

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И БАД

УДК 616-092.9+616.314.17

© **Е.В. Мокренко¹, П.Д. Шабанов²**¹ Иркутский государственный медицинский университет;² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

воспаление пародонта; модель; липидная перекисидация; антиокислительные системы; крысы.

Резюме

Предложена модель воспалительно-дегенеративного поражения тканей пародонта у крыс введением 2%-го раствора формальдегида в мягкие ткани пародонта с изучением липидной перекисидации и активности антиокислительных систем для оценки местного и системного противовоспалительного эффекта потенциальных противовоспалительных средств для нужд стоматологии. Выделение местного и системного компонентов в противовоспалительном действии расширяет возможности предложенной экспериментальной модели.

Среди многих актуальных проблем современной стоматологии остается важным и недостаточно разработанным вопрос создания адекватных моделей на животных для объективной оценки и изучения лекарственных средств, предупреждающих и корригирующих нарушения в тканях пародонта и восстанавливающих реминерализационную активность твердых тканей зуба. Это затрудняет разработку эффективных средств профилактики и лечения твердых тканей зуба, несмотря на существующее обилие лечебно-профилактических паст, зубных эликсиров и активаторов тканевой регенерации [10]. Следует констатировать, что в настоящее время простые, надежные и легко воспроизводимые в эксперименте модели для оценки эффектов фармакологических средств и биологически активных добавок (БАД) к пище, содержащих разные фармакологически активные ингредиенты, просто отсутствуют [1, 8].

Целью исследования была разработка экспериментальной модели воспалительно-дегенеративных нарушений тканей пародонта у грызунов (крыс) и ее биохимическая характеристика.

МЕТОДИКА

Опыты выполнены на 92 крысах самцах Вистар массой 220–250 г. С целью воспроизведения воспалительно-дегенеративных повреждений мягких тканей пародонта крысам, наркотизированным эфиром, в наружную часть десны на уровне нижних коренных зубов вводили по 0,15 мл с каждой стороны 2%-го водного раствора формальдегида (всего объ-

ем вводимого раствора составил 0,3 мл). Инъекции производили однократно. Контрольные животные получали инъекции 0,9%-го раствора натрия хлорида (физиологического раствора) в тех же объемах.

Уже через сутки на месте введения формалина развивались стойкие обширные воспалительно-дегенеративные изменения мягких тканей пародонта, которые сохранялись до 2 недель [3, 10]. Помимо измененных тканей пародонта воспаление развивалось и на внутренней части щек, поскольку у крысы щеки небольшие, тонкие, в норме их внутренняя поверхность гладкая, в ней находятся протоки слюнных желез. Внешне облик крысы менялся. Из-за отека мягких тканей щек обычная вытянутая форма морды животного изменялась, щеки раздувались, и животное становилось похожим на хомяка. Такой вид животных сохранялся обычно 3–4 дня, постепенно отек мягких тканей уменьшался. В отдельных случаях (приблизительно у 10% животных) наблюдали абсцедирование процесса, тогда отечность мягких тканей сохранялась более длительно [9].

Наблюдение за крысами с воспалительно-дегенеративным поражением мягких тканей пародонта показало, что в первые сутки после введения формальдегида у них несколько снижается двигательная активность, они меньше потребляют пищи. Уже на 2-е сутки уровень потребления пищи восстанавливается и по поведению эти животные практически не отличаются от контрольных.

Биохимические методы исследования. Объектом исследования явилась сыворотка крови и мягкие ткани пародонта. По окончании опытов (на 7-е сутки от начала воспаления) крыс умерщвляли, извлекали мягкие ткани пародонта из наружной части верхних десен (навеска 200–250 мг), кровь и мягкие ткани помещали в жидкий азот. В дальнейшем, в предварительно замороженных в жидком азоте мягких тканях пародонта и сыворотке крови, оценивали состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы по содержанию малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, восстановленного глутатиона и активности супероксиддисмутазы.

Концентрацию малонового диальдегида определяли по методу И.Д. Стальной, Т.Г. Гаришвили [7]. Метод определения основан на образовании в результате реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом при высокой температуре в кислой среде окрашенного триметинового

■ Таблица 1. Состояние процессов перекисного окисления липидов при моделировании воспалительно-дегенеративного поражения тканей пародонта у крыс

Группа крыс	Малоновый диальдегид		Диеновые конъюгаты	
	сыворотка крови, нмоль/мл	мягкие ткани пародонта, мкмоль/г	сыворотка крови, мкмоль/мл	мягкие ткани пародонта, мкмоль/г
Контроль (интактные)	5,61 ± 0,15	19,98 ± 0,18	10,04 ± 0,40	21,07 ± 0,27
Опыт (воспаление)	11,78 ± 0,23*	39,28 ± 0,12**	17,54 ± 0,80*	45,77 ± 0,41*

Примечание. *P < 0,01; **P < 0,001 по отношению к группе контроля. Исследование на 7-е сутки от начала воспаления

комплекса с максимумом поглощения при 533 нм. Количество комплекса, определяемого спектрофотометрически, пропорционально концентрации малонового диальдегида в пробе.

Концентрацию диеновых конъюгатов ненасыщенных жирных кислот определяли методом И.Д. Стальной [6]. Принцип метода основан на свойствах сопряженных двойных связей в молекулах полиненасыщенных жирных кислот в ходе перекисного окисления на стадии образования свободных радикалов интенсивно поглощать свет в ультрафиолетовой области с характерным максимумом при длине волны 233 нм.

Содержание восстановленного глутатиона определяли по Ф. Е. Путиной [5]. Принцип метода основан на том, что глутатион реагирует с избытком аллоксана, образуя соединение, имеющее максимум поглощения при длине волны 305 нм. Концентрация этого соединения прямо пропорциональна концентрации восстановленного глутатиона в пробе.

Активность супероксиддисмутазы оценивали по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии феназинметасульфата и НАДН2 методом Е.Е. Дубининой и соавторов [2]. Изменения оптической плотности проб регистрировали при длине волны 535 нм.

Активности всех изучаемых ферментов относили к содержанию белка в пробах. Белок определяли унифицированным методом О.Н. Lowry по биуретовой реакции, регистрируя оптическую плотность проб при длине волны 760 нм [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование воспалительного повреждения мягких тканей пародонта у крыс показало, что в результате введения раствора формальдегида у животных развивается стойкое повреждение мягких тканей. Визуально и морфологически оно может быть описано как воспалительно-дегенеративное поражение наружной части десен и мягких тканей пародонта. При этом в сы-

воротке крови на 7-е сутки от начала воспаления резко повышается содержание малонового диальдегида (в 2 раза) и диеновых конъюгатов (на 75%). Аналогичная, но даже более выраженная картина наблюдается и в мягких тканях пародонта. Перекисное окисление липидов в тканях резко активируется, содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в тканях увеличивается более чем в 2 раза (табл. 1).

Система антиоксидантной защиты организма при воспалительно-дегенеративном поражении мягких тканей пародонта резко снижается. Уровень восстановленного глутатиона в сыворотке крови снижается с 2,02 ± 0,09 до 0,88 ± 0,21 мкмоль/мл, а активность супероксиддисмутазы сыворотки — с 0,78 ± 0,10 до 0,28 ± 0,04 А/мг белка, то есть исследованные показатели снижаются в 2,5–3 раза (табл. 2).

Аналогичная закономерность наблюдается и в мягких тканях пародонта. Содержание восстановленного глутатиона при этом снижается в 2,1 раза, а активность супероксиддисмутазы — в 7 раз.

Таким образом, оксидативный статус, включая систему перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, является чувствительным показателем воспалительного процесса в тканях пародонта. Степень сдвигов в показателях перекисного окисления липидов (содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) через 7 дней от начала воспаления составляет порядок 2-кратного увеличения как в сыворотке крови, так и в тканях пародонта. Еще более чувствительной является система антиоксидантной защиты (содержание восстановленного глутатиона и активность супероксиддисмутазы), особенно в тканях. Примечательно, что в тканях пародонта при воспалении активность супероксиддисмутазы возрастала в 7 раз, то есть данный показатель является наиболее чувствительным из всех рассматриваемых в статье.

Следует также пояснить и некоторые особенности анатомической организации ротовой полости крыс, имеющие значение для формирования воспалительно-дегенеративных изменений в тканях пародонта при мо-

■ Таблица 2. Состояние процессов антиоксидантной защиты при моделировании воспалительно-дегенеративного поражения тканей пародонта у крыс

Группа крыс	Восстановленный глутатион		Активность супероксиддисмутазы	
	сыворотка крови, мкмоль/мл	мягкие ткани пародонта, мкмоль/г	сыворотка крови, А/мг белка	мягкие ткани пародонта, А/мг белка
Контроль (интактные)	2,02 ± 0,09	37,26 ± 0,23	0,78 ± 0,10	2,16 ± 0,11
Опыт (воспаление)	0,88 ± 0,21*	17,42 ± 0,69**	0,28 ± 0,04***	0,31 ± 0,03***

Примечание. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 по отношению к группе контроля. Исследование на 7-е сутки от начала воспаления

делировании околодентального воспаления. У крысы имеется 16 зубов, из них 8 на верхней челюсти и 8 — на нижней. Зубы у крысы очень специализированы. Они монофиодонтные, то есть, существует только одна генерация зубов и нет молочных зубов, как у большинства млекопитающих. У крысы на каждой челюсти развита пара резцов и три пары коренных зубов; клыков и малых коренных зубов нет. Промежуток между резцами и первым большим коренным зубом носит название диастема. В эти промежутки с обеих сторон рта заходят кожные складки, закрывая тем самым заднюю часть полости рта [4]. Такое анатомическое строение предполагает вовлечение в воспалительный процесс не только тканей пародонта, но и мягких тканей внутренней поверхности щек, к ним примыкающих, то есть, воспалительный процесс является более распространенным, чем в месте инъекции формальдегида. Это следует учитывать при трактовке лечебных эффектов оцениваемых лекарственных средств.

Другой особенностью модели является как местная реакция в виде воспалительно-дегенеративного процесса, так и системная реакция в виде изменения оксидативного/антиоксидативного статуса животного. Это предполагает, что при оценке даже местно действующих препаратов, например, зубных паст и эликсиров, в их действии должен оцениваться не только локальный, но и системный компонент противовоспалительного эффекта.

ВЫВОДЫ

1. Предложенная модель воспалительно-дегенеративного поражения тканей пародонта с оценкой липидной пероксидации и активности антиоксидантных систем у крыс позволяет адекватно оценивать как местный, так и системный противовоспалительный эффект потенциальных противовоспалительных средств для нужд стоматологии.
2. Выделение местного и системного компонентов в противовоспалительном действии расширяет возможности предложенной экспериментальной модели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов В. Г., Некрасова В. Б. Биологически активные добавки к пище: современное состояние и проблемы // Изучение и применение лечебно-профилактических препаратов на основе природных биологически активных веществ / Под ред. В. Г. Беспалова и В. Б. Некрасовой. СПб.: Эскулап. — 2000. — С. 44–53.

♦ Информация об авторах

Мокренко Евгений Владимирович — к. м. н., ассистент кафедры ортопедической стоматологии. ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» МЗ РФ. 664003, Иркутск, ул. Лапина, д. 4. E-mail: newstom@mail.ru.

Шабанов Петр Дмитриевич — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

2. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. — 1983. — № 10. — С. 30–33.
3. Зайчик А. Ш., Чурилов Л. П. Общая патофизиология. 2-е изд. — СПб.: Элби-СПб. — 2001. — 624 с.
4. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы. — СПб.: Лань. — 2001. — 464 с.
5. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона // Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: ЛГУ. — 1982. — С. 183–187.
6. Стальная И. Д. Метод определения диеновых конъюгатов ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина. — 1977. — С. 63–64.
7. Стальная И. Д., Горишвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М.: Медицина. — 1977. — С. 66–68.
8. Федоров Ю. А., Дрожжина В. А., Петрищев Н. Н. Современные представления о механизме кровотока десен при заболеваниях пародонта // Изучение и применение лечебно-профилактических препаратов на основе природных биологически активных веществ / Под ред. В. Г. Беспалова и В. Б. Некрасовой. — СПб.: Эскулап. — 2000. — С. 422–424.
9. Шабанов П. Д., Жукова Л. В. Моделирование воспаления тканей пародонта для лечебного и профилактического действия биологически активных добавок с экстрактом ламинарии // Усовершенствование методов и аппаратуры, применяемых в учебном процессе, медико-биологических исследованиях и клинической практике. — СПб.: ВМедА. — 2003. — Вып. 34. — С. 28–29.
10. Шабанов П. Д., Жукова Л. В. Биологически активные добавки к пище: гигиенические и медицинские аспекты // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 61–76.
11. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. Н. Метаболические корректоры гипоксии. — СПб.: Информ-навигатор. — 2010. — 916 с.

MODELING OF INFLAMMATORY AND DEGENERATIVE DAMAGES OF PARADONT TISSUE FOR ASSESSMENT OF DRUGS AND FOOD SUPPLEMENTS EFFECT

Mokrenko Ye. V., Shabanov P. D.

♦ **Summary:** A rat model of inflammatory and degenerative damages of paradont tissue by means of administration of 2% solution of formaldehyde into paradont tissue with investigation of lipid peroxidation and antioxidant systems activity for assessment of both local and systemic antiinflammatory effects of potential antiinflammatory drugs and food supplements in stomatology was developed. The separation of local and systemic components in antiinflammatory effect spreads the possibilities of this experimental model.

♦ **Key words:** paradont inflammation; model; lipid peroxidation; antioxidant systems.

Mokrenko Yevgeniy Vladimirovich — PhD (Stomatology), Assistant Professor, Dept. of orthopedic Stomatology. Irkutsk State Medical University. 664003, Irkutsk, Lapina St., 4. E-mail: newstom@mail.ru.

Shabanov Petr Dmitriyevich — Dr. of Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Department of Pharmacology. Kirov Military Medical Academy. 197376, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.