

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.314:576.36

**М.М. Звигинцева, С.И. Старосветский,
М.А. Звигинцев, Ю.В. Дубровина,
И.В. Камендов**

E-mail: nusa2000@list.ru

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИАБЕТА

Красноярский научный стоматологический центр

Научно-технический прогресс в генной инженерии привел не только к глубокому изучению молекулярных механизмов, происходящих в живом организме, но и к возможности получения полипептидных факторов обмена веществ.

Высокое значение в регенерации слизистой оболочки полости рта несёт эпидермальный фактор роста EGF, который впервые был обнаружен и выделен из подчелюстных желез мышей Cohen S. 1962 г. [1]. EGF представляет собой глобулярный белок, действующий как сильный митоген на различные клетки эндодермального, эктодермального и мезодермального происхождения и синтезируется в слюнных железах, крови, цереброспинальной жидкости, молоке, слюне, желудочном и панкреатическом соках. Эпидермальный фактор стимулирует пролиферацию эмбриональных клеток и увеличивает высвобождение кальция из костной ткани, что способствует резорбции кости, являясь при этом сильным гемоаттрактантом для фибробластов и эпителиальных клеток. В комбинации с другими цитокинами он является важнейшим фактором, опосредующим процессы заживления ран и ангиогенеза.

Важно отметить, что эффективность биологического действия EGF значительно выше близкого к нему трансформирующего фактора роста (TGF), при этом оба фактора связываются с одними и теми же клеточными рецепторами. Семейство TGF включает в себя многие морфогенетические протеины и продуцируется различными типами клеток: активированными Т-лимфоцитами, макрофагами, тромбоцитами, почками и

плацентой. Уровень TGF- β в плазме крови положительно коррелируется с васкуляризацией [2]. У больных сахарным диабетом II типа высокое содержание TGF- β в крови стимулирует синтез межклеточного матрикса и фиброгенеза и приводит к развитию макро- и микроангиопатии, что подтверждает гипотезу о его возможном участии в патогенезе этих осложнений.

Результаты клинических исследований ряда авторов [3,4] по применению факторов регенерации в заживлении ран выявили, что при лечении острых ран сроки их заживления сокращаются на 1-2 дня. При этом отмечено, что у больных с инсулинозависимым диабетом при лечении трофических ран гангрены ног, а также при лечении венозных трофических язв наблюдался высокий положительный эффект, заключающийся не только в заживлении ран, но и практически в отсутствии рубцов.

Фактор роста EGF обладает широким разнообразием биологических действий в механизме заживления слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при острой и хронической травмах [5]. При сахарном диабете у больных нарушено заживление ран слизистой оболочки полости рта вследствие недостаточной выработки EGF слюнными железами [4].

Целью работы явилось изучение влияния полипептидных факторов роста на регенеративную способность слизистой оболочки полости рта при острой и хронической травмах у животных с диабетом и последующая разработка терапевтических подходов в лечении патологических состояний полости рта, обусловленных как диабетом, так и наличием различных зубных протезов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В биоклинике Института биофизики СО РАН проведено исследование по изучению воздействия полипептидных факторов роста на регенеративную способность слизистой оболочки полости рта в условиях диабета. В связи с поставленной целью исследования нами использована выборочная совокупность для оценки как клинических изменений, так и биохимических показателей крови. Крысы линии «Браттлеборо» рождаются с уже генетически передаваемым по рецессивному типу несхарным диабетом, а при скрещивании внутри вида все животные страдают диабетом, поэтому все животные линии «Браттлеборо» были экспериментальными. В качестве контроля нами использованы генетически здоровые лабораторные крысы линии «Wistar». Для репрезентативности выборки было проведено изучение содержания в крови микроэлементов, наиболее жизненно важных для обмена веществ, таких, как натрий (Na), калий (K) и кальций (Ca). В качестве экспериментальных животных нами были выбраны 27 здоровых крыс линии «Wistar» и 27 диабетических крыс линии «Браттлеборо». Всем животным на нижней челюсти создавали острую травму слизистой оболочки полости рта в области переходной складки при помощи портативной бормашины (рис. 1, см. цветную вклейку) и на верхней челюсти – хроническую травму посредством изготовления пломбы из жидкотекучего

фотокомпозиата на передние резцы с контактом последнего со слизистой десны (рис. 2, см. цветную вклейку). За животными осуществлялся клинический контроль и проводилось изучение биохимических показателей сыворотки крови.

Через 7 дней эксперимента у животных с диабетом и острой травмой отмечалось незаживление раны (рис. 3, см. цветную вклейку). Зубы у всех животных вырастали на 0,8 – 1,2 мм и при этом отмечалось отсутствие контакта пломбировочного материала со слизистой оболочкой. После удаления пломбировочного материала наличие хронической травмы наблюдалось только у диабетических крыс (рис. 4, см. цветную вклейку), поэтому лечения и обследований в процессе лечения у крыс линии «Wistar» нами не проводилось. В качестве факторов, улучшающих эпителизацию ран, нами были применены подслизистые инъекции эпидермального EGF в дозе 1,6 мкг/кг, инсулинподобного IGF в дозе 1,6 мкг/кг и трансформирующего TGF в дозе 4,0 мг/кг (рис. 5, см. цветную вклейку). Биохимическое изучение уровня макроэлементов в крови контрольных животных проводилось лишь до опыта, а у экспериментальных животных на протяжении всего эксперимента, для чего из подкожной вены задней лапы брали 0,3 мл³ крови с последующим определением содержания Na, K и Ca по оптической плотности в фотоэлектрокалориметре КФК-2МП с использованием специальных хромированных пробирок. Проведено 324 биохимических анализа крови. При этом 81 анализ проведен у здоровых крыс линии «Wistar» (контроль нормы показателей биохимии крови) и 243 – линии «Браттлборо» (по 81 анализу до опыта, через 7 и 14 дней эксперимента). При статистическом анализе данные представлялись как $\bar{x} \pm S/\sqrt{n}$ (среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего). Среднее арифметическое находили по формуле $\bar{x} = 1/n \sum_{i=1}^n x_i$; выборочную дисперсию определяли по формуле $S^2 = 1/(n-1) \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$; выборочное среднее квадратическое отклонение на-

ходили как $S = \sqrt{S^2}$. Средние значения сравнивались по критерию Стьюдента с вычислением достигнутого уровня значимости p . Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05. При $p < 0,05$ различия средних значений считались статистически значимыми [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наблюдений за животными без диабета не выявили заметной разницы в скорости регенерации слизистой оболочки как при острой, так и при хронической травмах и характеризовались сроками заживления в пределах 3 – 4 дней. В то же время у животных с диабетом наблюдались значительные отклонения в скорости регенерации. Клиническое наблюдение показало, что в условиях диабета сроки регенерации острой травмы составляли 12 – 14 дней, а признаки заживления хронической травмы наступали лишь к 25 – 30 дням от начала эксперимента. Применение полипептидных факторов роста значительно сократило сроки заживления ран. Лечение острой травмы слизистой оболочки полости рта крыс линии «Браттлборо» с наследственной формой диабета полипептидными факторами роста практически не отличалось от здоровых крыс линии «Wistar» и составляло 3 – 5 дней. В процессе лечения хронической травмы слизистой оболочки полости рта при использовании EGF сроки заживления сократились до 4 – 5 дней (рис. 6, см. цветную вклейку). Применение IGF привело к полной регенерации тканей через 5 – 7 дней, а при воздействии TGF заживление наступало через 6 – 7 дней. Также хотелось бы отметить значительное снижение употребления воды, что характеризует нормализацию общего обмена веществ у крыс линии «Браттлборо» с наследственным диабетом.

Биохимический анализ крови на содержание макроэлементов выявил определенную зависимость общего воздействия полипептидных факторов на обмен

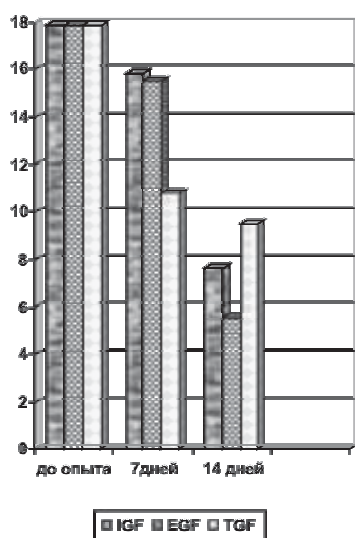


Рис 7. Содержание калия в крови животных

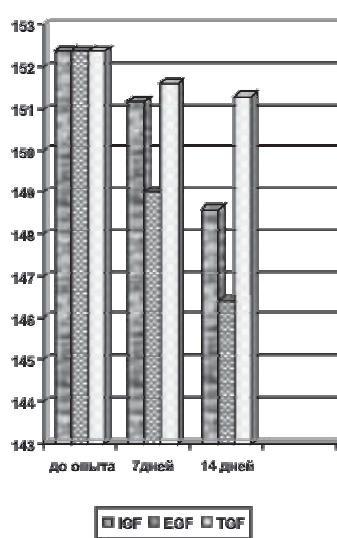


Рис.8. Содержание натрия в крови животных

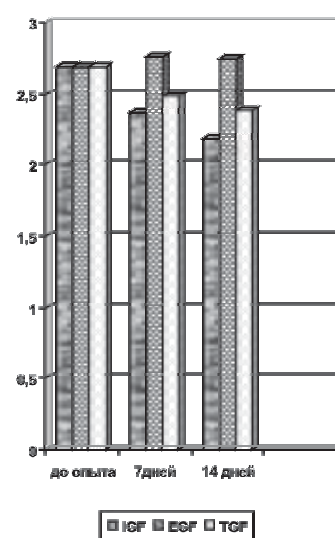


Рис.9. Содержание кальция в крови животных

веществ в организме диабетических крыс (рис. 7, 8, 9). Так, содержание калия в сыворотке крови здоровых крыс линии «Wistar» составляет $4,37 \pm 0,12$ ммоль/л, количество Na находилось в пределах $141,6 \pm 2,12$ ммоль/л, а содержание Ca составило $2,31 \pm 0,08$ ммоль/л. Количество макроэлементов у крыс линии «Браттлеборо» с наследственной формой диабета было значительно выше и составляло: K- $17,87 \pm 0,16$ ммоль/л ($p < 0,01$); Na - $152 \pm 2,46$ ммоль/л ($p < 0,05$); Ca - $2,69 \pm 0,10$ ммоль/л ($p < 0,05$).

При лечении как острой, так и хронической травм слизистой оболочки полости рта крыс линии «Браттлеборо» с наследственной формой диабета эпидермальным фактором роста наблюдалось снижение содержания калия к 7-му дню эксперимента с $17,87 \pm 0,16$ ммоль/л до $15,52 \pm 0,15$ ммоль/л ($p < 0,01$). К 14-му дню наблюдения содержание калия составляло $5,52 \pm 0,13$ ммоль/л ($p < 0,01$), что более чем в три раза ниже исходного уровня и статистически значимо не отличается от показателя здоровых крыс. Также хотелось отметить статистически незначимую тенденцию снижения содержания натрия в крови животных до $149,0 \pm 2,31$ ммоль/л ($p > 0,05$) к 7-м суткам от начала лечения, и к 14-му дню данный показатель составлял $146,2 \pm 2,29$ ммоль/л ($p > 0,05$). В то же время содержание кальция при применении EGF имеет статистически незначимую тенденцию к увеличению к 7-му дню исследования до $2,76 \pm 0,12$ ммоль/л ($p > 0,05$). При дальнейших наблюдениях данный показатель практически не меняется и к 14-м суткам составляет $2,75 \pm 0,12$ ммоль/л.

При анализе лечения острой и хронической травм слизистой оболочки полости рта крыс линии «Браттлеборо» с наследственной формой диабета инсулиноподобным фактором JGF роста было отмечено снижение содержания калия до $15,84 \pm 0,14$ ммоль/л ($p < 0,01$) к 7-м суткам исследования. На 14-е сутки от начала эксперимента данный показатель снизился более чем в два раза и составил $7,63 \pm 0,13$ ммоль/л ($p < 0,01$). Содержание натрия в сыворотке крови практически не менялось и составляло $151,2 \pm 2,38$ и $148,6 \pm 2,11$ ммоль/л на 7-е и 14-е сутки наблюдения соответственно ($p > 0,05$). Количество кальция в сыворотке крови экспериментальных животных при применении IGF начинает снижаться и к 7-м суткам составляет $2,37 \pm 0,08$ ммоль/л ($p > 0,05$), а к 14 дню исследования показатель достигает $2,19 \pm 0,07$ ммоль/л, ($p < 0,05$), что статистически значимо не отличается от показателей крови здоровых животных линии «Wistar».

Наблюдение за экспериментальными животными линии «Браттлеборо», леченными трансформирующим фактором роста, выявило положительную динамику в показателях макроэлементов в сыворотке крови крыс. Заметное уменьшение содержания калия наблюдалось на 7-е сутки опыта и составляло $10,78 \pm 0,14$ ммоль/л ($p < 0,01$). К 14-му дню исследования наблюдалась тенденция к дальнейшему снижению показателя до $9,53 \pm 0,14$ ммоль/л. Содержание натрия на протяжении всего опыта практически не менялось и составляло $151,6 \pm$

$2,42$ и $151,3 \pm 2,44$ ммоль/л соответственно к 7-м и 14-м суткам исследования ($p > 0,05$). Содержание кальция в сыворотке крови постепенно начинало снижаться и к 7-м суткам опыта составляло $2,48 \pm 0,08$ ммоль/л ($p > 0,05$), и к 14-му дню от начала эксперимента данный показатель достигал $2,39 \pm 0,09$ ммоль/л ($p < 0,01$). При этом содержание кальция приближалось к показателям кальция здоровых животных линии «Wistar» ($p > 0,05$).

Своевременное проведение лечебно-профилактических мероприятий, направленных на восстановление функции и эстетики зубочелюстной системы при сахарном диабете, является основным звеном в стоматологической реабилитации пациентов, страдающих этим заболеванием. Значимость данной проблемы в настоящее время подчеркивается тем, что сахарный диабет как первого, так и второго типов является заболеванием с генетической предрасположенностью, и в течение каждых 15 лет количество таких больных будет удваиваться [7]. Большой проблемой для всех врачей, и, в частности, для стоматологов, является проведение каких-либо хирургических вмешательств, связанных с незаживлением хирургической раны и расхождением операционных швов, а также длительно незаживающих пролежней и язв под съёмными зубными протезами при диабете [8]. Одним из ранних признаков сахарного диабета является сухость во рту, характеризующая нарушение функции слюнных желез [9], которые являются основным источником многих полипептидных факторов роста [3,4]. Для выявления зависимости диабета от недостаточной выработки полипептидных факторов роста и возможности их применения для лечения острых и хронических травм слизистой оболочки полости рта мы и предприняли наше исследование.

При обычном клиническом наблюдении за крысами линии «Браттлеборо» с наследственной формой диабета нам удалось выявить, что применение полипептидных факторов в виде подслизистых инъекций приводило к значительному улучшению регенерации слизистой оболочки полости рта животных. При этом у животных без диабета отмечалась высокая степень регенерации как острой, так и хронической травмы, без применения факторов роста заживление наблюдалось через 3 – 5 дней. Воздействие на раневую поверхность как EGF, так и IGF и TGF также приводило к заживлению ран через 3 – 4 дня, но при этом место травмы практически было невидимым. Это положение подтверждает мнение Brody G.S. с соавт. [10] и Kingsnorth AN с соавт. [11] о сокращении сроков и отсутствии рубцов при применении факторов роста за счет нормализации структуры коллагеновых волокон и восстановления нарушенного состояния некоторых аминокислот [12]. Сроки заживления хронической травмы слизистой оболочки полости рта у диабетических животных в значительной степени зависели от применения различных факторов роста. При этом хотелось бы отметить более высокую регенеративную способность EGF, при применении которого сроки заживления ран практически не отличались от здоровых крыс. Регенеративная способность

IGF и TGF более низкая, чем у EGF, что также подтверждает мнение Ehrlich H.P. и Massague J. [12,13].

Биохимический анализ крови экспериментальных животных также выявил неоднозначную реакцию на воздействие полипептидных факторов роста. Так, EGF приводит к значительному снижению содержания калия и натрия к 7-м суткам исследования, а к окончанию опыта практически восстанавливает данные показатели до нормальных величин. В то же время наблюдается повышение содержания кальция в сыворотке крови животных, что, по мнению Кусель С.И., характеризуется вымыванием кальция из костей, что может привести к остеопорозу [1]. Инсулиноподобный фактор роста, в отличие от EGF, наоборот, приводит к нормализации кальция уже к 7-м суткам от начала исследования, и к 14-му дню опыта его содержание в сыворотке крови становится ниже по сравнению с показателями здоровой группы животных. Последнее, очевидно, связано с повышением оссификации костной ткани. Хотя содержание в крови калия и натрия постепенно снижается, но их показатели не достигают нормальных величин. При воздействии трансформирующего фактора роста на организм крысы с диабетом нами выявлено снижение содержания в сыворотке крови калия, менее выраженного, чем при воздействии EGF, и снижения содержания кальция, менее выраженного, чем у IGF, при этом количественный состав натрия практически не изменился.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный эксперимент по применению факторов роста в способности к заживлению острых и хронических травм слизистой оболочки полости рта выявил неоднозначное действие полипептидных факторов как на регенеративную способность слизистой оболочки полости рта, так и на изменение биохимических показателей содержания основных микроэлементов в сыворотке крови экспериментальных животных с наследственным диабетом. Полученные предварительные данные раскрывают новые возможности и подходы к внешне простому и внутренне сложному процессу заживления ран не только при хирургических вмешательствах, но и при лечении хронических пролежней и язв у пациентов, страдающих сахарным диабетом.

Дальнейшие морфологические, биохимические и иммунологические исследования помогут глубже понять и раскрыть механизмы действия полипептидных факторов роста при лечении стоматологических заболеваний, воздействие их на организм в целом у пациентов, страдающих сахарным диабетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кусель С.И., Стойка Р.С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. М. Наука; 1985. - 236 с.
2. Pfeiffer A, Middelberg-Bisping K, Drewes C et al. Трансформирующий фактор роста- β и его содержание при осложненном сахарном диабете II типа. Diabetes Care, Volume 19, Number 10, October 1996, - P. 1113.

3. Kerr M; Lee A; Wang P.L.; Purushotham K.R.; Chegini N.; Yamamoto H.; Humphreys-Beher M.G. J.Biochem-Pharmacol. 1995 May 17; 49(10): 1521-31.
4. Purushotham K.R., Bui A.T., Zelles T., Blazsek J., Shultz G.S., Humphreys-Beher M.G. Absorption of epidermal growth factor occurs through the gastrointestinal tract and oral cavity in adult rats. 0193-1857/95 Copyright © 1995 the American Physiological Society.
5. Phylchenkov A.A, Slukvin I.I., Kudryavets Yu.I. Preferential coexpression of the functionally active receptors for EGF and transferring in some human tumor cell lines of the epithelial origin. Экспериментальная онкология 2000. Vol. 22, No. 3.
6. Белько И.В, Свирид Г.П. Теория вероятностей и математическая статистика - Минск: Новое знание, 2004. - 250 с.
7. Амбулаторная помощь эндокринному больному // А.С. Ефимов, Н.А. Скробонская, А.К.Чебан и др. / Под ред. А.С. Ефимова. - К.: Здоровье, 1988. - 256 с.
8. Балаболкин М.И. Сахарный диабет. - М.: Медицина, 1994. - 384 с.
9. Sreebny LM; Yu A; Green A; Valdin A. Xerostomia in diabetes mellitus. Diabetes-Care; 1992 Jul; 15(7); P. 900-904.
10. Bach M.A., Chin E., Bondy C.A. The effects of subcutaneous insulin-like growth factor-I infusion in insulin-dependent diabetes mellitus. // J. Clin-Endocrinol-Metab. - 1994 - Vol. 79. - No 4- P. 1040-1045.
11. Kingsnorth AN, Vowles R, Nash JRG. Epidermal growth factor increases tensile strength in intestinal wounds in pigs. Br J Surg 1990; 77: 409-412.
12. Ehrlich H.P., Buttle D.J., Bernanke D.H.. Physiological variables affecting collagen lattice contraction by human dermal fibroblasts. Exp Molec Pathol 1989; 50: 220-229.
13. Massague J. How Cells Read TGF- β Signals. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000, 1, 169-178.

INFLUENCE OF GROWTH FACTORS ON REGENERATION OF ORAL CAVITY MUCOUS MEMBRANE IN THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

**M.M. Zvigintseva, S.I. Starosvetsky,
M.A. Zvigintsev, U.V. Dubrovina, I.V. Kamendov**

SUMMARY

Influence of the peptide growth factor on oral cavity mucous membrane regeneration was studied in 28 laboratory rats of Wistar line and 28 diabetic rats of Brattleboro line as an experimental animals. Acute injury of oral cavity mucous membrane was created in all animals. The study results revealed that treatment terms of acute trauma of oral cavity mucous membrane of diabetic rats with polypeptide growth factors practically did not differ from those of healthy rats and ranges from 3 to 5 days. Duration of healing was significantly decreased by using polypeptide growth factors. Thus polypeptide growth factors may be considered to be perspective drugs in the treatment of oral cavity mucous membrane diseases in patients having diabetes mellitus.