УДК 612.826.33–07:616.311.2–092.9

Г.І. ХОДОРОВСЬКИЙ, Р.Р. ДМИТРЕНКО, О.В. ЯСІНСЬКА, І.Д. ШКРОБАНЕЦЬ
Буковинський державний медичний університет, м.Чернівці

Вплив пінеальної залози на біомаркери функціонального стану тканин ясен статевонезрілих самців щурів

Ясна (гінгіва), як частина пародонта, забезпечують щільне прикривання внутрішнього перидонтального простору і є першою лінією захисту гомеостазу пародонта [10]. Саме з цих міркувань структурний і функціональний стан тканин ясен заслуговує на першочергову увагу і вивчення. Незважаючи на значну кількість експериментальних і клінічних досліджень, проблема захворювань пародонта залишається надзвичайно актуальною для вітчизняної і світової стоматології [3, 6, 16].

Ми виділили дві групи факторів, що впливають на гомеостаз пародонта: ті, що діють на ясна з боку ротової порожнини (локальні), й ті, що є чинниками гомеостазу організменого рівня (системні, загальні) [10]. Серед останніх особливе місце посідають гормони (естрогени, глюкокортикоїди, тестостерон) [1, 13, 14]. Водночас у літературі відсутні відомості щодо ролі епіфіза (пінеальної залози) у функціях ясен, зокрема і пародонта, хоча відомо, що довжина фотоперіоду – основного часового інтегратора фізіологічних систем організму – перетворюється в зміну циркулюючого рівня пінеального гормону – мелатоніну [4]. Саме це спонукало нас дослідити вплив епіфіза на деякі показники (біомаркери) функціонального стану тканин ясен.

Мета дослідження – з'ясувати вплив пригнічення ("фізіологічна" епіфізектомія шляхом постійного освітлення тварин) та підвищення (тривале утримання тварин в умовах постійної темряви) функції епіфіза на функціональний стан тканин ясен.

Матеріали та методи дослідження. Досліджували 26 білих лабораторних безпородних щурів-самців статевонезрілого віку. Зміну активності пінеальної залози моделювали впродовж 14 діб шляхом утримання тварин за умов трьох режимів освітлення: природного (інтактні щури); постійного цілодобового освітлення інтенсивністю 500 лк (стан "фізіологічної" пінеалектомії); постійної цілодобової повної темряви (стан підвищеної функціональної активності пінеальної залози).

Тканини ясен одразу після декапітації щурів забирали на холоді та гомогенізували наважки в 1,2 мл охолодженого трис-буферу. Гомогенат використовували для визначення біомаркерів стану тканин ясен: прооксидантних (ПО) показників пероксидного окиснення ліпідів – (ПОЛ) малонового діальдегіду та дієнових кон'югат [9] і активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази) [7, 11]. Стан антиоксидантної системи (АО) у тканинах ясен визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД) та каталази. Оцінювали показник співвідношення активностей СОД та каталази (СОД/КТ), зміни якого можуть свідчити про внутрішній дисбаланс ферментативної антиоксидантної системи та зниження загального антиоксидантного потенціалу органа чи організму в цілому [12]. Оцінювали прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз ясен за інтегральним показником АО/ПО співвідношення сумарної антиоксидантної активності ферментів СОД та каталази (АО) та сумарного вмісту продуктів ПОЛ (ПО). Показник АО/ПО розраховували за формулою: АО/ПО=(СОД+КТ)/(ДК+МА), де СОД – абсолютні цифри активності СОД, од/хв • мг білка; КТ – абсолютні цифри активності каталази, мкмоль/хв • мг білка; ДК – абсолютні цифри вмісту ДК, нмоль/мг білка; МА – абсолютні цифри вмісту МА, нмоль/мг • білка.

© Ходоровський Г.І., Дмитренко Р.Р., Ясінська О.В., Шкробанець І.Д., 2013

Продукти окисно-модифікованих білків (ПОБ) визначали за реакцією 2,4-динітрофенілгідразоном і реєстрували при 370 нм (нейтрального характеру) та при 430 нм основного характеру [8].

Статистичну обробку результатів здійснювали за методом варіаційної статистики з використанням критерію *t* Стьюдента.

Експерименти проводили, дотримуючись Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Результати досліджень та їх обговорення. Перш за все привертають увагу відмінності у значеннях досліджуваних показників (біомаркерів) у плазмі крові і тканинах ясен як в інтактних тварин (природне освітлення), так і в тих, що перебували в умовах постійного 14-денного освітлення або темряви (див. таблицю).

Біомаркери функціонального стану тканин ясен і плазми крові за умов постійного освітлення чи темряви статевонезрілих самців щурів (*M*±*m*)

Умови досліду	ДК, нмоль/мг білка	МДА, нмоль/мг білка	СОД, од/хв · мг білка	КТ, мкмоль/хв · мг білка	ПОБ-370, нм×ммоль/г білка	ПОБ-430, нм×о.о.г./г білка
Тканини ясен						
Інтактні *n*=8	0,343 ± 0,017	0,243 ± 0,016	15,689 ± 0,713	7,145 ± 0,200	0,410 ± 0,015	4,007 ± 0,074
Постійне освітлення *n*=10	0,399 ± 0,015	0,236 ± 0,006	9,457* ± 0,453	4,454* ± 0,229	0,359* ± 0,010	3,438* ± 0,175
Постійна темрява *n*=8	0,464* ± 0,007	0,359* ± 0,005	17,045* ± 0,367	6,004* ± 0,154	0,312* ± 0,016	2,942* ± 0,123
Плазма крові						
Інтактні *n*=8	0,786 ± 0,012	0,239 ± 0,003	6,906 ± 0,074	1,744 ± 0,026	1,695 ± 0,032	17,095 ± 0,220
Постійне освітлення *n*=10	0,882* ± 0,009	0,258* ± 0,005	7,442* ± 0,076	1,595* ± 0,015	1,656 ± 0,023	16,686 ± 0,372
Постійна темрява *n*=8	1,238* ± 0,005	0,508* ± 0,009	3,749* ± 0,117	2,161* ± 0,022	3,469* ± 0,0567	34,952* ± 0,699

Примітка: * – вірогідно щодо групи контролю – «природне освітлення, нормоксія» ($p<0,05$).

У інтактних тварин активність антиоксидантних ферментів (СОД і каталази) у тканинах ясен була значно вищою, ніж у плазмі крові: СОД в 2,3 разу, каталази – в 4 рази. Відповідно АО/ПО індекс у тканинах ясен перевищував аналогічний показник у плазмі крові в 4,7 разу. Ці дані можна оцінити як наявність у тканинах ясен добре вираженої антиоксидантної системи захисту, яка потужніша, ніж на системному (організменному) рівні. Певною мірою про це свідчить інтенсивність окисно-модифікованих білків (ОМБ). Сумарний рівень ОМБ у плазмі крові в 4,25 разу вищий, ніж у тканинах ясен. Відомо, що накопичення (рівень) окисненого білка є критерієм пошкодження клітинних мембран активними формами кисню (АФК) [2].

Отже, уже в інтактних тварин перебіг вільнорадикальних реакцій у тканинах ясен менш виражений і краще контролюється, ніж на рівні організму (плазма крові), відповідно, функціонування антиоксидантного захисту в яснах ефективніше, ніж в організмі загалом. Відмінності системного й органного (надниркові залози) реагування пероксидного окиснення білків спостерігали й інші автори [12].

Зміни тривалості світлового режиму утримання піддослідних тварин суттєво вплинули на характер відповіді тканин ясен і плазми крові тварин, зокрема вільнорадикальних реакцій та системи антиоксидантного захисту. У тварин, які перебували в умовах постійного світла впродовж 14 діб, порівняно з інтактними, в яснах дещо збільшився вміст ДК, різко знизилася активність СОД (на 39,7%), каталази (на 37,6%) і відповідно зменшився індекс АО/ПО (44,9%) (рис. 1). За цей час вміст окисно-модифікованих білків не зазнавав суттєвих змін.

У цих же тварин зазначені біомаркери у плазмі крові порівняно з інтактними тваринами змінилися іншим чином. Зокрема, збільшився на 12,2% вміст ДК і на 7,9% одного з кінцевих продуктів ПОЛ МДА, практично не зазнали змін активність СОД, каталаза, вміст ОМБ і індекс АО/ПО.

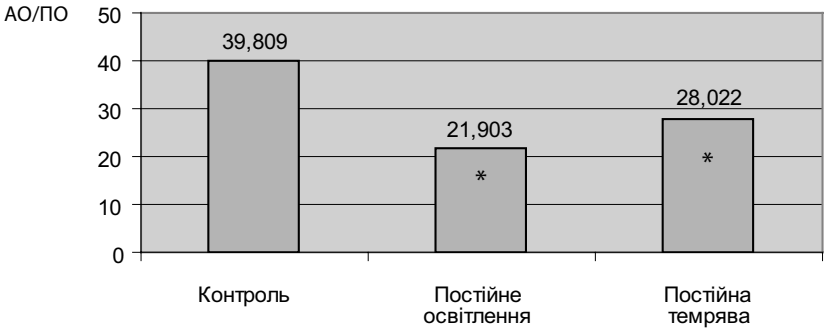

Рис. 1 Антиоксидантно-прооксидантний індекс (АО/ПО) тканин ясен статевонезрілих самців щурів за умов постійного освітлення або постійної темряви (* – вірогідно щодо групи контролю, – природне освітлення, нормоксія (p<0,05))

Аналіз даних цього фрагменту нашого дослідження дає змогу стверджувати, що під впливом тривалого (14 діб) освітлення тіла тварини в тканинах ясен страждає система антиоксидантного захисту, тоді як на організменому рівні посилюються процеси вільнорадикального окиснення ліпідів і система захисту не зазнає особливих змін. Такий різний характер реагування тканин ясен і плазми крові на пригнічену ("фізіологічна" епіфізектомія) тривалим освітленням функцію епіфіза свідчить про особливу роль цієї ендокринної залози у функціонуванні тканин ясен.

Відомо, що фотоперіод (тривалість світлової частини доби) є визначальним фактором циркулюючого рівня основного пінеального гормона – мелатоніна, який поряд з іншими функціями здійснює антистресовий і антиоксидантний захист організму [4]. Сьогодні вчені виокремлюють цілу мелатонінергічну систему, компоненти якої використовуються організмом для пристосування до несприятливих факторів навколишнього середовища [16].

В умовах нашого дослідження пригнічення мелатонінпродукуючої функції епіфіза могло бути причиною зниження активності антиоксидантних ферментів (СОД і каталази) і зменшення індексу АО/ПО. Отже, можна вважати, що мелатонінергічна система причетна до перебігу стану про- і антиоксидантних процесів у тканинах ясен.

Для підтвердження такого припущення була проведена ще одна серія експериментів з утриманням тварин у цілодобовій темряві впродовж 14 діб.

У тканинах ясен високий рівень функції пінеальної залози за умов тривалого утримання тварин у темряві призвів до посилення процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та накопичення молекулярних продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Зокрема, збільшився вміст ДК (на 35,3%) і особливо вміст кінцевого продукту ПОЛ-МДА на 47,7%. Водночас посилилася інтенсивність функціонування системи антиоксидантного захисту. Зокрема, активність СОД була вищою за контроль на 8,6%, каталази залишалася такою ж, як у контрольних тварин. Чітко проявилося зменшення сумарного рівня ОМБ на 25,2%

порівняно з інтактними тваринами, що свідчить про зниження перебігу вільнорадикальних реакцій. Прооксидантно-антиоксидантна рівновага в умовах темряви була позитивною, з переважанням антиоксидантних компонентів над прооксидантними (індекс АО/ПО – 28,022). Абсолютна величина індексу АО/ПО значно перевищувала величину цього індексу в тканинах ясен тварин, які були під дією 14-добового освітлення (індекс АО/ПО – 21,903).

Привертає увагу те, що в умовах темряви реакція біомаркерів стану тканини ясен була складнішою, ніж за умови тривалого освітлення. Темрява призводила до посилення у тканинах ясен процесів ПОЛ, ОМБ тільки основного характеру з одночасним підвищенням антиоксидантного захисту, причому тільки за рахунок СОД (рис. 2). Таку складну картину реагування досліджуваних нами маркерів міг створити мелатонін, для якого темрява є потужним стимулом утворення та секреції і який володіє антиоксидантною властивістю [5]. Його наявність у крові внесла, очевидно, певну корекцію в систему антиоксидантного захисту в яснах. Унаслідок цього в умовах темряви не відбулося очікуваного тотального зниження прооксидантних і підвищення антиоксидантних процесів. Тому заслуговують на увагу дані, які свідчать, що інтенсивність білкової пероксидації в корі великих півкуль мозку під впливом мелатоніну зменшувалася тільки за умови звичайного освітлення, а при порушенні звичайної фотоперіодичності, тобто при постійному тривалому освітленні або темряві, рівень ОМБ залишався високим. При цьому в темряві було зареєстровано навіть підвищення вмісту ОМБ [4].

Зазначені в тканинах ясен процеси певною мірою були синхронними щодо тих, які відбувалися в плазмі крові, але були більш вираженими як за вмістом, так і за активністю досліджуваних нами біомаркерів. Ще одна відмінність полягає в тому, що в плазмі в антиоксидантній системі провідною була каталаза, а в тканинах ясен – СОД. Також заслуговує на увагу той факт, що в плазмі крові в умовах тривалої темряви підвищився вміст ОМБ як нейтрального, так і основного характеру, а в тканинах ясен тільки основного.

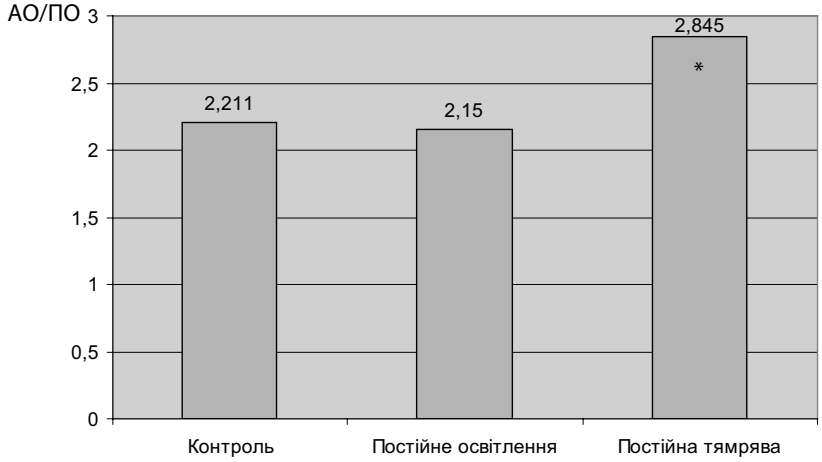

Рис. 2. Співвідношення СОД і каталази в тканинах ясен статевонезрілих самців щурів (* – вірогідно щодо групи контролю – природне освітлення, нормоксія (p<0,05))

Ці факти свідчать, що перебіг вільнорадикальних реакцій і функціонування системи антиоксидантного захисту слід оцінювати не за сумарним потенціалом таких реакцій і такого захисту, а за окремими складовими. Це важливо з огляду на те, що у працях останніх років наведені дані загальної антиоксидантної оцінки сироватки крові, слини і рідини ясенної щілини, зроблені за хемолюмінісцентною методикою [15].

Висновки. Зміна функції епіфіза статевонезрілих самців щурів шляхом утримання тварин в умовах тривалого освітлення ("фізіологічна" епіфізектомія) або темряви (стимуляція продукції мелатоніну) суттєво позначається на процесах вільнорадикального окиснення ліпідів і білків у тканинах ясен і плазмі крові. У інтактних тварин перебіг вільнорадикальних реакцій у тканинах ясен менш виражений і краще контролюється, ніж на рівні організму. Відповідно, функціонування антиоксидантного захисту в яснах ефективніше, ніж в організмі загалом.

Тривале (14 діб) освітлення ("фізіологічна" епіфізектомія) суттєво знижує активність системи антиоксидантного захисту в тканинах ясен. Тривале (14 діб) перебування тварин у темряві (стимуляція продукування мелатоніну епіфізом) призводить до складнішої реакції біомаркерів, ніж за умови освітлення. Темрява посилює у тканинах ясен перебіг процесів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків з одночасною активізацією антиоксидантного захисту переважно за рахунок супероксиддисмутази. Вірогідно, таку складну картину реагування біомаркерів міг створити мелатонін, який має антиоксидантну здатність. Зміна тривалості фотоперіоду порушує стан прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в тканинах ясен, що свідчить про причетність епіфізу до контролю функціонального стану тканин ясен.

Надалі будемо досліджувати роль епіфіза у про- і антиоксидантних процесах у тканинах ясен самок.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Білоклицька Г.Ф.* Структура захворювань тканин пародонта у жінок з фізіологічною та хірургічною менопаузою, ускладненою посткастраційним синдромом / Г.Ф. Білоклицька, Г.В. Погребняк // Галицький лікарський вісник. – 2004, Т. 11, № 1. – С. 133–136. 2. *Годованець Ю.Д.* Адаптація новонароджених дітей: функціональний стан гепатобіліарної системи в нормі та при перинатальній патології / Ю.Д. Годованець, Є.Є. Шунько. – Чернівці: БДМУ, 2007. – 320 с. 3. *Дмитренко Р.Р.* Інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів і білків на активність антиоксидантної системи тканин ясен статевонезрілих щурів за умови гіпобаричної гіпоксії / Р.Р. Дмитренко // Вісн. морфології. – 2012. – Т. 18, № 1. – С. 11–114. 4. *Заморский И.И.* Участие мелатонинэргической системы организма в механизмах немедленной адаптации к острой гипоксии / И.И. Заморский // Клін. та експерим. патол. – 2012. – Т. XI, № 3 (41), Ч. 1. – С. 74–76. 5. *Заморський І.І.* Вплив мелатоніну та епіталаміну на активність маркерних ферментів плазматичних мембран клітин переднього мозку щурів за умов гострої гіпоксії / І.І. Заморський, В.П. Пішак, .Ф. Мещишен // Укр. біохім. журн. – 1999. – Т. 71, № 6. – С. 33–36. 6. *Левицький А.П.* Порівняльна ефективність застосування яєчного лізоциму та фітолізоциму при лікуванні експериментального пародонтиту / А.П. Левицький, А.І. Фурдичко // Вісн. стоматології. – 2012. – № 1 (78). – С. 2–4. 7. *Королюк М.А.* Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова и др. // Лаб. дело. – 1988. – № 1.– С. 16–18. 8. *Мещишен І.Ф.* Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові / І.Ф. Мещишен // Бук. мед. вісн. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 156–158. 9. *Стальная И.Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Совр. методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68. 10. *Ходоровський Г.І.* Сучасні аспекти досліджень фізіологічної резистентності тканин ясен / Г.І. Ходоровський, Р.Р. Дмитренко, О.В. Ясінська // Клін. та експерим. патол. – 2012. – Т. XI, № 3 (41), Ч. 1. – С. 172–176. 11. *Чевари С.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11.– С. 678–681. 12. *Ясінська О.В.* Особливості системного й органного реагування пероксидного окиснення білків на дію гіпобаричної гіпоксії та різної довжини фотоперіоду у статевонезрілих самців щурів // Biomedical&Biological Anthropology. – 2006. – № 6. – С. 3–5. 13. *Cirillo N.* Characterization of a novel oral glucocorticoid system and its possible role in disease // N. Cirillo, Y. Hassonal, M. Pignatelli // J. Dent. Res. 2012, 91. – P. 97–103. 14. *Güncü G.* Effects of endogenous sex hormones on the periodontium – Review of literature / G. Güncü, T. Tözüm, F. Çaglayan // Australian Dental Journal. – 2005. – № 50 (3). – P. 138–145. 15. *Kawamoto A.* Relationship between salivary antioxidant capacity and phases of the menstrual cycle / A. Kawamoto, N. Sugano, M. Motohashi et.al // Journal of Periodontal Research. – 2013. – Vol. 47, № 47, Issue 5. – P. 593–598. 16. *Marinho Del.* Santo Periodontium and orthodontic implications: Biological basics // International Journal of Stomatological research. – 2012; – № 1 (2). – P. 6–16. 17. *Pevet P.* The melatoninergic system / P. Pevet Encephale. – 2006. – Vol. 32, № 5, Pt. 2. – S. 826–833.

Стаття надійшла до редколегії 10.08.13

ВЛИЯНИЕ ПИНЕАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА БИОМАРКЕРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ ДЕСЕН НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС

Г.И. ХОДОРОВСКИЙ, Р.Р. ДМИТРЕНКО, Е.В. ЯСИНСКАЯ, И.Д. ШКРОБАНЕЦ

Буковинский государственный медицинский университет, г.Черновцы

Гормоны влияют на основные процессы развития, функции органов и тканей ротовой полости. Роль гормонов пинеальной железы в этих процессах неизвестна.

На белых нелинейных крысах-самцах неполовозрелого возраста установлено, что 14-дневное пребывание животных в условиях постоянной освещенности ("физиологическая" эпифизэктомия) существенно снижает активность системы антиоксидантной защиты СОД и каталазы в тканях десен; такой же длительности пребывание в условиях постоянной темноты (стимуляция продуцирования мелатонина эпифизом) усиливает в тканях десен течение перекисного окисления липидов и белков с одновременной активацией антиоксидантных ферментов, в основном, супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: ткани десен, перекисное окисление липидов и белков, антиоксидантные ферменты, эпифиз.

EFFECTS OF THE PINEAL GLAND ON THE BIOMARKERS OF FUNCTIONAL STATE OF GINDIVAL AREA IN THE IMMATURE MALE ALBINO RATS

G. KHODOROVSKYI, R. DMITRENKO, O. YASINSKA, I. SHKROBANETC

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi

Hormones have potent effects on the major determinants of the developments and functions of oral cavity organs and tissues including gingiva. They can influence the peridontium at different life time. At puberty increased gingival inflammation was positively correlated with an increase in blood estradiol and progesterone, significant gingival inflammatory changes have been registered in association with the menstrual cycle, bleeding and swollen gingival occur during menstruation, pregnancy gingivitis is extremely common. Peridontal glucocorticoid system and its possible role in the periodontum deseases are described, testosterone receptors are found in periodontal tissues and results showed that testosterone may have anti-inflammatory effects on the periodontum.

Role of pineal gland-hormone – melatonin in the mentioned processes is not known. In this study we explore the relationship between biomarkers of functional state of gingival tissues and pineal gland functions.

The study experimental group consisted of 26 immature noneline male albino rats (one month old). Rats were assigned into one of the following groups in accordans with experimental conditions: 1) control-natural daylinght, 2) illumination (photophase), 3) darkness (scotophase). Rats were under these conditions for 14 days. There were measured lipids and proteins peroxidation processes (diene conjugates of polyunsaturated fatty acids and malone dialdehyde) and antioxidative enzymes (superoxide dismutase -SOD, catalase-Cat) in the gingival tissues and blood plasma.

Our findings showed that in the intact immature male rats the free radical reactions in the tissues of gingival area less pronounced and better controlled in comparison with systemic level- in the blood plasma. It suggests that the antioxidant system at the level of gingival area are more effective than at the whole body level.

The study showed in the gingival tissues statistically significant decreased enzymes (SOD, Cat) activity after illumination ("physiologic" pinealectomy) for 14 days and intensification of lipids and proteins peroxidation with a simultaneous increase activity of antioxidant enzymes, mainly SOD, after darkness (stimulation of melatonin production by the pineal body) for 14 days.

Pro- and antioxidative biomarkers in the gingival area respond to the functional state of the pineal body. Further investigation is still necessary to prove our findings on the female animals. Our results suggest that in the process of assessment of antioxidant activity of an organ or the whole body concrete antioxidant enzymes but not total antioxidant capacity should be taken into account.

Key words: gingival tissues, prooxidant processes, antioxidant enzymes, photoperiod, pineal gland.