

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ИНДОЛИЦИДИНА НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПАРОДОНТИТОМ

И.В. Кутепов¹, Ю.Д. Ляшев¹, М.А. Затолокина²

¹ ФГАОУ ВО «Белгородский национальный исследовательский университет», кафедра фармакологии и клинической фармакологии;

² ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии

Синтетические аналоги индолицидина рассматриваются как потенциальные антибиотики, поскольку обладают широким спектром антимикробной активности. В работе использованы синтетические аналоги индолицидина № 7 и 8, которые применяли для коррекции экспериментального пародонтита у крыс Вистар. Пептиды вводили внутривентриально в дозе 500 мкг/кг в течение 7 дней после моделирования пародонтита. Противовоспалительное действие аналогов индолицидина оценивали по изменениям интегральных гематологических индексов. Установлено статистически достоверное влияние исследованных аналогов индолицидина на индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов и лейкоцитарный индекс, что указывает на влияние пептидов на макрофагально-моноцитарный пул клеток, а также афферторное и эффекторное звенья гуморального иммунного ответа.

Ключевые слова: пародонтит, аналоги индолицидина, гематологические индексы, противовоспалительное действие.

DOI 10.19163/1994-9480-2021-1(77)-44-47

THE INFLUENCE OF SYNTHETIC INDOLICIDIN ANALOGUES ON THE HEMATOLOGICAL INDICES IN THE RATS WITH EXPERIMENTAL PERIODONTITIS

I.V. Kutepov¹, Y.D. Lyashev¹, M.A. Zatolokina²

¹ FSAEI HE «Belgorod State National Research University», Department of pharmacology and clinical pharmacology;

² FSBEI HE «Kursk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Department of histology, embryology, cytology

Synthetic analogues of indolicidin are considered as potential antibiotics, since they have a wide spectrum of antimicrobial activity. We used synthetic analogues of indolicidin No. 7 and 8, which were used to correct experimental periodontitis in Wistar rats. Peptides were injected intraperitoneally at a dose of 500 µg/kg for 7 days after periodontitis modeling. The anti-inflammatory effect of indolicidin analogues was assessed by changes in integral hematological indices. A statistically significant effect of the studied indolicidin analogues on the neutrophil-to-monocyte ratio and the leukocyte index was established, which indicates to the effect of peptides on the macrophage-monocytic cell pool, as well as the affector and effector mechanisms of the humoral immune response.

Key words: periodontitis, indolicidin analogues, hematologic indices, anti-inflammatory effect.

Пародонтит остается самой частой формой патологии орофасциальной области, и его распространенность среди взрослого населения достигает 75 % [6]. Учитывая ведущую роль пародонтопатогенных микроорганизмов в возникновении пародонтита и недостаточную эффективность антибиотиков при этом заболевании, поиск новых фармакологических средств для коррекции пародонтита остается актуальной проблемой [1].

Большой интерес исследователей вызывают антимикробные пептиды (АМП), которые не только обладают широким спектром антимикробной активности, но и обладают рядом важных свойств: крайне низкая вероятность формирования устойчивости микроорганизмов к АМП в связи с особенностями их механизма действия, а также невозможность их накопления в организме [7, 8].

При исследовании потенциальных антибиотиков возникает необходимость в использовании незатратных и информативных методов, которые адекватно позволяют оценить противовоспалительные эффекты препарата.

Таким методом может быть расчет гематологических индексов, которые доказали свою эффективность при прогнозировании тяжести воспалительного процесса и вероятности развития осложнений [3].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение противовоспалительного действия синтетических аналогов АМП индолицидина на основе анализа динамики интегральных гематологических индексов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 32 крысах-самцах Вистар. Животные были разделены на следующие группы: интактная группа – 8 крыс, контрольная группа (моделирование пародонтита и введение физраствора) – 8 крыс, первая опытная группа (моделирование пародонтита и введение индолицидина № 7) – 8 крыс, вторая опытная группа (моделирование пародонтита и введение индолицидина № 8) – 8 крыс. Экспериментальный пародонтит моделировали по методу, предложенному Воложиным А.И. и Виноградовой С.И. [1]. Нить оставляли на 14 дней, а затем удаляли.

Исследования проводили с соблюдением положений, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к лабораторным животным (2000 г.), директивы Европейского сообщества (86/609ЕС). Выполнение исследований разрешено Региональным этическим комитетом (протокол № 3 от 27 октября 2015 г.).

У оперированных животных забирали периферическую кровь в объеме 0,5 мл на 3, 7, 14 и 21-е сутки эксперимента из хвостовой артерии путем резекции кончика хвоста. Аналогично получали периферическую кровь у интактных крыс. Определяли количество лейкоцитов в камере Горяева и подсчитывали лейкоцитарную формулу в мазках крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе. Рассчитывали следующие интегральные гематологические индексы: 1) индекс Кребса (отношение нейтрофилов к лимфоцитам); 2) коэффициент Бредекка (отношение лимфоцитов к палочкоядерным нейтрофилам); 3) индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ); 4) индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ); 5) индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов (ИСЛЭ); 6) лейкоцитарный индекс (ЛИ) (отношение лимфоцитов к нейтрофилам) [5].

Для коррекции пародонтита применяли синтетические аналоги природного индолицидина: пептид № 7 (H-Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Lys-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂) и пептид № 8 (H-Ile-Lys-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂) (ООО «НПФ «Верта», Санкт-Петербург, Россия). Используемые в работе аналоги индолицидина подобно природному пептиду обладают высокой антимикробной активностью, не проявляя, однако, присущее ему гемолитическое действие. Индолицидины № 7 и 8 предварительно растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно в дозе 500 мкг/кг в объеме 0,2 мл один раз в день в течение 7 дней, начиная со дня снятия нити. Указанные дозы были выбраны на основании данных литературы и предшествующих экспериментов. Крысам контрольной группы аналогичным образом вводили физиологический раствор.

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после

проверки нормальности распределения изучаемых параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс контрольной группы установлено снижение индекса Кребса на протяжении всего эксперимента по сравнению с интактными животными (табл.). Так, на 3-и сутки после удаления нити уменьшение указанного индекса составило 15,9 % ($p < 0,01$), а на 21-е сутки эксперимента такое падение составило 43,2 % ($p < 0,001$).

У крыс с пародонтитом, которым вводили исследуемые аналоги индолицидина № 7 и 8, не установлено статистически достоверных отличий значений указанного индекса по сравнению с животными контрольной группы ($p > 0,05$).

При анализе изменений коэффициента Бредекка только на 21-е сутки после снятия нити установлено существенное увеличение коэффициента Бредекка у контрольных крыс (на 38,5 %, $p < 0,05$). Отсутствовали статистически достоверные отличия коэффициента Бредекка у животных контрольной и опытных групп на протяжении всего эксперимента.

У крыс контрольной группы отмечалось падение ИСНМ на протяжении всего эксперимента. На 3-и сутки падение составило 35,4 % ($p < 0,05$), а на 21-е сутки – 80,7 % ($p < 0,001$). Применение аналогов индолицидина № 7 и 8 оказывало влияние на динамику ИСНМ. Так, на 3-и сутки эксперимента у крыс с пародонтитом, которым вводили индолицидины № 7 и 8, показано снижение указанного индекса на 24,2 и 25,8 % соответственно по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,05$).

На 14-е сутки при применении индолицидина № 7 снижение составило 13,7 %, а при использовании индолицидина № 8 – 15,7 % ($p < 0,05$).

У крыс контрольной группы установлено снижение ИСЛМ на 7–21-е сутки эксперимента. Уменьшение указанного индекса на 7-е сутки составило 49,1 % ($p < 0,05$), а на 21-й день – 60,6 % ($p < 0,01$). Не установлено статистически достоверных различий между значениями ИСЛМ у крыс контрольной и опытных групп на протяжении всего эксперимента ($p > 0,05$).

Динамика ИСЛЭ характеризуется следующими особенностями: увеличение показателя в контрольной группе на 7–21-е сутки эксперимента. На 7-й день повышение составило 174,6 % ($p < 0,01$), а на 21-е – 227,2 % ($p < 0,001$). Применение аналогов индолицидина не оказывало существенного влияния на указанный показатель на протяжении всего периода наблюдения ($p > 0,05$).

У животных контрольной группы отмечено статистически достоверное увеличение ЛИ в течение всего эксперимента. Так, на 3-и сутки увеличение составило 17,5 % ($p < 0,001$), а на 21-е сутки – 72,5 % ($p < 0,001$). Статистически достоверные отличия ЛИ

между контрольной группой и животными, получавшими индолицидины № 7 и 8, установлены только на 14-е сутки наблюдения: при введении пептида № 7 рост индекса составил 10,8 % ($p < 0,05$), а пептида № 8 – 12,2 % ($p < 0,05$).

Гематологические индексы у крыс с пародонтитом контрольной группы и группы крыс, получавших индолицидины № 7 и 8

Показатель	Срок эксперимента, сут.	Интактная	Контрольная	Пародонти + Индолицидин № 7	Пародонтит + Индолицидин № 8
Индекс Кребса (индекс нейтрофилы/лимфоциты)	3	0,44 ± 0,01	0,37 ± 0,01 ^{xx}	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01
	7		0,32 ± 0,01 ^{xxx}	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01
	14		0,30 ± 0,01 ^{xxx}	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01
	21		0,25 ± 0,01 ^{xxx}	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Коэффициент Бредекка (индекс лимфоциты/ПЯ нейтрофилы)	3	24,7 ± 2,5	20,9 ± 1,1	19,7 ± 1,3	19,9 ± 1,4
	7		26,9 ± 2,7	22,7 ± 2,2	21,0 ± 1,1
	14		25,9 ± 2,6	30,3 ± 2,7	31,1 ± 2,4
	21		34,2 ± 2,1 ^x	32,6 ± 2,4	35,8 ± 1,6
Индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов	3	19,2 ± 2,8	12,4 ± 0,9 ^x	9,4 ± 0,8 ¹	9,2 ± 0,9 ¹
	7		7,2 ± 0,8 ^{xxx}	6,9 ± 0,4	7,6 ± 0,8
	14		5,1 ± 0,2 ^{xxx}	4,4 ± 0,2 ¹	4,3 ± 0,2 ¹
	21		3,7 ± 0,2 ^{xxx}	3,3 ± 0,1	3,7 ± 0,3
Индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов	3	44,2 ± 6,8	31,2 ± 2,2	25,0 ± 2,2	27,6 ± 2,3
	7		22,5 ± 2,3 ^x	22,0 ± 1,1	23,2 ± 2,1
	14		17,4 ± 0,7 ^{xx}	16,5 ± 0,9	16,3 ± 0,8
	21		14,5 ± 0,8 ^{xx}	13,3 ± 0,5	14,6 ± 0,8
Индекс соотношения лимфоцитов и эозинофилов	3	21,3 ± 2,1	34,0 ± 7,9	46,2 ± 7,0	52,0 ± 1,7
	7		58,5 ± 6,7 ^{xx}	68,1 ± 4,6	62,9 ± 5,9
	14		68,5 ± 4,7 ^{xxx}	69,9 ± 4,8	65,3 ± 6,2
	21		69,8 ± 4,6 ^{xxx}	69,9 ± 4,7	65,4 ± 6,2
Лейкоцитарный индекс (лимфоциты/нейтрофилов)	3	2,29 ± 0,03	2,69 ± 0,05 ^{xxx}	2,69 ± 0,03	2,65 ± 0,06
	7		3,13 ± 0,04 ^{xxx}	3,20 ± 0,06	3,20 ± 0,06
	14		3,43 ± 0,08 ^{xxx}	3,80 ± 0,04 ¹	3,85 ± 0,07 ¹
	21		3,95 ± 0,06 ^{xxx}	4,00 ± 0,08	4,03 ± 0,05

^x $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой, ^{xx} $p < 0,01$ по сравнению с интактной группой, ^{xxx} $p < 0,001$ по сравнению с интактной группой, ¹ $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Полученные нами результаты указывают на закономерные изменения интегральных гематологических индексов в процессе развития экспериментального пародонтита, связанные со сменой нейтрофильной фазы лейкоцитоза на моноцитарную и, в дальнейшем, на лимфоцитарную. Именно уменьшением содержания в крови палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов и повышением в крови моноцитов объясняется снижение индекса Кребса, ИСЛМ, ИСНМ, а также увеличение коэффициента Бредекка и ЛИ.

В работе установлено статистически достоверное влияние исследованных аналогов индолицидина на ИСНМ. Подобное действие можно объяснить стимулирующим влиянием индолицидинов на моноцитарно-макрофагальный пул клеток. Ранее нами показано усиление адгезивной способности перитонеальных макрофагов у крыс с пародонтитом под влиянием

индолицидинов № 7 и 8 [4]. Макрофаги не только выступают в роли фагоцитов, но и секретируют комплекс цитокинов, запускающих реакции пролиферации и заживления в области повреждения [2]. По данным литературы, ИСНМ позволяет судить о соотношении микрофагального и макрофагального звена системы врожденного иммунитета [6]. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о стимулирующем влиянии аналогов индолицидина на макрофагальный компонент этой системы.

Известно, что ЛИ отражает взаимоотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы [6]. Его повышение указывает, в первую очередь, на включение гуморальных иммунных механизмов в процессе развития пародонтита.

Отсутствие статистически достоверных изменений ИСЛМ у крыс с пародонтитом при введении

пептидов № 7 и 8 объясняется увеличением содержания обоих типов клеток. Показано ранее, что этот индекс отражает взаимоотношение аффлекторного и эффекторного звеньев иммунного ответа [6]. Результаты работы позволяют заключить, что исследованные индолицидины № 7 и 8 оказывают стимулирующее действие как на аффлекторное, так и на эффекторное звенья иммунного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в работе данные позволяют сделать вывод, что противовоспалительное действие аналогов индолицидина связано с повышением активности макрофагального звена врожденного иммунитета, а также аффлекторного и эффекторного звеньев гуморального иммунного ответа. При сравнительном анализе не установлено особенностей влияния индолицидина № 7 и 8 на интегральные гематологические индексы у крыс с экспериментальным пародонтитом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воложин А.И., Виноградова С.И. Моделирование и лечение воспаления в пародонте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1990. – № 6. – С. 49–51.
2. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. – СПб.: Наука, 2006. – 260 с.
3. Литвицкий П.Ф. Патология системы гемостаза // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – № 2 (13). – С. 65–76.
4. Ляшев Ю.Д., Артюшкова Е.Б., Солин А.В. и др. Влияние аналогов индолицидина на функциональную активность макрофагов и нейтрофилов у крыс с экспериментальным пародонтитом // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – № 12 (82). – С. 36–40.
5. Супильников А.А., Шабалин В.Н. Значение интегральных гематологических индексов для прогнозирования заживления послеоперационной раны в эксперименте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – № 3 (62). – С. 49–54.
6. Цепов Л.М., Цепова Е.Л., Цепов А.Л. Пародонтит: локальный очаг серьезных проблем (обзор литературы) // Пародонтология. – 2014. – № 3 (19). – С. 3–6.
7. De la Fuente-Núñez C., Hancock R.E. Using anti-biofilm peptides to treat antibiotic-resistant bacterial infections // Post Doc Journal. – 2015. – No. 2 (3). – P. 1–8.

8. Reffuveille F., de la Fuente-Núñez C., Mansour S., Hancock R.E.W. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2014. – No. 9 (58). – P. 5363–5371.

REFERENCES

1. Volozhin A.I., Vinogradova S.I. Modelirovanije i lechenije vospaleniya v parodonte [Modelling and treatment of inflammation in the periodontitis]. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija* [Pathological physiology and experimental therapy], 1990, no. 6, pp. 49–51. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Kokryakov V.N. Oчерки o vrozhdennom immunitete [Essays about congenital immunity]. St.Petersburg: Nauka, 2006. 260 p. (In Russ.; abstr. in Engl.)
3. Litvickiy P.F. Patologiya systemy gemostaza [Pathology of hemostasis system]. *Voprosy sovremennoi pediatrii* [Questions of modern pediatrics], 2014, no. 2 (13), pp. 65–76. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Lyashev Y.D., Artyushkova E.B., Solin A.V., et al. Vliyanie analogov indolicidina na funkcional'nuju aktivnost' makrofagov i neitrofilov u kryс s eksperimental'nym parodontitom [Influence of indolicidin analogues on the functional activity of macrophages and neutrophils in rats with experimental periodontitis]. *Ekspementalnaja i klinicheskaja farmakologija* [Experimental and clinical pharmacology], 2019, no. 12 (82), pp. 36–40. (In Russ.; abstr. in Engl.)
5. Supilnikov A.A., Shabalin V.N. Znachenije integral'nyh gematologicheskikh indeksov dlja prognozirovaniya zazhivleniya posleoperacionnoi rany v eksperimente [Meaning of integral hematological indices for prognosis of postoperation wound healing in the experiment]. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija* [Pathological physiology and experimental therapy], 2018, no. 3 (62), pp. 49–54. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Cepov L.M., Cepova E.L. Parodontit: lokal'nyi ochag serjoznyh problem (obzor literatury) [Periodontitis; local focus of serious problems (literature review)]. *Parodontologija* [Periodontology], 2014, no. 3 (19), pp. 3–6. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. De la Fuente-Núñez C., Hancock R.E. Using antibiofilm peptides to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Post Doc Journal*, 2015, no. 2 (3). pp. 1–8.
8. Reffuveille F., de la Fuente-Núñez C., Mansour S., Hancock R.E.W. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, no. 9 (58), pp. 5363–5371.

Контактная информация

Кутепов Игорь Валериевич – соискатель кафедры фармакологии и клинической фармакологии Медицинского института, Белгородский национальный исследовательский университет, e-mail: kutepov-iv@yandex.ru