

А. П. Левицкий¹, О. А. Макаренко¹, Л. Н. Хромагина¹, О. Э. Кнава¹,
Е. П. Ступак², Т. В. Томилина³

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОРАЛЬНЫХ АППЛИКАЦИЙ ГЕЛЯ «ЛИЗОМУКОИД» НА СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

¹ГУ «Институт стоматологии НАМН»

²ВГУУ «Украинская медицинская стоматологическая академия»

³ Харьковский национальный медицинский университет

Реферат. А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, Л. Н. Хромагина, О. Э. Кнава, Е. П. Ступак, Т. В. Томилина **ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОРАЛЬНЫХ АППЛИКАЦИЙ ГЕЛЯ «ЛИЗОМУКОИД» НА СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА.** Оральные аппликации липополисахарида повышают в тканях десны, слизистой оболочке щеки и в сыворотке крови крыс уровень маркеров воспаления (МДА и эластазы), микробного обсеменения (уреазы) и степень дисбиоза на фоне одновременного снижения неспецифического иммунитета (лизоцима), антиоксидантной защиты (каталазы) и антиоксидантно-прооксидантного индекса АПИ. Предварительные аппликации геля «Лизомукоид», содержащего лизоцим и овомукоид предотвращают установленные нарушения и оказывают лечебно-профилактический эффект.

Ключевые слова: липополисахарид, полость рта, воспаление, дисбиоз, лизомукоид.

Реферат. А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, Л. М. Хромагина, О. Е. Кнава, О. П. Ступак, Т. В. Томилина **ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ ОРАЛЬНИХ АППЛІКАЦІЙ ГЕЛЮ «ЛІЗОМУКОЇД» НА СТАН ТКАНИН ПОРОЖНИНИ РОТА ЩУРІВ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ.** Оральні аплікації ліпополісахариду підвищують в яснах, слизовій оболонці щоки і в сироватці крові щурів рівень маркерів запалення (МДА, еластази), мікробного обсіменіння (уреази) і ступень дисбіозу на тлі зниження неспецифічного імунітету (лізоциму), антиоксидантного захисту (каталази) і антиоксидантно-прооксидантного індексу АПІ. Попередні аплікації гелю «Лізоомукоїд», який містить лізоцим та овомукоїд запобігають встановленим порушенням і здійснюють лікувально-профілактичний ефект.

Ключові слова: ліпополісахарід, порожнина рота, запалення, дисбіоз, лізоомукоїд.

Summary. A. P. Levitskiy, O. A. Makarenko, L. N. Khromagina, O. E. Knava, E. P. Stupak, T. V. Tomilina **THE THERAPEUTIC AND PREVENTIVE EFFECT OF ORAL APPLICATIONS OF GEL “LYSOMUCOID” UPON THE STATE OF TISSUES OF ORAL CAVITY OF RATS AFTER THE INFLUENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDE.** The oral applications of lipopolysaccharide increase the level of the markers of inflammation (MDA and elastase), microbe insemination (urease) and the degree of dysbiosis simultaneously to the reduction of nonspecific immunity (lysozyme), antioxidant protection (catalase) and antioxidant-prooxidant index API in the tissues of gum, cheek mucous membrane and in blood serum of rats. The preliminary applications of gel “Lysomuroid”, containing lysozyme and ovomucoid, prevent the found disorders and have the therapeutic and prophylactic effect.

Key words: lipopolysaccharide, oral cavity, inflammation, dysbiosis, lysomuroid.

Липополисахарид (ЛПС), или кишечный эндотоксин, является главным патогенным фактором в развитии стоматологических заболеваний [1, 2]. Ранее нами было показано участие ЛПС в развитии стоматита [3] и пародонтита [4], а также стоматологических осложнений сахарного диабета [5]. В качестве лечебно-профилактического средства при стоматите и пародонтите нами был предложен зубной эликсир «Лизомукоид», содержащий яичный лизоцим, ингибитор протеиназ овомукоид и детергент цетримид [6]. Лизомукоид обладает выраженным антимикробным, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, что нашло своё подтверждение в ряде клинических исследований [7].

В последнее время нами разработана гелевая форма Лизомукоида, применение которой позволяет пролонгировать лечебно-профилактическое действие этого препарата при аппликации на ткани полости рта [8].

Целью настоящего исследования стало изучение влияния геля «Лизомукоид» на состояние тканей полости рта крыс после локального воздействия ЛПС.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 5 %-ный фитогель «Лизомукоид», содержащего лизоцим и овомукоид (РЦ У 24.5-13903778-37/1:2005. Заключение МЗУ № 05.03.02-07/29066 от 04.07.2005, производитель НПА «Одесская биотехнология»). Для воспроизведения патологических процессов в десне и в слизистой щеки использовали препарат ЛПС из *Salmonella typhi* (препарат «Пирогенал» производства «Медгамал», Россия) в дозе 75 мкг/кг массы. Эксперименты были проведены на 18 белых крысах линии Вистар (самцы, 4 месяца, средней массой 180±10 г). Все крысы были распределены на 3 равных групп по 6 голов в каждой. Группа № 1 – интактная (норма); группа № 2 – получала оральные аппликации геля с ЛПС в количестве 0,5 мл на крысу из расчёта 75 мг/кг массы. В течение 30 минут после аппликаций геля с ЛПС крысы не потребляли корма и не пили воду; группа № 3 – крысы предварительно до ЛПС получали в течение трёх дней аппликации геля «Лизомукоид» в количестве 0,5 мл на крысу (доза лизомукоида составила 125 мг/кг в сутки) в течение 3 дней. В последний день через 30 минут после аппликации гелем «Лизомукоид» осуществляли аппликации геля с ЛПС.

Продолжительность действия ЛПС составила 1 сутки, после чего крыс умерщвляли на 4-й день опыта под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путём тотального кровопускания из сердца. Получали сыворотку крови, иссекали десну и слизистую щеки. Гомогенаты тканей готовили на 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,5 из расчёта 20 мг/мл. В гомогенатах тканей и в сыворотке крови определяли следующие биохимические показатели: содержание малонового диальдегида (МДА) [9], активность эластазы [9], активность уреазы [10], активность лизоцима [10], активность каталазы [9]. По соотношению активностей каталазы и концентрации МДА рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс АПИ [9], а по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима – степень дисбиоза по А. П. Левицкому [10].

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты определения биохимических показателей десны крыс, получавших в течение 3 дней оральные аппликации геля «Лизомукоид», а затем локальное воздействие ЛПС. Как видно из этих данных, содержание МДА (маркер перекисного окисления липидов (ПОЛ) коррелирующего с выраженностью воспалительного процесса [9], достоверно возрастает при воздействии ЛПС и возвращается к норме, если предварительно наносили гель «Лизомукоид».

Активность эластазы, которая также является маркером воспаления, достоверно возрастает в десне после воздействия ЛПС, однако под влиянием Лизомукоида наблюдается лишь тенденция к снижению её активности (табл.1).

Влияние геля «Лизомукоид» на биохимические показатели десны крыс после аппликаций ЛПС

Показатели	Норма	ЛПС	ЛПС + Лизомукоид
Содержание МДА, ммоль/кг	13,4 ± 0,8	20,7 ± 1,9 p < 0,01	14,7 ± 1,2 p > 0,3 p ₁ < 0,05
Активность эластазы, мк-кат/кг	41 ± 6	62 ± 2 p < 0,01	57 ± 2 p < 0,01 p ₁ > 0,05
Активность уреазы, мк-кат/кг	0,78 ± 0,10	2,35 ± 0,13 p < 0,001	1,54 ± 0,08 p < 0,001 p ₁ < 0,001
Активность лизоцима, ед/кг	310 ± 48	209 ± 26 p < 0,05	227 ± 37 p > 0,05 p ₁ > 0,5
Активность каталазы, мкат/кг	7,85 ± 0,42	6,03 ± 0,22 p < 0,01	6,14 ± 0,87 p > 0,05 p ₁ > 0,6

Примечание. p – достоверность отличий по сравнению с нормой,

p₁ – достоверность отличий по сравнению с показателями в группе «ЛПС».

При действии ЛПС более, чем в 3 раза увеличивается активность уреазы, которая является биохимическим маркером микробной обсеменённости. Аппликации геля «Лизомукоид» снижают активность уреазы (p < 0,001), однако этот показатель не возвращается к норме.

Аппликации ЛПС достоверно снижают в десне активность лизоцима (показатель неспецифического иммунитета). Использование геля «Лизомукоид» несколько увеличивает его активность (однако p > 0,05).

Под влиянием ЛПС в десне также существенно снижается и активность антиоксидантного фермента каталазы. Применение Лизомукоида не повлияло на её активность (табл. 1).

В таблице 2 приведены результаты исследования биохимических показателей в слизистой щеки крыс. Как и в десне, в этой ткани ЛПС увеличивает уровень маркеров воспаления – МДА и эластазы, в 3 раза повышает активность уреазы и достоверно снижает активность лизоцима и каталазы. Применение геля «Лизомукоид» снижает практически до нормы уровень маркеров воспаления, несколько меньше (но достоверно) уменьшает активность уреазы, однако достоверно повышает активность каталазы (табл. 2).

Таблица 2

Влияние геля «Лизомукоид» на биохимические показатели слизистой щеки крыс после аппликаций ЛПС

Показатели	Норма	ЛПС	ЛПС + Лизомукоид
Содержание МДА, ммоль/кг	13,6 ± 1,1	21,3 ± 1,9 p < 0,01	14,7 ± 1,2 p > 0,3 p ₁ < 0,05
Активность эластазы, мк-кат/кг	51 ± 3	69 ± 2 p < 0,01	56 ± 11 p > 0,3 p ₁ > 0,05
Активность уреазы, мк-кат/кг	0,43 ± 0,12	1,41 ± 0,05 p < 0,001	1,21 ± 0,05 p < 0,001 p ₁ < 0,05
Активность лизоцима, ед/кг	310 ± 34	196 ± 20 p < 0,01	217 ± 31 p > 0,05 p ₁ > 0,3
Активность каталазы, мкат/кг	6,97 ± 0,47	5,22 ± 0,52 p < 0,05	6,50 ± 0,37 p > 0,3 p ₁ < 0,05

Примечание. p – достоверность отличий по сравнению с нормой,
p₁ – достоверность отличий по сравнению с показателями в группе «ЛПС».

В таблице 3 представлены результаты определения аналогичных показателей в сыворотке крови. Хотя они значительно отличаются по абсолютным цифрам от показателей в десне и щеке, однако характер их изменений под влиянием ЛПС носит такой же характер как и в тканях ротовой полости: уровень биохимических маркеров воспаления увеличивается, активность уреазы повышается в 5 раз, а активность лизоцима и каталазы достоверно падает (табл. 3). На наш взгляд, полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛПС, наносимый локально на ткани полости рта, способен легко проникать в кровеносное русло и оказывать патогенное действие на другие ткани и органы («стоматогенная эндотоксинемия» [11]).

Таблица 3

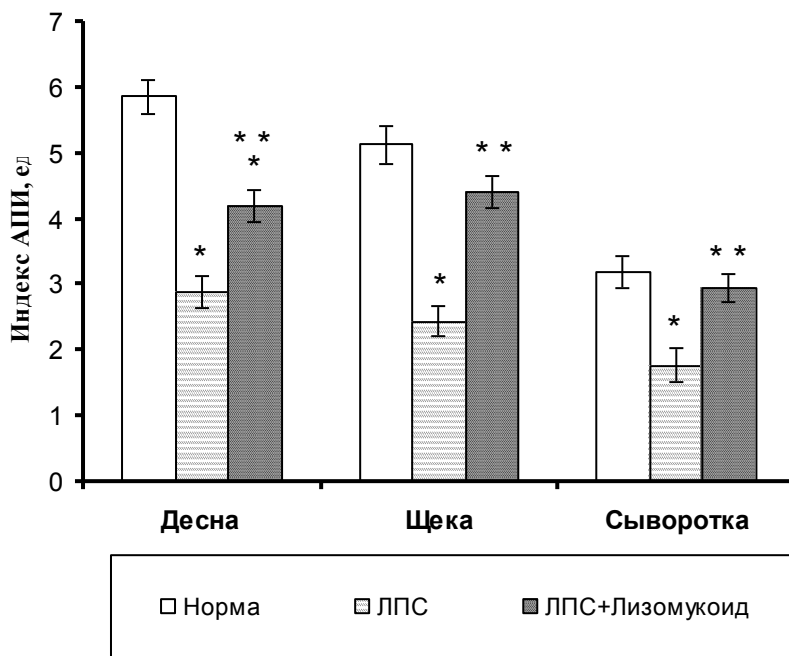
Влияние геля «Лизомукоид» на биохимические показатели сыворотки крови крыс после аппликаций ЛПС

Показатели	Норма	ЛПС	ЛПС + Лизомукоид
Содержание МДА, ммоль/л	0,72 ± 0,06	0,96 ± 0,02 p < 0,01	0,78 ± 0,04 p > 0,3 p ₁ < 0,05
Активность эластазы, мк-кат/л	284 ± 22	357 ± 32 p > 0,05	312 ± 31 p > 0,3 p ₁ > 0,3
Активность уреазы, мк-кат/л	0,005 ± 0,002	0,026 ± 0,002 p < 0,001	0,010 ± 0,002 p > 0,05 p ₁ < 0,001
Активность лизоцима, ед/л	72 ± 5	40 ± 3 p < 0,001	50 ± 4 p < 0,01 p ₁ < 0,05
Активность каталазы, мкат/л	0,23 ± 0,02	0,17 ± 0,02 p < 0,05	0,23 ± 0,10 p = 1 p ₁ < 0,05

Примечание. p – достоверность отличий по сравнению с нормой,
p₁ – достоверность отличий по сравнению с показателями в группе «ЛПС».

Оральные аппликации геля «Лизомукоид» нормализуют уровень маркеров воспаления, в 2,5 раза снижают активность уреазы и достоверно увеличивают активность лизоцима и каталазы в сыворотке крови животных (табл. 3).

На рисунке 1 представлены данные о характере изменения антиоксидантно-прооксидантного индекса АПИ. Локальное применение ЛПС снижает во всех исследуемых тканях этот индекс в среднем в 2 раза. Предварительные аппликации геля «Лизомукоид» достоверно увеличивают АПИ: в слизистой щеки и сыворотке крови практически до нормы.



* – $p < 0,05$ в сравнении с группой 1 (норма)

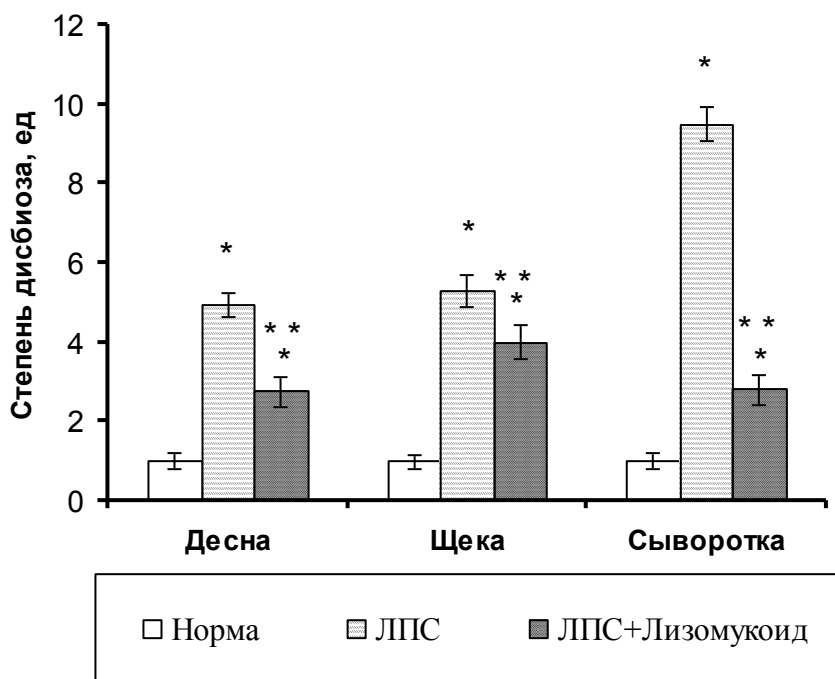
** – $p < 0,05$ в сравнении с группой 2 (ЛПС)

Рис.1. Влияние геля «Лизомукоид» на индекс АПИ в тканях крыс после оральной аппликации ЛПС.

На рисунке 2 приведены результаты определения степени дисбиоза по А.П. Левицкому. Из этих данных видно, что ЛПС более, чем в 5 раз увеличивает степень дисбиоза в тканях ротовой полости и почти в 10 раз в сыворотке крови. Аппликации геля «Лизомукоид» достоверно снижают степень дисбиоза, однако далеко не до нормы.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что ЛПС вызывает в тканях полости рта развитие воспалительно-дистрофических процессов, аналогичные тем, что мы наблюдали при воспроизведении стоматологической патологии. Это даёт нам основание полагать, что в патогенезе этих заболеваний решающую роль играет липополисахарид. Более того, установленные нами провоспалительные и дисбиотические изменения в сыворотке крови крыс после оральных аппликаций ЛПС, дают веские основания считать ротовую полость возможной причиной развития системной эндотоксинемии, на фоне которой развиваются многие заболевания (атеросклероз, сахарный диабет и др.) [12].

Возможно также и то, что предложенный нами препарат «Лизомукоид» может в значительной степени снизить патогенное влияние стоматогенного действия ЛПС. Производство этого препарата организовано НПА «Одесская биотехнология» и есть надежда на значительное расширение его использования для профилактики и лечения не только стоматологических, но и общесоматических заболеваний, в патогенезе которых существенную роль играет стоматогенный фактор.



* – $p < 0,05$ в сравнении с группой 1 (норма)

** – $p < 0,05$ в сравнении с группой 2 (ЛПС)

Рис.2. Влияние геля «Лизомукоид» на степень дисбиоза в тканях крыс после оральной аппликации ЛПС.

Литература

1. Яковлев М. Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М. Ю. Яковлев // Успехи соврем. биологии. – 2003. – Т. 123, № 1. – С. 31-40.
2. Рябиченко Е. В. Роль кишечной бактериальной аутофлоры и её эндотоксина в патологии человека / Е. В. Рябиченко, В. М. Бондаренко // ЖМЭИ. – 2007. – № 3. – С.103-111.
3. Прозапальна дія ліпополісахариду на слизову оболонку порожнини рота щурів / А. П. Левицький, С. О. Дем'яненко, О. А. Макаренко [та ін.] // Одеський медичний журнал. – 2010. – № 2 (118). – С. 9 – 11.
4. Сравнительная оценка действия кверцетина, инулина и квертулина на показатели воспаления и дисбиоза в десне крыс после аппликаций геля с липополисахаридом / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.] // Вісник морської медицини. – 2013. – № 1(58). – С. 75-78.
5. Левицкий А. П. Дисбиоз, диабетическая ретинопатия и пребиотики / А. П. Левицкий, Ю. В. Цисельский. – Одесса: КП «Одеська міська друкарня», 2012. – 197 с.
6. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.
7. Лечебно-профилактические зубные эликсиры. Учебное пособие / А. П. Левицкий, К. Н. Косенко, Ю. Г. Романова [и др.] – Одесса : КП «Одеська міська друкарня», 2010. – 246 с.
8. Применение мукозальных гелей в стоматологии (методические рекомендации) / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.]– Одесса: КП «Одеська міська друкарня», 2012. – 20 с.

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

10. 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, 2007. – 26 с.

11. Левицкий А. П. Стоματοгенная эндотоксинемия / А. П. Левицкий // Журн. НАМН Украины. – 2013. – Т..., № ... – С.

12. Яковлев М. Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М. Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2003. – Т. 29, № 4. – С. 98-109.

Работа поступила в редакцию 11.09.2013 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования