

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

“Журнал НАМН України”, 2013, т. 19, № 4. — С. 490-493.

УДК 612.821+576.314.6

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

А. П. Левицкий

Государственное учреждение “Институт стоматологии НАМН Украины”, 65026 Одесса

СТОМАТОГЕННАЯ ЭНДОТОКСИНЕМИЯ

В опытах на белых крысах показано, что аппликации геля с кишечным эндотоксином на слизистую полости рта оказывают более выраженное влияние на уровень биохимических маркеров воспаления и защиты в сыворотке крови, сердце и печени, чем внутрибрюшинное введение его значительно больших доз. Характер биохимических изменений в тканях полости рта после аппликаций эндотоксина аналогичен изменениям, наблюдаемым при стоматите.

Ключевые слова: эндотоксин, полость рта, печень, сердце, кровь, эластаза, малоновый диальдегид, каталаза, лизоцим.

Эндотоксинемия – это состояние, которое вызывается наличием в крови кишечного эндотоксина [12, 15]. Кишечный эндотоксин представляет собой липополисахарид (ЛПС) [1]. Он вырабатывается грамотрицательными бактериями [18], а также сине-зелеными водорослями [15]. Накапливается ЛПС в оболочке бактерий и после ее разрушения выделяется в окружающую среду [9]. Он легко проникает через гисто-гематические барьеры, а также через кишечную стенку [12]. Обладая большим сродством к клеточным мембранам, он легко связывается с ними, особенно с мембраной лейкоцитов [11]. После связывания с мембраной он поглощается клетками и деградирует.

ЛПС обладает широким спектром биологического действия [8] — пирогенностью (для людей и кроликов), адьювантной активностью, радиопротекторным действием, вызывает локальную реакцию Шварцмана, активирует макрофаги, гранулоциты, систему комплемента, индуцирует перекрестную толерантность к эндотоксинам, синтез ФНО (кахексин), интерлейкинов, колониестимулирующего фактора, эйкозаноидов.

При достижении определенной критической концентрации ЛПС оказывает патогенное действие на органы и ткани, это состояние получило название “эндотоксиновая агрессия” [16].

Поскольку самое большое количество грамотрицательных бактерий (энтеробактерии, бактероиды, порфиромонады и ряд других) находится в толстой кишке, то как правило считают, что наиболее опасен для макроорганизма ЛПС, вырабатываемый в кишечнике [9]. Однако не всегда учитывают, что на пути ЛПС, поступающего из кишечника в системный кровоток, стоит печень, которая поглощает и обезвреживает почти весь поступающий по воротной вене ЛПС [4, 14].

Вторым источником ЛПС в организме является ротовая полость, в которой наряду с грамположительными бактериями (в основном, стрептококками и стафилококками) содержатся и грамотрицательные бактерии, особенно при дисбактериозах полости рта [17]. Учитывая большую способность ЛПС проникать через тканевые барьеры и принимая во внимание отсутствие на пути стоматогенного ЛПС печени, можно полагать, что ЛПС, образуемый в полости рта, может представлять значительно большую угрозу для организма, чем ЛПС кишечного происхождения.

Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение воздействия ЛПС при внутрибрюшинном введении и после аппликаций на слизистую полости рта на уровень биохимических маркеров воспаления и защиты в сыворотке крови, сердце и печени.

А. П. Левицкий — зам. директора по научной работе, зав. отделом биотехнологий, чл.-кор. НААН Украины (flavan@mail.ru)

© А. П. Левицкий, 2013 .

Материал и методы. Эксперименты были проведены на белых крысах линии Вистар в 4 сериях опытов (табл. 1). В работе был использован ЛПС из *E. coli* 0111:B4, очищенный фенольной экстракцией, содержащий 500 тыс. эндотоксиновых единиц на 1 мг (*Sigma*, США). Кроме того, использовали препарат пчелиного яда (*Sigma*).

Таблица 1

Характеристика серий опытов

Препарат	Доза	Продолжительность экспозиции	Крысы
ЛПС, аппликация на СОПР	75 мкг/кг	1 сут	Самцы, 7 мес (n = 14)
ЛПС, аппликация на СОПР	30 мкг/кг 60 мкг/кг 90 мкг/кг	4 ч	Самцы, 14 мес (n = 20)
ЛПС, внутривнутрибрюшинно	200 мкг/кг	1 сут	Самки, 13 мес (n = 20)
Пчелиный яд, аппликация на СОПР	9 мг/кг	7 сут	Самки, 15 мес (n = 16)

Препараты апплицировали на слизистую оболочку полости рта (СОПР) в составе гелей на основе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [6].

В качестве контроля служили крысы, которым наносили на СОПР гель карбоксиметилцеллюлозы без ЛПС или пчелиного яда. В группе с в/брюшинным вводом ЛПС контролем служили крысы, которым в/брюшинно вводили 0,9 % NaCl.

Умерщвление животных осуществляли под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца.

В качестве маркеров воспаления были избраны активность эластазы [7] или казеинолитическая активность [5], концентрация малонового диаль-

дегида (МДА) [5], а в качестве показателей систем защиты — лизоцимная активность (неспецифический иммунитет) [3] и активность каталазы (антиоксидантный фермент) [5], которые определяли в сыворотке крови, гомогенатах слизистой щеки и десны, а также сердца и печени.

Статобработку проводили с использованием пакета "Statistica-5" с определением среднеарифметического значения, стандартной ошибки и *t*-критерия Стьюдента [10].

Результаты и их обсуждение. Аппликации эндотоксина из расчета 75 мкг/кг массы тела на СОПР вызывают существенное повышение активности эластазы не только местно в слизистой щеки и десны, но и в меньшей степени в сыворотке крови, печени и сердце (табл. 2). Уровень другого маркера воспаления — МДА — достоверно повышается в СОПР и сыворотке крови, но мало изменяется в печени и сердце.

Наиболее значительно под влиянием ЛПС изменяется лизоцимная активность — показателя неспецифического иммунитета. Ее уровень в наибольшей степени снижается в СОПР, однако снижение лизоцимной активности также весьма значительно в печени и сердце.

Что касается активности каталазы, то ее уровень несколько снижается в СОПР и в сердце, значительно снижается в сыворотке крови. Совершенно не реагирует на введение ЛПС печень. Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что ЛПС может легко проникать из полости рта в системный кровоток и оказывать патогенное действие на другие органы и ткани ("стоматогенная эндотоксинемия").

Результаты определения воздействия на биохимические маркеры в сыворотке крови разных доз

Таблица 2

Уровень биохимических маркеров воспаления и защиты через 1 сут после аппликации ЛПС (75 мкг/кг) на СОПР крыс, $M \pm m$

Биохимические маркеры	Слизистая щеки	Десна	Сыворотка крови ¹	Печень	Сердце
Эластаза, мк-кат/кг					
контроль	40 ± 3	41 ± 2	195 ± 16	371 ± 15	63 ± 1
ЛПС	50 ± 2*	58 ± 2*	293 ± 24*	439 ± 15*	74 ± 2*
МДА, ммоль/кг					
контроль	13,8 ± 0,4	13,7 ± 1,0	0,42 ± 0,01	28,1 ± 1,1	14,8 ± 1,1
ЛПС	15,6 ± 0,6*	18,2 ± 1,0*	0,63 ± 0,02*	29,2 ± 2,1	15,6 ± 1,1
Лизоцим, ед/кг					
контроль	358 ± 31	393 ± 70	96 ± 7	191 ± 16	171 ± 9
ЛПС	149 ± 31***	167 ± 13*	73 ± 3*	87 ± 12**	91 ± 8**
Каталаза, мкат/кг					
контроль	5,70 ± 0,10	5,84 ± 0,17	0,22 ± 0,01	5,50 ± 0,04	4,55 ± 0,25
ЛПС	5,17 ± 0,09*	5,46 ± 0,16*	0,11 ± 0,01***	5,52 ± 0,04	3,98 ± 0,28

Примечания: ¹ — здесь и в табл. 4, 5 биохимические показатели сыворотки крови рассчитывали на 1 л; здесь и в табл. 3-5: * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,01$, *** — $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3

Влияние разных доз ЛПС через 4 ч после его аппликации на СОПР крыс на уровень биохимических маркеров воспаления и защиты в сыворотке крови крыс, $M \pm t$

Биохимические маркеры	Контроль	ЛПС, мкг/кг		
		30	60	90
Эластаза, мк-кат/л	258 ± 17	308 ± 11*	313 ± 18*	309 ± 17*
МДА, ммоль/л	1,15 ± 0,03	1,99 ± 0,02***	2,39 ± 0,02***	1,25 ± 0,02*
Лизоцим, ед/л	103 ± 11	90 ± 10	86 ± 7	77 ± 9*
Каталаза, мкат/л	0,21 ± 0,02	0,15 ± 0,01*	0,15 ± 0,01*	0,14 ± 0,01*

ЛПС при аппликациях на СОПР приведены в табл. 3. Как видно из этих данных, с увеличением дозы и срока воздействия ЛПС дозозависимо растет активность эластазы и дозозависимо снижается лизоцимная активность. Причем, доза ЛПС при его аппликации на СОПР из расчета 30 мкг/кг уже оказывает ощутимое влияние эффект, особенно на уровень МДА, который повышается в 1,5-2 раза, тогда как активность эластазы — лишь в 1,2-1,5 раза.

В табл. 4 представлены результаты определения биохимических маркеров воспаления и защиты в тканях после введения ЛПС внутрибрюшинно в дозе из расчета 200 мкг/кг. Из этих данных видно, что в сыворотке и в слизистой щеки внутрибрюшинный способ менее эффективен, чем аппликационный (см. табл. 2). Об этом свидетельствует более низкая активность эластазы и мало изменяющийся уровень МДА.

Таблица 4

Уровень биохимических маркеров воспаления и защиты через 1 сут после внутрибрюшинного введения крысам ЛПС (200 мкг/кг), $M \pm t$

Биохимические маркеры	Слизистая щеки	Десна	Сыворотка крови	Печень
Казеинолитическая активность, нкат/кг				
контроль	36,8 ± 5,1	39,2 ± 4,3	1,77 ± 0,29	33,8 ± 3,8
ЛПС	51,8 ± 6,5	47,0 ± 5,2	1,91 ± 0,24	44,2 ± 2,7*
МДА, ммоль/кг				
контроль	19,9 ± 1,2	20,5 ± 3,3	0,75 ± 0,08	35,6 ± 1,0
ЛПС	19,3 ± 1,0	25,1 ± 3,2	0,84 ± 0,13	55,3 ± 4,8*
Лизоцим, ед/кг				
контроль	395 ± 41	274 ± 32	85 ± 3	—
ЛПС	186 ± 94*	143 ± 80	77 ± 5	—
Каталаза, мкат/кг				
контроль	10,50 ± 0,48	11,38 ± 0,34	0,27 ± 0,01	5,72 ± 0,40
ЛПС	9,29 ± 0,53	10,13 ± 0,35*	0,23 ± 0,01*	5,42 ± 0,78

В табл. 5 представлены результаты определения вышеуказанных биохимических маркеров в сыворотке крови и в СОПР крыс при моделировании у них стоматита аппликациями пчелиного

яда. Анализируя результаты, показанные в табл. 5, можно заключить, что при действии пчелиного яда в сыворотке крови в большей степени повышается содержание МДА, а в слизистой щеки больше снижается лизоцимная активность. Представленные результаты показывают, что характер изменений биохимических маркеров очень напоминает изменения, наблюдаемые при аппликации ЛПС. Можно предположить, что в патогенезе стоматита ведущим фактором является ЛПС, образуемый оральными грамотрицательными бактериями.

Таблица 5

Уровень биохимических маркеров воспаления и защиты в тканях крыс на 7-е сутки после аппликации пчелиного яда (9 мг/кг) на СОПР (экспериментальный стоматит), $M \pm t$

Биохимические маркеры	Слизистая щеки	Десна	Сыворотка крови
Эластаза, мк-кат/кг			
контроль	40 ± 2	41 ± 1	237,9 ± 8,8
стоматит	52 ± 2**	50 ± 2**	260,7 ± 27,8
МДА, ммоль/кг			
контроль	19,5 ± 0,5	14,1 ± 0,3	0,56 ± 0,01
стоматит	26,5 ± 0,5***	19,7 ± 0,4***	1,07 ± 0,01***
Лизоцим, ед/кг			
контроль	357 ± 25	391 ± 9	91 ± 3
стоматит	39 ± 8***	161 ± 8***	81 ± 3*
Каталаза, мкат/кг			
контроль	5,29 ± 0,27	5,68 ± 0,21	0,16 ± 0,01
стоматит	4,98 ± 0,24	5,11 ± 0,23*	0,13 ± 0,01

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о способности ЛПС, образуемого в полости рта, свободно проникать в системный кровоток и оказывать воздействие на многие органы и ткани, причем в дозировках значительно меньших, чем при внутрибрюшинном введении. Характер биохимических изменений в СОПР и в сыворотке крови при моделировании стоматита очень похож на характер изменений, наблюдаемых при аппликации ЛПС, что может указывать на ведущий патогенетический механизм развития этих заболеваний и свидетельствовать о стоматогенной эндотоксинемии.

Принимая во внимание массовый характер развития дисбиозов полости рта [2], можно полагать, что стоматогенная эндотоксинемия должна обязательно учитываться при рассмотрении пато-

генеза многих неинфекционных заболеваний — таких, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2 типа, ожирение и некоторые другие [12].

Список использованной литературы

1. Варбанец Л. Д. Эндотоксины грамотрицательных бактерий: структура и биологическая роль // Микробиол. журн. — 1994. — 56, № 3. — С. 76-97.
2. Зеленова Е. Г., Заславская М. И., Салина Е. В. и др. Микрофлора полости рта: норма и патология. — Н. Новгород: НГМА, 2004. — 158 с.
3. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков. — Одесса: КП ОГТ, 2005. — 74 с.
4. Левицкий А. П., Демьяненко С. А., Цисельский Ю. В. Антимикробная функция печени. — Одесса: КП ОГТ, 2011. — 141 с.
5. Левицкий А. П., Денга О. В., Макаренко О. А. и др. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации. — Одесса, 2010. — 16 с.
6. Левицкий А. П., Макаренко О. А., Селиванская И. А. и др. Применение мукозальных гелей в стоматологии (метод. рекомендации). — Одесса, 2012. — 20 с.
7. Левицкий А. П., Макаренко О. А. Деструктивна роль еластази у патологічній резорбції кісткової тканини // Вісник морської медицини. — 2011. — № 3. — С. 140-142.
8. Малов В. А., Пак С. Г., Суджан Е. В. Синдром интоксикации в инфекционной патологии: новый взгляд на старую проблему // ЖМЭИ. — 1994. — № 5. — С. 105-109.
9. Рябиченко Е. В., Бондаренко В. М. Роль кишечной бактериальной аутофлоры и ее эндотоксина в патологии человека // ЖМЭИ. — 2007. — № 3. — С. 103-111.
10. Сернов Л. Н., Гоцура В. В. Элементы экспериментальной фармакологии. — М.: Наука, 2000. — 352 с.
11. Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Биологические свойства эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Успехи соврем. биол. — 1980. — 90, № 1. — С. 62-80.
12. Титов В. Н., Дугин С. Ф. Синдром транслокации, липополисахариды бактерий, нарушения биологических реакций воспаления и артериального давления (лекция) // Клин. лабор. диагностика. — 2010. — № 4. — С. 21-37.
13. Чижиков Н. В., Аниховская И. А., Лиходед В. Г. и др. Системная эндотоксинемия в патогенезе атеросклероза // Успехи соврем. биол. — 2001. — 121, № 3. — С. 266-274.
14. Яковлев М. Ю. Роль кишечной микрофлоры и недостаточности барьерной функции печени в развитии эндотоксинемии и воспаления // Казанский мед. журн. — 1988. — 69, № 5. — С. 353-358.
15. Яковлев М. Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека // Физиология человека. — 2003. — 29, № 4. — С. 98-109.
16. Яковлев М. Ю. “Эндотоксиновая агрессия” как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных // Успехи соврем. биол. — 2003. — 123, № 1. — С. 31-40.
17. Tamura V., Tociuda M., Nagaoka S. et al. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukine-8 gene expression in human gingival fibroblast culture // Infect. Immun. — 1992. — 60, № 11. — P. 4932-4937.
18. Wang X., Quinn P. Endotoxins: structure, function and recognition. — Seria: Subcellular Biochemistry. — V. 53. — Springer, 2010. — 415 p.

Получено 26.03.2013

СТОМАТОГЕННА ЕНДОТОКСИНЕМІЯ

А. П. Левицкий

Державна установа “Інститут стоматології НАМН України”, 65026 Одеса

У досліджах на білих щурах показано, що аплікації гелю з кишковим ендотоксином на слизову оболонку рота здійснюють більш сильний вплив на рівень біохімічних маркерів запалення і захисту в сироватці крові, серці і печінці порожнини рота, ніж внутрішньоочеревинне введення його значно більших доз. Характер біохімічних змін у тканинах порожнини рота після аплікацій ендотоксину аналогічний змінам, що спостерігаються при стоматиті.

STOMATOGENIC ENDOTOXINEMIA

A. P. Levitsky

State Institution “Institute of Stomatology NAMS Ukraine”, 65026 Odessa

In experiments on albino rats were shown that applications of gel with intestinal endotoxin to the mucosa of mouth cavity produce a more marked effect on the level of biochemical markers of inflammation and protection in the blood serum, heart and liver vs. intraperitoneal administration of its considerably larger doses. The nature of biochemical changes in the tissues of mouth cavity following endotoxin applications was similar to those observed in stomatitis.