

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

DOI 10.35220/2078-8916-2019-33-3-2-7

УДК 591.4:616.314-089.23(048)+611.08

**О. В. Павленко, д. мед. н.,  
А.С. Опанасюк, \*В.В. Гаргін**

Національна медична академія післядипломної освіти  
імені П.Л.Шупика

\*Харківський національний медичний університет

**МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ  
КІСТКОВИХ СТРУКТУР  
ПРИ ПРОВЕДЕННІ ОРТОДОНТИЧНОЇ  
ЕКСТРУЗІЇ ЗУБІВ В УМОВАХ  
ЕКСПЕРИМЕНТУ**

**Мета дослідження.** Вивчення стану кісткової тканини при ортодонтичній екструзії зубів шляхом спрямованої остеорегенерації дугою 0,016 NiTi.

**Матеріал і методи дослідження.** Матеріалом для морфологічного дослідження служили кісткові тканини щелеп тварин (кролі-самці голландської породи у віці 16-18 місяців). Вибір кролів цього віку зумовлений тим, що в цьому віці перестають функціонувати клітини, які викликають постійний ріст зубів. Всього нами було використано 10 тварин. Для проведення ортодонтичної екструзії ми використали відповідну схему і термін екструзії складав 6 тижнів.

Після закінчення цього терміну тварин виводили з експерименту, тканини пародонту і кісткові тканини фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну на 72 години, після чого впродовж 24 годин зразки тканини промивали в проточній воді.

**Результати досліджень та їх обговорення.** При гістологічному дослідженні мікропрепаратів було встановлено, що лунка видаленого зуба не заповнена кістковою тканиною. При дослідженні препаратів даної досліджуваної групи виявляється, що маргінальні і альвеолярні ясна покриті багатошаровим плоским зроговілим епітелієм та відзначається невиражене потовщення рогового шару на тлі тенденції до потоншення шипуватого і зернистого шарів.

При гістологічному дослідженні матеріалів виявлено, що кісткова тканина представлена кортикальною пластинкою і губчастою кісткою. Міжбалочний простір заповнений ретикулярною стромою без вогнищ кровотворення і з ділянками грубоволокнистої неоформленої сполучної тканини. Кортикальна пластинка з добре вираженими заверсовими каналами представлена пластинчастою кістковою тканиною.

**Висновки.** Нами було встановлено і морфологічно підтверджено, що проведення направленої остеорегенерації з використанням дуги NiTi 0,016 не веде до повного заповнення кістковою тканиною лунки видаленого зуба.

Встановлено, що додатковим ушкоджуючим фактором при цьому є розвиток гіпоксії тканин, про що свідчить наявність зон ішемії в навколишніх м'яких

тканинах, аж до розвитку склеротичних змін власної пластинки слизової оболонки.

**Ключові слова:** кісткові тканини, ортодонтична екструзія, тварини.

**А.В. Павленко, А.С. Опанасюк, \*В. В. Гаргін**

Национальная медицинская академия  
последипломного образования имени П. Л. Шупика

\*Харьковский национальный медицинский  
университет

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
КОСТНЫХ СТРУКТУР ПРИ ПРОВЕДЕНИИ  
ОРТОДОНТИЧЕСКОЙ ЭКСТРУЗИИ ЗУБОВ  
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

**Цель исследования.** Изучение состояния костной ткани при ортодонтической экструзии зубов путем направленной остеорегенерации дугой 0,016 NiTi.

**Материал и методы исследования.** Материалом для морфологического исследования служили костные ткани челюстей животных (кролики-самцы голландской породы в возрасте 16-18 месяцев). Выбор кроликов данного возраста обусловлен тем, что в этом возрасте перестают функционировать клетки, которые вызывают постоянный рост зубов. Всего нами было использовано 10 животных. Для проведения ортодонтической экструзии мы использовали соответствующую схему, и срок экструзии составлял 6 недель.

После окончания этого срока животных выводили из эксперимента, ткани пародонта и костные ткани фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина на 72 часа, после чего в течение 24 часов образцы ткани промывали в проточной воде.

**Результаты исследований и их обсуждение.** При гистологическом исследовании микропрепаратом было установлено, что лунка удаленного зуба заполнена костной тканью. При исследовании препаратов данной исследуемой группы выявляется, что маргинальные и альвеолярные десны покрыты многослойным плоским ороговым эпителием и отмечается невыраженное утолщение рогового слоя на фоне тенденции к утончению шиповатого и зернистого слоев.

При гистологическом исследовании материалов выявлено, что костная ткань представлена кортикальной пластинкой и губчатой костью. Межбалочное пространство заполнено ретикулярной стромой без очагов кровотворения и с участками грубоволокнистой неоформленной соединительной ткани. Кортикальная пластинка с хорошо выраженными заверсовыми каналами представлена пластинчатой костной тканью.

**Выводы.** Нами было установлено и морфологически подтверждено, что проведение направленной остеорегенерации с использованием дуги NiTi 0,016 не ведет к полному заполнению костной тканью лунки

удаленого зуба.

*Установлено, что дополнительным повреждающим фактором при этом является развитие гипоксии тканей, о чем свидетельствует наличие зон ишемии в окружающих мягких тканях, вплоть до развития склеротических изменений собственной пластинки слизистой оболочки.*

**Ключевые слова:** костные ткани, ортодонтическая экструзия, животные.

**O. V. Pavlenko, A.S. Opanasjuk, V.V. Gargin**

P. L. Shupik national medical Academy of postgraduate education

\*Kharkiv national medical University

### **MORPHOLOGICAL STUDIES OF BONE STRUCTURES DURING ORTHODONTIC EXTRUSION OF TEETH IN EXPERIMENTAL CONDITIONS**

#### **ABSTRACT**

**Purpose of research.** *To study the state of bone tissue in orthodontic extrusion of teeth by directed osteoregeneration arc 0,016 NiTi.*

**Material and methods.** *Bone tissues of jaws of animals (rabbits-males of the Dutch breed at the age of 16-18 months) served as a material for morphological research. The choice of rabbits of this age is due to the fact that at this age the cells that cause the constant growth of teeth cease to function. In total we used 10 animals. For orthodontic extrusion, we used the appropriate scheme and the extrusion period was 6 weeks.*

*After this period, the animals were withdrawn from the experiment, periodontal tissue and bone tissue were fixed in a 10% solution of neutral formalin for 72 hours, after which the tissue samples were washed in running water for 24 hours.*

**Research results and their discussion.** *Histological examination of micropreparations revealed that the hole of the removed tooth is filled with bone tissue. In the study of drugs of this study group revealed that the marginal and alveolar gums are covered with a multilayer flat keratinized epithelium and there is an unexpressed thickening of the stratum corneum against the background of a tendency to thin the spiny and granular layers.*

*Histological examination of the materials revealed that the bone tissue is represented by the cortical plate and spongy bone. The interstitial space is filled with a reticular stroma without foci of hematopoiesis and with areas of coarse-fibrous unformed connective tissue. Cortical bone with pronounced gaversoviyh channels presented lamellar bone tissue.*

**Summary.** *We have established and morphologically confirmed that the guided osteoregeneration using the arc NiTi 0,016 does not lead to a complete filling of the bone tissue of the hole of the removed tooth.*

*It was found that an additional damaging factor in this case is the development of tissue hypoxia, as evidenced by the presence of ischemic zones in the surrounding soft tissues, up to the development of sclerotic changes in the mucosal lamina proper.*

**Key words:** bone tissue, orthodontic extrusion, animals.

Принцип спрямованої регенерації кісткової тканини із застосуванням мембранної техніки був успішно використаний в клінічній імплантології для попереднього збільшення обсягу атрофованої альвеолярної кістки [130-131].

На теперішній час робота по удосконаленню методу збільшення обсягу кісткової тканини при атрофії альвеолярного відростка триває, про що свідчать численні публікації [1-5].

Проте не лише хірургічної підготовки потребує дентальна імплантація. При видаленні зуба фізіологічне навантаження на пародонт більш не надається, що призводить до резорбції альвеол, в більшості випадків викликає руйнування вестибулярної стінки альвеоли.

Багато авторів пропонували свої варіанти усунення або мінімізації можливості виникнення резорбції після видалення зуба. Метод Socket Preservation – всебічно вивчений і широко застосований метод запобігання процесів резорбції. Однак збереження кістки при цьому абсолютно не гарантовано [6-7]. Завдяки методам аугментації досягаються заздалегідь прогнозовані і довговічні клінічні результати [8].

Ортодонтична екструзія зубів з дефектами пародонту є ефективним рішенням, оскільки на сьогоднішній день видатні успіхи в стоматологічній імплантології повинні бути не тільки з точки зору довговічності остеointegraції, а й з естетичної точки зору. Ортодонтична екструзія – не нова процедура [9]: існує багато клінічних випадків з різцями верхньої щелепи, що не підлягають відновленню, для яких за допомогою повільної ортодонтичної екструзії були досягнуті оптимальні естетично-реставраційні результати. Нарощування кісткового ложа за допомогою ортодонтичної екструзії потребує розуміння багатьох важливих понять і принципів як ортодонтії, так і пародонтології.

**Мета нашого дослідження.** Вивчення стану кісткової тканини при ортодонтичній екструзії зубів шляхом спрямованої остеорегенерації дугою 0,016 NiTi.

**Матеріал і методи дослідження.** Матеріалом для морфологічного дослідження служили кісткові тканини щелеп тварин (кролі-самці голландської породи у віці 16-18 місяців). Вибір кролів цього віку зумовлений тим, що в цьому віці перестають функціонувати клітини, які викликають постійний ріст зубів. Всього нами було використано 10 тварин.

Для проведення ортодонтичної екструзії ми використали наступну схему:

1. Брекеті фіксувалися на верхні різці (система Roth)
2. Для фіксації кінців дуги встановлювалися мікроімпланти .

3. Дуга NiTi 0,016 дюйма
  4. Швидкість витягування 1 мм на тиждень
  5. Видалення зубу
- Термін екструзії склав 6 тижнів.

Після закінчення цього терміну тварин виводили з експерименту тканини пародонту і кісткові тканини фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну на 72 години, після чого впродовж 24 годин зразки тканини промивали в проточній воді. Після декальцинування в оцтовій кислоті, ущільнення тканин шляхом проводили через спирти в концентрації, що збільшується, целоїдин, хлороформ і заливали в парафін. Після рутинної проводки виготовляли зрізи завтовшки  $5 \times 10^{-6}$  м, які забарвлювали гематоксином і еозином, по ван Гизону, пентахромної забарвленням Мовата, по Маллори, по Рего (рис. 1). Забарвлення гематоксином і еозином використовується в науковій і практичній діяльності для вивчення гістологічних особливостей об'єкту, що вивчається, і дозволяє їх характеризувати з точки зору якісного і кількісного клітинного складу, волокон судин, кісткових співвідношень клітинних елементів і неклітинних структур матеріалу [10-12]. Отримані мікропрепарати вивчали на мікроскопі "Olympus BX - 41" з об'єктивами x4, x100, x200, x400 і з подальшою обробкою програмою "Olympus DP - soft version 3.2" за допомогою якої виконували морфометричне дослідження.

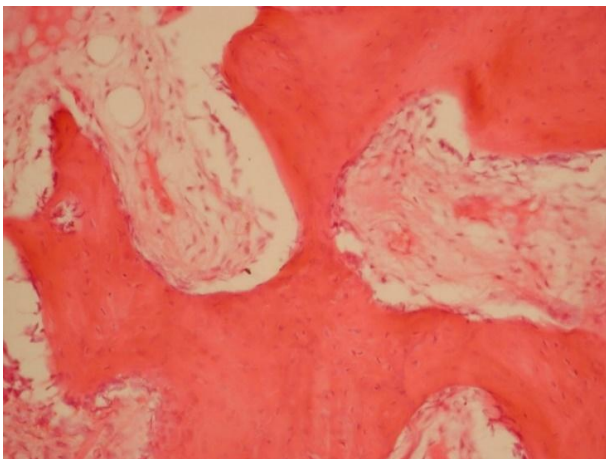


Рис. 1. Кісткова тканина. Забарвлення гематоксином і еозином, збільшення x200.

#### **Результати досліджень та їх обговорення.**

При гістологічному дослідженні мікропрепаратів було встановлено, що лунка видаленого зуба не заповнена кістковою тканиною.

При дослідженні препаратів даної досліджуваної групи виявляється, що маргінальні і альвеолярні ясна покриті багатошаровим плоским зроговілим епітелієм та відзначається невиражене потовщення рогового шару на тлі тенденції до потоншення шипуватого і зернистого шарів. Зве-

ртають на себе увагу ознаки проліферації кліток базального шару, про що свідчить поява виражених акантотичних тяжів (рис.2).

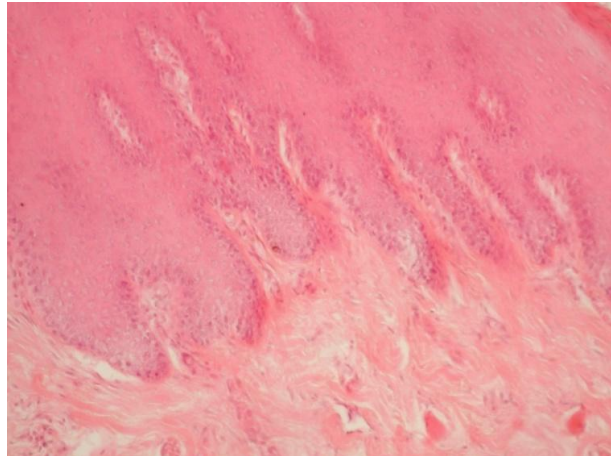


Рис. 2. Епітелій і власна пластинка слизової оболонки. Забарвлення гематоксином і еозином, збільшення x200.

У цитоплазмі епітеліоцитів зернистого шару виявляються багаточисельні зерна кератогиаліну, які зливаються між собою. На наш погляд, це є наслідком застосування дуги NiTi 0,016, що привело до розвитку гіпоксичних процесів, про що свідчить наявність полів чорнуватого фарбування при вивченні препаратів забарвлених по Рего (рис. 3). При цьому, як правило, інтенсивність гіпоксії (чорніші зони) та ступінь вираженості акантозу характеризуються паралельними змінами.



Рис. 3. Епітелій і власна пластинка слизової оболонки. Наявність зон ішемії анатомічно відповідних акантотичним тяжам, що формуються. Паралелізм в розвитку гіпоксії і розвитку акантозу. Забарвлення по Рего, збільшення x200.

Такі ж ділянки (чорнуватого фарбування відповідні зонам ішемії) виявляються і у власній пластинці слизової оболонки і навіть в м'язовому шарі слизової оболонки, при тому, що судини розташовані довкола м'язових волокон повнокровні, про що свідчить фарбування множинних еритроцитів в просвіті судин на мікрофотографії розташованій нижче. В цілому, власній пластинці слизової оболонки виявляються ознаки невираженого набряку, помірно виражений склероз, вогнища розпушування волокнистих структур.

При гістологічному дослідженні матеріалів виявлено, що кісткова тканина представлена ко-



ртикальною пластинкою і губчастою кісткою. Міжбалочний простір заповнений ретикулярною стромою без вогнищ кровотворення і з ділянками грубоволокнистої неоформленої сполучної тканини. Кортикальна пластинка з добре вираженими гаверсовими каналами представлена пластинчастою кістковою тканиною (рис. 4).

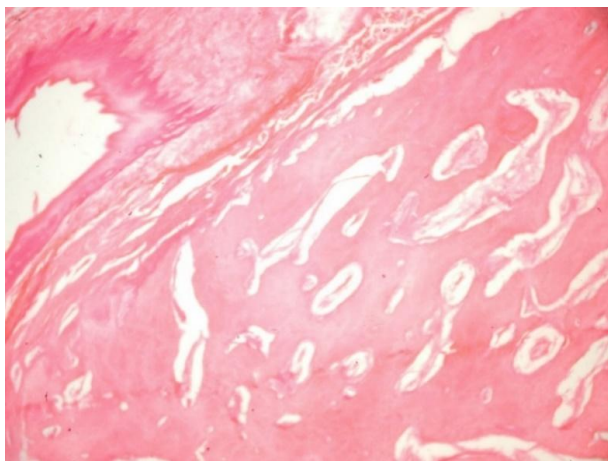


Рис. 4. Кісткова тканина. Кісткова тканина представлена кортикальною пластинкою і губчастою кістю. Забарвлення гематоксиліном і еозином, збільшення x200.

Лакуни остеоцитів часто не містять клітин, частково порожні. Забарвлення по Маллорі, пентахромна реакція виявляють наростаючу осередкову щільність колагену в матриксі з ділянками дезорганізації.

Губчаста речовина представлена пластинчастою кістковою тканиною, з наявністю в трабекулі гаверсових каналів, остеонна структура згладжена або несформована. Кісткова речовина частини трабекул представлена неоднорідним кістковим матриксом з щілинами і розшаруваннями кісткової речовини, особливо в безкліткових ділянках. Поверхнева тканина представлена сполучною тканиною з помірною кількістю клітин, наявністю осередкових скупчень лімфоцитів. Об'єм волокнистої тканини істотно перевищував третину всієї тканини, представлена в отриманих зразках. У зонах, прилеглих до стінок лунки, виявляється схильність до утворення однонаправлених ниток, нагадують періодонтальні волокна (рис. 5).

Регенеруюча кісткова тканина представлена переважно ділянками незрілого кісткового регенерату, що складається з потовщених кісткових балок, первинних кісткових балок. На їх поверхні виявляється велика кількість активних остеобластів. Кількість остеокластів також велика. Для більш глибоко розташованих від поверхні кісткових балок характерний зріліший склад, наявність більшої кількості елементів пластинчастої кісті.

Кортикальна пластинка не оформлена. Трабекули формуючої губчастої речовини також неоднорідні, місцями потовщені. Міжбалочний простір заповнений волокнами сполучної тканини. Часто в препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, ця тканина складається переважно з незрілих волокон сполучної тканини регенераторного типу (рис. 6). У більш поверхневих шарах виявляється гістологічна будова, яка відповідає явищам фіброзу.

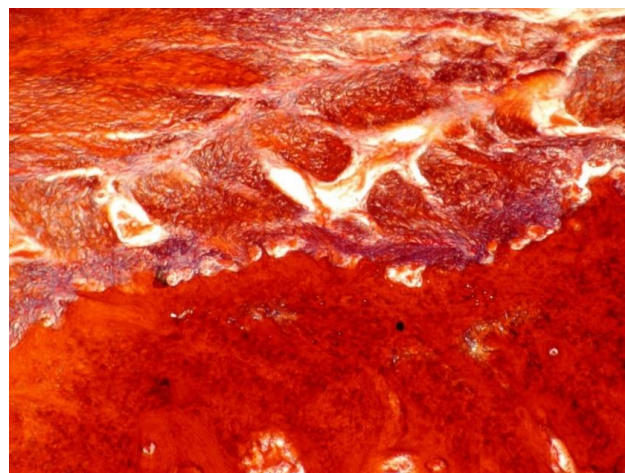


Рис. 5. Кісткова тканина, середня зона лунки зуба. Губчастий тип будови кісті. Однонаправлене розташування пучків сполучно-тканинних волокон в зоні прилягання до стінки лунки. Формування зв'язко-подібних пучків. Забарвлення по Маллорі, збільшення x100.

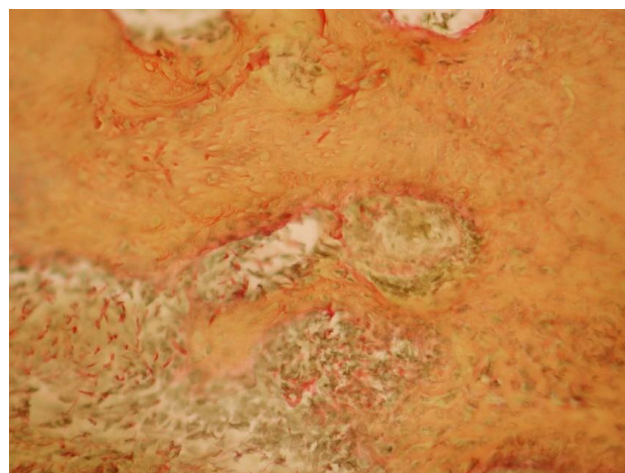


Рис. 6. Кісткова тканина. Наявність сполучно-тканинних волокон різної міри зрілості. Наявність в міжбалочному просторі незрілих волокон сполучної тканини як пучкового, так і різноспрямованого розташування. Забарвлення по Маллорі, збільшення x200.

Звертає на себе увагу наявність в остеобластах довгих цитоплазматичних відростків, що також говорить про їх активний функціональний стан, зокрема про активний синтез органічного матриксу. Формування лакун що містять зрілі кісткові клітки також пов'язано з цим процесом. Велике збільшення дозволяє виявити з'єднання

кліток один з одним завдяки відросткам не дивлячись на проведену декальцинацію. Таким чином, оточені кістковим матриксом і сполучені між собою цитоплазматичні відростки утворюють систему кісткових каналців що виявляються при фарбуванні по Маллорі (рис. 7).

Основним клітинним елементом, що характеризує стан кісткової структури є остеоцити.



Рис. 7. Кісткова тканина, середня зона лунки зуба. Наявність міжклітинних відростків. Формування системи кісткових каналців. Велика кількість остеобластів на поверхні кісткової балки. Забарвлення по Маллорі, збільшення x200.

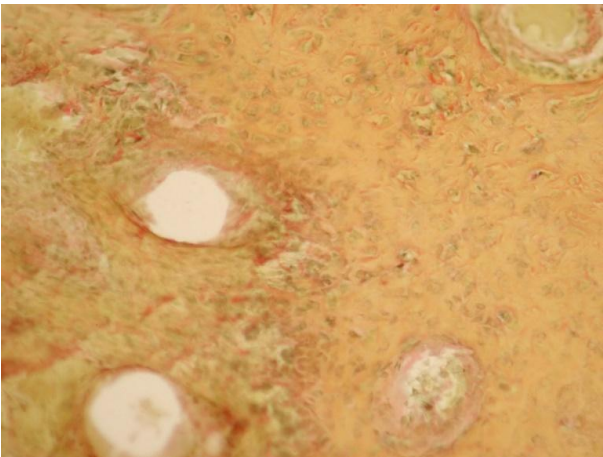


Рис. 8. Кісткова тканина. Невелика кількість зрілих остеоцитів. Наявність кісткових лакун що повторюють контури остеоциту. Забарвлення по ван Гізону, збільшення x200.

Слід зазначити, що в мікропрепаратах на поверхні кісткових перетинок (рис. 8) виявляється чимала кількість остеокластів (остеокластоцитів) і, як наслідок, процеси кісткової резорбції в даній групі більш виражені. Така картина також свідчить про продовження активного ремоделювання остеорегенерації.

Серед остеоцитів зустрічаються як сформовані, так і не сформовані клітини. Частково спостерігається процес їх занурення в кісткові лакунки. При цьому інтенсивність фарбування зрізів пентахромною реакцією свідчить про підвищені

обмінні процеси і формування основних тяжів кісткової грубоволокнистої тканини. У аморфній речовині виявляються ознаки формування незначних вогнищ лімфо-гістіоцитарної інфільтрації (рис. 9).

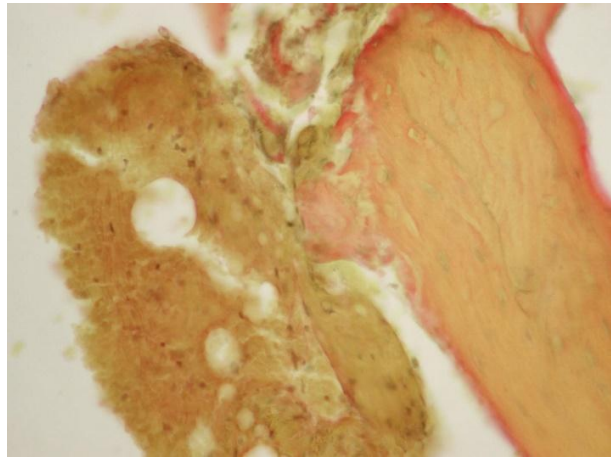


Рис. 9. Кісткова тканина. Добре виражені ознаки остеокластичної резорбції. Кортикальна пластинка, трабекула губчастого речовини. Забарвлення по ван Гізону, збільшення x400.

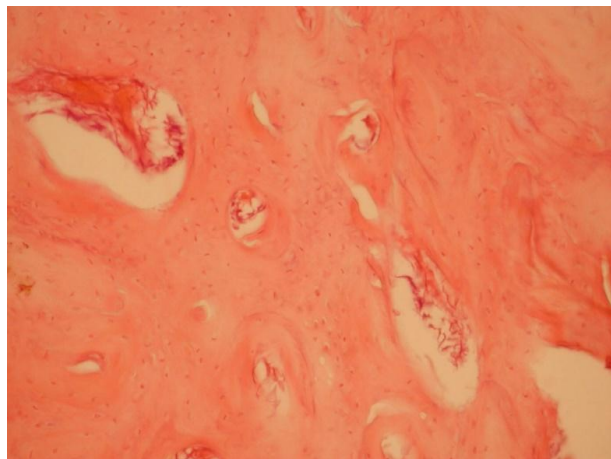


Рис. 10. Кісткова тканина. Губчастий тип будови кістки. Розрідження трабекулярної мережі. Забарвлення гематоксилином і еозином, збільшення x200.

Аналіз результатів морфологічного дослідження показав, що в лунці зуба експериментальних тварин через 42 дні після проведення направленої остеорегенерації дугою NiTi 0,016 спостерігається розрідження трабекулярної мережі, стоншування кісткової трабекули. Це може бути ознакою як наслідків ішемічних пошкоджень, так і наслідків модуляції регенераторного процесу.

При цьому стверджувати про пригнічення процесів кісткоутворення не можна, оскільки питома вага активних клітинних елементів досить висока. У препаратах часто зустрічається одиничні короткі трабекули із сліпими закінченнями. При цьому поперечна едальна трабекула, практично, відсутня. Має місце розрідження трабекулярної мережі, що супроводиться формуванням



довгої кісткової трабекули без поперечної єднальної трабекули. Частина трабекули стоншена, аж до появи переривистих «ниткоподібних», що відображає активізацію процесів кісткової резорбції у тварин на тлі зниження проведеної модуляції (рис. 10).

Остеоцити, що знаходяться на поверхні кістки, оточені лакунами з нечіткими контурами, мають великі, базофільні забарвлені ядра. Окремі клітини невеликого розміру, містять щільні ядра і знаходяться в розширених лакунах з базофільними краями, що може бути ознакою порушення мінералізації і кальцифікації стінок лакун. Щільність остеоцитів досить висока, проте, вони характеризуються нерівномірним розподілом в матриці і варіабельністю розмірів. У лакунах остеоцитів спостерігається утворення вакуолей, внаслідок чого клітки набувають зірчастої форми.

Таким чином, нами було встановлено і морфологічно підтверджено, що проведення направленої остеорегенерації з використанням дуги NiTi 0,016 не веде до повного заповнення кістковою тканиною лунки видаленого зуба. Незважаючи на те, що процес регенерації кісткової тканини відбувається за класичною схемою (відкладення остеїду, остеобластична проліферація, остеокластична резорбція кісткового матриксу), однак спостерігається уповільнення процесів регенерації, яке характеризується відсутністю результату через 6 тижнів (кісткова тканина незріла і в ній продовжують йти процеси модуляції). Встановлено, що до закінчення цього терміну для регенерату характерний сітчастий тип будови кісткової тканини, тобто потрібно більш тривалий ретенційний період. Встановлено, що додатковим ушкоджуючим фактором при цьому є розвиток гіпоксії тканин, про що свідчить наявність зон ішемії в навколишніх м'яких тканинах, аж до розвитку склеротичних змін власної пластинки слизової оболонки.

### Список літератури

1. Efficacy and predictability of short dental implants (<8mm): a critical appraisal of the recent literature / M. Srinivasan, L. Varquez, P.Rieder [et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implant.* – 2012. – №27. – P. 1429-1437.
2. **Steenberghe D.** The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation / D. Steenberghe, A. Callens, L. Geers // *Clin. Oral Implants Res.* – 2000. – V.1, №2. – P. 171-178.
3. **Pye A. D.** A review of dental implants and infection/ A. D. Pye, D. E. Lockhart, M.P. Dawson // *J Hosp Infect.* – 2009. – №2(72). – P. 104-10.
4. Хабкек Д. Руководство по дентальной имплантологии / Д. Хабкек, Р. Уотсон, А. Сизн // М: Медпресс-инфо.: – 2010. – 224 с.
5. **Ушаков А. И.** Планирование дентальной имплантации при дефиците костной ткани и профилактика

операционных рисков / А. И. Ушаков, Н. С. Серова, А. В. Даян // *Стоматология.* – 2012. – № 1. – С. 48-53.

6. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes / V. Lekovic [et al.] // *Journal of Periodontology.* – 1998. – №9(69). – P. 1044-1049.
7. Socket Augmentation: Rationale and Technique / Hom-Lay Wang. [et al.] // *Implant Dentistry.* – 2004. – № 4 (13). – P. 286-296.
8. Changes in alveolar bone height and width following ridge augmentation using bone graft and membranes / B.J. Simon [et al.] // *Journal of Periodontology.* – 2000. – №11 (71). – P. 1774-1791.
9. Implant site development by orthodontic extrusion: a systematic review / M. Korayem, C. Flores-Mir, U. Nassar [et al.] // *Angle Orthod.* – 2008. – № 78. – P. 752 – 760.
10. **Саркисов Д. С.** Микроскопична техніка: Керівництво. / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М: Медицина. – 1996. – 544 с.
11. Атлас электронной микроскопии по частной гистологии / [Баринов Э. Ф. и др.]. – Донецк : Изд-во Донецкого медицинского ун-та, 1998. – 271 с.
12. **Шереметьева Г. Ф.** Методы гистологических исследований / Г. Ф. Шереметьева, Е. З. Кочарян. – РАМН, Научный центр хирургии. – М. – 1995. – 38 с.

### REFERENCES

1. **Srinivasan M, Varquez L, Rieder P et al.** Efficacy and predictability of short dental implants (<8mm): a critical appraisal of the recent literature. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2012;27: 1429-1437.
2. **Steenberghe D, Callens A, Geers L.** The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin. Oral Implants Res.* 2000;1(2):171-178.
3. **Pye AD, D. Lockhart E, Dawson MP.** A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect.* 2009;2(72): 104-10.
4. **Khabkek D, Uotson R, Sizn A.** *Rukovodstvo po dentalnoj impantologii* [Guide to dental implantology]. M: Medpress-info; 2010:224.
5. **Ushakov A I, Serova N S, Dajan A V.** Planning of dental implantation in case of bone tissue deficiency and prevention of operational risks. *Stomatologija.* 2012;1:48-53.
6. **Lekovic V et al.** Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *Journal of Periodontology.* 1998;9(69):1044-1049.
7. **Hom-Lay Wang et al.** Socket Augmentation: Rationale and Technique. *Implant Dentistry.* 2004;4(13):286-296.
8. **Simon BJ et al.** Changes in alveolar bone height and width following ridge augmentation using bone graft and membranes. *Journal of Periodontology.* 2000;11(71):1774-1791.
9. **Korayem M, Flores-Mir C, Nassar U et al.** Implant site development by orthodontic extrusion: a systematic review. *Angle Orthod.* 2008;78:752 – 760.
10. **Sarkysov DS, Perov JuL.** *Mikroskopichna tehnika: Kerivnyctvo* [Microscopic technique: a Guide]. M: Medycyna;1996: 544.
11. **Barinov Je F. i dr.** *Atlas jelektronnoj mikroskopii po chastnoj gistologii. T. 2.* [Atlas of electron microscopy in private histology. Vol.2.] *Izd-vo Doneckogo medicinskogo universiteta. Doneck;* 1998:271.
12. **Sheremet'eva G F, Kocharjan E Z.** *Metody gistologicheskijh issledovanij* [Methods of histological studies]. RAMN, Nauchnyj centr hirurgii. Moskva; 1995:38.



DOI 10.35220/2078-8916-2019-33-3-8-12

УДК 616.31:615.015:577.16:612.397

**В. М. Батіг, к. мед. н.**

Буковинський державний медичний університет

**ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ ПНЖК «ЛІПОСАН-3» НА СТАН ТКАНИН РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ЩУРІВ В УМОВАХ АВІТАМІНОЗУ F**

**Мета.** Визначити вплив препарату поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) «Ліпосан-3» на стан м'яких тканин порожнини рота щурів в умовах експериментального авітамінозу F.

**Матеріали і методи.** Використовували препарат, який містить приблизно 170 мг/мл ПНЖК, з яких приблизно 100 мг/мл представлені  $\omega$ -3 ПНЖК. Авітаміноз F відтворювали у щурів шляхом їх утримання на полусинтетичному безжировому раціоні (БЖР). Щури 2-ої групи отримували ліпосан - 3 з кормом щоденно в дозі 131 мг на щура (або 1092 мг/кг) у перерахунок на 1 кг ваги. Щури 3-ої групи отримували ліпосан-3 з кормом щоденно в дозі 193 мг (або 1569 мг/кг). У перерахунок на ПНЖК щури 2-ої групи отримували 184,5 мг/кг (у тому числі  $\omega$ -3 ПНЖК 113,6 мг/кг), а щури 3-ої групи отримували 265,2 мг/кг ПНЖК (у тому числі  $\omega$ -3 ПНЖК 163,2 мг/кг).

Щури отримували БЖР і раціони з 0,5 та 1,0 % ліпосану протягом 21 дня.

В гомогенатах ясен і СОПР (слизова оболонка щоки) визначали активність еластази, каталази, уреазы, лізоцима і вміст МДА. За співвідношенням каталази і МДА розраховували антиоксидантно - прооксидантний індекс (АПІ), а за співвідношенням уреазы і лізоцима – ступінь дисбіозу.

**Результати.** Уведення ліпосану-3 знижує в яснах щурів активність еластази, а в СОПР вміст МДА (у третій групі), що може свідчити про антизапальну дію ліпосану - 3. Споживання ліпосану-3 трохи знижує активність антиоксидантного фермента каталази, однак не змінює суттєво індекс АПІ. У щурів, які отримували корм з 0,5 % ліпосану-3, спостерігається в яснах зниження активності лізоцима і підвищення ступеня дисбіозу, тоді як у СОПР активність лізоциму підвищується і декілька знижується ступінь дисбіозу.

**Висновки.** Препарат «Ліпосан-3» здійснює протизапальну дію на ясна, однак підвищує в них ступінь дисбіозу. На СОПР ліпосан-3 здійснює мукозопротекторну дію, можливо, за рахунок активації лізоциму.

**Ключові слова:** ПНЖК, ясна, слизова оболонка порожнини рота, запалення, дисбіоз, ліпосан.

**В. М. Батіг**

Буковинський державний медичний університет

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ПНЖК «ЛИПОСАН-3» НА СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ КРЫС В УСЛОВИЯХ АВИТАМИНОЗА F**

**Цель.** Определить влияние препарата полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) «Липосан-3» на состояние мягких тканей полости рта крыс в условиях экспериментального авитаминоза F.

**Материалы и методы.** Использовали препарат, содержащий около 170 мг/мл ПНЖК, из которых около 100 мг/мл представлены  $\omega$ -3 ПНЖК. Авитаминоз F воспроизводили у крыс путем их содержания на полусинтетическом безжировом рационе (БЖР). Крысы 2-й группы получали липосан-3 с кормом ежедневно в дозе 131 мг на крысу (или 1092 мг/кг) в пересчете на 1 кг веса. Крысы 3-й группы получали липосан-3 с кормом ежедневно в дозе 193 мг (или 1569 мг/кг). В пересчете на ПНЖК крысы 2-й группы получали 184,5 мг/кг (в том числе  $\omega$ -3 ПНЖК 113,6 мг/кг), а крысы 3-й группы получали 265,2 мг/кг ПНЖК (в том числе  $\omega$ -3 ПНЖК 163,2 мг/кг).

Крысы получали БЖР и рационы с 0,5 и 1,0 % липосана в течение 21 дня.

В гомогенатах десны и СОПР (слизистая оболочка щеки) определяли активность эластазы, каталазы, уреазы, лизоцима и содержание МДА. По соотношению каталазы и МДА рассчитывали антиоксидантно - прооксидантный индекс (АПИ), а по соотношению уреазы и лизоцима – степень дисбиоза.

**Результаты.** Ввод в корм липосана-3 снижает в десне крыс активность эластазы, а в СОПР содержание МДА (в третьей группе), что может свидетельствовать об противовоспалительном действии липосана-3. Потребление липосана-3 несколько снижает активность антиоксидантного фермента каталазы, однако не изменяет существенно индекс АПИ. У крыс, получавших корм с 0,5 % липосана-3, наблюдается в десне снижение активности лизоцима и увеличение степени дисбиоза, тогда как в СОПР активность лизоцима увеличивается и несколько снижается степень дисбиоза.

**Выводы.** Препарат «Липосан-3» оказывает противовоспалительное действие на десну, однако увеличивает в ней степень дисбиоза. На СОПР липосан-3 оказывает мукозопротекторное действие, возможно, за счет активации лизоцима.

**Ключевые слова:** ПНЖК, десна, слизистая оболочка полости рта, воспаление, дисбиоз, липосан.

**V. M. Batig**

Bukovinian State University, Chernivtsi

**THE EFFECT OF THE PREPARATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS "LIPOSAN-3" ON THE CONDITION OF THE TISSUES OF THE ORAL CAVITY OF RATS IN CONDITIONS OF AVITAMINOSIS F****ABSTRACT**

**The aim.** Determine the effect of the drug polyunsaturated fatty acids (PUFA) "Liposan-3" on the condition of the soft tissues of the oral cavity of rats under conditions of experimental avitaminosis F.

**The materials and methods.** A preparation containing about 170 mg / ml PUFA was used, of which about

100 mg/ml are  $\omega$ -3 PUFA. Avitaminosis F was reproduced in rats by keeping them on a semi-synthetic fat-free diet (FFD). Rats of the 2nd group received liposan-3 with food daily at a dose of 131 mg per rat (or 1092 mg/kg) in terms of 1 kg of weight. Rats of the 3rd group received liposan-3 with food daily at a dose of 193 mg (or 1569 mg/kg). In terms of PUFA, rats of the 2nd group received 184.5 mg / kg (including  $\omega$ -3 PUFA 113.6 mg / kg), and rats of the 3rd group received 265.2 mg/kg PUFA (including  $\omega$ -3 PUFA 163.2 mg/kg).

Rats received FFD and rations with 0.5 and 1.0 % liposan for 21 days.

The activity of elastase, catalase, urease, lysozyme, and the content of MDA were determined in the homogenates of the gums and the BM (bucal mucosa). The antioxidant-prooxidant index (API) was calculated by the ratio of catalase and MDA, and the degree of dysbiosis by the ratio of urease and lysozyme.

**The findings.** Entering Liposan-3 into the diet reduces elastase activity in the gingiva of rats, and the content of MDA (in the third group) in the BM, which may indicate the anti-inflammatory effect of liposan-3. The consumption of liposan-3 slightly reduces the activity of the antioxidant enzyme catalase, but does not significantly change the API index. In rats fed with 0.5% liposan-3, there is a decrease in lysozyme activity and an increase in the degree of dysbiosis in the gums, whereas in the BM, the activity of lysozyme increases and the degree of dysbiosis decreases slightly.

**The conclusion.** The drug "Liposan-3" has an anti-inflammatory effect on the gum, but it increases the degree of dysbiosis. Liposan-3 have a mucoso-protective effect on the BM, possibly due to the activation of lysozyme.

**Key words:** PUFA, gums, bucal mucosa, inflammation, dysbiosis, liposan.

До поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) відносяться вищі жирні кислоти, які мають не менше двох подвійних зв'язків. В організмі людини і більшості тварин до ПНЖК відносяться ліолева (C<sub>18:2</sub>), ліоленова (C<sub>18:3</sub>), арахідонова (C<sub>20:4</sub>), ейкозапентаєнова (C<sub>20:5</sub>) і докозагексаєнова (C<sub>22:6</sub>) кислоти [1].

Одна з важливих функцій ПНЖК – структурна, пов'язана з їх наявністю в складі мембранних ліпідів, особливо в структурі нервових клітин [2, 3].

На жаль, в організмі людини ендogenous біосинтез ПНЖК дуже обмежений [4], що обумовлює необхідність їх обов'язкового введення з їжею, подібно вітамінам. Тому часто ПНЖК називають вітаміном F [5, 6]. Дефіцит ПНЖК в дієті викликає розвиток патологічного стану (авітаміноз F) і це впливає, в першу чергу, на функціональну активність нервової системи [7-10].

Для ПНЖК важливим є положення кінцевого подвійного зв'язку: якщо він знаходиться в 6-му положенні, рахуючи з кінцевої (метильної)

групи, то це  $\omega$ -6 ПНЖК, а якщо він знаходиться в 3-му положенні, то це  $\omega$ -3 ПНЖК.

При пероксидному окисленні  $\omega$ -6 ПНЖК утворюються біологічно активні речовини (ейкозаноїди), які володіють прозапальними, тромбогенними та імуносупресивними активностями. В той же час, при пероксидному окисленні  $\omega$ -3 ПНЖК утворюються ейкозаноїди, які володіють антизапальними, тромболітичними та імуностимулюючою активностями [3, 11].

Вважали, що оптимальним співвідношенням  $\omega$ -6 і  $\omega$ -3 ПНЖК є 4:1 [12], однак останнім часом отримані дані, які свідчать, що для деяких фізіологічних функцій (наприклад, репродуктивної [13]) необхідно мати співвідношення  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ПНЖК менше 4:1 (можливо 1:1).

**Мета нашої роботи.** Дослідження впливу нового препарату ПНЖК «Ліпосан-3» на стан тканин ротової порожнини в умовах авітамінозу F.

**Матеріали і методи дослідження.** Було використано препарат «Ліпосан-3» (співвідношення риб'ячого жиру і катом асу 1:2), виробництва НВА «Одеська біотехнологія» у відповідності до ТУ У 10.8-37420386-002:2015 [14].

Жирнокислотний склад препарату визначали газо-хроматографічним методом [15].

Авітаміноз F викликали у щурів шляхом їх утримання на безжировому полівітамінному раціоні [16].

Досліди було проведено на білих щурах лінії Вістар (самці, 3-4 місяці, початкова жива маса 94-123 г), яких було поділено на 3 рівні групи: 1-а – контроль, отримувала безжировий раціон (БЖР), 2-а – отримувала такий же раціон, але з вмістом 0,5 % препарату «Ліпосан-3» і 3-я група отримувала раціон з вмістом 1 % препарату «Ліпосан-3».

На 22-й день досліду щурів піддавали евтаназії під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) шляхом тотальної кровотечі із серця. Виділяли ясна і слизову оболонку порожнини рота (СОПР). В гомогенаті цих тканин визначали активність еластази [17], каталази [18], уреаз [19], лізоцима [20] та вміст малонового діальдегіда (МДА) [21]. За співвідношенням активності каталази і вмісту МДА розраховували антиоксидантно - прооксидантний індекс АПІ [22], а за співвідношенням відносних активностей уреаз і лізоцима – ступінь дисбіозу за А. П. Левицьким [23].

Результати дослідів піддавали стандартній статистичній обробці [24].

**Результати та їх обговорення.** В таблиці 1 представлено жирнокислотний склад препарату «Ліпосан-3», з якого видно, що вміст ПНЖК становить 16,9 %, з яких 6,5 % представлено  $\omega$ -6 ПНЖК і 10,4 %  $\omega$ -3 ПНЖК. Співвідношення  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ПНЖК дорівнює 0,62.



В таблиці 2 представлено результати визначення рівня біохімічних маркерів запально-дистрофічних процесів, а саме активність еластази та вміст МДА. З цих даних видно, що введен-

ня ліпосану-3 достовірно знижує активність еластази в яснах, а вміст МДА в СОПР, що може свідчити про його антизапальну дію.

Таблиця 1

### Вміст ПНЖК в препараті «Ліпосан-3» (співвідношення риб'ячого жиру і катомасу 1:2)

ПНЖК	Скорочена формула	Вміст, %
1. Лінолева	C <sub>18:2</sub>	6,0
2. Ліноленова	C <sub>18:3</sub>	0,3
3. Арахідонова	C <sub>20:4</sub>	0,5
4. Ейкозапентаєнова	C <sub>20:5</sub>	5,0
5. Докозапентаєнова	C <sub>22:5</sub>	1,0
6. Докозагексаєнова	C <sub>22:6</sub>	4,1
<b>Всього ПНЖК</b>		16,9
Сума ω-6 ПНЖК		6,5
Сума ω-3 ПНЖК		10,4
ω-6/ω-3		0,62

Таблиця 2

### Вплив препарату «Ліпосан-3» на рівень маркерів запалення в яснах і СОПР щурів, які отримували безжировий раціон (БЖР) (n=5 в усіх групах)

Показники	Групи		
	1 – БЖР	2 – +0,5 % ліпосану-3	3 – +1,0 % ліпосану-3
<b>Ясна</b>			
Еластаза, мк-кат/кг	139±12	84±8 p<0,01	93±3 p<0,01
МДА, ммоль/кг	36,5±3,2	39,6±1,7 p>0,3	35,1±1,1 p>0,3
<b>СОПР</b>			
Еластаза, мк-кат/кг	101±5	94±4 p>0,1	109±3 p>0,1
МДА, ммоль/кг	57,5±0,5	59,4±3,2 p>0,3	49,6±2,6 p<0,05

Примітка: p – показник достовірності відмінностей з групою 1 – БЖР.

Таблиця 3

### Вплив препарату «Ліпосан-3» на активність каталази та індекс АПІ в яснах і СОПР щурів, які отримували безжировий раціон (БЖР) (n=5 в усіх групах)

Показники	Групи		
	1 – БЖР	2 – +0,5 % ліпосану-3	3 – +1,0 % ліпосану-3
<b>Ясна</b>			
Каталаза, мкат/кг	8,43±0,56	7,27±0,22 p<0,05	7,78±0,63 p>0,3
АПІ	2,31±0,20	1,84±0,17 p>0,05	2,22±0,21 p>0,5
<b>СОПР</b>			
Каталаза, мкат/кг	7,30±0,31	6,82±0,24 p>0,1	6,55±0,29 p>0,05
АПІ	1,27±0,14	1,15±0,12 p>0,3	1,32±0,11 p>0,3

Примітка: p – показник достовірності відмінностей з групою 1 – БЖР.

В таблиці 3 представлено результати визначення активності антиоксидантного фермента каталази та індекса АПІ. Як видно з цих даних, активність каталази і рівень індекса АПІ мало

змінюється під впливом ліпосану-3, за виключенням активності каталази в яснах щурів, які отримували 0,5 % ліпосану-3 (група 2).

В таблиці 4 представлено результати визна-

чення активності уреазі і лізоцима, а також ступеня дисбіозу. З цих даних видно, що у шурів, які отримували 0,5 % ліпосану-3 вдвічі знижується в яснах активність лізоцима і майже вдвічі

зростає ступінь дисбіозу. В той же час в СОПР активність лізоцима зростає, а ступінь дисбіоза проявляє тенденцію до зниження.

Таблиця 4

**Вплив препарату «Ліпосан-3» на активність уреазі, лізоцима і ступінь дисбіозу в яснах і СОПР шурів, які отримували безжировий раціон (БЖР) (n=5 в усіх групах)**

Показники	Групи		
	1 – БЖР	2 – +0,5 % ліпосану-3	3 – +1,0 % ліпосану-3
<b>Ясна</b>			
Уреаза, мк-кат/кг	0,58±0,04	0,55±0,03 p>0,3	0,69±0,05 p>0,05
Лізоцим, од/кг	86±7	42±9 p<0,05	95±8 p>0,3
Ступінь дисбіозу	1,00±0,15	1,94±0,25 p<0,05	1,08±0,19 p>0,5
<b>СОПР</b>			
Уреаза, мк-кат/кг	0,42±0,03	0,38±0,03 p>0,3	0,42±0,04 p=1
Лізоцим, од/кг	41±2	48±2 p<0,05	47±3 p>0,05
Ступінь дисбіозу	1,00±0,14	0,77±0,20 p>0,3	0,87±0,19 p>0,5

*Примітка:* p – показник достовірності відмінностей з групою 1 – БЖР.

Таким чином, проведені нами дослідження показали здатність препарату ПНЖК «Ліпосан-3» знижувати запалення і не впливати суттєво на стан антиоксидантно-прооксидантних систем і на ендогенну мікробіоту тканин ротової порожнини.

Враховуючи, що ліпосан-3 підвищує в ліпідах печінки і сироватки крові вміст ω-3 ПНЖК і покращує співвідношення ω-6/ω-3 ПНЖК, можна вважати, що «Ліпосан-3» здійснює органопротекторну ефективність за рахунок оптимізації жирнокислотного складу мембранних ліпідів усіх органів, в тому числі і нервової системи.

**Список літератури**

1. **Титов В. Н.** Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина / В. Н. Титов, Д. М. Лисицын. – Тверь: Триада, 2006. – 672 с.
2. **Spector A. A.** Essentiality of fatty acids / A. A. Spector // *Lipids*. – 1999. – 34, suppl. S 1-3. – P. 1-3.
3. **Omega 3 fatty acids:** Biological activity and effects on human health / M. La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo [et al.] // *Panminerva med.* – 2005. – v. 47, № 4. – P. 245-257.
4. **Plourde M.** Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements / M. Plourde, S. C. Cunnane // *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* – 2007. – v. 32, № 4. – P. 619-634.
5. **Алимова Е. К.** Эссенциальные жирные кислоты (витамин F) / Е. К. Алимова, А. Т. Аствацатурьян // В кн.: *Экспериментальная витаминология* (под ред. Островского Ю. М.). – Минск: Наука и техника, 1979. – С. 526-545.
6. **Lees R. S.** Omega-3 fatty Acids in Health and Disease / R. S. Lees, M. Karel. – N. Y.: Basel, 1990. – 240 p.
7. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1β-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats / C. Song, X. Lui, B. E. Leonard [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2003. –

- v. 44, № 10. – P. 1984-1991.
8. Food groups and fatty acids associated with self-reported depression: An analysis from the Australian National Nutrition and Health Surveys / B. J. Meyer, N. Kolanu, D. A. Griffiths [et al.] // *Nutrition*. – 2013. – V. 29, № 7-8. – P. 1042-1047.
9. **Messamore E.** Detection and treatment of omega-3 fatty acid deficiency in psychiatric practice: Rationale and implementation / E. Messamore, R. K. McNamara // *Lipids in Health and Disease*. – 2016. – V. 15, № 25. – P. 1-13.
10. ω-3 fatty acids-supplementary in gestation alleviates neuroinflammation and modulates neurochemistry in rats / M. Tang, R. Dang, S. Liu [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2018. – V. 17, № 247. – P. 1-11.
11. **Serhan C. N.** Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways / C. N. Serhan // *Ann. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 25, № 1. – P. 101-137.
12. Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linolenic acid to α-linolenic acid ration / C. Blank, M. A. Neumann, M. Makrides [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2002. – V. 43. – P. 1537-1543.
13. Effects of different dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid rations on boar reproduction / Y. Lin, X. Cheng, J. Mao [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2016. – V. 15, № 31. – P.1-10.
14. Патент на корисну модель, Україна 108571, МПК А61Р 9/00. Препарат незамінних жирних кислот «Ліпосан» / Левицький А. П., Ходаков І. В., Левицький Ю. А. [та ін.]. – Опубл. 25.07.2016, Бюл. № 14.
15. **Левицький А. П.** Методи исследования жиров и масел / А. П. Левицький, О. А. Макаренко, И. В. Ходаков. – Одесса: КП ОГТ, 2015. – 32 с.
16. **Левицький А. П.** Методи експериментальної стоматології: учебно-методическое пособие / А. П. Левицький, О. А. Макаренко, С. А. Демьяненко. – Симферополь: Тарпан, 2018. – 78 с.
17. **Левицький А. П.** Методи определения активности эластазы и ее ингибиторов: методические рекомендации / А. П. Левицький, А. В. Стефанов. – К.: ГФЦ, 2002. – 15 с.

18. **Гирин С. В.** Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах / С. В. Гирин // Лабораторная диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45-46.

19. **Гаврикова Л. М.** Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // Стоматология. – 1996. – Спец. выпуск. – С. 49-50.

20. **Левицкий А. П.** Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

21. **Стальная И. Д.** Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // В кн.: Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

22. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: методические рекомендации / А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.]. – Одесса: КП ОГТ, 2010. – 16 с.

23. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: методические рекомендации / Левицкий А. П., Макаренко О. А., Селиванская И. А. [и др.]. – К.: ГФЦ, 2007. – 22 с.

24. **Трухачева Н. В.** Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 379 с.

#### REFERENCES

1. **Titov VN, Lisitsyn DM.** *Zhurnye kisloty. Fizicheskaya khimiya, biologiya i meditsyna* [Fat acids. Physical chemistry, biology and medicine]. Tver, Triada, 2006: 672.

2. **Spector AA.** Essentiality of fatty acids. *Lipids*. 1999; 34(S 1-3): 1-3.

3. **Guardia M La, Giammanco S, Majo D Di. et al.** Omega 3 fatty acids: Biological activity and effects on human health. *Panminerva med*. 2005; 47(4):245-257.

4. **Plourde M, Cunnane SC.** Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2007; 32(4): 619-634.

5. **Alimova EK, Astvatsaturian AT.** Essential fatty acids (vitamin F). *Experimental vitaminology (under the editorship of Ostrovsky Yu. M.)*. Minsk, Science and technology, 1979: 526-545.

6. **Lees RS, Karel M.** Omega-3 fatty Acids in Health and Disease. N. Y.: Basel, 1990: 240.

7. **Song C, Lui X, Leonard BE. et al.** Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1 $\beta$ -induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. *J. Lipid Res*. 2003; 44(10): 1984-1991.

8. **Meyer BJ, Kolanu N, Griffiths DA. et al.** Food groups and fatty acids associated with self-reported depression: An analysis from the Australian National Nutrition and Health Surveys. *Nutrition*. 2013; 29(7-8): 1042-1047.

9. **Messamore E, McNamara RK.** Detection and treatment of omega-3 fatty acid deficiency in psychiatric practice: Rationale and implementation. *Lipids in Health and Disease*. 2016; 15(25): 1-13.

10. **Tang M, Dang R, Liu S. et al.**  $\omega$ -3 fatty acids-supplementary in gestation alleviates neuroinflammation and modulates neurochemistry in rats. *Lipids in Health and Disease*. 2018; 17(247): 1-11.

11. **Serhan C N.** Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Ann. Rev. Immunol*. 2007; 25(1): 101-137.

12. **Blank C, Neumann MA, Makrides M et al.** Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linolenic acid to  $\alpha$ -linolenic acid ration. *J. Lipid Res*. 2002; 43: 1537-1543.

13. **Lin Y, Cheng X, Mao J. et al.** Effects of different dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid rations on boar reproduction. *Lipids in Health and Disease*. 2016; 15(31): 1-10.

14. **Levitsky AP, Khodakov IV, Levitsky YuA. ta in.**

Preparation of irreplaceable fat acids of "Liposan". Patent of Ukraine 108571. IPC A61P 9/00. Publ.: 25.07.2016. Bul. № 14.

15. **Levitsky AP, Makarenko OA, Khodakov IV.** *Metody issledovaniya zhirov i masel* [Methods to investigate fats and oils]. Odessa, KP OGT, 2015: 32.

16. **Levitsky AP, Makarenko OA, Demyanenko SA.** Methods of experimental dentistry (teaching aid). *Simferopol, Tarpan*, 2018: 78.

17. **Levitsky AP, Stefanov AV.** *Metody opredeleniya aktivnosti elastazy i eye ingibitorov: metodicheskie rekomendatsii* [The methods of the determination of the activity of elastase and its inhibitors: method guidelines]. Kiev, GFK, 2002:15.

18. **Girin SV.** The modification of the method of the determination of catalase activity in biological substrates. *Laboratornaya diagnostika*. 1999; 4: 45-46.

19. **Gavrikova LM, Segen IT.** Urease activity of oral liquid in patients with acute odontogenic infection of maxillo-facial part. *Stomatologiya*. 1996; The extra issue: 49-50.

20. **Levitsky AP.** *Lizotsym vmesto antibiotikov* [Lysozyme instead of antibiotics]. Odessa, KP OGT, 2005: 74.

21. **Stalnaya ID, Garishvili TG.** *Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoshchyu tiobarbiturovoy kisloty* [The method of revelation of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid]. Moskva, Meditsina, 1977: 66-68.

22. **Levitsky AP, Denga OV, Makarenko OA. i dr.** *Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii* [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. Odessa, KP OGT, 2010: 16.

23. **Levitsky AP, Makarenko OA, Selivanskaya IA i dr.** *Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skringa pro- i prebiotikov: metodicheskie rekomendatsii* [Enzymatic methods for determination of oral dysbiosis for screening pro- and prebiotics: method guidelines]. Kiev, GFC, 2007: 22.

24. **Truhacheva NV.** *Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyah s primeneniem paketa Statistica* [Mathematical Statistics in biomedical research using application package Statistica]. Moskva, GJeOTAR-Media, 2012: 379.

Надійшла 19.08.19



DOI 10.35220/2078-8916-2019-33-3-12-16

УДК 616.31:616.71:579.26:616.34:577.16

<sup>1</sup>О. А. Макаренко, д. біол. н., <sup>2</sup>О. Є. Успенський,  
<sup>3</sup>Т. О. Севостьянова, <sup>3</sup>С. А. Шнайдер, д. мед. н.

<sup>1</sup>Одеський національний університет  
ім. І.І. Мечникова

<sup>2</sup>Харківський національний медичний університет

<sup>3</sup>Державна установа «Інститут стоматології  
та щелепно-лицевої хірургії Національної академії  
медичних наук України»

#### СТОМАТОПРОТЕКТОРНА ЕФЕКТИВНІСТЬ КВЕРЦЕТИНУ У ЩУРІВ З ТОКСИЧНИМ ГЕПАТИТОМ НА ТЛІ ДИСБІОЗУ

*Мета роботи – дослідження лікувально - профілактичної дії препарату «Кверцетин» на тканини*

© Макаренко О. А., Успенський О. Є., Севостьянова Т. О.,  
Шнайдер С. А., 2019.



порожнини рота щурів при гепатиті та дисбіозі.

**Матеріали та методи.** Дослідження провели на 24 щурах, яким моделювали комбіновану патологію дисбіоз та гепатит, а також профілактику препаратом з софори японської «Кверцетин». Гепатит створювали шляхом внутрішньочеревного введення гідразину сірчаноокислого 50 мг/кг двічі на тиждень протягом 5 тижнів, дисбіоз – додаванням 70 мг/кг лінкомицину в питну воду перші 5 діб. Через 30 діб в гомогенатах слизової оболонці щоки визначали активність уреазы, лізоциму, ступінь дисбіозу. В кістковій тканині нижньої щелепи проводили визначення маркерів кісткового метаболізму – активності лужної і кислій фосфатаз, а також загальної протеолітичної активності.

**Результати.** Поєднання гепатиту з дисбіозом призводить в слизовій оболонці щоки щурів посилення обсіменіння умовно-патогенної мікробіотою (підвищення активності уреазы) на тлі зниження неспецифічного антимікробного захисту (зниження активності лізоциму). В кістковій тканині щелеп тварин моделювання поєднаної патології викликало запально-дистрофічні процеси у колагеновій матриці кістки (підвищення загальної протеолітичної активності), а також порушення процесів мінералізації кісткової тканини (підвищення активності кислій та зниження активності лужної фосфатази). Профілактичне введення кверцетину щурам з моделюванням комбінованої патології дисбіозу та гепатиту справило виражений стоматопротекторний ефект: знизило розвиток дисбіозу в слизовій оболонці порожнини рота та сприяло нормалізації процесів мінералізації в кістковій тканині щелеп тварин.

**Ключові слова:** слизова оболонка порожнина рота, дисбіоз, гепатит, кісткова тканина пародонта, кверцетин.

<sup>1</sup>О. А. Макаренко, <sup>2</sup>О. Е. Успенский,  
<sup>3</sup>Т. А. Севостьянова, <sup>3</sup>С. А. Шнайдер

<sup>1</sup>Одесский национальный университет  
имени И.И. Мечникова

<sup>2</sup>Харковский национальный медицинский  
университет

<sup>3</sup>Государственное учреждение «Институт  
стоматологии и челюстно-лицевой хирургии  
Национальной академии медицинских наук Украины»

### СТОМАТОПРОТЕКТОРНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КВЕРЦЕТИНА У КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ НА ФОНЕ ДИСБИОЗА

**Цель работы.** Исследование лечебно - профилактического действия «Кверцетина» на ткани полости рта крыс при гепатите и дисбиозе.

**Материалы и методы.** Исследования провели на 24 крысах, которым моделировали сочетанную патологию дисбиоз и гепатит, а также профилактику препаратом из софоры японской «Кверцетин». Гепатит моделировали путем внутрибрюшинного введения гидразина сернокислого 50 мг/кг дважды в неделю в течение 5 недель, дисбиоз – введением 70 мг/кг лин-

комицина в питьевую воду первые 5 дней. Через 30 дней в гомогенатах слизистой оболочки щеки определяли активность уреазы, лизоцима, степень дисбиоза. В костной ткани нижней челюсти проводили оценку маркеров костного метаболизма – активности щелочной и кислой фосфатаз, а также общей протеолитической активности.

**Результаты.** Сочетание гепатита с дисбиозом вызывает в слизистой оболочке щеки крыс усиление контаминации условно-патогенной микробиотой (повышение активности уреазы) на фоне снижения неспецифической антимикробной защиты (снижение активности лизоцима). В костной ткани челюстей крыс моделирование сочетанной патологии вызывало воспалительно-дистрофические процессы в коллагеновой матрице кости (повышение общей протеолитической активности), а также нарушение процессов минерализации костной ткани (повышение активности кислой и снижение активности щелочной фосфатазы). Профилактическое введение кверцетина крысам с сочетанной патологией оказало выраженный стоматопротекторный эффект: снизило развитие дисбиоза в слизистой оболочке полости рта и способствовало нормализации процессов минерализации в костной ткани челюстей крыс.

**Ключевые слова:** слизистая оболочка полости рта, дисбиоз, гепатит, костная ткань пародонта, кверцетин.

<sup>1</sup>О. А. Makarenko, <sup>2</sup>О. Е. Uspensky,  
<sup>3</sup>Т. А. Sevostyanova, <sup>3</sup>С. А. Shnajder

<sup>1</sup> Odessa I.I. Mechnikov National University

<sup>2</sup> Kharkiv National Medical University

<sup>3</sup> State Establishment «Institute of Stomatology  
and Maxillofacial Surgery of the National Academy of  
Medical Sciences of Ukraine»

### STOMATOPROTECTIVE EFFICACY OF QUERCETIN IN RATS WITH TOXIC HEPATITIS ON THE BACKGROUND OF DYSBIOSIS

#### ABSTRACT

**The aim of the work.** Investigate the therapeutic and prophylactic effect of the drug "Quercetin" on the tissue of the oral cavity of rats with a combined of hepatitis and dysbiosis modeling.

**Materials and Methods.** In the work on 24 rats, a combined simulation of hepatitis and dysbiosis was conducted, as well as prophylaxis with the preparation "Quercetin". Hepatitis was reproduced by intraperitoneal administration of hydrazine 50 mg / kg twice a week for 5 weeks, and dysbiosis by administering lincomycin 70 mg / kg to drinking water for the first 5 days. In the mucous membrane of the cheek, the urease activity marker and the nonspecific antimicrobial protection marker, lysozyme activity, were determined by a microbial seeding marker, the degree of dysbiosis in the oral cavity was calculated by the ratio of their activities. In the jaw bone, markers of bone metabolism were determined – alkaline and acid phosphatase activity, as well as proteolytic activity.

**Results.** *The combination of hepatitis and dysbiosis leads to increased contamination by conditionally pathogenic microbiota (increased urease activity) against the background of decreased antimicrobial protection (decreased lysozyme activity) in the rat cheek mucosa. Pathology also caused inflammatory and dystrophic processes in the collagen matrix of bones (an increase in proteolytic activity), as well as a violation of bone mineralization processes. Prophylactic administration of quercetin to rats with a combined pathology of dysbiosis and hepatitis had a pronounced stomatology effect: reduced the development of dysbiosis in the oral mucosa, and also contributed to the normalization of the processes of mineralization in the jawbone of the jaws of animals.*

**Conclusion.** *Studies have shown high efficacy of quercetin as an anti-dysbiosis agent, as well as a drug that stimulates bone mineralization processes, impaired liver pathology and the development of dysbiosis.*

**Keywords:** *oral mucosa, dysbiosis, hepatitis, periodontal bone tissue, quercetin.*

Дисбіотичні явища відіграють важливу роль в патогенезі багатьох інфекційних і навіть неінфекційних захворювань. Не є винятком в цьому плані і стоматологічні захворювання. Встановлено, що в регуляції мікробіоценозу та усунення явищ дисбіозу (дисбактеріозу) досить значну роль відіграє печінка, яка є бар'єром на шляху проходження з кишечника бактерій і їх токсинів. Дослідження в цій області важливі, оскільки для розробки ефективних схем лікування і профілактики поєднаних захворювань печінки, кишечника і порожнини рота необхідні глибокі знання патогенезу, що відбуваються [1].

Є численні данні, які указують на перспективність застосування біофлавоноїдів в якості ефективних пребіотичних засобів. Доведено, що кверцетин з софори японської має мукозопротекторні і гепатопротекторні властивості за рахунок своєї здатності надавати виражену антиоксидантну дію, інгібувати активність таких деструктивних ферментів, які беруть участь в запальних процесах, як гіалуронідаза, колагеназа, еластаза, фосфоліпаза А<sub>2</sub>. Важливо, що кверцетин, як і інші біофлавоноїди є дуже ефективним капиллярозміцнювальним засобом [2, 3].

**Мета роботи.** Дослідити лікувально-профілактичну дію препарату «Кверцетин» на тканини порожнини рота щурів на тлі сумісного моделювання гепатиту і дисбактеріозу.

**Матеріали та методи дослідження.** В роботі використовували 24 лабораторних щура, самці віком 12 місяців, яких поділили на три групи по 8 щурів: перша – інтактна, друга – сумісне моделювання гепатиту та дисбіозу, третя – на тлі моделювання гепатиту та дисбіозу щурам перорально вводили препарат «Кверцетин» в дозі 200 мг/кг. Токсичний гепатит відтворювали шляхом

внутрішньочеревного введення гідразину сірчанокислого в дозі 50 мг/кг двічі на тиждень протягом 5 тижнів. Дисбіоз моделювали шляхом додавання 70 мг/кг лінкомицину в питну воду перші 5 днів [4].

Тварин виводили з експерименту через 30 днів під тіопенталовим наркозом. Гомогенати тканин (слизова оболонка щоки та кісткова тканина нижньої щелепи) готували з розрахунку 50 мг/мл 0,05М трис-НСІ-буфера рН 7,5 і для біохімічних досліджень використовували надосадову рідину, яку отримали після центрифугування при 2500 об/хв на протязі 30 хвилин.

В слизовій оболонці щоки визначали активність уреазы [5] та лізоциму [6], по співвідношенню їх відносних активностей розраховували ступінь дисбіозу в порожнини рота [6]. В кістковій тканині нижньої щелепи проводили визначення маркерів кісткового метаболізму – активності лужної (ЛФ) і кислій фосфатаз (КФ), а також загальної протеолітичної активності [7].

**Результати дослідження та їх обговорення** Результати дослідження біохімічних показників, які характеризують стан мікробіоценозу слизової оболонки щоки щурів (активність уреазы та лізоциму) при моделюванні дисбіозу і гепатиту та впливу кверцетину наведені у таблиці 1. Отримані дані показують, що активність уреазы підвищувалась при дисбіозі з гепатитом, хоча і недостовірно ( $P > 0,05$ ). Це свідчить про зростання мікробного обсіменіння порожнини рота щурів при розвитку комбінованої патології. Профілактичне введення препарату кверцетин на тлі патології дисбіозу з гепатитом сприяло зниженню активності уреазы, а значить і кількості умовно-патогених бактерій, в слизовій оболонці щоки щурів, хоча  $P_1 > 0,05$ .

Моделювання поєднаної патології дисбіозу з гепатитом призводило до зниження активності антимікробного фермента лізоцима в слизовій оболонці щоки щурів – в 1,7 разів ( $P < 0,01$ ). Профілактичне застосування кверцетину у щурів з патологією зробило виражений профілактичний ефект на активність лізоциму – відбувалось підвищення цього показника, хоча і недостовірно ( $P < 0,05$ ;  $P_1 > 0,4$ , табл. 1).

Ступінь дисбіозу розраховували за методом Левицького як відношення відносної активності уреазы до відносної активності лізоциму. Встановили, що цей показник в слизовій оболонці щоки щурів з гепатитом і дисбіозом підвищувався в 2,4 рази ( $P < 0,001$ ). Профілактичне введення тваринам препарату кверцетин призводило до деякого зниження ступеня дисбіозу в слизовій оболонці щоки щурів з патологією, хоча і не досягло нормальних значень ( $P < 0,001$ ;  $P_1 > 0,05$ ).

Загалом, результати табл. 1 свідчать про по-

рушення мікробіоценозу в порожнині рота щурів з гепатитом і кишковим дисбіозом і про профілактичну дію препарату кверцетин.

У таблиці 2 наведені результати дослідження біохімічних маркерів мінералізації кісткової тка-

нини щелеп у спостережуваних щурів: ЛФ – маркера остеобластів, які відповідні за мінералізацію кісткової тканини, і КФ – маркера остеобластів, які приймають участь у руйнуванні кістки.

Таблиця 1

**Вплив кверцетину на біохімічні показники слизової оболонки щоки щурів при моделюванні дисбіозу і гепатиту (M ± m)**

Показники	Групи щурів, n=8		
	Норма	Дисбіоз + гепатит	Дисбіоз + гепатит + кверцетин
Активність уреаз, мк-кат / кг	1,50 ± 0,26	2,22 ± 0,28 P > 0,05	1,69 ± 0,18 P > 0,3 P <sub>1</sub> > 0,05
Активність лізоциму, од / кг	620 ± 57	357 ± 22 P < 0,01	391 ± 39 P < 0,01 P <sub>1</sub> > 0,4
Ступінь дисбіозу	1,0 ± 0,2	2,4 ± 0,2 P < 0,001	2,0 ± 0,2 P < 0,001 P <sub>1</sub> > 0,05

*Примітка:* P – показник достовірності відмінностей з «Нормою»; P<sub>1</sub> – показник достовірності відмінностей з групою «Дисбіоз + гепатит».

Таблиця 2

**Вплив кверцетину на біохімічні показники кісткової тканини альвеолярного відростка нижньої щелепи щурів з гепатитом на тлі дисбіозу (M ± m)**

Показники	Контроль n=8	Дисбіоз + гепатит n=8	Дисбіоз + гепатит + кверцетин, n=8
Активність лужної фосфатази, мк-кат / кг	203,0 ± 17,3	147,9 ± 14,3 P < 0,05	191,6 ± 7,2 P > 0,5 P <sub>1</sub> < 0,05
Активність кислої фосфатази, мк-кат / кг	21,6 ± 2,5	29,3 ± 0,8 P < 0,01	22,9 ± 2,4 P > 0,5 P <sub>1</sub> < 0,05
ЗПА, нкат/кг	13,6 ± 1,0	19,7 ± 1,5 P < 0,01	14,5 ± 1,3 P > 0,3 P <sub>1</sub> < 0,05
Індекс мінералізації ЛФ / КФ	9,40 ± 0,97	5,05 ± 0,51 P < 0,01	8,37 ± 0,74 P > 0,3 P <sub>1</sub> < 0,01

*Примітка:* P – показник достовірності відмінностей з «Контролем»; P<sub>1</sub> – показник достовірності відмінностей з групою «Дисбіоз + гепатит».

Як видно, в таблиці 2, активність ЛФ в кістковій тканині щелеп щурів с поєднаною патологією дисбіозу і гепатиту значно (на 27 %) зменшується по відношенню до норми (P<0,05). Це говорить про зниження інтенсивності процесів мінералізації в кістковій тканині на тлі розвитку патологічного стану. Профілактичне додавання шурам з патологією кверцетину попереджає зниження цього показника: активність ЛФ в групі щурів, які отримували кверцетин не відрізняється від нормальних значень (P>0,5; P<sub>1</sub> <0,05).

Активність КФ в кістковій тканині щелеп щурів з патологією збільшувалась на 36 %, що

означає посилення руйнування кісткової тканини (P<0,01). Додавання шурам кверцетину на тлі моделювання гепатиту і дисбіозу сприяло зменшенню активності КФ до рівня нормальних значень (P > 0,5; P<sub>1</sub> < 0,05).

ЗПА, яка свідчить про руйнування колагену кістки, збільшувалась на 45 % (P<0,01), що підтверджує посилення руйнування кісткової тканини тварин з дисбіозом і гепатитом. Можна відмітити, що профілактика за допомогою додавання кверцетину гальмувала збільшення показника деструкції кістки на тлі розвитку гепатиту і дисбіозу (P > 0,3; P<sub>1</sub> <0,05).



Індекс мінералізації, який розраховували як співвідношення ЛФ / КФ свідчать про його зниження по відношенню до норми у щурів з дисбіозом і гепатитом в 1,9 рази ( $P < 0,01$ ). В кістковій тканині щелеп щурів, яким додавали профілактично кверцетин, індекс мінералізації значно підвищився і відповідав значенням у контрольної групі тварин ( $P > 0,3$ ).

Узагальнюючи результати таблиці 2, необхідно відзначити, що поєднана патологія гепатиту і дисбіозу викликає деструкцію колагену і порушення мінералізації кісткової тканини щелеп тварин. Профілактичне введення щурам кверцетину має виражену протекторну дію і активно попереджує процеси деградації кісткової тканини, які були індуковані розвитком кишкового дисбіозу на тлі токсичного гепатиту.

Проведені дослідження свідчать про високу ефективність кверцетину як антидисбіотичного засобу, а також препарату, що стимулює процеси мінералізації кісткової тканини, які порушені патологією печінки і розвитком дисбіозу.

#### Список літератури

1. Lee K. N. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome / K. N. Lee, O. Y. Lee // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – V. 20, № 27. – P.1047-1055.
2. Фитоадаптогены в профилактике и лечении кариеса зубов / Левицкий А. П., Макаренко О. А., Денга О. В. [и др.]. – Одеса: КП «Одеська міська друкарня», 2013. – 120 с.
3. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice / M. Tsuji, H. Yamamoto, T. Sato [et al.] // *J. Bone Miner. Metab.* – 2009. – V. 27, N 6. – P. 673-681.
4. Патент на корисну модель № 31012. Спосіб моделювання дисбіозу (дисбактеріозу). Левицький А. П., Селіванська І. О., Цісельський Ю. В. [та ін.]. № у 2007 11609 від 22.10.2007. Опубл. 25.03.2008. Бюл. № 6.
5. Гаврикова Л. М. Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой и одонтической инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень //

*Стоматология.* – 1996. – Спецвыпуск. – С. 49-50.

6. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / А.П. Левицкий, О.А. Макаренко, И.А. Селиванская [и др.]. – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 22 с.

7. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза : метод. рекомендации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Денга [и др.] – К.: ГФЦ МЗ Украины «Авиценна», 2005. – С. 31-38.

#### REFERECES

1. Lee KN, Lee OY. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(27): 1047-1055.
2. Levitskiy AP, Makarenko OA, Denga OV, Denga AE, Lepskiy VV, Lepskiy VV. *Fitoadaptogeny v profilaktike i lechenii kariesa zubov* [Phytoadaptogens in the prevention and treatment of dental caries]. *Odessa, KP OGT*, 2013:119.
3. Tsuji M, Yamamoto H, Sato T. et al. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Metab.* 2009; 27(6): 673-681.
4. Levitskiy AP, Selivanskaya IA, Tsiselskiy YuV. et al. Method of modeling dysbiosis (dysbiosis). Patent of Ukraine № 31012. Publ.: 25.03.2008. Bul. № 6.
5. Gavrikova LM, Segen IT. Urease activity of the oral fluid of patients with acute odontogenic infection and maxillofacial. *Stomatologiya.* 1996; *spetsvyypusk*: 49-50.
6. Levitskiy AP, Makarenko OA, Selivanskaya IA, Rossachanova LN, Denga OV, Pochtar VN, Skidan KV, Goncharuk SV. *Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skrininga pro- i prebiotikov: metodicheskie rekomendatsii* [Enzymatic methods for determination of oral dysbiosis for screening pro- and prebiotics: method guidelines]. *Kiev, GFC*; 2007: 22.
7. Levitskiy AP, Makarenko OA, Denga OV, Sukmanskiy OI, Podorozhnaya RP, Rossachanova LN, Khodakov IV, Zelenina YuV. *Eksperimentalnye metody issledovaniya stimulyatorov osteogeneza: metodicheskie rekomendatsii* [The experimental methods of the study of osteogenesis stimulators]. *Kiev, GFC*; 2005:50.

Надійшла 12.08.19

