргинин) и снижение его образования, что приводит к повышению агрегационной способности тромбоцитов, снижению фибринолитической активности крови, нарушению регуляции сосудистого тонуса и развитию микротромбозов сосудистой системы. Негативное воздействие NO начинает проявляться, когда его суммарная концентрация резко снижается либо возрастает, приводя к функциональным и структурным повреждениям органа [2, 3, 5]. Результаты исследования (таблица) показали, что уровень стабильных метаболитов NO в гомогенатах тканей десны крыс с гастродуоденитом уменьшался почти в три раза ($P < 0,001$) по сравнению с показателем в группе интактных животных, что говорит об истощении депо оксида азота при данном заболевании. Отмечается достоверное уменьшение содержания белка в тканях у животных экспериментальной группы ($P < 0,01$). Очевидно, на фоне хронической гастродуоденальной патологии происходит активация катаболических процессов в десне. Поскольку оксид азота непосредственно влияет на трофику тканей, усиливая их кровоснабжение, следует рассмотреть морфологические изменения, происходящие в собственной пластинке десны, при

Таблица

Содержание белка и метаболитов оксида азота в сыворотке крови и гомогенатах ткани десны у крыс ($M \pm m$)

Группа животных	Белок, г/л		Метаболиты NO, мкмоль/л	
	гомогенат десны	сыворотка крови	гомогенат десны	сыворотка крови
Контрольная (n=10)	6,6 ± 0,3	50,5 ± 3,3	134,9 ± 3,4	2,2 ± 0,2
Экспериментальная (n=22)	4,8 ± 0,1 (P < 0,01)	54,1 ± 3,7 (P < 0,05)	49,3 ± 3,2 (P < 0,001)	37,6 ± 7,3 (P < 0,001)

Примечание. P – достоверность различий с показателями контрольной группы животных.

сопутствующей гастродуоденальной патологии, так как именно в ней залегают кровеносные сосуды, питающие эпителиальный пласт.

Собственная (соединительнотканная) пластинка слизистой оболочки десны, на которой лежит пласт эпителия, состоит из волокнистой соединительной ткани, образующей в поверхностных отделах многочисленные выступы или сосочки. Они внедряются в пласт эпителия. Эти соединительнотканые сосочки построены из рыхлой соединительной ткани, в них проходят кровеносные сосуды, питающие эпителий [1]. Соответственно эпителий также образует выросты, заполняющие промежутки между соединительноткаными сосочками (рис. 1, 2). Считается, что эти сосочки увеличивают площадь соприкосновения между эпителием и соединительной тканью и способствуют лучшему обмену веществ между ними. Кроме того, они обеспечивают более прочное прикрепление эпителиального пласта к собственной пластинке слизистой оболочки.

Соединительнотканые сосочки особенно сильно развиты у свободного края десны, здесь они настолько глубоко проникают в эпителиальный слой, что оказываются отделенными от поверхности лишь немногими слоями эпителиальных клеток. Питание эпителиоцитов осуществляется диффузно через базальную мембрану со стороны подлежащей соединительной ткани [5].

Высота соединительнотканых выступов пропорциональна толщине

эпителия. По высоте и рельефу соединительнотканых сосочков можно косвенно судить о размере капиллярного русла, питающего эпителиальный пласт десны. Таким образом, уменьшение высоты соединительнотканых сосочков ведет к нарушению трофики эпителия и ухудшению прикрепления к собственной пластинке десны. Рельеф соединительнотканых сосочков у крыс с гастродуоденитом претерпевает значительные изменения, становится сглаженным (рис. 3). Отмечается достоверное снижение высоты соединительнотканых сосочков до $0,011 \pm 0,001$ мм у животных экспериментальной группы против $0,037 \pm 0,003$ мм у крыс контрольной группы ($P < 0,001$). В собственной пластинке десны определяются явления фиброза сосочкового и сетчатого слоя.

Отмечается obturation просвета кровеносных сосудов и капилляров пучками коллагеновых волокон и основного вещества («зарастание» капилляров). В сосочковом слое соединительнотканной пластинки десны определяется большое количество тучных клеток, являющихся ранними предвестниками воспалительной реакции. Локальная гипоксия стимулирует выделение тучными клетками соединительной ткани гистамина и гепарина. В настоящее время участию медиаторов тучных клеток в коррекции гемостаза придается значение. P. Valent и соавт. [40] установили, что вокруг затромбированных участков сосудов скапливается большое количество тучных клеток, секретирую-

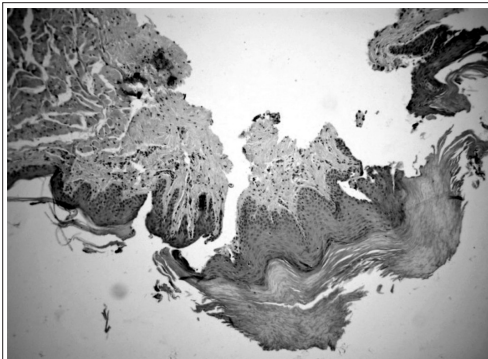


Рис. 1. Десна крысы контрольной группы. Увеличение $\times 100$. Окрашивание – гематоксилин-эозин.

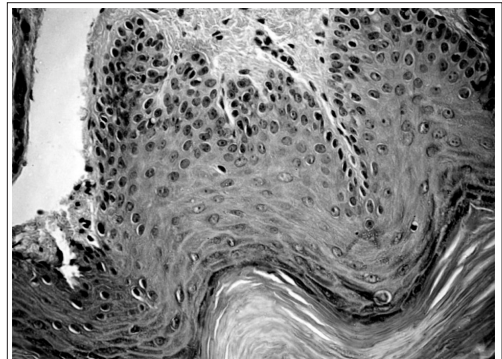


Рис. 2. Десна крысы контрольной группы. Увеличение $\times 200$. Окрашивание – гематоксилин-эозин.

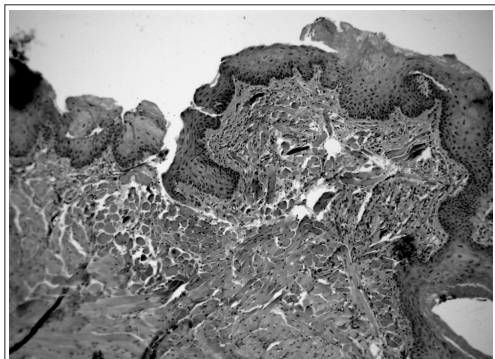


Рис 3. Десна крысы экспериментальной группы. Сглаженность соединительнотканых сосочков десны. Увеличение $\times 200$. Окрашивание – гематоксилин-эозин.

щих медиаторы, способствующие восстановлению кровотока [10].

Эпителиальный слой слизистой оболочки десны истончен до $0,091 \pm 0,001$ мм у животных экспериментальной группы против $0,124 \pm 0,005$ мм у крыс контрольной группы ($P < 0,01$). Истончение эпителия рассматривается как неблагоприятный признак, вследствие которого эпителий и подлежащие ткани подвергаются усиленному воздействию повреждающих веществ и атаке микроорганизмов [1].

Выявленные изменения, происходящие в собственной пластинке десны у экспериментальных животных, являются дистрофическими и связаны с распадом белковых структур вследствие гипоксии. Гипоксия и недостаточность пластического обеспечения с одной стороны, сами по себе приводят к нарушению функционирования тканей, а с другой стороны, способствуют развитию структурных, морфологических изменений (дистрофии, атрофии, склероза).

В то же время в сыворотке крови крыс с гастродуоденитом количество метаболитов оксида азота резко повышалось, также происходило достоверное увеличение количества белка (таблица). Разнонаправленные изменения в тканях десны и сыворотке крови объясняются тем, что при экспериментальном гастродуодените метаболиты оксида азота кумулируются в крупных сосудах кровеносной системы, чтобы обеспечивать адекватное кровоснабжение жизненно важных органов и поддержание гомеостаза [8, 9]. Возрастные концентрации метаболитов оксида азота в крови при гипоксических условиях необходимо для генерации NO и улучшения кровоснабжения тканей [11]. При этом происходит перераспределение стабильных метаболитов оксида азота в тканях, дефицит их содержания в тканях пародонта, что ведет к спазму и тромбозу капилляров, развитию трофической недостаточности в тканях десны.

Первичные дистрофические изменения в собственной пластинке десны обуславливают снижение барьерной функции эпителия к повреждающему действию механических, физических, химических и микробных факторов внешней среды. Знание патогенетических механизмов развития хронического катарального гингивита при сопутствующей гастродуоденальной патологии дает возможность построения рациональных терапевтических мероприятий.

В перспективе планируется изучить действие препаратов-доноров оксида азота на состояние трофической функции соединительнотканной пластинки десны у крыс с экспериментальным гастродуоденитом.

1. Быков В. Л. Функциональная морфология эпителиального барьера слизистой оболочки полости рта / В. Л. Быков // Стоматология. – 1997. – № 3. – С. 12–17.
2. Гоженко А. И. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляции и агрегатного состояния крови / А. И. Гоженко, С. Г. Котюжинская, А. И. Котюжинский // Укр. мед. альманах. – 2000. – Т. 3, № 1. – С. 197–200.
3. Ивашкин В. Т. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока / В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 376 с.
4. Канканян А. П. Стимуляция синтеза оксида азота как возможная протективная функция слюны и ее нарушения при заболеваниях пародонта / А. П. Канканян, С. Э. Акопов // Стоматология. – 1996. – Т. 75, № 3. – С. 19–21.
5. Лазебник Л. Б. Роль оксида азота (NO) в патогенезе некоторых заболеваний органов пищеварения / Л. Б. Лазебник, В. Н. Дроздов, Е. Н. Барышников // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2005. – № 2. – С. 4–11.

6. Лангле Р. П. Атлас заболеваний полости рта : пер. с англ / Р. П. Лангле, К. С. Миллер; под ред. Л. А. Дмитриевой. – [3-е изд.] – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 220 с.
7. Мотавкин П. А. Оксид азота в органах пищеварительной системы / П. А. Мотавкин // Pacific Medical Journal. – 2004. – № 2. – С. 13–17.
8. Реутов В. П. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин, Н. С. Косицын. – М.: Наука, 1998. – 160 с.
9. Реутов В. П. Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина / В. П. Реутов, Я. И. Ажипа, Л. П. Каюшин // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1983. – № 3. – С. 408–418.
10. New aspects in thrombosis research: possible role of mast cells as profibrinolytic and antithrombotic cells / P. Valent, M. Baghestanian, H. C. Bankl [et al.] // Thromb. Haemost. – 2002. – V. 87, № 5. – P. 786–790.
11. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs // Pharmacol. Rev. – 1991. – V. 43, № 1. – P. 109–142.
12. Зак М. Ю. Вплив жовчичних кислот на морфологічний стан шлунка у експериментальних тварин / Зак М. Ю., Мосійчук Л. М., Руденко А. І. // Biomedical and biosocial anthropology. – 2011. – № 16. – С. 56–59.
13. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biosocial fluids / Green L. C., Wagner D. A., J. Glogowski // Analytical Biochemistry. – 1982. – V. 126, № 1. – P. 131–138.
14. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях (инструкция по применению) / А. П. Солодков, И. С. Веремей, С. С. Осорчук [и др.]. – Витебский гос. мед. ун-т, 2011. – 9 с.

О. Г. Романенко, В. Й. Мамчур, А. Е. Левих

Значення оксиду азоту в забезпеченні трофічної функції власної пластинки ясни при експериментальному гастродуоденіті

За умов відтворення хронічного гастродуоденіту в щурів було досліджено вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в крові та гомогенатах слизової оболонки ясен, а також їхній вплив на трофічну функцію сполучнотканинної пластинки ясен. Виявлено, що рівень стабільних метаболітів NO у гомогенатах тканин ясен щурів з гастродуоденітом зменшувався майже в 3 рази ($P < 0,001$) порівняно з показником у групі інтактних тварин, що свідчить про виснаження депо оксиду азоту при захворюванні. Відзначається достовірне зменшення вмісту білка в тканинах ясен у тварин експериментальної групи ($P < 0,05$), що свідчить про переважання катаболічних процесів. Знижується висота сполучнотканинних сосочків ясен до $0,011 \pm 0,001$ мм у тварин експериментальної групи проти $0,037 \pm 0,003$ мм у щурів контрольної групи ($P < 0,001$). У власній пластинці ясен визначаються явища фіброзу сосочкового і сітчастого шару. Відзначається обтурація просвіту кровоносних судин і капілярів пучками колагенових волокон і основної речовини. Подібні явища свідчать про дистрофічні зміни в слизовій оболонці ясен, а поява великої кількості тучних клітин – про включення медіаторів запалення в патологічний процес.

Ключові слова: оксид азоту, гастродуоденіт, трофічна функція

E. G. Romanenko, V. I. Mamchur, A. E. Lievykh

Importance of nitric oxide in ensuring of trophic function of lamina propria of the gum in experimental gastroduodenitis

Under modeling of chronic gastroduodenitis in Wistar rats the levels of nitric oxide stable metabolites in the blood and mucosal homogenates of the gums were examined and their impact on the trophic function of connective plate gums was analyzed. It has been revealed that the level of NO stable metabolites in tissue homogenates of rats with gastroduodenitis decreased almost three times ($p < 0,001$) compared to the group of intact animals, indicating that the depletion of nitric oxide deposit with the disease. There was a significant decrease in the protein content of gingival tissues in animals of the experimental group ($P < 0,05$), indicating the prevalence of catabolic processes in the gum. Reduced height of the connective tissue papillae of the gum $0,011 \pm 0,001$ mm was revealed in animals of the experimental group versus $0,037 \pm 0,003$ mm in rats of the control group ($P < 0,001$). The phenomenon of fibrosis of papillary and reticular layers was determined in the lamina propria gums. Obstruction of the lumen of blood vessels and capillaries by collagen fibers and ground substance was observed. These phenomena indicate degenerative changes in the gum, and the emergence of a large number of mast cells indicates the inclusion of inflammatory mediators in the disease process.

Key words: nitric oxide, gastroduodenitis, trophic function

Поступила: 05.03.2013 г.

Контактное лицо: Романенко Елена Григорьевна, кандидат медицинских наук, ассистент, кафедра детской стоматологии, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины». Тел.: +38 0 562 27 89 88. Электронная почта: helenromanenko@mail.ru