

М. С. ЄВТУШЕНКО¹, О. Ю. КОШОВА², С. І. КРИЖНА¹, Т. І. ТЮПКА³

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БАКТЕРІАЛЬНОГО ЛІЗАТУ НА ПОКАЗНИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПАРОДОНТИТІ У ЩУРІВ

¹Харківська академія післядипломної освіти; ²Харківський національний фармацевтичний університет; ³Харківський державний медичний університет <kryghna@gmail.com>

Проведено один з етапів патофізіологічного дослідження прооксидантно-антиоксидантного стану за показником оксидативного стресу слизової оболонки ротової порожнини у щурів з експериментальним пародонтитом та фармакологічної корекції бактеріальним лізатом. Відтворення пародонтиту достовірно призводило до високого ступеня порушення системи перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту (АОЗ) коефіцієнт red/ox-балансу. Доведено, що до кінця 90-денного терміну спостереження перебігу пародонтиту потужність природних компенсаторних механізмів набула стану декомпенсації, що проявлялося високим коефіцієнтом red/ox-балансу, пригніченням функціональної активності як неферментативної, так і ферментативної ланок АОЗ у гомогенаті тканини ясен контрольної патології тварин: $K(ПОЛ/АОЗ) = 0,39$, в інтактних тварин $= 1$. Застосування Респіброну® протягом 30 діб сприяло нормалізації антиоксидантно-прооксидантного індексу, який дорівнював у цій групі 0,9 і був статистично значуще вищим за такий у групі Імудону® (0,64). Отримані результати дають змогу продовжити дослідження перебігу експериментальних пародонтитів з точки зору встановлення механізмів розвитку, захисту, відновлення тканин за умов фармакологічної корекції бактеріальним лізатом Респіброн®.

Ключові слова: пародонтит; перекисне окиснення ліпідів; антиоксидантний захист; коефіцієнт red/ox-балансу; Респіброн®.

Запальні захворювання пародонта є однією з актуальних проблем стоматології, що пов'язано з їх значною поширеністю, хронічним перебігом, запуском порочного кола патологічних змін, які наразі відомі як прояви системного низькоінтенсивного запалення. Нині відомо його вплив на розвиток серцево-судинних захворювань, інсультів, несприятливого перебігу цукрового діабету, вагітності тощо [9]. Дисбаланс у системі ліпопероксидації, місцеве і системне запалення, порушення імунітету та мікробіоценозу різних епітопів розглядаються як одні з найважливіших складових у формуванні патологічного процесу при гострих і хронічних пародонтитах. Дослідження такого багатокомпонентного процесу слід проводити з урахуванням вищенаведеної низки процесів. На сьогодні в комплексному лікуванні хворих з пародонтитом рекомендується використання топічної імуномодуляції [5]. При цьому враховується вплив таких засобів на показники оксидативного стресу та запального процесу. Ці два процеси мають тісний зв'язок. Так, оксидативний стрес є наслідком порушення балансу між продукцією вільних радикалів і вираженістю антиоксидантного захисту. А ряд реактивних видів кисню та азоту можуть посилювати експресію прозапального гена [10]. Таким чином, запалення та оксидативний стрес є тісно пов'язаними патофізіологічними явищами [8].

Мета роботи – експериментальне вивчення корекції бактеріальним лізатом порушеного перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту (АОЗ) на місцевому й системному рівнях на моделі пародонтиту за показ-

ником коефіцієнта оксидативного стресу в умовах експериментального пародонтиту на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету (НФаУ). Наукова новизна полягає у патофізіологічному дослідженні особливостей перебігу оксидативного стресу на експериментальній моделі пародонтиту та фармакологічній корекції. Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт НФаУ («Технологія одержання оригінальних та комбінованих фармацевтичних засобів у різних формах», науково-дослідна робота (НДР) № 0108U009174; «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини», НДР № 0114U000945, 2014–2019 рр.). Практична значущість проведення низки патофізіологічних досліджень для медичної практики полягає у теоретичному узагальненню та новому розв'язанню актуальної науково-практичної проблеми сучасної біологічної та медичної патологічної фізіології – ролі впливу бактеріальних лізатів у патогенетичній терапії пародонтиту, що дозволяє патогенетично обґрунтувати принципи корекції цього патологічного процесу.

Матеріали і методи. Експериментальний пародонтит у щурів викликали утриманням щурів на дієті легкої консистенції з високим вмістом вуглеводів за О. І. Євдокимовим [4] у модифікації О. І. Сукманського та О. А. Макаренка [1]. Тварин було розподілено на чотири групи: I – інтактні тварини; II – щури з експериментальним пародонтитом; III – щури з експериментальним пародонтитом, яким проводили зрошення порожнини рота водним розчином Респіброну® у дозі 10 мг/кг 1 раз на добу; IV група – щури з експериментальним пародонтитом, яким проводили зрошення порожнини рота водним розчином препарату порівняння Імудоном®. Тривалість експерименту становила 90 діб: 60 діб тривало моделювання пародонтиту (30 діб проводили лікування Респіброном® (бактеріальний лізат) та препаратом порівняння – відомим засобом з імуномодулювальними властивостями Імудоном®, до складу якого входять лізати штамів найпоширеніших бактеріальних збудників патологічного процесу в порожнині рота) [6]. Механізм його дії полягає у стимулюванні захисних реакцій слизової оболонки порожнини рота шляхом збільшення фагоцитарної активності поліморфноядерних лейкоцитів (ПЯЛ), вмісту в змішаній слині лізоциму, стимуляції імунокомпетентних клітин, а також стимуляції і збільшення секреторного IgA.

Про стан системи ПОЛ та АОЗ судили за концентрацією активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), активністю каталази (Кат), вмістом відновленого глутатіону (ВГ) в сироватці крові і гомогенаті тканини ясен за загальноприйнятими методами [3]. З метою оцінювання балансу окиснювально-відновних процесів використовували коефіцієнт red/ox-балансу (K red/ox), який розраховували як відношення загальної кількості прооксидантів до загальної кількості антиоксидантів [2], виражали у відносних одиницях вмісту прооксидантів (ТБК-АП) до добутку вмісту антиоксидантів (Кат та ВГ). Дієнові кон'югати (ДК) визначали спектрофотометрично при 233 нм класичним методом Z. Placer (1968) у модифікації В. Б. Гаврилова, М. И. Мишко-рудной (1983). Вміст ТБК-реактантів визначали за методом І. Д. Стальної, Т. Г. Гаришвілі (1977): колориметричним методом, який ґрунтується на здатності суми цих сполук утворювати у кислому середовищі забарвлені триметинові комплекси з ТБК, що мають максимум поглинання при довжині хвилі 532 нм [5].

Стан АОЗ оцінювали за вмістом ВГ і активністю ферменту антиоксидантного захисту Кат у крові і гомогенаті слизової оболонки порожнини рота. Активність Кат оцінювали за методом Королюк зі співавт. – за зменшенням вмісту гідрогену пероксиду в інкубаційному середовищі. Метод визначення

активності Кат базується на здатності гідрогену пероксиду утворювати із солями амонію стійкі забарвлені екстракти, які мають максимум поглинання при довжині хвилі 410 нм [5]. Показники визначали на 60-у (одразу після закінчення моделювання пародонтиту) та 90-у добу експерименту (на 30-й день лікування Респіброном®).

Визначення вмісту ВГ проводили за здатністю низькомолекулярних тіолових сполук утворювати під час взаємодії з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензоатом забарвлену сполуку – тіо-2-нітробензойну кислоту, водний розчин якої має характерний максимум поглинання при довжині хвилі 412 нм. За відносну одиницю приймали значення величин, які визначали у інтактних тварин [3]. Гомогенати тканин отримували шляхом центрифугування у центрифугу РС-6 при 3000 об./хв протягом 15 хв за температури +4 °С.

Оцінювання результатів біохімічних досліджень здійснювали згідно з існуючими стандартами шляхом зіставлення показників групи порівняння з основними і початковими показниками, а також між підгрупами групи порівняння залежно від експозиції експерименту [2, 5].

Усі втручання та евтаназію тварин здійснювали з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р., зі змінами, внесеними в 1998 р.) та ухвали П'ятого Національного конгресу з біоетики (Київ, 2013). Виводили з експерименту тварин шляхом декапітації під легким інгаляційним наркозом (ексикатор). Дослідження проводили у центральній науково-дослідній лабораторії (ЦНДЛ) НФаУ, яка сертифікована Державним фармакологічним центром (ДФЦ) МОЗ України (посвідчення № 008/11 від 18.10.2011 р.).

Статистичний аналіз даних проводили із визначенням середнього арифметичного значення (\bar{X}) та його статистичної похибки (Sx) для груп із нормальним розподілом ознак, а також медіани (Me) і мінімальних та максимальних дат для груп із ненормальним розподілом ознак. Для аналізу відмінностей використовували критерій Ньюмена – Кейсла та критерій Даннета. Оцінювання «нульових» гіпотез здійснювали на рівні значущості не більше ніж 0,05.

Результати та їх обговорення. Відомо, що для нормальних фізіологічних процесів необхідні низькі концентрації активних форм кисню (АФК): вони виконують антимікробну функцію, стимулюють зростання фібробластів і епітеліоцитів [9]. Збільшення синтезу прозапальних цитокінів, судинні порушення і гіпоксія тканин, «респіраторний вибух» у нейтрофілах призводять до підвищення активності вільнорадикального окиснення в тканинах пародонта з надмірним утворенням АФК [8]. Мішенями для їх шкідливої дії стають всі компоненти клітин: фосфоліпіди мембран, білки, нуклеїнові кислоти. Проте показано, що за умови пародонтиту рівень АФК залежить не від тяжкості, а від активності запального процесу [7].

Дані, наведені у таблиці свідчать про очевидну активізацію вільнорадикальних механізмів пошкодження пародонта щурів з групи контрольної патології, яка проявилася зростанням вмісту продуктів переокиснення ліпідів у тканині ясен тварин. Підсумковим результатом аномального ПОЛ виступає статистично значуще, до інтактного контролю, зростання вмісту ДК і ТБК-АП у тканині ясен (таблиця). При формуванні експериментального пародонтиту інтенсифікація процесу ПОЛ супроводжувалася пригніченням функціональної активності як неферментативної, так і ферментативної ланок антиоксидантного захисту. Наведене позначалось статистично значущим зниженням вмісту ВГ та пригніченням активності Кат у тканині ясен (див. таблицю). Підтвердженням зрушення рівноваги у системі ПОЛ/АОЗ є також зниження $K_{\text{ПОЛ/АОЗ}}$ до 0,39 ($K_{\text{ПОЛ/АОЗ}}$ у групі інтактних тварин = 1).

Вплив Респіброну® на динаміку показників перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи в гомогенаті тканини ясен щурів з експериментальним пародонтитом порівняно з Імудоном® ($M \pm m$; $n = 8$)

| Група тварин | Показники, 90-а доба експерименту | | | | |
|--|-----------------------------------|------------------|---------------|--------------------|-----------------|
| | ТБК-АП, Мкм/Г | ДК, Мкм/Г | ВГ, Мкм/Г | Каталаза, мкмоль/Г | К(ПОЛ/АОЗ) |
| I – інтактний контроль | 64,90 ± 9,30 | 34,55 ± 3,15 | 5,19 ± 0,40 | 5,66 ± 0,12 | 1 |
| II – контрольна патологія (пародонтит) | 152,40 ± 9,28* | 52,22 ± 3,09* | 3,36 ± 0,39* | 4,47 ± 0,13* | 0,39 ± 0,03* |
| III – Респіброн® + пародонтит | 91,82 ± 9,18** | 37,06 ± 3,29**/# | 5,38 ± 0,49** | 5,81 ± 0,15** | 0,90 ± 0,10**/# |
| IV – Імудон® + пародонтит | 115,06 ± 7,19*/** | 44,26 ± 5,85 | 4,38 ± 0,27** | 5,35 ± 0,14** | 0,64 ± 0,04** |

*Відмінності статистично значущі щодо показників інтактного контролю ($P < 0,05$).

**Відмінності статистично значущі щодо показників контрольної патології ($P < 0,05$).

#Відмінності статистично значущі щодо показників групи Імудон® ($P < 0,05$).

Застосування Респіброну® протягом 30 діб сприяло зниженню активності процесів перекисного окиснення ліпідів, про що свідчило зниження вмісту ДК та ТБК-АП до рівня інтактних тварин. Поряд із цим відбувалося підвищення вмісту ВГ та активності каталази у гомогенаті тканин ясен, що вказує на відновлення антиоксидантного захисту. Підтвердженням наведених припущень слугує нормалізація антиоксидантно-прооксидантного індексу, який дорівнював майже 1 у цій групі – 0,9 і був статистично значуще вищим за такий у групі Імудону® (див. таблицю).

Застосування Імудону® в умовах експериментального пародонтиту чинило захисний вплив на пародонт, що позначилося зменшенням активності процесів ПОЛ зі статистично значущою розбіжністю від значень тварин з контрольної патології. На тлі застосування Імудону® вірогідно зменшувався вміст ДК та ТБК-АП у гомогенаті ясен, проте показник ТБК-АП не досягав значень інтактного контролю. Поряд із цим підвищувався первинний глутатіоновий захист (за вмістом ВГ у гомогенаті ясен) і активність ферментної ланки АОЗ (за вмістом каталази). Отримана динаміка досліджуваних показників свідчить про відновлення балансу в системі ПОЛ/АОЗ, але у значно меншому ступені, ніж під дією Респіброну®, про що свідчить статистично значуще менший показник антиоксидантно-прооксидантного індексу, який дорівнював 0,64 проти 0,9 у групі тварин, яким вводили Респіброн® (див. таблицю).

Таким чином, у патогенезі пародонтиту істотну роль відіграє активізація процесів перекисного окиснення ліпідів і порушення механізмів антиоксидантного захисту. Застосування Респіброну® сприяє нормалізації антиоксидантно-прооксидантного індексу при пародонтиті і є перспективним засобом для його лікування.

Отже, на підставі отриманих даних можна дійти висновку, що на відміну від препарату порівняння Імудона®, введення Респіброну® протягом 30 діб суттєво знижує вираженість запального процесу в щурів з експериментальним пародонтитом.

Висновки. 1. Доведено, що до кінця 90-денного терміну спостереження перебігу експериментального пародонтиту потужність природних компенсаторних механізмів набула стану декомпенсації, що проявлялося високим коефіцієнтом оксидативного стресу на місцевому рівні в гомогенаті тканини ясен контрольної патології групи тварин. 2. Достовірно встановлено потужний коригувальний вплив препаратів з бактеріальних лізатів Респіброн® та Імудон® за показником коефіцієнта red/ox-балансу оксидативного стресу на моделі хронічного експериментального пародонтиту. Інгібіторний вплив обумовлений

запобіганням структурної дестабілізації клітинних мембран пародонта, зумовленої гіперактивацією ПОЛ та захистом ендogenous компонентів АОЗ (Кат і ВГ). 3. Терапевтичний ефект Респіброну® (бактеріальний лізат 13 штамів мікроорганізмів) можна оцінити як вираженіший і більш потужний порівняно з Імудоном®.

Отримані результати дають змогу продовжити дослідження перебігу експериментальних пародонтитів з точки зору встановлення механізмів розвитку, захисту, відновлення тканин за умов фармакологічної корекції бактеріальним лізатом Респіброном®.

Конфлікт інтересів немає.

Список літератури

1. Борисенко А. В., Ткаченко А. Г. Стимуляция местных защитных факторов полости рта в комплексном лечении генерализованного пародонтита с использованием препарата Имудон® // Соврем. стоматология. – 2016. – № 3. – С. 57–59.
2. Даренская М. А., Гребенкина Л. А., Мокренко Е. В. и др. Коррекция метаболических нарушений при воспалительных заболеваниях пародонта у крыс с помощью иммуномодулятора // Соврем. проблемы науки и образования. – 2019. – № 2. – <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28742> (дата обращения: 06.12.2020).
3. Дослідження пероксидної оксидції ліпідів та антиоксидантного захисту організму в клінічній практиці (методичні рекомендації). – Львів, 2002. – 20 с.
4. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
5. Стальная И. Д., Горишвили Т. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Соврем. методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
6. Шабанов П. Д., Мокренко Е. В. Состояние оксидативного статуса крови и тканей при воспалительно-дегенеративных поражениях мягких тканей пародонта у крыс после применения зубных паст и их отдельных компонентов // Мед. академ. журн. – 2017. – Вып. 15, № 2. – С. 55–61.
7. Bhattarai G., Poudel S. B., Kook S. H., Lee G. S. Anti-inflammatory, anti-osteoclastic, and antioxidant activities of genistein protect against alveolar bone loss and periodontal tissue degradation in a mouse model of periodontitis // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2017. – Vol. 105, N 9. – P. 2510–2521.
8. Graziani F., Cei S., Tonetti M. et al. Systemic inflammation following non-surgical and surgical periodontal therapy // J. Clin. Periodontol. – 2018. – Vol. 37, N 9. – P. 848–854.
9. Hienz S. A., Paliwal S., Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis // J. of Immunol. research. – 2017. – № 10. – <https://doi.org/10.1155/2015/615486>
10. Tóthová L., Celec P. Oxidative Stress and Antioxidants in the Diagnosis and Therapy of Periodontitis // Front Physiol. – 2017. – Vol. 14, N 8. – P. 1055. – doi: 10.3389/fphys.2017.01055. eCollection 2017
1. Borisenko A. V., Tkachenko A. G. Stimulyaciya mestnyh zashchitnyh faktorov polosti rta v kompleksnom lechenii generalizovannogo parodontita s ispol'zovaniem preparata Imudon® // Sovrem. stomatologiya. – 2016. – № 3. – P. 57–59.
2. Darenskaya M. A., Grebenkina L. A., Mokrenko E. V. i dr. Korrekciya metabolicheskikh narushenij pri vospalitel'nyh zabolevaniyah parodonta u krys s pomoshch'yu immunomodulyatora // Sovrem. problemy nauki i obrazovaniya. – 2019. – № 2. – <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28742> (data obrashcheniya: 06.12.2020).
3. Doslidzhennya peroksidnoï oksidacii lipidiv ta antioksidantnogo zahistu organizmu v klinichnij praktici (metodichni rekomendacii). – L'viv, 2002. – 20 p.
4. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Majorova I. G., Tokarev V. E. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy // Lab. delo. – 1988. – № 1. – P. 16–19.
5. Stal'naya I. D., Gorishvili T. D. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoj kisloty // Sovrem. metody v biokhimii. – M.: Medicina, 1977. – P. 66–68.
6. Shabanov P. D., Mokrenko E. V. Sostoyanie oksidativnogo statusa krovi i tkanej pri vospalitel'no-degenerativnyh porazheniyah myagkih tkanej parodonta u krys posle primeneniya zubnyh past i ih ot-del'nyh komponentov // Med. akadem. zhurn. – 2017. – Vyp. 15, № 2. – P. 55–61.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИЗАТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ У КРЫС

М. С. Євтушенко, Е. Ю. Кошова,
С. І. Крыжная, Т. І. Тюпка (Харьков)

Проведён один из этапов патофизиологического исследования прооксидантно-антиоксидантного состояния по показателю окислительного стресса слизистой оболочки ротовой полости у крыс с экспериментальным пародонтитом и фармакологической коррекции бактериальным лизатом. Воспроизведение пародонтита достоверно приводило к высокой степени нарушения системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ), коэффициент red/ox -баланса. Доказано, что к концу 90-дневного срока наблюдения течения пародонтита, мощность природных компенсаторных механизмов приобрела состояния декомпенсации, что проявлялось высоким коэффициентом red/ox -баланса, угнетением функциональной активности как неферментативной, так и ферментативной звеньев АОЗ в гомогенате ткани дёсен контрольной патологии животных: $K(\text{ПОЛ}/\text{АОЗ}) = 0,39$, у интактных животных $= 1$. Применение Респиброн® в течение 30 сут способствовало нормализации антиоксидантной-прооксидантного индекса, равный в этой группе 0,9 и был статистически значимо высшим за такой в группе Имудон® (0,64). Полученные результаты позволяют продолжить исследования течения экспериментальных пародонтитов с точки зрения установления механизмов развития, защиты, восстановления тканей в условиях фармакологической коррекции бактериальным лизатом Респиброн®.

Ключевые слова: пародонтит; перекисное окисление липидов; антиоксидантная защита; коэффициент red/ox -баланса; Респиброн®.

STUDY OF THE INFLUENCE OF BACTERIAL LYSATE ON OXIDATIVE STRESS INDICATORS IN EXPERIMENTAL PERIODONTITIS IN RATS

М. С. Ievtushenko¹, О. Yu. Koshova²,
S. I. Kryzhna¹, T. I. Tyupka³ (Kharkiv, Ukraine)

¹Kharkiv Academy of Postgraduate Education;

²Kharkiv National Pharmaceutical University; ³Kharkiv Medical University

One of the stages of the pathophysiological study of the prooxidant-antioxidant state in terms of oxidative stress of the oral mucosa in rats with experimental periodontitis and pharmacological correction with bacterial lysate was carried out. Reproduction of periodontitis reliably led to a high degree of impairment of the lipid peroxidation (LPO) and antioxidant system (AOS), the red/ox -balance coefficient. It was proved that by the end of the 90-day period of observation of the course of periodontitis, the power of natural compensatory mechanisms acquired a state of decompensation, which was manifested by a high red/ox -balance ratio, inhibition of the functional activity of both non-enzymatic and enzymatic AOS links in the homogenate of gum tissue of control animal pathology: $K(\text{LPO}/\text{AOS}) = 0.39$, in intact animals $= 1$. The use of Respibron® for 30 days contributed to the normalization of the antioxidant-prooxidant index, equal to 0.9 in this group and was statistically significantly higher than that in the Imudon group (0.64). The results obtained make it possible to continue studies of the course of experimental periodontitis from the point of view of establishing the mechanisms of development, protection, and restoration of tissues under conditions of pharmacological correction with the bacterial lysate Respibron®.

Key words: periodontitis; lipid peroxidation (LPO); antioxidant system (AOS); red/ox -balance ratio; Respibron®.