

УДК 616. 314-002-85. 242-085. 31:547. 953. 2:615. 038

О. С. Волкова, Е. Н. Рябокони, *Н. П. Головки

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРЫС, СОДЕРЖАЩИХСЯ НА КАРИЕСОГЕННОЙ ДИЕТЕ С ДОБАВЛЕНИЕМ ЛЕЦИТИНА, РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА И ПРЕПАРАТА КАЛЬЦИЯ

Харьковский национальный медицинский университет

*Харьковский государственный университет питания и торговли

Фагоцитарная активность нейтрофилов, открытая 120 лет тому назад И. И. Мечниковым, удостоенным за это открытие Нобелевской премии, является филогенетически наиболее древней формой неспецифической защитной реакции организма от патогенных бактерий [1-3].

Развитие и широкое внедрение в клиническую практику иммунологического анализа в последнее десятилетие показывает, что частота многочисленных заболеваний полости рта, особенно таких заболеваний как пародонтит и кариес, находится в прямой зависимости от состояния местных и общих факторов иммунитета полости рта [4-7].

Содержание животных на кариесогенном рационе вызывает глубокие изменения в обмене веществ и в функциональном состоянии ряда органов и тканей [8]. Предположительно в этом случае должны наблюдаться изменения в состоянии фагоцитарной активности нейтрофилов.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния диетических добавок (лецитина, подсолнечного масла и препаратов кальция) на фагоцитарную активность нейтрофилов крыс, находившихся на сахарозо-казеиновой кариесогенной диете М. Г. Бугаевой, С. А. Никитина.

Материалы и методы исследования. Эксперимент был проведен на 30 крысах линии WAG (Wistar Albino Glaxo) в возрасте 45 ± 5 дней со средней начальной массой 67 ± 1 , 3 г. Длительность эксперимента составила 60 дней.

Экспериментальный алиментарный кариес у белых крыс воспроизводили путем содержания их на сахарозо-казеиновой кариесогенной диете (КГД) М. Г. Бугаевой, С. А. Никитина (1954), состоящей из 54% сахарозы, 18, 5% творога и 5% подсолнечного нерафинированного масла, 18, 5% сухарей из белого пшеничного хлеба высшего сорта, 4% солевой смеси, 1 таблетки поливитаминов «Ундевит» на 100 г рациона [9, 10].

В качестве профилактических препаратов использовали следующие биологически активные вещества, разрешенные к применению МЗ Украины: лецитин (натуральный соевый лецитин, сертификат о госрегистрации № 3568-UA1. 003. X037085-05 от 01. 08. 2005 № 384, производитель «Фарметикс» Инк., Канада); полуфабрикат костный пищевой, содержащий 15% кальция, ТУ У 15. 1-01566330. 159-2004 [11]. Также одна из групп получала повышенное в 2 раза (10%) содержание нерафинированного подсолнечного масла.

Перед введением в эксперимент животных взвешивали, описывали их общее состояние. Профилактику препаратами начинали с первого дня введения кариесогенного рациона. Препарат животным вводили *per os* путем добавления в ежедневный рацион 1 раз в день. Дозировку всех вводимых в рацион препаратов проводили из расчета на килограмм массы тела [12, 13].

Контрольные и опытные группы крыс формировали с учетом одинакового отклонения от средней массы (67 ± 1 , 3 г) и далее в зави-

симости от применения профилактических препаратов, распределяли по 5 животных в группе следующим образом: 1 группа – интактные крысы на стандартном рационе вивария, сбалансированном по своим качественным и количественным характеристикам, который согласно зоотехническим нормам предусмотрен для данного вида животных [14] (биологический контроль № 1); 2 группа – кариесогенная диета М. Г. Бугаевой и С. А. Никитина (контроль № 2); 3 группа получала КГД с добавлением 0, 33 г лецитина на 100 г корма (натуральный соевый лецитин, сертификат и госрегистрация № 3568-UA1. 003. X037085-05 от 01. 08. 2005 № 384, производитель «Фарметикс» Инк., Канада); 4 группа получала КГД с добавлением 2% препарата кальция в виде пищевой костной муки, содержащей 15% кальция (ТУ У 15. 1-01566330. 159-2004); 5 группа получала КГД с добавлением дополнительно 5 г подсолнечного масла на 100 г диеты (всего 10%).

Животных содержали на КГД 60 дней, после чего их подвергали эвтаназии под наркозом и получали сыворотку крови.

Содержание экспериментальных животных и манипуляции с ними проводили согласно научно-практическим рекомендациям по содержанию лабораторных животных [15] и обращению с ними, положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и научных целей», а также в соответствии с положениями «Общих этических

принципов экспериментов на животных», утвержденных на I Национальном конгрессе по биоэтике (К., 2001), и требованиями Приложения № 4 к «Правилам проведения работ по использованию экспериментальных животных», утвержденными приказом Министерства охраны здоровья № 755 от 12.08.1977 г. «Про меры дальнейшего усовершенствования организационных работ и использованию экспериментальных животных» [16, 17].

В сыворотке крови определяли показатели фагоцитоза путем оценки фагоцитарной реакции нейтрофильных лейкоцитов крови. Принцип метода основан на количественном определении поглощенных и переваренных нейтрофилами микроорганизмов при совместной инкубации исследуемой крови с микробной тест-культурой (суточная микробная культура *Staphylococcus* (штамм С-52).

Расчет и оценка результатов. При микроскопии окрашенных мазков учитывали 100-200 нейтрофилов, в которых подсчитывали:

- 1) количество клеток с признаками фагоцитоза;
- 2) количество поглощенных фагоцитами микробов, из них:

– количество убитых (переваренных) микробов, которые окрашены в различные оттенки розового цвета;

– количество поглощенных микробов, окрашенных в интенсивно розовый цвет.

Фагоцитарный показатель (индекс гамбургера) – процент фагоцитов, которые принимают активное участие в фагоцитозе из числа сосчитанных нейтрофилов. Фагоцитарное число (индекс Райта) – среднее число микроорганизмов, поглощенных одним активным нейтрофилом, который принимает участие в фагоцитозе.

Для оценки переваривающей функции фагоцитов определяли бактерицидную активность нейтрофилов (БАН), т. е. отношение количества переваренных микробов к общему числу поглощенных микробов (переваренных и непереваренных), выраженное в процентах [18].

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с помощью программы «Statistica-6.0» [19, 20].

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследования фагоцитарной активности нейтрофилов крыс, содержащихся на КГД и получавших

кормовые добавки, представлены в табл. 1. Из этих данных видно, что у крыс, получавших КГД, достоверно снижены фагоцитарный показатель и бактерицидная активность нейтрофилов. Дополнительное введение в корм лецитина не оказывает существенного влияния на измененные при КГД показатели фагоцитоза. Аналогичные результаты показывает и добавление растительного масла.

В то же время, включение в рацион костной муки почти полностью восстанавливает до нормы фагоцитарный показатель и бактерицидную активность нейтрофилов, сниженные при КГД.

У животных, которых содержали на стандартном рационе вивария, нейтрофилы также не реагировали на введение с кормом лецитина, о чем свидетельствуют практически не изменившиеся показатели фагоцитарной активности (табл. 2).

Таким образом, полученные нами данные о благоприятном влиянии костной муки на фагоцитарную активность нейтрофилов хорошо согласуются с ранее полученными данными о положительном влиянии этого препарата на состояние печени [4].

Таблица 1

Влияние лецитина, подсолнечного масла и костной муки на фагоцитарную активность нейтрофилов крыс, находящихся на кариезогенной диете (КГД)

№ п/п	Группы	Фагоцитарный показатель, %	Фагоцитарное число	Бактерицидная активность нейтрофилов, %	Индекс завершенности фагоцитоза, ед.
1	Контроль (интактные)	95,6±0,75	3,59±0,39	40,2±0,90	0,96±0,04
2	КГД	88,8±2,57 p<0,05	4,16±0,27 p>0,1	31,3±1,84 p<0,01	0,87±0,05 p>0,05
3	КГД + лецитин	85,2±1,50 p<0,001 p ₁ >0,3	4,14±0,28 p>0,1 p ₁ >0,9	34,4±1,1 p<0,05 p ₁ >0,05	0,83±0,02 p<0,05 p ₁ >0,4
4	КГД + подсолнечное масло	92,0±3,05 p>0,1 p ₁ >0,3	4,47±0,52 p>0,05 p ₁ >0,4	35,4±2,46 p>0,05 p ₁ >0,05	0,92±0,09 p>0,7 p ₁ >0,4
5	КГД + костная мука	95,0±1,00 p>0,8 p ₁ <0,05	4,38±0,62 p>0,1 p ₁ >0,4	38,6±0,80 p>0,05 p ₁ <0,05	0,82±0,01 p>0,4 p ₁ >0,3

p – показатель достоверности различий с группой № 1;

p₁ – показатель достоверности различий с группой № 2.

Влияние лецитина на фагоцитарную активность нейтрофилов интактных крыс

№ п/п	Фагоцитарная активность	Контроль (интактные)	Опыт (+ лецитин)
1	Фагоцитарный показатель, %	95,60±0,75	93,2±1,35 p>0,05
2	Фагоцитарное число	3,59±0,39	4,31±0,43 p>0,3
3	Бактерицидная активность нейтрофилов, %	40,24±0,90	38,06±0,86 p>0,05
4	Индекс завершенности фагоцитоза, ед.	0,96±0,04	0,90±0,06 p>0,1

p – показатель достоверности различий с группой "контроль".

Выводы

1. Содержание крыс на кариесогенном рационе снижает фагоцитарную активность нейтрофилов.
2. Введение в кариесогенный рацион препарата костной муки восстанавливает фагоцитарную активность нейтрофилов.
3. Добавление лецитина и растительного масла в рацион не оказывало существенного влияния на фагоцитарную активность нейтрофилов.

Литература

1. Белова Л. А. Биохимия процессов воспаления и поражения сосудов. Роль нейтрофилов / Л. А. Белова // Биохимия. – 1997. – Т. 62, № 6. – С. 659-668.
2. Eick S. Phagocytosis of periodontopathogenic bacteria by cervicular granulocytes is depressed in progressive periodontitis / Eick S., Pfister W., Signsch B., Straube E. // Infection. – 2000. – V. 28, № 5. – P. 301-304.
3. Плехова Н. Г. Бактерицидная активность фагоцитов / Н. Г. Плехова // ЖМЭИ. – 2006. – № 6. – С. 89-96.
4. Сукманский О. И. Неспецифическая резистентность / О. И. Сукманский // Вестник стоматологии. – 2008. – №4. – С. 35-38.
5. Боровский Е. В. Биология полости рта / Е. В. Боровский, В. К. Леонтьев. - М.: Медицина, 1991. - 304 с.
6. Олейник И. И. О защитных факторах слюны и сыворотки крови больных с воспалительными поражениями пародонта / И. И. Олейник, Е. Б. Маринова // Военно-медицинский журнал. - 1983. - № 11. - С. 62-64.
7. Олейник И. И. Современные аспекты биологии и иммунологии / И. И. Олейник, В. Н. Покровский // Журнал микробиологии. - 1987. - №6. - С. 91-97.
8. Волкова О. С. Биохимические изменения в сыворотке крови крыс, содержащихся на кариесогенной диете с добавлением фосфатидилхолина (лецитина), растительного масла и препарата кальция / О. С. Волкова, С. Н. Волков // Вестник стоматологии. – 2009. – № 1. – С. 6-10.
9. Бугайова М. Г. Матеріали до проблеми карієсу: підсумки експериментальних досліджень / М. Г. Бугайова, І. А. Бегельман, Л. А. Бланк // Стоматологія. – 1960. – № 6. – С. 3.
10. Бугаева М. Г. Влияние питания белых крыс (самок) диетами, богатыми углеводами, на развитие кариеса зубов у потомства / М. Г. Бугаева // Проблемы терапевтической стоматологии. – 1970. – № 5. – С. 11-16.
11. Головки М. П. Наукове обґрунтування та розробка технології продуктів харчування, збагачених на кальцій, з використанням продуктів переробки харчової кістки: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора техн. наук: спец. 05. 18. 16 «Технологія продуктів харчування» / М. П. Головки. - Харків, 2008. - 34 с.
12. Владимиров В. Г. Підрахунок кількості лікарських препаратів на поверхню тіла, як один із заходів визначення рівно ефективних доз для тварин та людини / В. Г. Владимиров // Фармакологія та токсикологія. – 1976. – № 1. – С. 123-128.
13. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады Академии наук СССР. – 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513-1516.
14. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філіпенко, Г. А. Сайфетдінова]. – К.: Авіценна, 2002. – 156 с.
15. Кожухов А. Н. Ветеринарно-санитарные правила и нормы содержания подопытных (лабораторных) животных, соответствующие международно принятым требованиям / А. Н. Кожухов, И. В. Калинин, А. Т. Добржинский // Лабораторные животные. – 1992. – Т. 2, № 2. – С. 27-46.

16. Кудрявицкий А. И. Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых и больных в прямом визуальном тесте /А. И. Кудрявицкий // Лабораторное дело. – 1985. – № 1. – С. 45-47.

17. Лапач О. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / О. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.

Стаття надійшла
1. 03. 2010 р.

Резюме

В експерименті на 30 білих щурах відтворювали експериментальний карієс за допомогою дієти М. Г. Бугайової, С. А. Нікітіна (1954) і встановили зниження фагоцитарної активності нейтрофілів.

Одночасне введення препарату натурального соєвого лецитину та рослинної олії практично не викликало змін показника фагоцитарної активності. Введення в карієсогенний раціон напівфабрикату кісткового харчового з умістом 15% кальцію відновлювало до норми фагоцитарний показник та бактерицидну активність нейтрофілів, знижених при карієсогенній дієті.

Ключові слова: карієс, цукрово-казеїнова карієсогенна дієта, лецитин, кальцій, фагоцитарна активність нейтрофілів.

Summary

The experimental caries at the research of 30 white rats was reproduced with the help of Bugayova's and Nikitin's diet (1954). The reduction of phagocytes' activity of neutrophils was settled.

Concurrent introduction of natural soy-bean lecithin and vegetable oil practically didn't cause any indices changes of phagocytes' activity of neutrophils. Introduction into cariesogenic ration semi-finished product of osseous food, containing 15% of calcium, restored up to standard phagocytes' index and bactericidal activity of neutrophils, reduced with the help of cariesogenic diet.

Key words: caries, saccharose - caseinic cariesogenic diet, lecithin, calcium, phagocytes' activity of neutrophils.