

## КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА У КРЫС С ПОМОЩЬЮ ИММУНОМОДУЛЯТОРА

Даренская М.А.<sup>1</sup>, Гребенкина Л.А.<sup>1</sup>, Мокренко Е.В.<sup>2</sup>, Сусликова М.И.<sup>2</sup>, Губина М.И.<sup>2</sup>, Гончаров И.С.<sup>2</sup>, Мокренко М.Е.<sup>2</sup>, Колесникова Л.И.<sup>1</sup>, Колесников С.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, e-mail: marina\_darenskaya@inbox.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, e-mail: smibalis2@rambler.ru

Целью проведенного исследования явилось определение корригирующего влияния крезацина (оксиэтиламмония метилфеноксиацетата) в отношении метаболических нарушений при моделировании воспалительно-дегенеративных повреждений пародонта у крыс. Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Были сформированы 2 опытные группы: 1-я опытная группа – животные с воспалительно-дегенеративными повреждениями пародонта, 2-я опытная группа – животные с воспалительно-дегенеративными повреждениями пародонта, получавшие крезацин в дозе 50 мг/кг в течение 3 дней подряд внутрь. Активность липопероксидных процессов оценивали по уровню первичных – диеновых конъюгатов и конечных - ТБК-активных продуктов; антиоксидантную защиту - по активности супероксиддисмутазы и уровню восстановленной формы глутатиона. Иммунный статус животных оценивали по ряду показателей: реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ); фагоцитарной реакции нейтрофилов; степени активности кислороднезависимых и кислородзависимых микробицидных систем фагоцита. Показано, что крезацин способствует эффективной профилактике окислительного стресса и нормализации иммунологических нарушений при развитии данного патологического процесса. Корригирующее действие препарата выразилось в снижении уровней продуктов липопероксидации на фоне одновременного увеличения концентрации, восстановленного глутатиона и активности ведущего фермента - супероксиддисмутазы, со стороны иммунной системы – повышением лимфокинпродуцирующей функциональной активности лимфоцитов и фагоцитарной активности клеток-нейтрофилов.

Ключевые слова: пародонтит, воспаление, крысы, липопероксидация, фагоциты, иммуномодуляторы.

## CORRECTION OF METABOLIC DISORDERS IN INFLAMMATORY PERIODONTIUM DISEASES IN RATS WITH THE IMMUNOMODULATOR

Darenskaya M.A.<sup>1</sup>, Grebenkina L.A.<sup>1</sup>, Mokrenko E.V.<sup>2</sup>, Suslikova M.I.<sup>2</sup>, Gubina M.I.<sup>2</sup>, Goncharov I.S.<sup>2</sup>, Mokrenko M.E.<sup>2</sup>, Kolesnikova L.I.<sup>1</sup>, Kolesnikov S.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, e-mail: marina\_darenskaya@inbox.ru;

<sup>2</sup>Irkutsk State Medical University, Irkutsk, e-mail: smibalis2@rambler.ru

The aim was to define correction effects of krezacin (oxyaethylammonii methylphenoxyacetate) regarding the metabolic disorders in modeling of inflammatory and degenerative damage of the periodontium in rats. The study was carried out in mature male Wistar rats. Two test groups were formed, the first test group was comprised of animals with inflammatory and degenerative damage of the periodontium, the second test group were animals with inflammatory and degenerative of the periodontium, which were taken krezacin at a dose of 50mg/kg for 3 days. The intensity of LPO processes in blood was estimated by content of primary product - conjugated dienes (CD) and final product - TBA-reactive substances of the lipid peroxidation processes. The status of antioxidative defense system (AOD) was determined by superoxide dismutase (SOD) activity and level of reduced glutathione (GSH). Animals' immune status was assessed by several indicates as leukocyte migration inhibition test (LMIT), phagocytic reactions of neutrophils, degree of activity for oxygen-dependent and oxygen-independent microbicidal phagocyte system. It was shown that krezacin contributes to effective prevention of oxidative stress and recovery of immune disorders in given pathogenic mechanism. Correction effects of the medication were expressed in reducing the levels of primary and final the lipid peroxidation products, increasing the content of reduced glutathione and superoxide dismutase activity as well as increasing lymphokine producing function of lymphocytes and recovery of Neutrophil phagocytic activity in immune system.

Keywords: periodontitis, inflammation, rats, lipid peroxidation, phagocytes, immunomodulator.

Вопросы патологии зубочелюстной системы имеют очень долгую историю. Все возрастающий интерес специалистов к данным вопросам связан с высокой значимостью зубочелюстных заболеваний как с медицинской, так и с социальной точки зрения, что обусловлено широким распространением, разнообразием клинических симптомов и особенностей течения патологического процесса. Заболевания пародонта имеют полиэтиологическое происхождение, в основе их развития лежит комплекс патологических сдвигов, протекающих в полости рта и связанных с иммунологическими и микробиологическими изменениями [1]. Убедительно доказано, что сохранить здоровые зубы и ткани пародонта, и таким образом улучшить ситуацию, можно только через повсеместное внедрение в практику профилактических методов зубочелюстных заболеваний. В связи с этим поиск универсальных профилактических препаратов, повышающих устойчивость тканей зубочелюстной системы к действию различных негативных экзо- и эндогенных факторов среды, является крайне актуальной задачей [1-3]. Важными считаются как профилактические действия на локальном уровне, так и создание условий для общесистемного повышения резистентности к действию негативных факторов окружающей среды. Известно о благоприятном действии различного рода иммуномодуляторов, способствующих нормализации местного иммунитета, приостановлению воспалительно-деструктивных процессов и повышению качества жизни пациентов [4]. Отечественный препарат – крезацин (оксиэтиламмония метилфеноксиацетат) относится к классу фитогормонов, является высокоэффективным адаптогеном с иммуномодулирующими свойствами, действует как эффективный стресс-протектор, имеет репарационный эффект на моделях различных видов гиподинамического стресса, оказывает противотоксический эффект, также защищает от СВЧ-облучения и т.д. [5]. Проведенные эксперименты свидетельствуют о малотоксичности соединения, высокой фармактивности в диапазоне доз от 0,5 до 100 мг/кг, хорошей биодоступности [5]. Крезацин быстро метаболизируется печенью и выделяется почками, в основном в виде соединений-глюкуронидов, период его полувыведения из организма составляет 1,7 часа [5; 6]. Клиническими исследованиями доказана его выраженная эффективность в отношении простудных заболеваний, артериальной гипертензии, ожирения, расстройств репродуктивной системы у мужчин, лечения гнойных ран [5; 7]. Имеются данные, что данный препарат оказывает стабилизирующие эффекты на структуру мембран клеток и процессы окислительного фосфорилирования, тормозит липопероксидные процессы [5]. Учитывая разнообразие эффектов данного иммуномодулирующего препарата на системном уровне, нами было высказано предположение о возможном его использовании в качестве перспективного редокс-регулятора заболеваний зубочелюстной системы.

Целью проведенного исследования явилось определение корректирующего влияния крезацина в отношении метаболических нарушений при моделировании воспалительно-дегенеративных повреждений пародонта у крыс.

**Материал и методы исследования.** Исследования проведены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар, массой 220-250 г. Эксперименты проводили на базе лаборатории кафедры фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (г. Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных клетках, доступе к воде и пище (питание стандартным кормом в соответствии с суточными нормами). Были сформированы 2 опытные группы: 1-я опытная группа – животные с воспалительно-дегенеративными повреждениями пародонта (n=10), 2-я опытная группа – животные с воспалительно-дегенеративными повреждениями пародонта (n=10), получавшие крезацин в дозе 50 мг/кг в течение 3 дней подряд внутрь. Создание модели воспалительно-дегенеративных повреждений тканей пародонта у крыс проводили по определенному методу (когда наркотизированным животным вводится во внешнюю часть десны по 0,15 мл 2-процентного водного раствора формальдегида с каждой стороны (общий объем = 0,3 мл) [6]. Осуществлялось однократное введение инъекции, далее спустя сутки в месте введения образовывались обширные воспалительно-дегенеративные изменения тканей. Интактные животные (группа контроля) (n=10) получали инъекции физиологического раствора в тех же объемах. Животные всех групп подвергались декапитации, после чего у них брали кровь для исследований. Для лечения воспалительно-дегенеративных поражений пародонта у крыс использовали субстанцию иммуномодулятора - крезацин (ОАО «Усолъе-Сибирский ХФЗ», Иркутская область). Крезацин был создан в Институте органической химии СО РАН (г. Иркутск) в 90-х годах, затем активно изучался в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ.

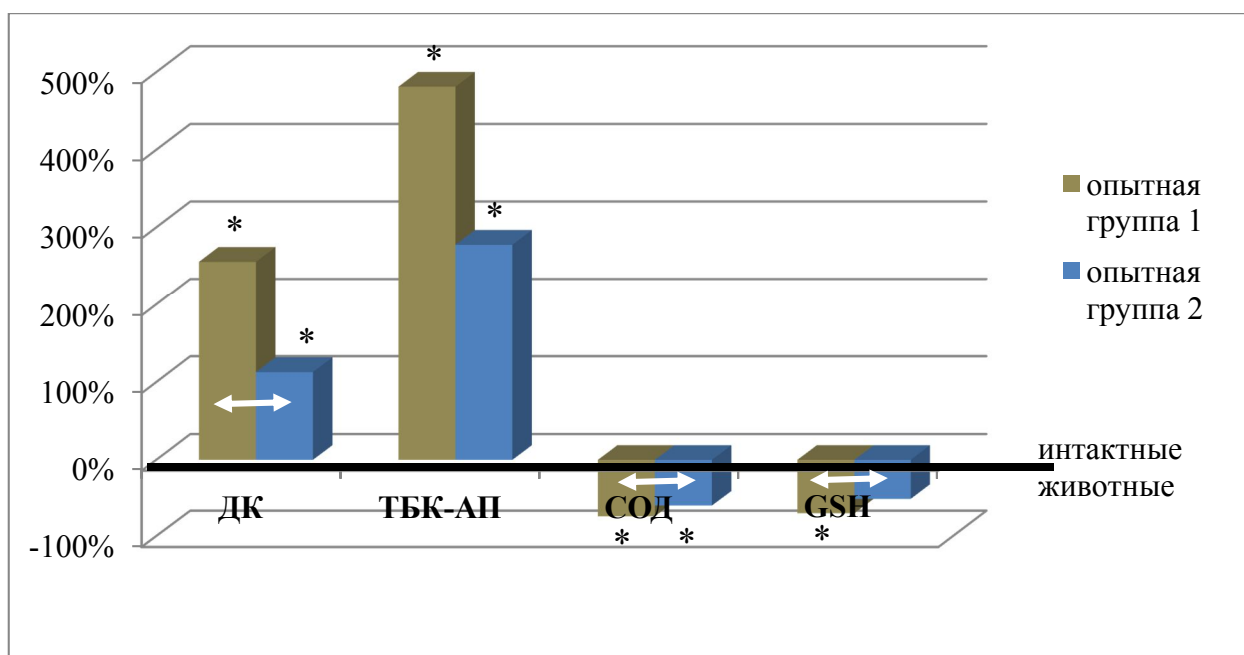
В исследовании производился анализ интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ): первичные – диеновые конъюгаты (ДК) и конечные - ТБК-активные продукты, а также оценивалось состояние системы антиоксидантной защиты (АОЗ): активности супероксиддисмутазы (СОД) и содержание восстановленной формы глутатиона (GSH) [8]. Иммунный статус животных оценивали по ряду показателей: реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ); фагоцитарной реакции нейтрофилов; степени активности кислороднезависимых и кислородзависимых микробицидных систем фагоцита. Оценка РТМЛ состоит в способности Т-лимфоцитов (сенсibilизированных) в ходе специфических реакций с антигеном *in vitro* продуцировать биологически активные вещества (лимфокины), в том числе факторы с функцией ингибирования миграции лейкоцитов (РТМЛ выражалась в %) [9]. Использовали методику реакции РТМЛ с

митогенами – фитогемагглютинином и конканавалином А. Определение фагоцитарной реакции нейтрофилов крови осуществляли с помощью фагоцитарного показателя (ФП) - количества фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов (в %), а также фагоцитарного числа (ФЧ) - среднего количества микробов, поглощенных одним нейтрофилом (в усл. ед.). Анализ переваривающей функции производили по показателю завершенности фагоцитоза (ПЗФ) - отношению количества переваренных микробов ко всему числу поглощенных микробов (в %) [9]. Степень активности кислороднезависимых микробицидных систем фагоцита оценивали с помощью лизосомально-катионного теста (в %) [9]. Активность кислородзависимых микробицидных систем фагоцита оценивали с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) (в %) [8; 9]. В НСТ-тесте исследуют живые клетки, которые фиксируют после инкубации с гистохимическим индикатором респираторного взрыва - нитросиним тетразолием. Это осуществляется без дополнительной стимуляции (спонтанный НСТ-тест) или при стимуляции нейтрофилов *in vitro* (индуцированный или стимулированный НСТ-тест).

Данное исследование было выполнено по стандартам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях (г. Страсбург, 1986 г.); «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005 г.) [10] и «Правилам лабораторной практики» (Приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Расчеты производились в программе STATISTICA 6.1 Stat-Soft Inc, США. В ходе исследования использовали визуально-графический метод, критерии согласия Колмогорова-Смирнова - при определении близости к нормальному закону распределения. Проверка равенства генеральных дисперсий производилась с помощью критерия Фишера. Данные представляли в виде медианы (Me), 25-75% квартилей. При расчете межгрупповых различий для независимых выборок использовали непараметрический Манна-Уитни критерий. Критический уровень значимости - 5% (0,05).

**Результаты исследования и их обсуждение.** При анализе влияния крезацина на состояние липоперекисных процессов было обнаружено, что данное соединение оказывает качественный положительный эффект на степень окисленности компонентов жирных кислот у крыс с воспалительно-дегенеративными изменениями тканей пародонта (опытная группа 2), о чем свидетельствовало статистически значимое снижение значений показателей первичных (ДК - в 1,67 раза) и конечных ТБК-активных продуктов (в 1,54 раза) относительно данных первой опытной группы (рисунок 1).



*Рис. 1. Состояние системы липопероксидации - антиоксидантной защиты у крыс с воспалительно-дегенеративным поражением пародонта (опытная группа 1) и крыс с воспалительно-дегенеративным поражением пародонта на фоне лечения (опытная группа 2)*

\* - статистически значимые различия с интактными животными (значения приняты за 0%);

↔ - статистически значимые различия между двумя опытными группами.

Диеновые конъюгаты относятся к первичным токсичным интермедиатам ПОЛ, оказывают повреждающее действие на различные компоненты: липопротеиды, белки, нуклеиновые кислоты и т.д. [11; 12]. К продуктам, реагирующим с тиобарбитуровой кислотой, относится большое количество высокорепреактивных альдегидов и кетонов, так называемых карбонильных соединений, являющихся непосредственными участниками процессов эндогенной интоксикации [13]. Данные соединения также вызывают химическую модификацию большинства биологически активных веществ - нуклеиновых кислот, белков, углеводов и витаминов [13]. Можно заключить, что крезацин предохраняет ненасыщенные жирные кислоты от окисления, что может благоприятно сказаться на характере течения процессов липидной пероксидации.

Качественно оценить состояние процессов пероксидации можно только при одновременном исследовании факторов, определяющих мощность антиоксидантной защиты, состоящей из низкомолекулярного и ферментативного звеньев. При оценке изменений в антиоксидантной системе было установлено, что исследуемый препарат значительно повышал активность ключевого фермента редокс-метаболизма - супероксиддисмутазы (в 1,55 раза), а также уровень основного клеточного антиоксиданта – восстановленного глутатиона (в 1,66 раза) относительно соответствующих величин первой опытной группы (рисунок 1). СОД

относится к гидрофильным соединениям, переводит супероксидный радикал в электронейтральную форму – перекись водорода [11; 12]. В условиях патологии активные формы кислорода ингибируют активность ферментов-антиоксидантов; так, гидроперекиси тормозят активность СОД, повреждают структуру ее молекул токсичными продуктами. Известно, что даже незначительное снижение активности данного фермента в условиях развития воспаления может оказывать негативный эффект на состояние биомембран клеток пародонтальных тканей [12]. Снижение восстановленной формы глутатиона может свидетельствовать о разбалансировке функционирования ферментов глутатионового обмена и негативно отражаться на общем антиоксидантном статусе организма. Так, уменьшение содержания восстановленного глутатиона при увеличении окисленного, возможно, связано со снижением активности глутатионредуктазы, функция которой состоит в поддержании высокого уровня GSH и низкого GSSG, и, следовательно, высоких значений отношения GSH/GSSG. Кроме того, данные изменения можно пояснить повышением активности глутатионпероксидазы, обеспечивающей окисление глутатиона и инактивацию перекисей [13]. Можно предположить, что имеющийся положительный сдвиг в антиоксидантной защите, заключающийся в увеличении активности СОД и восстановленного глутатиона в ходе осуществления лечебных мероприятий, будет создавать вполне достаточную буферную емкость в отношении прооксидантных компонентов и тем самым способствовать эффективной профилактике окислительных процессов. Наши результаты подтверждают данные других исследований, согласно которым отмечены выраженные стабилизирующие эффекты препарата крезацина в отношении процессов липидной пероксидации [5].

При введении препарата экспериментальным животным также имела место выраженная тенденция в сторону значительного восстановления иммунологических параметров

(рисунок

2).

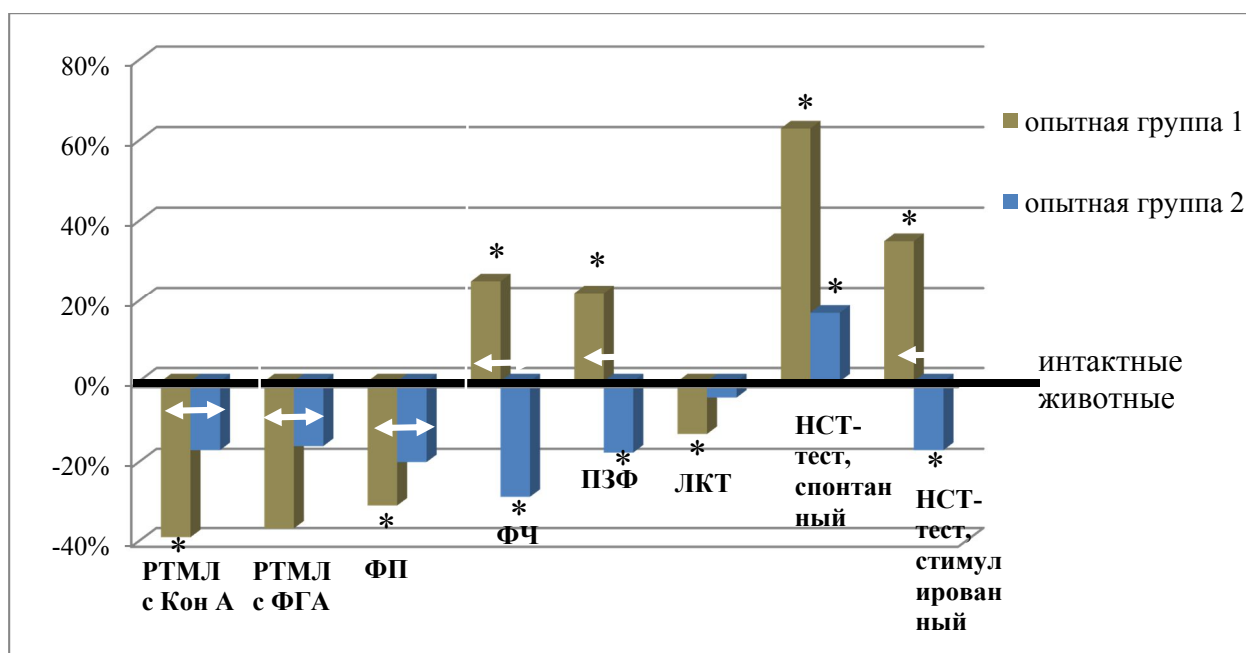


Рис. 2. Изменение иммунологических показателей у крыс с воспалительно-дегенеративным поражением пародонта (опытная группа 1) и крыс с воспалительно-дегенеративным поражением тканей пародонта на фоне лечения (опытная группа 2)

\* - статистически значимые различия с интактными животными (значения приняты за 0%);

↔ - статистически значимые различия между двумя опытными группами.

Так, отмечалось статистически значимое повышение функциональной активности лимфоцитов в реакциях торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А – в 1,35 раза. Подобным образом изменялись значения с фитогемагглютинином – в 1,32 раза. Фагоцитарное число в исследуемой группе значимо снижалось в 1,76 раза, показатель завершенности фагоцитоза – в 1,48 раза относительно значений первой опытной группы (рисунок 2). Наряду с этим увеличивались значения стимулированного НСТ-теста (в 1,62 раза). Регистрируемые нами увеличенные значения реакций торможения миграции лимфоцитов с различными митогенами при введении препарата крезацина следует рассматривать как прогностически благоприятный фактор снижения интенсивности воспалительного процесса в данной модели. Нормализация значений во второй опытной группе имела место и в случае анализа показателей фагоцитоза. Так, фагоцитарный показатель, отражающий относительное количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, отличался увеличенными значениями в сравнении с группой без лечения. Считается, что фагоцитарная активность нейтрофилов повышается в начале воспалительного процесса, а её снижение ведёт к хроническому течению вследствие нарушения функции разрушения и выведения иммунных комплексов из организма [1; 8]. При этом остальные показатели состояния фагоцитоза - фагоцитарное число и показатель завершенности фагоцитоза - не отмечали увеличения значений на фоне введения препарата, что могло

свидетельствовать о недостаточном восстановлении поглотительной и переваривающей способностей нейтрофилов. Также не обнаруживал восстановления показатель интегрального НСТ-теста, отражающего состояние кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов. Установлено, что значения НСТ-теста отличает рост в начальный период острых бактериальных инфекций, тогда при хронизации инфекционного процесса они снижаются. При этом резкое падение показателя считается прогностически неблагоприятным признаком [8].

**Заключение.** Проведенное нами исследование действия многофункционального препарата - крезацина с использованием модели воспалительно-дегенеративных повреждений пародонта в условиях эксперимента показало, что в данном случае являются превалирующими не столько изменения местного характера, сколько серьезные системные сдвиги в иммунном и редокс-статусе. Крезацин проявляет выраженные метаболические эффекты, которые, наряду с уже доказанными противовоспалительными, антитоксическими и энергостабилизирующими свойствами, стабилизируют иммунный ответ и компенсируют сдвиги в системе антиоксидантной защиты. Безусловно, это заставляет пересмотреть вероятные направления его практического применения в клинической медицине и послужит основой его использования в стоматологической практике.

### Список литературы

1. Быкова Н.И., Одольский А.В., Григорян В.А. Показатели клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном воспалении тканей пародонта // Кубанский научный медицинский вестник. 2016. № 6. С. 20-26.
2. Рычкова Л.В., Погодина А.В., Аюрова Ж.Г., Климкина Ю.Н. Ожирение и связанное со здоровьем качество жизни в этнических группах подростков, проживающих в сельских районах республики Бурятия // Бюллетень сибирской медицины. 2018. Т. 17. № 3. С. 105-114.
3. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Ураков А.Л. Возможности фармакологической регуляции процессов адаптации к стоматологическим конструкциям // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15. № 2. С. 12-21.
4. Абрамов А.В., Парфенов С.А., Белов В.Г., Парфенов Ю.А. Применение иммуномодуляторов при лечении переломов нижней челюсти у пациентов пожилого возраста с неполной вторичной адентией // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77. № 9. С. 23-27.
5. Кузнецов И.А., Смирнов А.М., Куралева О.О., Быстрыкова Е.А., Лакейкина И.А., Бегметова М.Х. Биологические и фармакологические свойства трекрезана // Современные



проблемы науки и образования. 2015. № 1-1. [Электронный ресурс].URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=17830> (дата обращения: 30.03.2019).

6. Мокренко Е.В., Шабанов П.Д. Модель воспалительно-дегенеративных повреждений тканей пародонта для оценки действия фармакологических средств // Обозрение психиатрии и медицинской психологии им. В. М. Бехтерева. 2014. Прил. С.118-119.

7. Зарубина И.В., Болахан А.В., Шабанов П.Д. Эффективность трекрезана при экспериментальной бронхопневмонии у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 8. С. 170-173.

8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. 3-е изд. М.: МЕДпресс информ, 2009. 896 с.

9. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. Практическое руководство. М.: Медицина. 2007. 1870 с.

10. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-изд., перераб. и доп. М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. 832 с.

11. Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Nikitina O.A., Lazareva L.M., Suturina L.V., Danusevich I.N., Druzhinina E.B., Semendyaev A.A. Activity of LPO Processes in Women with Polycystic Ovarian Syndrome and Infertility. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. Vol. 162 (3). P. 320-322.

12. Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Semenova N.V., Grebenkina L.A., Suturina L.V., Dolgikh M.I., Gnusina S.V. Lipid peroxidation and antioxidant protection in girls with type 1 diabetes mellitus during reproductive system development. Medicina. 2015. Vol. 51 (2). P. 107-111.

13. Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Romanova E.D., Chkhenkeli V.A., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Korytov L.I., Bugun O.V., Koroleva N.V., Gutnik I.N., Antonenko F.F. Effect of preparation based on *Trametes Pubescens* xylotroph fungi on lipid peroxidation in the blood of experimental animals under conditions of dark stress. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. Vol. 162. no 6. P. 762-764.