

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

УДК 616.314.17.008.1–092.612.015.14

*А. П. Левицкий, д. биол. н.¹, О. В. Деньга, д. мед. н.¹,
О. А. Макаренко, д. биол. н.¹, Л. Н. Хромагина, к. биол. н.¹,
Е. П. Ступак, к. мед. н.², Т. В. Томилина, к. мед. н.³, О. Э. Кнава¹*

¹ГУ «Институт стоматологии НАМН»²ВГУУ «Украинская медицинская стоматологическая академия»³ГУ «Харьковский национальный медицинский университет»**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ГИНГИВИТА**

В работе дана характеристика методам моделирования наиболее распространённой патологии пародонта – гингивита. Всего представлено 7 моделей гингивита, в основе которых лежат различные патогенетические принципы, что очень важно для поиска наиболее эффективных средств и способов для лечения и профилактики этой патологии. Все представленные модели воспроизведения гингивита разработаны и применяются в ГУ «Институт стоматологии НАМН».

Ключевые слова: гингивит, методы моделирования.

*А. П. Левицький¹, О. В. Деньга¹, О. А. Макаренко¹, Л. М. Хромагіна¹,
О. П. Ступак², Т. В. Томіліна³, О. Е. Кнава¹*

¹ДУ «Інститут стоматології НАМН»²ВДУУ "Українська медична стоматологічна академія"³ДУ «Харківський національний медичний університет»**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИ ВІДТВОРЕННЯ ГІНГІВІТУ**

В работе дана характеристика методам моделирования наиболее распространённой патологии пародонта – гингивиту. Всего представлено 7 моделей гингивиту, в основе которых лежат различные патогенетические принципы, что очень важно для поиска наиболее эффективных средств и способов для лечения и профилактики этой патологии. Все представленные модели моделирования гингивиту разработаны и используются в ДУ «Институт стоматологии НАМН».

Ключеві слова: гінгівіт, методи моделювання.

*A. P. Levitskij¹, O. V. Den'ga¹, O. A. Makarenko¹,
L. N. Khromagina¹, E. P. Stupak², T. V. Tomilina³, O. E. Knava¹*

¹SE "The Institute of Stomatology of the NAMS"²HSEI "Ukrainian Medical Stomatological Academy"³SE "Kharkov National Medical University"**THE EXPERIMENTAL METHODS OF GINGIVITIS SIMULATION**

The characteristics of the methods of simulation of gingivitis, the most spread pathology in periodontium, were given in the article. In total, 7 simulations of gingivitis, in the basis of which different pathogenetic principles lie, are presented. This variety is very important in the search of the most effective remedies and methods for the treatment and prevention of this pathology. All introduced simulations of gingivitis are elaborated and used in SE "The Institute of Stomatology of the NAMS".

Key words: gingivitis, the methods of simulation.

Патология пародонта является одной из наиболее сложных и актуальных проблем стоматологии [1, 2]. Среди всех воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта первое место по частоте занимает гингивит [3, 4].

Для исследования патогенетических меха-

низмов развития гингивита и, особенно, для изучения эффективности разрабатываемых новых средств с целью профилактики и лечения этого заболевания необходимо иметь адекватные экспериментальные модели гингивита. Представ-

ленная работа рассматривает 7 моделей гингивита, в основе которых лежат различные патогенетические принципы, что очень важно для поиска наиболее эффективных лечебно - профилактических средств и способов.

1. Моделирование гингивита у крыс при помощи аппликаций фосфолипазой А₂ или пчелиным ядом

Фосфолипаза А₂ (ФЛА₂) играет пусковую роль в развитии патологических процессов в организме. Расщепляя лецитин и другие фосфолипиды, образующие, как известно, липидную основу биомембран, ФЛА₂ оказывает 3 негативных влияния: а) разрушает или модифицирует плазматические и внутриклеточные мембраны, что вызывает значительные нарушения в функционировании клетки; б) образует лизолецитины (лизофосфатиды), которые, обладая очень высокими поверхностно-активными свойствами, разрывают гидрофобные связи, обеспечивающие взаимодействие липидов и белков; в) выделяет из фосфолипидов молекулу полиненасыщенной жирной кислоты – арахидоновой, являющейся субстратом для циклооксигеназ, под действием которых образуется множество биологически активных соединений эйкозаноидов. В число последних входят простагландины, лейкотриены, тромбоксаны.

На основании патогенетической роли ФЛА₂ было предложено использовать аппликации с этим ферментом на ткани полости рта экспериментальных животных (крыс) с целью воспроизведения воспалительно-дистрофических изменений. В результате было установлено, что аппликации раствором ФЛА₂ различного происхождения (панкреатическая или из пчелиного яда фирмы "Sigma") на пародонт крыс вызывают увеличение маркеров воспаления и дистрофию альвеолярной кости животных [5].

Для моделирования воспалительного процесса в тканях десны крыс использовали также пчелиный яд, который помимо ФЛА₂ содержит меллитин, усиливающий провоспалительное действие. Таким образом, предложено воспроизводить экспериментальный гингивит у крыс, используя аппликации на десну геля на 2,5 %-ной карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), содержащего 10 мг/мл пчелиного яда. КМЦ-гель позволяет пролонгировать действие ФЛА₂

Аппликации на десну крыс наносят по 0,25 мл и осуществляют в течение двух дней по одному разу [6]. В работе [7] нами было показано, что максимально выраженные воспалительно-дистрофические и дисбиотические процессы

в десне крыс наблюдаются на 7-8 день после аппликации пчелиного яда. Контрольной группе крыс параллельно наносили на СОПР аппликации геля с физраствором.

О наличии воспалительного процесса в тканях десны судят по уровню биохимических показателей: маркеров воспаления (активность эластазы и содержание МДА), показателей микробной обсемененности (активность уреазы) неспецифического иммунитета (активность лизоцима), показателей состояния антиоксидантной системы (активность каталазы и антиоксидантно-прооксидантный индекс АПИ). Гомогенаты тканей десны готовят из расчета 20 мг/мл 0,05 М трис-НСІ буфера рН 7,5.

Моделирование гингивита этим способом приводит к достоверному росту активности важнейшего маркера воспаления – эластазы, имеющей, в основном, лейкоцитарное или микробное происхождение; уровня МДА и активности уреазы, что может свидетельствовать о росте микробной обсемененности десны. На фоне этих нарушений, как правило, снижается активность лизоцима, указывающая на ослабление неспецифического иммунитета тканей десны, а пониженная активность каталазы в десне крыс после аппликаций с пчелиным ядом указывает на недостаточность антиоксидантной защиты тканей десны.

2. Протаминавая модель гингивита

Протамин представляет собой аргининсодержащий белок, который в больших количествах находится в молоках рыб [8]. В медицинской практике растворы протамин (протамин сульфата) используют в качестве антидотов при передозировке гепарина [9]. При длительном (около 10 дней) парентеральном введении раствора протамин сульфата у животных развивается иммунорезистентность и сахарный диабет 2 типа [10].

При воспроизведении сахарного диабета при помощи протамин в составе геля, наносимого в виде аппликаций на СОПР крыс, было показано по биохимическим маркерам в тканях десны развитие дисбиоза и воспаления. Установленные изменения биохимических показателей были аналогичны тем, которые наблюдали при моделировании гингивита при помощи аппликаций гелем, содержащим пчелиный яд [11].

В работе использовали протамин сульфат производства ЗАО "Индар", (Украина) в виде 1 %-ного раствора (1000 м.е./мл) (регистрационное свидетельство Минздрава Украины № UA/9616/01/01 от 13.05.09 г. № 331). Гель, содержащий протамин сульфат, готовили на 2,5 %-ном растворе КМЦ натриевой соли с конечной

концентрацией протамина сульфата 1 мг/мл. Гингивит вызывали путём нанесения на СОПР 0,5 мл геля с протамин сульфатом один раз в день в течение 2 дней. Контрольной группе крыс параллельно наносили аппликации с физраствором.

В гомогенатах десны определяли те же биохимические показатели, что указаны выше, и дополнительно – содержание гиалуроновой кислоты. Поскольку известно, что гиалуроновая кислота является биологическим "цементом" соединительной ткани, определяя в значительной степени её способность препятствовать проникновению высокомолекулярных соединений и микробов внутрь тканей.

Нами установлено, что аппликации геля с протамин сульфатом достоверно снижают и содержание гиалуроновой кислоты в тканях десны, что может приводить к существенному повышению тканевой проницаемости и, как следствие, к увеличению транслокации бактерий и повышению риска развития воспаления. Помимо этого, результаты биохимического исследования ткани десны крыс убедительно доказывают инициирование процессов воспаления и развитие дисбиоза после нанесения аппликаций геля с протамин сульфатом [10].

3 Моделирование гингивита при помощи липополисахарида

Большинство реакций, возникающих в организме в ответ на инфекцию, инициирует кишечный эндотоксин липополисахарид (ЛПС), который образуется условно-патогенными грамотрицательными бактериями. Ведущими исследователями роли системной эндотоксинемии являются российские ученые М. Ю. Яковлев, А. В. Викторов, В. М. Бондаренко и другие [12–14], которые обосновали основные принципы формирования «эндотоксиновой агрессии» как универсального фактора патогенеза заболеваний человека.

После высвобождения из мембран грамотрицательными бактериями ЛПС всасывается из кишечника, связывается с сывороточными белками и образует комплекс «ЛПС–протеин», конъюгирующий со всеми доступными клеточными рецепторами CD₁₄, расположенными на мембранах макрофагов, полиморфноядерных лейкоцитов, эндотелиоцитов, активирует их, стимулируя выработку этими клетками цитокинов и других медиаторов воспалительной реакции (комплемента, вазоактивных медиаторов, метаболитов арахидоновой кислоты, адгезинов, кининов, факторов активации тромбоцитов, гистамина, активных кислородных радикалов и ок-

сида азота) [15].

На основании изложенного предположили, что непосредственное нанесение ЛПС в составе геля на СОПР экспериментальных животных может запускать каскад воспалительных реакций и приводить к развитию стойкого воспаления.

Для воспроизведения патологических процессов в десне используют препарат ЛПС из *Salmonella typhi* (препарат «Пирогенал» производства «Медгамал», Россия) в дозе 75 мкг/кг массы. Крысы наносят оральные аппликации геля с ЛПС на 2,5 %-ном КМЦ в количестве 0,5 мл на крысу из расчёта 75 мг/кг массы. В течение 30 минут после аппликаций гелем с ЛПС крыс лишают корма и воды. Умерщвление животных осуществляли на 2-й день опыта под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путём тотального кровопускания из сердца. В гомогенатах десны определяют вышеуказанные биохимические маркеры.

4 Перекисная модель гингивита

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является жизненно важным и физиологически необходимым процессом для синтеза таких внутриклеточных регуляторов, как простагландины, лейкотриены, а также фагоцитоза, пиноцитоза и других процессов. В физиологических условиях активация регулируемого эндогенного ПОЛ является необходимым механизмом обновления фосфолипидных мембранных структур. Однако, при экстремальных состояниях и патологических процессах резкое возрастание стационарного уровня эндогенных перекисей липидов выступает в качестве повреждающего фактора, нарушая структурную и функциональную ориентацию мембран. Образующиеся при этом продукты, например малоновый диальдегид (МДА), являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью [16, 17].

Перекисная модель патологических процессов в полости рта основана на использовании патогенных свойств перекисей липидов, способных при длительном поступлении в организм приводить к воспалительно-дистрофическим изменениям в тканях полости рта экспериментальных животных.

Для воспроизведения гингивита крысам к обычному рациону добавляют переокисленное соевое или подсолнечное масло с перекисным числом 35-45 в дозе 1 мл на животное (крысы линии Вистар) в течение не менее трех недель (10 мл/кг массы). Лечебное действие лекарственного средства испытывают с первого дня опыта (начало введения переокисленного масла) По ис-

течении срока опыта (3, 4 или 5 недель) животных умерщвляют, выделяют мягкие ткани десны, в гомогенатах которой определяют уровень маркеров воспаления: концентрацию МДА, активность эластазы, активность кислой фосфатазы и уреазы.

5 Моделирование гингивита при помощи гепатотоксинов

В настоящее время имеется множество убедительных клинических и экспериментальных данных, свидетельствующих о связи стоматологической и гепато-билиарной патологии. Анализируя работы, посвященные роли печени в развитии стоматологической патологии, следует остановиться на наиболее вероятных механизмах влияния гепато-билиарной патологии на состояние тканей полости рта.

Прежде всего, напрашивается предположение о цитотоксическом действии больной печени, которое может быть опосредовано влиянием на мягкие ткани полости рта главных продуктов, экскретируемых печенью с желчью - желчных кислот и билирубина. Во-вторых, при гепато-билиарной патологии снижается антиоксидантная функция печени, особенно в отношении токсинов, образуемых в кишечнике под действием кишечной микрофлоры либо поступающих с пищей или в виде лекарств. И, в-третьих, очень важным аспектом участия печени в патогенезе стоматологических заболеваний может быть ее антимикробная функция. Печень является одним из важнейших барьеров на пути следования микробов и их токсинов из кишечника через лимфатическую и кровеносную системы. Нарушение барьерной функции печени приводит к прорыву условно-патогенных и патогенных бактерий в систему гемодинамики с последующим инфицированием различных органов, в том числе и тканей ротовой полости.

На основании изложенного предлагается несколько моделей токсического поражения печени, ведущего к развитию воспаления в десне экспериментальных животных.

При моделировании токсического гепатита у крыс путем внутрибрюшинного введения 50 % масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) в дозе 3,5 мл/кг один раз уже в первые 3-5 дней наблюдают истончение эпителиального слоя слизистой оболочки полости рта и уменьшение содержания РНК в эпителиоцитах [18]. В гомогенатах десны при этом отмечают увеличение общей протеолитической активности, активности щелочной фосфатазы и рост концентрации маркера перекисного окисления липидов - мало-

нового диальдегида [19].

Моделирование у крыс гепатохолецистита путем введения *per os* в течение 2 недель комплекса туберкулостатиков (изониазид 50 мг/кг, рифампицин 500 мг/кг и пиперазинид 1500 мг/кг) вызывает увеличение уровня маркеров воспаления в десне (малоновый диальдегид, общая протеолитическая активность, кислая фосфатаза), существенно снижает уровень антиоксидантной защиты, о чем свидетельствует снижение активности каталазы [20].

Токсический гепатит, вызванный у крыс с помощью однократного внутримышечного введения гидразина гидрохлорида 100 мг/кг, на 14-й день приводит к увеличению всех маркеров воспаления в десне крыс.

При воспроизведении у экспериментальных животных обтурационного холестаза уже на 3-и сутки в тканях десны также отмечается увеличение активности всех маркеров воспаления.

б Дисбиотическая модель гингивита

При воспроизведении системного дисбиоза (дисбактериоза) с помощью линкомицина (60 мг/кг), который вводят крысам с питьевой водой на протяжении 5 дней, помимо увеличения активности уреазы и падения активности лизоцима в тканях полости рта отмечается рост всех маркеров воспаления (активности эластазы, кислой фосфатазы, уровня МДА) [19]. На основании полученных данных можно считать, нарушение микробиоценоза индуцирует воспаление.

7 Модель асептического воспаления

Модель воспаления получают путем нанесения на десну 5%-ного раствора едкого натра в виде аппликации на 10 секунд. Через 1 час развивается воспалительный процесс, выражающийся в резком отеке слизистой оболочки языка. После этого можно применять испытуемое лечебное средство для полости рта по схеме и в дозировке, рекомендуемой к клиническому применению.

По окончании эксперимента животных забивают методом тотального кровопускания, оценивают клиническое состояние исследуемого объекта и проводят биохимические исследования гомогената участка десны с воспалением.

Список литературы

1. Данилевский Н. Ф. Заболевания пародонта / Н. Ф. Данилевский, А. В. Борисенко. - К.: Здоров'я, 2000. - 160 с.
2. Машенко И. С. Болезни пародонта / И. С. Машенко. - Днепропетровск: КОЛО, 2003. - 272 с.

3. **Влияние** комплекса фитоадаптогенов на биохимические параметры ротовой жидкости при лечении хронического катарального гингивита у девочек в пубертатном периоде / О. В. Деньга, Е. А. Юдина, О. А. Макаренко, Е. О. Воскресенская // Вісник стоматології. – 2004. – № 3. – С. 69-71.
4. **Чумакова Ю. Г.** Патогенетичне обґрунтування методів комплексного лікування генералізованого пародонтиту : автореф. дис. на здобуття наук. Ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.00.21 «Стоматологія» / Ю. Г. Чумакова. – Одеса, 2008. – 37 с.
5. **Фосфоліпазна** модель пародонтиту / В. М. Зубачик, А. П. Левицкий, О. А. Макаренко [та ін.] // Вісник стоматології. – 1999. – № 4. – С. 3-7.
6. **Ткачук Н. И.** Биохимические изменения в тканях полости рта крыс при воспроизведении стоматита с помощью пчелиного яда / Н. И. Ткачук, В. Я. Скиба, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2007. – № 6. – С. 16-20.
7. **Состояние** пародонта у крыс после аппликации на десну геля с пчелиным ядом / Н. Л. Хлыстун, М. И. Скидан, К. В. Скидан [и др.] // Вісник стоматології. – 2012. – № 2 (79). – С. 8-10.
8. **Гауровиц Ф.** Химия и функции белков / Ф. Гауровиц – М.: Мир, 1965. – 531 с.
9. **Машковский М. Д.** Лекарственные средства / М. Д. Машковский - М.: Медицина, 1978. – 8-е изд. – Т. 1. – 529 с.
10. **Ульянов А. М.** Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов // Вопросы мед. химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.
11. **Биохимические** изменения в десне и сыворотке крыс после оральной аппликации геля с протамином / И. И. Соколова, Н. Л. Хлыстун, Е. П. Ступак [и др.] // Вісник стоматології. – 2012. – № 4 (81). – С. 8-11.
12. **Яковлев М. Ю.** «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М. Ю. Яковлев // Успехи соврем. биохимии. – 2003 Т. 123, № 1. – С. 31-40.
13. **Викторов А. В.** Связывание липополисахарида и комплексов липополисахарида с сывороточными липопротеинами низкой плотности с макрофагами печени / А. В. Викторов, В. А. Юркив // Биомед. химия. – 2006. – Т. 52, в. 2. – С. 36-43;
14. **Лиходед В. Г.** Антиэндотоксиновый иммунитет в регуляции численности эшерихиозной микрофлоры кишечника / В. Г. Лиходед, В. М. Бондаренко. – М.: Медицина, 2007. – 216 с.
15. **Петухов В. А.** Дисбиоз, эндотоксиновая агрессия, нарушение функции печени и дисфункция эндотелия в хирургии. Современный взгляд на проблему / В. А. Петухов // Трудный пациент. – 2006. – № 4. – С. 46-51.
16. **Сазонтова Т. Г.** Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2 – 18.
17. **Воейков В. Л.** Активные формы кислорода – патогенны или целители? / В. Л. Воейков // Клиническая геронтология. – 2003. – Т. 9, № 3. – С. 27 – 40.
18. **Демьяненко С. А.** Применение лецитиновых гепатопротекторов в стоматологии / С. А. Демьяненко – Симферополь: изд-во "Тарпан", 2010. – 50 с.
19. **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.
20. **Амелина Н. В.** Сравнительное изучение профилактической эффективности лецитиновых препаратов на фоне сочетанной патологии печени и кариеса зубов у крыс / Н. В. Амелина, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2008. – № 2. – С. 2-6.

