

ПРИЧИНИ ТА РІВЕНЬ НАКОПИЧЕННЯ ОСМІЮ У ТКАНИНАХ ЯСЕН ЩУРІВ НА МЕТАБОЛІЧНІЙ МОДЕЛІ ПАРОДОНТИТУ: МОРФОЛОГІЧНА ТА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНА ОЦІНКА

О.Й. Кордіяк¹, М.В. Ридчук²

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Кафедра нормальної анатомії (зав. - проф. Ю.Я. Кривко)

² Львівський національний університет імені Івана Франка

Кафедра аналітичної хімії (зав. - проф. Я.М. Каличак)

Реферат

Мета роботи - визначити важкість ушкодження та ступінь відновлення мембранних структур при медикаментній корекції пародонтиту в експерименті за морфологічними та спектрофотометричними показниками рівня накопичення осмію у тканинах пародонту щурів.

Матеріал і методи

Експериментальне дослідження провели на 36 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях I (контрольної) і двох дослідних груп (по 12 тварин у кожній): II - із нелікованим пародонтитом, змодельованим шляхом введення впродовж 30 діб 0,04% розчину амонію хлориду і III - після медикаментної корекції пародонтиту 5% розчином мельдонію дигідрату (дом'язово) у поєднанні із гліцерофосфатом кальцію (per/os). Після виведення тварин із експерименту зафіксовані зрізи тканин пародонту переглядали в електронному трансмісійному мікроскопі TEM-100 і фотографували за допомогою цифрової камери SONY-H9 при збільшенні 4000-6000. Визначали вміст осмію у наборах фіксаторів і зафіксованих тканинах пародонту щурів спектрофотометричним методом з кислотними моноазобарвниками (тропеолін О, тропеолін ООО-І, тропеолін ООО-ІІ, оранжевий Ж).

Результати й обговорення

Інтерстиційний набряк призвів до розширення навколосудинного простору, вакуолізації та надмірної гідратації ендотеліоцитів з ознаками деструкційних змін - до значного звуження просвіту кровоносних капілярів пародонту тварин II групи. У тварин III групи у пародонті переважали ендотеліоцити звичайної будови та розмірів, що вказує на відновлення синтетичних функцій цих клітин. Не виявлено суттєвих розбіжностей результатів спектрофотометричних вимірювань вмісту осмію, відповідно - у фіксаторах і зафіксованих тканинах пародонту щурів для різних реактивів. Натомість, тканини ясен щурів III групи поглинули більшу кількість осмію, ніж контрольної групи ($8,6 \pm 0,3$ мг проти $7,4 \pm 0,2$ мг), але менше, ніж II групи ($11,2 \pm 0,4$ мг), у залишках фіксаторів, відповідно - $5,5 \pm 0,2$ мг/мл проти $14,2 \pm 0,3$ мг/мл і $3,1 \pm 0,1$ мг/мл, зі статистично вірогідними відмінностями ($p < 0,05$).

Висновок

Рівень накопичення і характер розподілу осмію засвідчив відновлення структури та білково-ліпідного складу клітинних мембран тканин пародонту щурів III групи.

Ключові слова: тканини пародонту щурів, модель пародонтиту, медикаментна корекція, мембранні структури, білково-ліпідний склад

Abstract

CAUSES AND LEVELS OF OSMIUM ACCUMULATION IN RAT GUM TISSUE IN A METABOLIC MODEL OF PERIODONTITIS: MORPHOLOGICAL AND SPECTROPHOTOMETRIC ASSESSMENTS

O.J. KORDIYAK¹, M.V. RYDCHUK²

¹ The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

² The Ivan Franko National University in Lviv

Aim: To determine the severity of injury and degree of membrane structure recovery in the pharmacological therapy of periodontitis in an experiment using morphological and spectrophotometric indicators of osmium accumulation in the periodontal tissues of rats.

Methods: An experimental study was conducted in 36 white mature male nonlinear rats, with a control group and two experimental groups (12 animals in each). One experimental group had untreated periodontitis, modelled by introducing 0.04% ammonium chloride solution within 30 days, while the other experimental group underwent pharmacological correction of periodontitis by 5% meldonium dihydrate solution (intramuscular) combined with oral calcium glycerophosphate. After the animals were sacrificed, periodontal tissue sections were fixed and viewed using transmission electron microscopy and photographed with a digital camera at 4000 - 6000 x magnification. Osmium concentrations in sets of fixing solutions and fixed periodontal tissues were defined by the spectrophotometric method with acidic monoazostains (Tropeoline O, Tropeoline OOO-I, Tropeoline OOO- II, Orange F).

Results: Interstitial swelling led to the expansion of the pericapillary space and vacuolization and excessive hydration of endotheliocytes with signs of destructive changes, with a significant narrowing of the periodontal blood capillary clearance in the untreated periodontitis group animals. In the treated periodontitis group animals, endothelial cells with normal structure and size prevailed, suggesting the recovery of cell synthesis. There was no substantial discrepancy in spectrophotometric osmium content measurements results in the fixing solutions and the fixed periodontal tissues of the rats with various reagents. However, the gingival tissue of the treated periodontitis group absorbed more osmium than the control group (8.6 ± 0.3 mg vs. 7.4 ± 0.2 mg), but less than the untreated periodontitis group (11.2 ± 0.4 mg). In the fixing solution

residues, osmium concentrations were 5.5 ± 0.2 mg/mL vs. 14.2 ± 0.3 mg/mL and 3.1 ± 0.1 mg/mL, and the differences were significant ($p < 0.05$).

Conclusion: The osmium levels and the mode of distribution showed recovery of periodontal cell membrane structure and protein-lipid composition in the rats in the treated periodontitis group.

Key words: rat periodontal tissues, model of periodontitis, pharmacological correction, membrane structure, protein-lipid composition

Вступ

За сучасними науковими поглядами, розвиток багатьох патологічних станів організму людини зумовлений структурно-функціональними порушеннями клітинних та субклітинних мембран [1, 4, 9]. Для всебічного вивчення властивостей біологічних мембран визначальними є фізично-хімічні дослідження їх структурної основи - біомолекулярних (подвійних) ліпідних шарів мембран клітин і органел, що підтримують стабільність їх молекулярної організації і є найбільш чутливими до дії різноманітних патогенних чинників [2].

Так, зокрема, для забезпечення високої вторинної електронної емісії й посилення контрасту забарвлення, як ліпідний барвник при оптичній, трансмісійній і сканувальній електронній мікроскопії застосовують осмію тетроксид (ОТ), особливості взаємодії якого з ненасиченими жирними кислотами при фіксації тканин вперше відзначив R. Altman (1894), згодом детально описали V.B. Wigglesworth (1957), O. Hess (1959), W. Stoeckenius (1960), V.C. Riemersma (1963) [6, 8, 11].

Отже, порівняльну оцінку рівня накопичення осмію у тканинах ясен при різних умовах експерименту вважаємо актуальною, що спрямована, як і, наприклад - ультраструктурні дослідження біопатів ясен [3, 4] та мікроциркуляційного русла [5] - не лише на розкриття основних ланок патоморфогенезу різноманітних порушень мембранних систем організму при запально-дистрофічних процесах, але й на обґрунтування вибору раціональних методів медикаментної корекції.

Мета - визначити важкість ушкодження та ступінь відновлення мембранних структур тканин пародонта при медикаментній корекції пародонтиту в експерименті за морфологічними та спектрофотометричними показниками рівня накопичення осмію у цих тканинах щурів.

Матеріал і методи

Експериментальне дослідження провели на 36 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях (віком 2-4 міс, середня маса 210 ± 16 г), яких утримували у стандартних умовах віварію. До I (контрольної) групи увійшли 12 інтактних щурів, які під час експерименту перебували на стандартному раціоні віварію. Для відтворення метаболічної моделі пародонтиту 24 щурам впродовж 30 дів per/os вводили 0,04% розчину амонію хлориду, із розрахунку 4 мг на 1 кг маси тіла. У ході експерименту 12 щурів з нелікованим пародонтитом склали II (дослідну) групу. У інших 12 тварин, що увійшли до III (дослідної) групи, з 31 доби експерименту впродовж 14 дів щоденно проводили фармакотерапевтичну корекцію шляхом дом'язового введення 5%-го розчину мельдонію дигідрату (препарат "Вазонат", виробництво Олайнфарм, Латвія), із розрахунку 0,25 мг на 1 кг маси тіла щура, у поєднанні із препаратом гліцерофосфатом кальцію (виробник ВАТ "Луганський хіміко-фармацевтичний завод") (per/os), із розрахунку 0,13 мг на 1 кг маси тіла.

Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом через 30 дів від початку експерименту, виділяли блоки нижніх щелеп із зубами у всіх групах. Зразки тканин пародонту розміром 1×3 мм впродовж 2 год. фіксували на холоді в 1,5% розчині ОТ у 0,2 М какодилатному буферному розчині (pH - 7,2), у якому їх тричі промивали і зневоднювали в етиловому спирті зростаючих концентрацій (50%, 70%, 90% і абсолютній). Потім зразки проводили через окис пропілену і оправляли епоксидною смолою Епон - 812, полімеризацію якої проводили у термостаті при 600°C впродовж 2 дів. Зрізи готували на ультрамікромі УМТП - 6М за допомогою алмазного ножа (DIATOM) й переглядали в електронному трансмісійному мікроскопі ТЕМ - 100 з прискорувальною напругою 75 кВ у центральній науково-дослідній лабораторії електронної мікроскопії ЛНУ імені Івана Франка. Досліджувані зразки фотографували за допомогою цифрової камери SONY-H9 при збільшенні 4000-6000.

Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших нау-

кових цілей" (Страсбург, 1985), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), згідно з "Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин" (2007).

Вміст осмію у наборі фіксуючої рідини, використаних фіксаторів й оброблених фіксатором тканинах пародонту щурів визначали за кількісними спектрофотометричними методами з кислотними моноазобарвниками тропеоліном О (TrO), тропеоліном ООО-І (TrОООІ), тропеоліном ООО-ІІ (TrОООІІ) та оранжевим Ж (ОЖ) [10, 12], водні розчини яких готували з відповідних реактивів фірми "Синбіас" (Україна) та Шосткінського заводу хімреактивів (Україна). Вимірювання рН проведено за допомогою приладу рН-150М (Білорусь) зі скляним електродом у діапазоні рН 1-14 із використанням розведених розчинів хлорної кислоти і натрію гідроксиду.

Спектри в ультрафіолетовому і видимому світловому діапазонах вимірювали на скануючому спектрофотометрі CARY WIN - UV-VIS-50, Varian (США) (спектральний діапазон 190-800 нм), спектрофотометрі UV-VIS SPECORD M40, Carl Zeiss Jena (Німеччина) (спектральний діапазон 190-1100 нм) і фотометрі КФК-2 МПІ, Загорський механічно-оптичний завод (Росія) (спектральний діапазон 315-980 нм) при температурі 20°C.

Рівень накопичення осмію визначали також непрямим вольтамперометричним способом [10] із використанням цифрового осцилополярографа ПО-5122 модель 03 (Росія) в триелектродній комірці. Ртутний крапельний електрод, платиновий електрод і насичений каломельний електрод були, відповідно, вимірювальним, допоміжним і електродом порівняння.

Статистичну оцінку вірогідності різниці середніх значень за результатами парних спостережень проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати й обговорення

Завдання цієї праці ґрунтувалися на положеннях відомої гіпотези про те, що одним із механізмів виникнення і перебігу генералізованого пародонтиту є надмірне активування перекисного окиснення ліпідів, а продукти пероксидації яких здатні пошкоджувати мембрани і спричиняти по-

рушення обміну речовин у тканинах пародонту [4]. Отже, із врахуванням тропності сполук осмію до ліпопротеїдів клітинних мембран, ультраморфологічні дослідження й були спрямовані на визначення стану мембранних систем тканин пародонту щурів І (контрольної), ІІ і ІІІ дослідних груп на метаболічній моделі пародонтиту.

На рис. 1 зображено фрагмент стінки венули, у просвіті якої розміщується еритроцит та елементи плазми. Проміжки між ендотеліоцитами стінки мікросудини вузькі, заповнені електроннощільними ділянками облітерації. Цитоплазматичний матрикс - однорідної консистенції, середньої електронної щільності, містить тонкі трубочки гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, помірну кількість мікропіноцитних везикул, а також поодинокі мітохондрії зі збереженими кристами. Базальна мембрана ендотеліоцитів - тонка, однорідної щільності. Стінка мікросудини містить також гладком'язові клітини звичайної ультраструктури, у цитоплазмі яких помітні численні мітохондрії.

Інтерстиційний набряк призвів до розширення навколокапілярного простору, а збільшення об'єму ендотеліоцитів внаслідок вакуолізації та надмірної гідратації - до значного звуження просвіту кровоносних капілярів пародонту тварин ІІ (дослідної) групи (рис. 2). На деструкційні зміни ендотеліоцитів вказують неправильна форма ядер, із ущільненим по периферії хроматином, розширені цистерни ендомембранної системи клітин - ендоплазматичного ретикулуму, а також набряклі, позбавлені крист мітохондрії.

На окремих ділянках препаратів у тварин

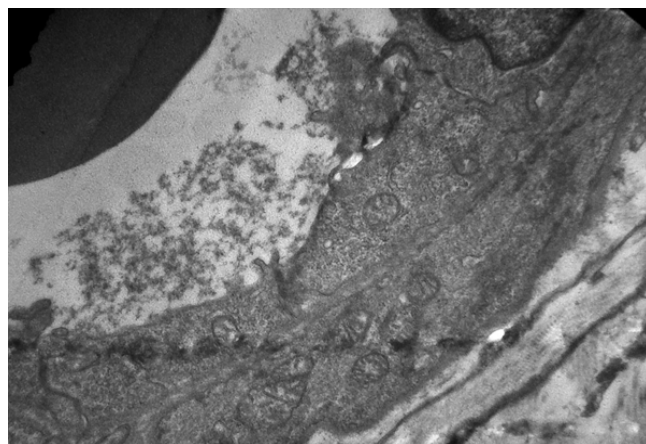


Рис. 1
Фрагмент венули ясен щура І (контрольної) групи.
36. x 6000

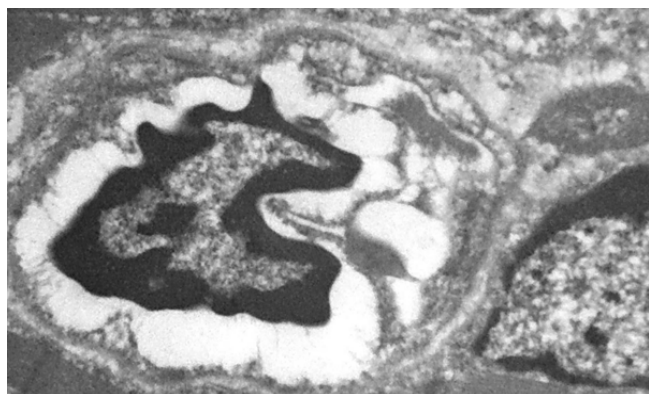


Рис. 2

Кровоносний капіляр ясен щура II (дослідної) групи.
Зб. х 4000

цієї групи базальна мембрана ендотеліоцитів потовщена, оточена осмієфільним некротичним детритом. Відомо, що основу молекулярної структури мембранних систем тканин складають ліпоїдні сполуки - фосфоліпіди (фосфатиди), які у взаємодії із білками забезпечують вибіркиму проникність мембран для різноманітних речовин [2]. Як зазначили F. Di Scipio et al. [7], D. Studer et al. [11], потемніння гістологічних матеріалів відбувається завдяки накопиченню осаду ОТ (продукту відновлення та гідролізу моно- або ди-естерів осмію) саме у гідрофільних ділянках карбоксильних груп, а також етиленових подвійних зв'язків поліненасичених ланцюгах жирних кислот фосфоліпідних головок ліпопротеїнів.

Про гідропічну дистрофію гладком'язових клітин за умов експериментального пародонтиту свідчили вакуолізовані мітохондрії та поодинокі дрібні вторинні лізосоми у цитоплазмі, а ознаками часткової фрагментації актинових волокон, пов'язаної із окисненням сірковмісних амінокислот при застосуванні ОТ для фіксації тканин [7] - розрідження (розпушення) окремих міофіламентів. Характерними ультраструктурними виявами збільшення проникності судинної стінки є розширення міжклітинних проміжків, а також наявність численних мікропіноцитозних везикул.

На рис. 3. представлено фрагмент вени ясен щура III (дослідної) групи звичайної ультраструктури, із розміщеними у центрі еритроцитами. Люмінальна поверхня ендотеліоцита має нерівний контур, помітні також дві лізосоми звичайної округлої форми. Цитоплазматична мембрана клітини утворює інвагінації та містить мікропіноцитозні везикули, які забезпечують транспорт речовин крізь ендотелію стінку. У гладко-

м'язових клітинах стінки судини помітними є набряклі мітохондрії зі зменшеною кількістю крист.

Медикаментну корекцію було спрямовано на зменшення накопичення активованих форм недоокиснених жирних кислот, що мають руйнівну дію на мембрани, для зменшення агрегації тромбоцитів й еритроцитів та покращення мікроциркуляції. У тварин III групи переважали ендотеліоцити звичайної будови та розмірів, лише у деяких була вакуолізована цитоплазма, мітохондрії з зменшеною кількістю крист. В окремих препаратах був порушений зв'язок рибосом з мембранами гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, цистерни якого були помірної щільності, однорідними за формою та розміром, з гранулярним матеріалом низької електронної щільності, що свідчило про відновлення синтетичних функцій клітин.

У всіх 6-ти серіях експерименту не було суттєвих відмінностей результатів спектрофотометричних і вольтамперометричних (контрольних) вимірювань вмісту ОТ для різних реактивів у фіксаторах (1.1-1.3) і зафіксованих тканинах щурів (2.102.3) (табл. 1). Водночас, відмінності середніх значень вмісту ОТ між трьома групами досліджуваних зразків не були випадковими ($p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$).

Отож, процес фіксації біологічних тканин супроводжується утворенням нерозчинного

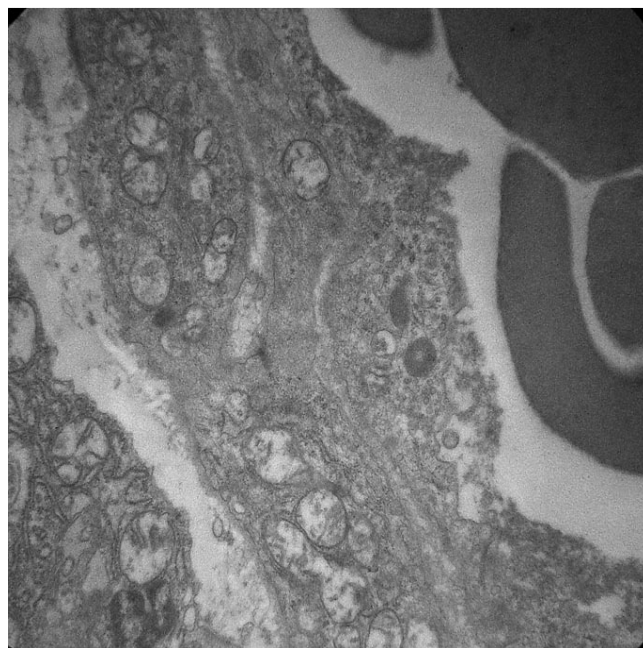


Рис. 3

Фрагмент стінки вени ясен щура III (дослідної) групи.
Зб. х 6000

комплексу при взаємодії шляхом перехресного зв'язування сполук осмію з ліпідними молекулами мембран [6]. Через те, що осмій реагує переважно з ліпідами, окиснення яких при гіпоксії є неповним [10], зростання частки протеїну в мембранних структурах тканин очікувано супроводжувалося зниженням відкладення ОТ. Так, у фіксаторах в серії 1.2 виявили у 4,6 рази, а в серії 1.3 - у 2,6 рази менше ОТ, ніж в серії 1.1 (найнижчий рівень - з TrOOOI , $14,0 \pm 0,9$ мг/мл, найвищий - з TrOOOI , $14,6 \pm 0,6$ мг/мл). Найменший залишок осмію у розчині як для серії 1.2, так і 1.3 виявили за допомогою TrOOOI , відповідно: $2,9 \pm 0,1$ мг/мл і $5,3 \pm 0,2$ мг/мл. Найвищим цей залишок був визначений за допомогою TrO : $3,3 \pm 0,1$ мг/мл і $5,8 \pm 0,2$ мг/мл.

Стабільність подвійного ліпідного шару мембран, пронизаного або периферійно зв'язаного з трансмембранними білками, забезпечують сили гідрофобної взаємодії, а також гідратації і водневих зв'язків [2]. Отож, накопичення та глибина проникнення ОТ передусім залежать від структури і складу бімолекулярного ліпідного шару - адже при реакції з протеїнами значно менша кількість ОТ набуває нелеткої форми, ніж при реакції з ліпопротеїнами [10]. У тканинах пародонту щурів найменша (від $7,3 \pm 0,4$ мг TrO до $7,8 \pm 0,3$ мг TrOOOI) кількість продукту реакції осмію з ліпідами мембран визначена в серії 2.1, а найбільша (від $10,8 \pm 0,5$ мг з TrO до $11,3 \pm 0,5$ мг з TrOOOI) - в серії 2.2. Рівень накопичення ОТ в серії 2.3 - від $8,2 \pm 0,3$ мг (TrO) до $8,8 \pm 0,5$ мг (ОЖ) - був дещо ближчим до результатів серії 2.1, ніж серії 2.2.

Висновки

1. Результати морфологічних та спектрофотометричних досліджень засвідчили залежність рівня накопичення і характеру розподілу ОТ у тканинах ясен щурів I (контрольної) і II, III (дослідних) груп від білково-ліпідного складу і структури клітинних мембран.
2. Збереження у щурів III групи під час фіксації зразків більшої кількості ОТ, ніж I групи, але меншої, ніж II групи, відображає різний (найвищий - у тварин II, найнижчий - у тварин I групи) вміст ненасичених ліпідів у мембранних структурах

тканин ясен.

3. Рівень накопичення і характер розподілу ОТ у тканинах ясен тварин III групи свідчить про відновлення структури мембран після медикаментної корекції пародонтиту препаратами метаболічної (мельдонію дигідрат) та остеотропної (гліцерофосфат кальцію) дії.

Література

1. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / За ред. О. Я.Склярова. К.: Здоров'я, 2004. - 192 с.
2. Генніс Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. - М.: Мир, 1997. - 624 с.
3. Зубачик В.М. Електронно-мікроскопічне дослідження порушення мембранно-десмосомальних міжклітинних контактів в епітелію ясен при пародонтиті / В.М. Зубачик, Ю.В.Бісярін, О.О.Пасько // AML. - 2000. - VI (2). - С. 31-34.
4. Зубачик В.М. Роль мембран у формуванні бар'єрної функції ясен / В.М.Зубачик, А.П.Левицький, О.А. Макаренко // Вісник стоматології. - 2001. - № 1. - С. 14-20.
5. Павловська Г.Я. Ультроструктурні зміни мікроциркуляторного русла бульбарної кон'юнктиви у хворих з діабетичною ангіопатією та ретинопатією / Г.Я.Павловська, П.Д.Гордій, Ю.В.Абліцов// AML. - 2002. - VIII (4). - С. 24-27.
6. Belazi D. Chemical analysis of osmium tetroxide staining in adipose tissue using imaging ToF-SIMS / D.Belazi, S.Sole-Domenech, B.Johansson et al. // Histochemistry and Cell Biology. - 2009. - № 132 (1). - P. 105-115.
7. Di Scipio F. A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation / F. Di Scipio, S.Raimondo, P.Tos, S. Geuna // Microscopy Research and Technique. - 2008. - № 71 (7). - P.497-502.
8. Hayat M. A. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications / M. A. Hayat. - Cambridge University Press, 2000. - P. 45-61.
9. Heupel W.M. Extending the knowledge in histochemistry and cell biology / W.M.Heupel, D.Drenckhahn // Histochemistry and Cell Biology. - 2010. - № 133 (1). - P. 1-40.
10. Osmium assay in fixatives and stained rat tissues by means of acid and o,o'-dihydroxy substituted monoazo dyes and some flavonoids. M.Rydchuk, G.Mykhalyna, O.Dobryanska et al. // Central European Journal of Chemistry. - 2011. - № 9 (5). - P. 886-895.
11. Studer D. Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution / D.Studer, B.M.Humbel, M.Chiquet // Histochemistry and Cell Biology. - 2008. - № 130 (5). - P. 877-889.
12. Vrublevska T. A simple titrimetric method for the determination of osmium(IV) in standard chloride solutions and intermetallic alloys / T. Vrublevska, M.Rydchuk, O.Bonishko, G.Mykhalyna // Materials Science. - 2010. - Vol. 46 (3). - P. 399-407.