

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БАКТЕРИАЛЬНО-ИММУННОМ ПАРОДОНТИТЕ И КОРРЕКЦИЯ ИХ ФЛАВОНОЛОМ

А.Е. ДЕМКОВИЧ

Тернопольский Государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского МЗ Украины, г. Тернополь

БАКТЕРИАЛ – ИММУН ПАРОДОНТИТ ТАЖРИБАСИДА НОСПЕЦИФИК ХУЖАЙРА ИММУНИТЕТ ФАОЛЛАГИНИНГ ЎЗГАРИШИ ВА УНИ ФЛАВОНОЛ БИЛАН БАРТАРАФ ЭТИШ

А.Е. ДЕМКОВИЧ

Украина ССВ И.Я. Горбачевский номидаги Тернополь Давлат медицина университети, Тернополь шаҳри

CHANGES IN ACTIVITY OF NON-SPECIFIC CELL IMMUNITY IN EXPERIMENTAL BACTERIAL-IMMUNE PERIODONTITIS AND CORRECTION WITH THEIR FLAVONOL

A.E. DEMKOVICH

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University Ministry of Health of Ukraine, Ternopil

Тадқиқот мақсади бактериял – иммун пародонтит тажрибасида носпецифик ҳужайра иммунитет фаоллагининг ўзгаришини аниқлаш ва унинг кўрсаткичларига флавонол таъсирини ўрганиш бўлди. Мақолада фагоцитар индекс кўрсаткичларига ва 14-суткада фагоцитар миқдорга асосан тадқиқот натижалари келтирилган, яъни тажрибада бактериял-иммун пародонтит клиникаси авж олган давр ва кверцетин билан бартараф этилган даврга (14-суткада) тўғри келади. Бунда пародонтал комплексида яллиғланиш учогининг шаклланиш жараёнида фагоцитар фаоллигининг ўзгариш характери келтирилган. Иммун жараёнга таъсир этувчи кверцетин қўлланилганда пародонт тўқимасида яллиғланиш жараёнини чегаралаб, дори воситаси юборилмаган ҳайвонлардаги кўрсаткичлардан фарқли организмнинг носпецифик ҳужайра жавоби фаоллигининг пасайишига олиб келди. Ушбу кўрсаткичлар назорат гуруҳидаги кўрсаткичларга яқин бўлди, аммо у даражага етмади.

Калим сўзлар: фагоцитоз, фагоцитар миқдор, фагоцитар индекс, кверцетин, бактериял-иммун пародонтит.

The aim of the investigation was to evaluate activity of a non-specific link of the body protection for experimental bacterial-immune periodontitis and to find out the effects of flavonol quercetin on its parameters. The article presents the results of indices phagocytic activity of blood granulocytes by phagocyte index and phagocyte number on the 14th day, in the period the most expressed manifestation of the experimental bacterial-immune periodontitis and after correction with quercetin (on the 14th day). In this case, the character of changes in phagocytic activity in the process of inflammatory site formation in the periodontal complex was determined. The use of quercetin, which acting immune processes, limited the inflammatory response in the periodontal tissues and led to a decrease in the activity of the non-specific immune cell relative to the rates of animals that did not take the medicine. These indices were near to the control group, but did not reach their.

Key words: phagocytosis, phagocytic number, phagocytic index, quercetin, bacterial-immune periodontitis.

Введение. Механизмы развития воспалительного процесса в пародонтальном комплексе включают ряд сложных процессов, приводящих к генерализации и хронизации его, потери зубов и появления осложнений со стороны других органов. Исследование механизмов формирования воспалительных процессов в тканях пародонта и в настоящее время остается актуальной задачей, что связано, в первую очередь, с относительно высокой распространённостью и неблагоприятным прогнозом их, а также несовершенством лечения [1-4] и профилактики [5-6]. Известные методы

лечения требуют усовершенствования на основе патогенетически обоснованных подходов к их решению. Выяснение характера нарушений иммунологических процессов позволит установить роль одной из важных звеньев, которые приводят к повреждению структур пародонтального комплекса, и ведет к формированию воспалительного процесса различной степени тяжести [7, 8]. В настоящее время общепризнано, что одну из ключевых звеньев в иммунной системе занимает фагоцитоз, который рассматривают не только как инструмент противомикробного иммунитета,

но и как универсальный эффектор, реагирующий на многочисленные сигналы о дестабилизации внутренней среды организма и является одним из ключевых патогенетических звеньев развития и течения иммунных и воспалительных реакций [9, 10].

Известно, что некоторые полифенолы и флавоноиды растительного происхождения способны проявлять мощные антиоксидантные свойства при многих воспалительных и дегенеративных заболеваниях [11, 12], что указывает на целесообразность их исследования при пародонтите. С этой точки зрения заслуживает внимания результаты исследований свойств флавонола кверцетина. Он 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 [13, 14]. Противовоспалительные и противоаллергические эффекты связаны также со способностью кверцетина угнетать кальций-АТФ-азу и синтез лейкотриенов. Флавоноид снижает также активность гиалуронидазы и способен повышать содержание клеток иммунной системы в крови (фагоцитов, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов), в результате чего уменьшаются проявления вторичной иммуносупрессии [15, 22].

Целью данного исследования было выяснить влияние флавонола кверцетина на показатели фагоцитарной способности клеток неспецифического иммунитета при экспериментальном бактериально-иммунном пародонтите.

Методика. Исследование проведено на белых беспородных клинически здоровых крысах массой 150-200 г в условиях вивария. Животные находились на стандартном рационе, сбалансированном по элементам питания. 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 были 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 животных вызывали путем инъекции в ткани пародонтального комплекса смеси микроорганизмов, разбавленной яичным протеином [16]. Для усиления иммунного ответа одновременно проводилась

инъекция в лапку крысы полного адьюванта Фрейнда. Крысам третьей группы вводили водорастворимый препарат кверцетина (корвитин, производства Борщаговского ХФЗ) путем внутримышечных инъекций (100 мг / кг массы животного) в течение 7-ми суток (с седьмого по 14-е сутки).

На 14-е сутки, в период максимального формирования иммунных процессов, исследуемых животных умерщвляли путем кровопускания под тиопенталовым наркозом. Для дальнейших исследований отбирали кровь из тканей пародонта, в которой определяли показатели фагоцитарной активности, в частности фагоцитарного числа (ФЧ) и фагоцитарного индекса (ФИ) гранулоцитов крови [17]. Кровь брали из механически поврежденных сосудов участка воспаления (в интактных животных – из тканей пародонта прилегающих к нижним центральным резцам) в пастеровскую пипетку с 2 % раствором цитрата натрия. В эту же пробирку заносили культуры *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus hemolytic*, которые предварительно были разведены в изотоническом растворе хлорида натрия. Соотношение крови к цитрату натрия и культур составляло 2:1:1. Содержимое пробирки смешивали и на 30 мин ставили в термостат при температуре 37 °С. Готовили мазки и красили по методу Циля-Нильсена. В препарате подсчитывали 100 нейтрофилов. Показатель фагоцитарного числа – среднее число микробов, поглощенных одним нейтрофилом выражали в условных единицах (усл. ед.) и фагоцитарного индекса – процент фагоцитов из числа подсчитанных нейтрофилов. Целью данного исследования было выяснить влияние флавонола кверцетина на показатели фагоцитарной способности клеток неспецифического иммунитета при экспериментальном бактериально-иммунном пародонтите.

Методика. Исследование проведено на белых беспородных клинически здоровых крысах массой 150-200 г в условиях вивария. Животные находились на стандартном рационе, сбалансированном по элементам питания. 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 были 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 животных вызывали путем инъекции в ткани пародонтального комплекса смеси микроорганизмов, разбавленной яичным протеином [16]. Для усиления иммунного ответа одновременно проводилась

донтального комплекса смеси микроорганизмов, разбавленной яичным протеином [16]. Для усиления иммунного ответа одновременно проводилась инъекция в лапку крысы полного адьюванта Фрейнда. Крысам третьей группы вводили водорастворимый препарат кверцетина (корвитин, производства Борщаговского ХФЗ) путем внутримышечных инъекций (100 мг / кг массы животного) в течение 7-ми суток (с седьмого по 14-е сутки).

На 14-е сутки, в период максимального формирования иммунных процессов, исследуемых животных умерщвляли путем кровопускания под тиопенталовым наркозом. Для дальнейших исследований отбирали кровь из тканей пародонта, в которой определяли показатели фагоцитарной активности, в частности фагоцитарного числа (ФЧ) и фагоцитарного индекса (ФИ) гранулоцитов крови [17, 21]. Кровь брали из механически поврежденных сосудов участка воспаления (в интактных животных – из тканей пародонта прилежающих к нижним центральным резцам) в пастеровскую пипетку с 2 % раствором цитрата натрия. В эту же пробирку заносили культуры *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus hemolytic*, которые предварительно были разведены в изотоническом растворе хлорида натрия. Соотношение крови к цитрату натрия и культур составляло 2:1:1. Содержимое пробирки смешивали и на 30 мин ставили в термостат при температуре 37 °С. Готовили мазки и красили по методу Циля-Нильсена. В препарате подсчитывали 100 нейтрофилов. Показатель фагоцитарного числа – среднее число микробов, поглощенных одним нейтрофилом выражали в условных единицах (усл. ед.) и фагоцитарного индекса – процент фагоцитов из числа подсчитанных нейтрофилов.

Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием параметрических и непараметрических методов статистики с помощью программного обеспечения «Excel» («Microsoft», США) и «STATISTICA» 10.0 («Statsoft», США) [18]. Достоверность различий значений между независимыми количественными

величинами определяли при нормальном распределении по критерию U-критерию Манна-Уитни [19].

Результаты и их обсуждение. В результате 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 у человека [20]. При этом воспалительная реакция данного типа сопровождалась повышением фагоцитарной активности гранулоцитов крови экспериментальных животных. В частности, в период наиболее выраженных проявлений бактериально-иммунного процесса, который совпадал с 14-ми сутками развития воспалительной реакции, в пародонтальном комплексе, возникало максимальное повышение фагоцитарной активности (в 1,12 раза; $p < 0,01$) по сравнению с соответствующим показателем интактной группы животных (табл. 1).

Использование антиоксиданта кверцетина в течение 7-ми дней (с 7-ых по 14-е сутки) в дозе 100 мг / кг внутримышечно, приводило к снижению данного показателя неспецифического звена защиты организма, в частности фагоцитарного индекса, который определялся на 14-е сутки развития воспаления в пародонтальном комплексе. Так, по сравнению с показателем, который имел место в группе животных с экспериментальным пародонтитом, которые не получали этого вещества (на 14-е сутки исследования), индекс фагоцитарной активности в 1,08 раза был ниже ($p < 0,01$), что свидетельствует о способности его подавлять неспецифический клеточный иммунитет организма в период разгара патологического процесса (рис. 1). Вместе с тем следует отметить, что фагоцитарный индекс в данной группы животных все же не достигал уровня контрольной группы и был выше в 1,04 раза ($p < 0,05$).

Таблица 1.

Влияние кверцетина на показатели фагоцитарного индекса у белых крыс при экспериментальном пародонтите ($M \pm m$)

Этапы опыта		Количество животных	ФИ, %
Интактные животные. Контроль		10	$78,20 \pm 0,76$
Белые крысы с экспериментальным пародонтитом (14-е сутки) без коррекции	Без коррекции	8	$87,75 \pm 0,59$ $p_1 < 0,01$
	После коррекции кверцетином	8	$81,50 \pm 0,73$ $p_1 < 0,05; p_2 < 0,01$

Примечания: 1. p_1 – достоверность различий по отношению к интактным животным; 2. p_2 – достоверность различий по отношению к животным с пародонтитом (14-е сутки).

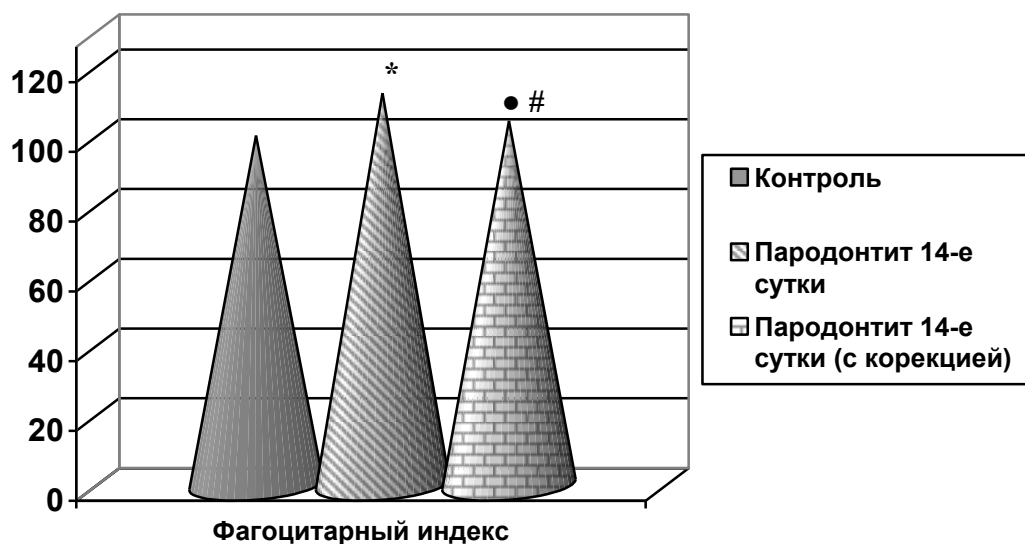


Рис. 1. Изменения фагоцитарного индекса гранулоцитов крови крыс в условиях развития экспериментального пародонтита и при коррекции кверцетином (в % от контроля).

Примечания: * – достоверность различий по отношению к интактным животным ($p < 0,01$); • – достоверность различий относительно животных с пародонтитом на 14-е сутки эксперимента ($p < 0,05$); # – достоверность различий относительно животных с пародонтитом на 14-е сутки эксперимента ($p < 0,01$).

Характеризуя активность гранулоцитов крови подопытных животных с бактериально-иммунным пародонтитом по фагоцитарному числу, следует отметить, что исследуемый показатель активности фагоцитов крови на 14-е сутки эксперимента значительно превышал (в 1,46 раза; $p < 0,01$) показатель животных контрольной группы в ответ на повышенную антигенную стимуляцию, что свидетельствует о возросшей активности неспецифического клеточного звена защиты, что было подтверждено результатами наших исследований (табл. 2, рис. 2).

Что касается влияния данного флавонола на активность фагоцитов по фагоцитарному числу, в данной модели пародонтита у экспериментальных животных, то следует отметить, что кверцетин снижал этот показатель в 1,24 раза; $p < 0,01$, по

сравнению с животными на 14-е сутки, но не получавших препарат (табл. 2, рис. 2).

Вместе с тем при сравнении изменений исследуемых показателей неспецифического звена защиты организма, которые наблюдались на 14-е сутки развития после введения кверцетина, оказалось, что он все же не достигал показателей контрольной группы животных и оставался выше в 1,18 раза ($p < 0,01$).

Таким образом, исследованные нами изменения показателей неспецифического клеточного иммунитета организма при экспериментальном пародонтите при использовании флавонола кверцетина в форме водорастворимого препарата корвитина свидетельствуют о его стабилизирующем влиянии на развитие иммунно-воспалительного процесса данной локализации.

Таблица 2.

Влияние кверцетина на показатели фагоцитарного числа у белых крыс при экспериментальном пародонтите ($M \pm m$)

Этапы опыта		Количество животных	ФЧ, усл. ед.
Интактные животные. Контроль		10	$6,23 \pm 0,17$
Белые крысы с экспериментальным пародонтитом (14-е сутки) без коррекции	Без коррекции	8	$9,07 \pm 0,12$ $p_1 < 0,01$
	После коррекции кверцетином	8	$7,34 \pm 0,19$ $p_1 < 0,01$; $p_2 < 0,01$

Примечания: 1. p_1 – достоверность различий по отношению к интактным животным; 2. p_2 – достоверность различий по отношению к животным с пародонтитом (14-е сутки).

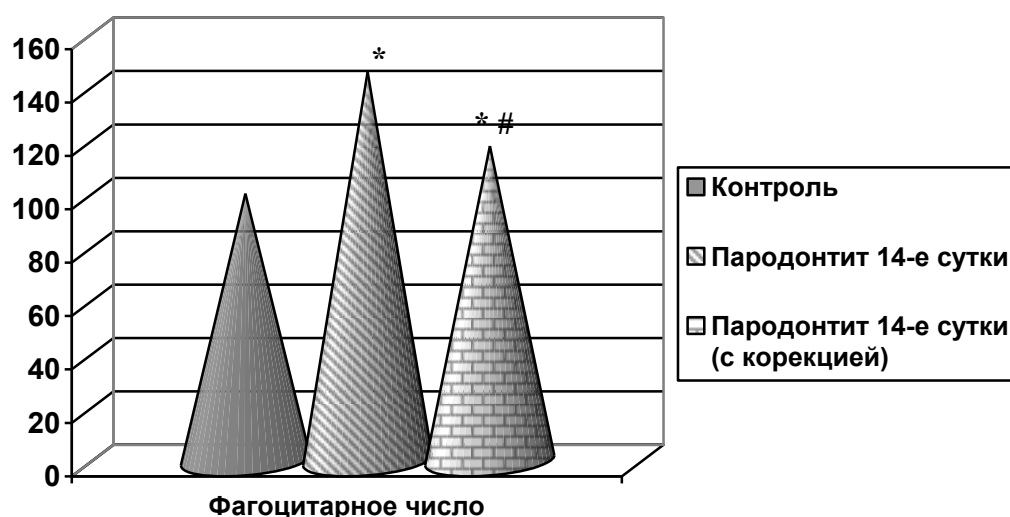


Рис. 2. Изменения фагоцитарного числа гранулоцитов крови крыс в условиях развития экспериментального пародонтита и при коррекции кверцетином (в % от контроля).

Примечания: * – достоверность различий по отношению к интактным животным ($p < 0,01$); # – достоверность различий относительно животных с пародонтитом на 14-е сутки эксперимента ($p < 0,01$).

Выводы:

1. Развитие экспериментального бактериально-иммунного пародонтита сопровождается значительным повышением фагоцитарной активности гранулоцитов крови в период наиболее выраженного проявления воспалительного процесса в тканях пародонтального комплекса, что в значительной степени определяет характер формирования, течения и исхода патологического процесса.
2. Флавоноид кверцетин (в форме водорастворимого препарата корвитина) стабилизирует систему неспецифического клеточного иммунитета по показателям фагоцитарной активности гранулоцитов крови животных с экспериментальным бактериально-иммунным пародонтитом, что способствует также угасанию воспалительного процесса.

Литература:

1. Use of osteoplastic material to guide bone tissue regeneration defect / A. Machavariani, K. Mazmishvili, T. Grdzeldze [et al.] // *Georgian. Med. News.* – 2011. – № 201. – P. 70-73.
2. Madrid C. What impact do systemically administered bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review / C. Madrid, M. Sanz // *Clin. Oral. Implants. Res.* – 2009. – № 4. – P. 87-95.
3. Association between oral bisphosphonate use and dental implant failure among middle-aged women / J. K. Yip, L. N. Borrell, S. C. Cho [et al.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2012. – Vol. 39, № 4. – P. 408-414.
4. Направленная иммунокоррекция хронического пародонтита / Е. А. Киселева, Е. А. Те, О. Ю. Николаева [и др.] // *Клиническая стоматология.* – 2011. – № 4. – С. 80-83.
5. Introducing cut-points for salivary nitric oxide to distinguish periodontitis from the normal periodontium / M. Khorsavi Samani, Mir A. Poorsattar Bejeh, M. Kashiri [et al.] // *Minerva Stomatol.* – 2012. – Vol. 61, № 10. – P. 443-448.
6. Сергеева И. Е. Исследование функциональных особенностей клеток иммунной системы у больных генерализованным пародонтитом / И. Е. Сергеева // *Запорожский медицинский журнал.* – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 48-50.
7. Сергеева И. Е. Гуморальные факторы неспецифического иммунитета у больных генерализованным пародонтитом / И. Е. Сергеева // *Вісник стоматології.* – 2011. – № 4. – С. 108-109.
8. Harutyunyan A. Comparative evaluation of indicators of local, humoral immunity and nonspecific resistance in patients with different pathology of the cervix / A. Harutyunyan // *Georgian Med. News.* – 2011. – № 190. – P. 7-15.
9. Фагоцитарная защита пародонта и способы ее активации / Ш. Л. Шиманский, В. Н. Чиликин, И. Ю. Малышев [и др.] // *Стоматология.* – 2013. – Т. 92, № 5. – С. 64-69.
10. Alveolar epithelial cells are critical in protection of the respiratory tract by secretion of factors able to modulate the activity of pulmonary macrophages and directly control bacterial growth / O. D. Chuquimia, D. H. Petursdottir, N. Periolo [et al.] // *Infect. Immun.* – 2013. – Vol. 81, № 1. – P. 381-389.
11. Kumar S. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview / S. Kumar, A. K. Pandey // *The Scientific World Journal.* – 2013. – № 2013. – P. 16.
12. Kumar S. Free radicals: health implications and their mitigation by herbals / S. Kumar, A. K. Pandey // *British Journal of Medicine and Medical Research.* – 2015. – Vol. 7, № 6. – P. 438-457.
13. D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifac-

- eted therapeutic applications? / G. D'Andrea // *Fitoterapia*. – 2015. – № 106. – P. 256-271.
14. Miles S. L. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease / S. L. Miles, M. McFarland, R. M. Niles // *Nutrition Reviews*. – 2014. – Vol. 72, № 11. – P. 720-734.
15. Malik A. et al. Hypertension-related knowledge, practice and drug adherence among inpatients of a hospital in Samarkand, Uzbekistan // *Nagoya journal of medical science*. – 2014. – Т. 76. – №. 3-4. – С. 255.
16. Kasimov S. et al. Haemosorption In Complex Management Of Hepatargia // *The International Journal of Artificial Organs*. – 2013. – Т. 36. – №. 8. – С. 548.
17. Посохова К. А. Влияние кверцетино-содержащих соединений на состояние миокарда при сахарном диабете 2 типа / К. А. Посохова, И. П. Стечишин, В. В. Подгирный // *Достижения клинической і экспериментальной медицины*. – 2014. – № 2. – С. 17-21.
18. Демкович А. Е. Патогенетические основы моделирования пародонтита у животных / А. Е. Демкович, Ю. И. Бондаренко // *Достижения клинической и экспериментальной медицины*. – 2015. – № 1 (22). – С. 54-57.
19. Гордиенко С. М. Современные методические подходы к изучению фагоцитарной активности лейкоцитов / С. М. Гордиенко // *Лаб. дело*. – 1984. – № 5. – С. 285-289.
20. Орлов А. И. Математика случая: Вероятность и статистика – основные факты: учебное пособие / А. И. Орлов. – М.: МЗ-Пресс, 2004. – 100 с.
21. Berger R. L. *Statistical Inference*. 2nd ed. / R. L. Berger, G. Casella. – Duxbury Press, 2001. – 374 p.
22. Демкович А. Е. Особенности формирования микробиоценоза в развитии воспалительных заболеваний пародонта / А. Е. Демкович // *Инфекционные болезни*. – 2015.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БАКТЕРИАЛЬНО-ИММУННОМ ПАРОДОНТИТЕ И КОРРЕКЦИЯ ИХ ФЛАВОНОЛОМ

А.Е. ДЕМКОВИЧ

Тернопольский Государственный медицинский
университет им. И.Я. Горбачевского
МЗ Украины, г. Тернополь

Цель исследования заключалась в оценке активности неспецифического звена защиты организма при экспериментальном бактериально-иммунном пародонтите и выяснении влияния флавонола кверцетина на его показатели. В статье приведены результаты исследований показателей фагоцитарной активности гранулоцитов крови по показателям фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа на 14-е сутки, то есть в период наиболее выраженного проявления экспериментального бактериально-иммунного пародонтита и после коррекции его кверцетином (на 14-е сутки). При этом приводится характер изменений фагоцитарной активности в процессе формирования воспалительного очага в пародонтальном комплексе. Использование кверцетина, который, воздействуя на иммунные процессы, ограничивал воспалительную реакцию в тканях пародонта и приводил к снижению активности неспецифической клеточного ответа организма относительно показателей животных, которым не вводили этот препарат. Данные показатели были близки к величинам контрольной группы, однако не достигали их уровня.

Ключевые слова: фагоцитоз, фагоцитарное число, фагоцитарный индекс, кверцетин, бактериально-иммунный пародонтит.