

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БАКТЕРИАЛЬНО-ИММУННОМ ПАРОДОНТИТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ФЛАВОНОЛОМ

А.Е. Демкович

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет
имени И.Я. Горбачевского МЗ Украины», Тернополь, Украина

Ключевые слова: бактериально-иммунный пародонтит, фагоцитоз, моноциты, кверцетин.

Key words: bacterial-immune periodontitis, phagocytosis, monocytes, quercetin.

Цель исследования заключалась в оценке активности нейтрофилов крови при экспериментальном бактериально-иммунном пародонтите и выяснении влияния флавонола кверцетина на его показатели. В статье приведены результаты исследований показателей спонтанного и активированного теста с нитросиним тетразолием на 14-е сутки экспериментального бактериально-иммунного пародонтита и после коррекции его кверцетином (в тот же период эксперимента). При этом приводятся данные о характере изменений нейтрофильной активности в процессе формирования воспалительного очага в пародонтальном комплексе. Применение флавонола кверцетина, который, воздействуя на иммунные процессы, ограничивал воспалительную реакцию в тканях пародонта и приводил к снижению активности нейтрофилов относительно показателей животных, которым не вводили этот препарат. В результате применения кверцетина показатели активности нейтрофилов приближались к величинам контрольной группы.

CHANGES OF ACTIVITY OF NEUTROPHILS OF BLOOD AT EXPERIMENTAL BACTERIAL AND IMMUNE PERIODONTAL DISEASE AND THEIR CORRECTION BY FLAVONOL

A.E. Demkovich

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

The purpose of the study was to evaluate the activity of neutrophils in the blood under the condition of the experimental bacterial-immune periodontitis and to clarify the effect of flavonol quercetin on its parameters. The article presents the results of research on the indices of the spontaneous and activated test with nitrosin tetrazolium on the 14th day of the experimental bacterial-immune periodontitis and after correction with quercetin (in the same period of the experiment). In this case, data on the nature of changes in neutrophilic activity in the process of formation of inflammatory focus in the periodontal complex are given. The use of flavonol quercetin, which, acting on the immune processes, limited the inflammatory response in the periodontal tissues and led to a decrease in neutrophil activity relative to the rates of animals that did not receive the drug. As a result of the use of quercetin, the activity of neutrophils approached the values of the control group.

Введение. В настоящее время отмечается значительный рост воспалительных заболеваний пародонта и «омоложение» контингента пациентов с данной патологией. Пародонтит – это сложный аутоиммунный и нейротрофический процесс. Изучению данного вопроса посвящено значительное количество научных исследований [1]. Однако в реальной практической работе врача-стоматолога нет, к сожалению, существенных изменений в процессе лечения, приносящих за короткий период времени результаты (выздоровление или достижение долговременной ремиссии). Пародонтит характеризуется наличием устойчивых прогрессирующих морфофункциональных изменений с формированием хронического инфекционного очага, проявляется не только на местном уровне, но и на уровне целого организма [2].

В последнее время накоплено много подтверждений тому, что в результате заболевания пародонта может возрастать риск системных болезней. Это касается, например, коронарной болезни сердца, инфаркта миокарда, инсульта, атеросклероза, опасности преждевременных родов. Терапия заболеваний пародонта считается сложной проблемой [3]. Известные методы лечения требуют новых подходов их решений на основе патогенетически обоснованных разработок и усовершенствований.

Актуально более глубокое и всестороннее изучение характера нарушений иммуноло-

гических процессов в механизмах развития данной патологии как одной из важных звеньев патогенеза [4]. В настоящее время общепризнано, что одно из ключевых звеньев в иммунной системе занимает фагоцитоз, который рассматривается не только как инструмент противоинфекционного иммунитета, но и как универсальный эффектор, реагирующий на многочисленные сигналы о дестабилизации внутренней среды организма и является одной из ключевых патогенетических звеньев развития и протекания иммунных и воспалительных реакций [5].

Установлено, что флавонол кверцетин является мощным антиоксидантом, который проявляет также антиишемическое, мембраностабилизирующее и иммуномодулирующее действие, эффективно влияет на энергетический обмен в миокарде, при этом снижает потребность его в кислороде, проявляет антиаритмические и анаболические эффекты, имеет значительный восстановительный потенциал [6].

Противовоспалительные и противоаллергические эффекты связаны также со способностью кверцетина подавлять кальций-АТФазу и синтез лейкотриенов. Флавонол способен повышать содержание клеток иммунной системы в крови (фагоцитов, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов), в результате чего уменьшаются проявления вторичной иммуносупрессии [7], и может быть перспективным в плане исследования его свойств при пародонтите.

Целью данного исследования было выяснить влияние флавонола кверцетина на показатели метаболической активности нейтрофилов крови при экспериментальном бактериально-иммунном пародонтите.

Методика. Исследование проведено на белых беспородных клинически здоровых крысах-самцах массой 150-200 г в условиях вивария. Эксперименты проводились с соблюдением общих правил и положений Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 1986), общих этических принципов экспериментов на животных (Киев, 2001). Животные находились в течение всего времени наблюдения на стандартном пищевом рационе, сбалансированном по элементам пищи со свободным доступом к воде. Крысы были рандомизировано разделены на 3 группы: I – интактные животные, контроль (n = 10); II – животные с экспериментальным пародонтитом на 14-е сутки исследования (n = 8); III – животные с экспериментальным пародонтитом на 14-е сутки исследования, которым вводили кверцетин (n = 8). Экспериментальный бактериально-иммунный пародонтит у опытных животных вызывали путем введения в ткани пародонтального комплекса смеси микроорганизмов, разбавленной яичным протеином [8]. Для усиления иммунного ответа одновременно проводилась инъекция в лапку крысы полного адьюванта Фрейнда. У крыс третьей группы использовали водорастворимый препарат кверцетина (корвитин, производства Борщаговского ХФЗ) путем инъекций (100 мг/кг массы животного) в течение 7-ми суток (с 7-ой по 14-е сутки).

На 14-е сутки, в период максимального формирования иммунно-воспалительного процесса, исследуемых животных умерщвляли путем кровопускания под тиопенталовым наркозом. Для дальнейших исследований брали кровь, в которой определяли бактерицидное действие нейтрофилов с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [9].

При постановке спонтанного НСТ-теста фагоциты культивировались в присутствии нитросинего тетразолия без предварительной активации клеток, при проведении индуцированного НСТ-теста – к среде культивирования добавляли активатор фагоцитарной реакции. Реакцию оценивали путем подсчета 100 нейтрофилов на наличие в цитоплазме гранул и зерен диформаза. В цитоплазме клеток, которые положительно реагировали с НСТ, зафиксировано выпадение гранул формаза сине-фиолетового цвета. При отрицательной реакции с НСТ – гранулы формаза в цитоплазме клеток отсутствовали. Для характеристики резервных возможностей кислород-зависимого метаболизма определяли показатель резерва и коэффициент метаболической активации.

Полученные цифровые величины статистически обрабатывали с применением пара-

метрических и непараметрических методов статистики с помощью программного обеспечения «Excel» («Microsoft», США) и «STATISTICA» 10.0 («Statsoft», США) [10]. Достоверность различий значений между независимыми количественными величинами определяли при нормальном распределении по U-критерию Манна-Уитни [11].

Результаты и их обсуждение. После введения экспериментальным животным в ткани пародонта смеси микроорганизмов разбавленной протеином, развивался воспалительный процесс с выраженными изменениями со стороны мягких тканей нижней челюсти, которые сопровождались отеком и гиперемией слизистой оболочки и по характеру проявления были подобны изменениям, имеющих место у человека [12].

НСТ-тест относят к иммунологическим исследованиям, который позволяет оценить активность кислородно-антимикробной системы фагоцитов, а также фагоцитарную и метаболическую активность этих клеток [13]. Спонтанную кислородную бактерицидность фагоцитирующих клеток обозначают как спонтанный НСТ-тест, этот же показатель при стимуляции клеток активатором фагоцитарной реакции принято обозначать как стимулированный НСТ-тест.

Исследуя количество диформазанположительных клеток при постановке активированного НСТ-теста у крыс с экспериментальным бактериально-иммунным пародонтитом на 14-е сутки развития воспалительного процесса в пародонтальном комплексе, было обнаружено уменьшение количества нейтрофилов с данными свойствами в 1,47 раза ($p < 0,01$) относительно контрольной группы. Вместе с тем при определении величины данного показателя при спонтанном НСТ-тесте результаты оказались противоположного направления, то есть количество диформазанположительных клеток увеличилось в 1,57 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными животными (таблица 1), что является проявлением повышения кислородной бактерицидности лейкоцитов.

Таблица 1.

Влияние кверцетина на показатели НСТ-теста нейтрофилов крови белых крыс с экспериментальным бактериально-иммунным пародонтитом ($M \pm m$)

Показатели	Контроль. Интактные животные	Животные с экспериментальным пародонтитом	
		на 14-е сутки исследования	на 14-е сутки исследования + кверцетин
Количество животных	10	8	8
Диформазанположительные клетки в активированном тесте (%)	$31,07 \pm 1,01$	$21,20 \pm 0,74$ $p_1 < 0,01$	$27,51 \pm 0,84$ $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,01$
Диформазанположительные клетки в спонтанном тесте (%)	$14,39 \pm 0,84$	$22,54 \pm 0,90$ $p_1 < 0,01$	$16,90 \pm 0,80$ $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,01$
Коэффициент метаболической активации	$29,23 \pm 1,91$	$20,07 \pm 0,81$ $p_1 < 0,01$	$26,87 \pm 0,85$ $p_1 > 0,05$; $p_2 < 0,01$
Показатель резерва кислород- зависимого метаболизма	$2,24 \pm 0,17$	$0,98 \pm 0,07$ $p_1 < 0,01$	$1,62 \pm 0,09$ $p_1 < 0,01$; $p_2 < 0,01$

Примечания: p_1 – достоверность различий по отношению к интактным животным;
 p_2 – достоверность различий по отношению к животным с пародонтитом (14-е сутки).

При этом изменилась также величина коэффициента метаболической активации. Так, на 14-е сутки развития бактериально-иммунного пародонтита он уменьшился в 1,46 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем.

Что касается показателя резервных возможностей кислород-зависимого метаболизма, то при его определении была обнаружена аналогичная тенденция к уменьшению. В частности, у крыс с экспериментальным генерализованным пародонтизом он уменьшался в 2,29 раза относительно интактной группы ($p < 0,01$).

Применение флавонола кверцетина в дозе 100 мг / кг в течение 7-ми дней внутримышечно приводило к увеличению диформазаположительных клеток в индуцированном тесте с нитросиним тетразолием в 1,30 раза ($p < 0,01$) в крови по сравнению с такими показателями группы животных с экспериментальным пародонтизом на 14-е сутки, не получавших этого вещества. Полученные результаты свидетельствуют о его влиянии на клеточное звено неспецифической резистентности организма, и может быть показателем повышенной готовности их к завершению фагоцитоза (таблица 1, рисунок 1).

Следует заметить, что при сравнении вышеупомянутого показателя активности фагоцитирующих клеток на 14-е сутки экспериментального пародонтиза с тем, который был определен в данный период исследования, но у животных, которым вводили кверцетин, оказалось, что он оставался на более низком уровне относительно показателя контрольной группы животных (в 1,13 раза, $p < 0,05$).

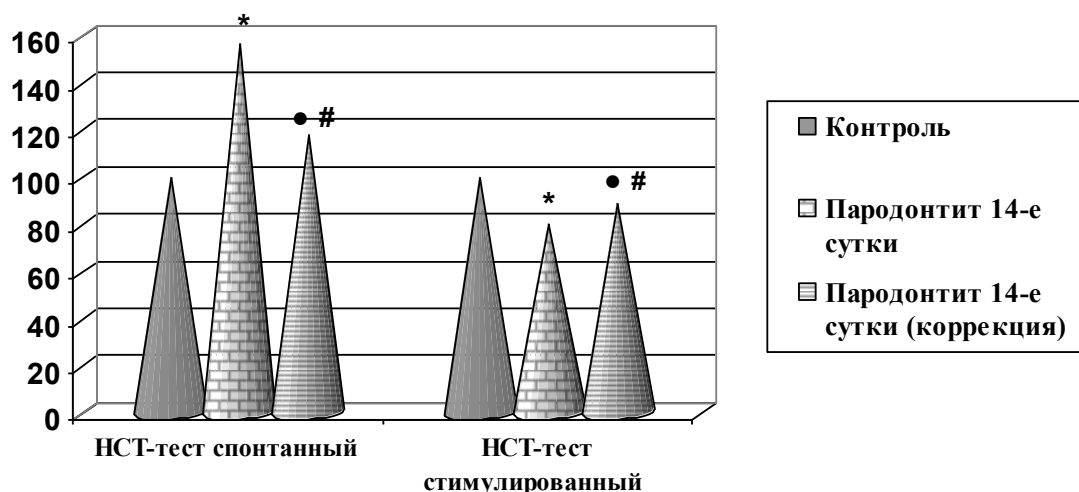


Рис. 1 – Изменения показателей НСТ-теста лейкоцитов крови крыс в условиях развития экспериментального пародонтиза и при коррекции кверцетином (в % от контроля).

Примечания: * – достоверность различий относительно интактных животных ($p < 0,01$);

● – достоверность различий относительно интактных животных ($p < 0,05$);

– достоверность различий относительно животных с пародонтизом на 14-е сутки эксперимента ($p < 0,01$).

Анализируя изменения показателей спонтанного НСТ-теста лейкоцитов крови экспериментальных животных с пародонтизом, которые получали флавонол в процессе развития воспалительной реакции, было выявлено более высокий уровень содержания диформазаположительных клеток (в 1,33 раза; $p < 0,01$) по сравнению с животными, которые исследовались на 14-е сутки и не получали средство. Вместе с тем данный показатель оказался более высоким относительно показателя, который был у крыс контрольной группы (в 1,17 раза; $p < 0,05$). Применение кверцетина способствовало повышению величины коэффициента метаболической активации и резерва кислород-зависимого метаболизма соответственно в 1,34 раза ($p < 0,01$) и в 1,65 раза ($p < 0,01$), относительно крыс с экспериментальным бактериально-иммунным пародонтизом на 14-е сутки без коррекции, что является свидетельством положительного влияния его на течение воспалительного процесса в пародонтальном комплексе.

Исследуемый показатель коэффициента метаболической активации после проведенной коррекции флавонолом оставался сниженным по сравнению с данными интактной группы, однако результаты были статистически не достоверны ($p > 0,05$). Показатель резерва кислород-зависимого метаболизма также был ниже (в 1,38 раза; $p < 0,01$) по сравнению с данными животных в такой же срок исследования, но без введения препарата.

Таким образом, приведенные результаты исследования свидетельствуют о положительном эффекте флавонола кверцетина на активность клеточного неспецифического звена резистентности организма, в частности на интралейкоцитарную бактерицидную систему, и течение бактериально-иммунного воспалительного процесса в пародонтальном комплексе.

Выводы:

1. Положительный спонтанный тест с нитросиним тетразолием нейтрофилов крови подопытных животных с бактериально-иммунным пародонтитом на 14-е сутки указывает на повышенную кислород-зависимую бактерицидную активность их и наличие в крови активаторов, способных повышать функциональную активность фагоцитоза.

2. Снижение показателей индуцированного НСТ-теста, резерва кислород-зависимого метаболизма, коэффициента метаболической активации нейтрофилов в крови крыс с распространенным воспалительным процессом в пародонте на 14-е сутки эксперимента является результатом истощения метаболических резервов данных клеток и нарушений процесса фагоцитоза.

3. Флавонол кверцетин стабилизирует клеточное неспецифическое звено резистентности организма в процессе протекания экспериментального бактериально-иммунного пародонтита, что проявляется увеличением диформазаположительных клеток при активированном НСТ-тесте и снижением при спонтанном НСТ-тесте в крови подопытных животных, и может быть одним из индикаторов стабилизации и затихания воспалительного процесса.

Использованная литература:

1. Г.И. Гордиенко, Т.М. Бородин, Т.А. Дудина, Г.А. Самсыгина Исследование поглотительной и метаболической активности нейтрофилов периферической крови у детей раннего возраста // Педиатрия. 2003. № 5. С. 1-11.
2. А.Е. Демкович, Ю.И. Бондаренко Патогенетические основы моделирования пародонтита у животных // Достижения клинической и экспериментальной медицины. 2015. № 1 (22). С. 54-57.
3. А.Г. Димитрова, Ю.Г. Коленко Оценка эффективности различных иммуномодуляторов в комплексном лечении генерализованного пародонтита у лиц молодого возраста (18–25 лет) // Современная стоматология. 2013. № 2. С. 38-39.
4. Е.А. Киселева, Е.А. Те, О.Ю. Николаева [и др.] Направленная иммунокоррекция хронического пародонтита // Клиническая стоматология. 2011. № 4. С.80-83.
5. Орлов А.И. Математика случая: Вероятность и статистика – основные факты: учебное пособие. М.: МЗ-Пресс, 2004. 100 с.
6. Ш.Л. Шиманский, В.Н. Чиликин, И.Ю. Малышев [и др.] Фагоцитарная защита пародонта и способы ее активации // Стоматология. 2013. Т. 92, № 5. С. 64-69.
7. D. Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? // Fitoterapia. 2015. № 106. P. 256-271.
8. Berger. R.L., Casella. G. Statistical Inference 2nd ed. Florida: Duxbury Press. 2001. 374 p.
9. A. Demkovych, Yu. Bondarenko, P. Hasiuk Humoral immune reactivity disorders in experimental parodontitis and their correction by flavonol // World of Medicine and Biology. 2017. № 3 (61). P. 97-100.
10. A. Demkovych, Yu. Bondarenko, P.A. Hasiuk Oxidative modification of proteins in the process of experimental periodontitis development // Interventional Medicine and Applied Science. 2017. № 9 (4). P. 218-221.
11. S.L. Miles, M. McFarland, R.M. Niles Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease // Nutrition Reviews. 2014. Vol. 72, № 11. P. 720-734.
12. V. Thumbigere-Math, B. S. Michalowicz, J. S. Hodges [et al.] Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw // J. Periodontol. 2014. Vol. 85, № 2. P. 226-233.