

# ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ И ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ТРЕКРЕЗАНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА

УДК 616-092.9+616.314.17-008.1

© П. Д. Шабанов<sup>1</sup>, Е. В. Мокренко<sup>2</sup><sup>1</sup>ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск

## Ключевые слова:

пародонт; воспаление; оксидативный стресс; иммунный статус; трекрезан; противовоспалительное и иммуностимулирующее действие.

## Резюме

В модели воспалительно-дегенеративного поражения тканей пародонта введением 2%-го водного раствора формальдегида (0,3 мл) в мягкие ткани пародонта крысам оценивали оксидативный и иммунный статус. Показатели перекисного окисления липидов (содержание малонового диальдегида — МДА и диеновых конъюгатов) через 3 дня от начала воспаления были в 3,6–5,8 раз выше в сыворотке крови и тканях пародонта. Воспаление сопровождалось угнетением лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А (Кон-А) на 39 % и с фитогемагглютинином (ФГА) на 37 %. Активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов снижалась на 13 %, что характерно для подострого течения воспалительного процесса. На фоне воспаления у крыс достоверно увеличивалось значение фагоцитарного числа на 26 % и показателя завершенности фагоцитоза — на 22 %, при снижении на 31 % числа нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе. Наряду с этим, показатели спонтанного НСТ-теста повышались на 63 %, а стимулированного — на 35 %. Трекрезан, вводимый внутрибрюшинно в течение 3 дней, снижал содержание МДА в крови на 61 %, диеновых конъюгатов — на 68 %, увеличивал содержание восстановленного глутатиона в 2,9 раз и активность СОД на 79 %. При этом наблюдали повышение лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с Кон-А на 67 % и с ФГА — на 73 %. Фагоцитарная активность нейтрофилов увеличивалась на 24 %. Фагоцитарное число, равное среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом, и показатель завершенности фагоцитоза снижались на 26 и 14 % соответственно. Введение трекрезана внутрь оказывало сходное, но менее выраженное действие. Предварительное введение в желудок лидокаина с целью блокады желудочных афферентов, существенно не меняло эффекты трекрезана. Следовательно, трекрезан оказывает как

противовоспалительное, так и иммуностимулирующее действие, при этом эффект от введения препарата внутрь несколько ниже, чем при введении внутрибрюшинно, и не зависит от активации афферентов желудка.

В настоящее время фармакология располагает достаточно большим арсеналом иммуномодулирующих средств, применяемых при различных видах патологии, включая воспалительный процесс. Новый отечественный препарат трекрезан — триэтаноламмониевая соль 2-метилфеноксиуксусной кислоты — представляет собой высокоэффективное фармакологическое средство с адаптогенным и иммуностимулирующим действием. Трекрезан относится к малотоксичным соединениям (IV класс токсичности) с ЛД<sub>50</sub> >2,5 г/кг у мышей и >6,5 г/кг у крыс. Он оказывает стресспротекторное действие в моделях иммобилизационного и болевого гиподинамического стресса, ускоряет репарацию поврежденных тканей (печень, миокард, мышцы), защищает внутренние органы от повреждающего действия токсинов, СВЧ-облучения, инфекционного фактора, обладает антиоксидантной активностью [16, 17]. Экспериментальными и клиническими исследованиями доказано, что фармакодинамические эффекты трекрезана сводятся, в основном, к следующим видам активности: 1) адаптогенная, 2) иммуностимулирующая, 3) энергостабилизирующая (антиастеническая), 4) противовоспалительная, 5) антиоксидантная, 6) антитоксическая [16]. Учитывая, что большинство экспериментов с трекрезаном выполнено при его введении внутрибрюшинно, а по инструкции препарат вводится внутрь, а также то, что трекрезан представляет собой триэтаноламмониевую соль 2-метилфеноксиуксусной кислоты (в молекуле значимы ионные и водородные связи), возникает вопрос, действует ли сама молекула трекрезана или ее компоненты, поскольку в водных средах трекрезан должен диссоциировать. С другой стороны, иммуномодуляторы применяются во всех областях медицины, включая стоматологию, хотя в последней весьма осторожно, что связано с недостаточностью экспериментальных данных, подтверждающих эффективность иммуномодуляторов в стоматоло-

гической практике. В этом случае особенно важна оценка как местных изменений тканей пародонта, так и системных отклонений в функциях организма, на которые, как правило, обращают меньшее внимание [7, 8].

Целью исследования была оценка противовоспалительного и иммуностимулирующего действия трекрезана, вводимого различными путями в организм (внутрь и внутрибрюшинно), в экспериментальной модели воспалительно-дегенеративных нарушений тканей пародонта у грызунов (крыс).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Животные и модель.** Опыты выполнены на 79 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 объем вводимого раствора составил 0,3 мл). Инъекции производили однократно. Контрольные животные получали инъекции 0,9%-ного 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. 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 [8, 18].

**Дизайн исследования.** Для лечения воспалительно-дегенеративных поражений мягких тканей пародонта использовали субстанцию трекрезана (ОАО «Усолъе-Сибирский ХФЗ», Иркутская область), вводимую в дозе 50 мг/кг в течение 3 дней подряд внутрибрюшинно (в/бр) или внутрь (внутрижелудочно с помощью зонда). В отдельной серии исследований использовали предварительное введение лидокаина 1%-го раствора 0,3 мл внутрижелудочно за 10 мин до введения трекрезана внутрь. Формировали следующие группы: 1) контроль 1 (интактные); 2) воспаление + физиологический раствор (контроль 2); 3) воспаление + трекрезан в/бр; 4) воспаление + трекрезан внутрь; 5) воспаление + лидокаин + трекрезан внутрь.

После окончания всех опытов животных умерщвляли декапитацией, в крови биохимически определяли содержание малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (перекисное окисление липидов), а также оценивали активность антиоксидантных систем (содержание восстановленного глутатиона и активность супероксиддисмутазы — СОД). Кроме того, в крови исследовали показатели иммунного статуса. Для изучения клеточного звена иммунитета использовали реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с митогенами. В качестве последних применяли фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Кон-А). Состояние механизмов неспецифической защиты организма оценивали по показателям фагоцитоза, лизосомально-катионного теста (ЛКТ), теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест).

**Методы определения продуктов перекисного окисления липидов.** Содержание ТБК-связывающих продуктов в пересчете на концентрацию малонового диальдегида определяли после приготовления 10% гомогенатов больших полушарий мозга в 25 мМ Трис-НСl с 175 мМ КCl буфере (рН 7,4) и осаждения в них белка [13].

Метод определения малонового диальдегида (МДА) основан на образовании в результате реакции тиобарбитуровой кислоты с малоновым диальдегидом при высокой температуре в кислой среде окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. Количество комплекса, определяемого спектрофотометрически, пропорционально концентрации малонового диальдегида в пробе.

Концентрации диеновых конъюгатов определяли, используя методы [15] в модификации [6]. Принцип метода основан на свойствах сопряженных двойных и тройных связей в молекулах полиненасыщенных жирных кислот в ходе перекисного окисления на стадии образования свободных радикалов интенсивно поглощать в ультрафиолетовой области с характерными максимумами. Диеновые конъюгаты экстрагировали из навески ткани мозга массой 100 мг смесью гептана и изопропанола в соотношении 1:1 в объеме 2 мл. После добавления 0,2 мл воды и расслоения фаз, отбирали 0,5 мл верхнего гептанового слоя, к которому добавляли 2 мл 95% этанола. Затем пробы фотометрировали. Поглощение при длине волны 233 нм обусловлено содержанием диеновых конъюгатов.

**Методы определения антиоксидантных систем.** Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии феназинметасульфата и НАДН по методу [1]. Изменения оптической плотности проб регистрировали при длине волны 535 нм. Содержание восстановленного глутатиона определяли по методу [13]. Принцип метода основан на реакции глутатиона с избытком аллоксана с образованием соедине-

ния с максимумом поглощения при длине волны 305 нм. Концентрация этого соединения прямо пропорциональна концентрации восстановленного глутатиона в пробе.

**Методы определения показателей энергетического обмена.** Содержание молочной и пировиноградной кислот определяли в крови энзиматическим методом [19] в модификации [2].

**Методы иммунологических исследований.** Иммунологические исследования проводили, руководствуясь методическими материалами по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств [10].

**Реакция торможения миграции лейкоцитов.** РТМЛ с митогенами характеризует функциональное состояние Т-лимфоцитов. РТМЛ основана на способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в специфических реакциях с антигеном *in vitro* выделять биологически активные субстанции или лимфокины, в том числе факторы, ингибирующие миграцию лейкоцитов. РТМЛ выполняли в капиллярах по [12]. Результаты реакции выражали в виде индекса миграции (ИМ) или как процент миграции: ИМ = длина зоны миграции в присутствии митогена/длина зоны миграции в контроле.

**Определение фагоцитарной реакции нейтрофилов крови.** Уровень нейтрофильного фагоцитоза по отношению к микробной тест-культуре изучали по [10]. Поглотительную способность фагоцитов оценивали по фагоцитарному показателю (ФП) — проценту фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов, фагоцитарному числу (ФЧ) — среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом. Для оценки переваривающей функции определяли показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ), т.е. отношение количества переваренных микробов к общему числу поглощенных микробов (переваренных и непереваренных), выраженное в процентах: ПЗФ = общее количество переваренных микробов × 100 % / общее количество поглощенных микробов.

**Лизосомально-катионный тест.** Степень активности кислороднезависимых микробцидных систем фагоцита оценивали с помощью лизосомально-катионного теста (ЛКТ) [12]. Принцип метода основан на цитохимическом выявлении неферментных лизосомальных катионных белков, относительное содержание которых в исследуемых клетках позволяет судить о представительстве указанных антимикробных систем. Внутриклеточное содержание катионных белков крови оценивали по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК), вычисляемого по формуле:  $СЦК = (3a + 2b + 1,5v + 1g + 0,5d + 0e) / 100$ , где а–е — количество однотипных клеток с определенной степенью окрашиваемости цитоплазмы прочным зеленым, а цифры показывают степень выраженности и интенсивности окрашивания.

**Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ).** Принцип метода основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции. Отложение синефиолетовых гранул диформазана в фагоцитирующей клетке соответствует локализации НАДФН-оксидазы. При этом размеры диформазановых отложений являются показателем суммарной активности НАДФН-оксидазы, инициирующей процесс стимуляции фагоцита. НСТ-тест, таким образом, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита, степень активации глюкозомонофосфатного шунта и связанное с ним образование свободных радикалов кислорода [4, 5]. В НСТ-тесте, в отличие от большинства цитохимических реакций, исследуют живые клетки, которые фиксируют лишь после инкубации с гистохимическим индикатором респираторного взрыва — нитросиним тетразолием. Это выполняется без дополнительной стимуляции (спонтанный НСТ-тест) или при стимуляции нейтрофилов *in vitro* (индуцированный или стимулированный НСТ-тест). Спонтанный НСТ-тест отражает степень функциональной активации клеток *in vivo*, индуцированный — функциональный резерв клетки и позволяет судить о дефектах бактерицидной системы фагоцитов [3]. Постановку НСТ-теста воспроизводили по методике, описанной в работе [11]. Индекс активации нейтрофилов рассчитывали по формуле:  $ИАН = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3) / 100$ , где А — количество клеток, не содержащих диформазановых отложений или содержащих их в виде пылевидных немногочисленных включений; В — количество клеток, в которых площадь отложений диформазана не превышает 1/3 площади ядра; С — количество клеток, в которых отложения диформазана занимают от 1/3 до всей величины площади ядра; D — количество клеток с диформазановыми отложениями, по площади превосходящими площадь ядра.

**Статистическая обработка результатов исследования.** Выборка для каждой группы животных составила не менее 10 крыс. Математическую обработку результатов исследования проводили на компьютере с использованием стандартного пакета программ STATISTICA for Windows по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой статистической значимости показателей и различий рассматриваемых выборок по критерию Стьюдента. Различия в сравниваемых группах считались достоверными при уровне значимости 95 % ( $p < 0,05$ ). В тексте, таблицах результаты экспериментов представлены в виде  $M \pm m$ , где: M — среднее арифметическое, m — среднеквадратичная ошибка среднего арифметического, n — число животных в группах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдение за крысами с воспалительно-дегенеративным поражением мягких тканей па-

■ Таблица 1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных систем в крови крыс на 3-и сутки воспалительно-дегенеративного поражения мягких тканей пародонта ( $M \pm m$ )

Группы	МДА, нмоль/мл	ДК, мкмоль/мл	Восстановленный глутатион, мкмоль/мл	СОД, А/мл
Интактные (контроль 1)	2,82 ± 0,24	8,83 ± 0,50	2,52 ± 0,28	1,65 ± 0,35
Воспаление	16,39 ± 0,80*	31,40 ± 2,18*	0,74 ± 0,05*	0,42 ± 0,05*

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными животными

■ Таблица 2. Содержание лактата и пирувата в крови крыс на 3-и сутки воспалительно-дегенеративного поражения мягких тканей пародонта ( $M \pm m$ )

Группы	Лактат, мкмоль/мл	Пируват, мкмоль/мл
Интактные (контроль 1)	2,68 ± 0,15	0,44 ± 0,03
Воспаление	8,86 ± 0,43*	0,12 ± 0,01*

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с интактными животными

родонта 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. В месте 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. В крови животных с воспалением на 3-и сутки в 5,8 раз увеличивалось содержание МДА, в 3,6 раз уровень диеновых конъюгатов, на 71 % снижалось содержание восстановленного глутатиона и на 75 % активность супероксиддисмутазы (табл. 1).

У животных, перенесших воспаление, наблюдали признаки лактацидоза, что проявлялось в увеличении в крови уровня лактата в 3,3 раза на фоне снижения на 73 % содержания пирувата (табл. 2).

Моделируемое воспалительно-дегенеративное поражение мягких тканей пародонта у крыс сопровождалось угнетением лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А на 39 % и с фитогемагглютинином на 37 % (табл. 3).

Активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов снижалась на 13 %, что характерно для подострого и хронического течения воспалительного процесса.

На фоне воспаления у крыс достоверно увеличивалось значение фагоцитарного числа на 26 % и показателя завершенности фагоцитоза — на 22 %, при снижении на 31 % числа нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе. Наряду с этим, показатели спонтанного НСТ-теста повышались на 63 %, а стимулированного — на 35 %.

Таким образом, моделируемое воспалительно-дегенеративное поражение мягких тканей пародонта у крыс сопровождается выраженными метаболическими нарушениями, заключающимися в лактацидозе и активации процессов ПОЛ на фоне угнетения активности антиоксидантных систем в крови животных. Наряду с этим, воспаление протекает на фоне измененного фагоцитоза, дисфункция которого выражается в угнетении поглотительной и бактерицидной способностей нейтрофилов крови. Степень снижения показателей фагоцитоза находится в прямой корреляции со степенью тяжести воспалительной реакции. У крыс наблюдали признаки развития вторичного иммунодефицита, заключающиеся в повышенной фагоцитарной активности лимфоцитов, угнетении Т-лимфоцитарной

■ Таблица 3. Изменение иммунологических показателей у крыс на 3 сутки воспалительно-дегенеративного поражения мягких тканей пародонта ( $M \pm m$ )

Показатели	Группы животных	
	Интактные (контроль 1)	Воспаление
РТМЛ с КонА, %	84,00 ± 2,00	51,21 ± 6,65*
РТМЛ с ФГА, %	54,60 ± 3,40	34,50 ± 9,98*
ФП, %	95,00 ± 0,82	65,49 ± 4,09*
ФЧ	12,57 ± 0,34	15,78 ± 1,16*
ПЗФ, %	22,50 ± 1,40	27,39 ± 2,95*
ЛКТ, усл. ед.	1,49 ± 0,02	1,29 ± 0,03*
НСТ спонтанный, усл. ед.	0,24 ± 0,02	0,39 ± 0,04*
НСТ стимулированный, усл. ед.	0,54 ± 0,03	0,73 ± 0,04*

РТМЛ — реакция торможения миграции лимфоцитов; Кон-А — конканавалин А; ФГА — фитогемагглютинин; ПЗФ — показатель завершенности фагоцитоза; ФП — фагоцитарный показатель; ФЧ — фагоцитарное число; ЛКТ — лизосомально-катионный тест; НСТ — тест восстановления нитросинего тетразолия, \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем

■ Таблица 4. Влияние трекрезана при различных путях введения на показатели перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных систем в крови на 3 сутки воспалительно-дегенеративного поражения мягких тканей пародонта ( $M \pm m$ )

Группы	МДА, нмоль/мо	ДК, мкмоль/мл	Восстановленный глутатион, мкмоль/мл	СОД, А/мл
Воспаление (контроль 2)	16,39 ± 0,80*	31,40 ± 2,18*	0,74 ± 0,05*	0,42 ± 0,05*
Воспаление + трекрезан в/бр	6,34 ± 0,60	10,04 ± 0,78	2,15 ± 0,11	0,75 ± 0,03
Воспаление + трекрезан внутри	10,65 ± 0,74	18,79 ± 0,80	1,23 ± 0,16	0,65 ± 0,04
Воспаление + лидокаин + трекрезан внутри	9,01 ± 0,89	15,41 ± 0,84	1,43 ± 0,08	0,74 ± 0,09

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем

■ Таблица 5. Влияние трекрезана при различных путях введения на содержание лактата и пирувата в крови крыс на 3 сутки воспалительно-дегенеративного поражения мягких тканей пародонта ( $M \pm m$ )

Группы	Лактат, мкмоль/мл	Пируват, мкмоль/мл
Воспаление (контроль 2)	8,86 ± 0,43	0,12 ± 0,01
Воспаление + трекрезан в/бр	4,40 ± 0,60	0,31 ± 0,03
Воспаление + трекрезан внутри	6,05 ± 0,31	0,25 ± 0,02
Воспаление + лидокаин + трекрезан внутри	5,73 ± 0,48	0,27 ± 0,02

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем

функции и активности кислороднезависимых микробцидных систем фагоцитов.

На фоне внутрибрюшинного введения животным трекрезана содержание МДА в крови снижалось на 61 %, диеновых конъюгатов — на 68 %, возрастало содержание восстановленного глутатиона в 2,9 раз и увеличивалась активность СОД на 79 % (табл. 4).

При введении трекрезана внутрь содержание МДА в крови животных снижалось на 35 %, диенов — на 40 %, увеличивалось содержание глутатиона на 66 % и активность СОД на 55 %. Применение трекрезана внутрь через 10 мин после внутрижелудочного введения лидокаина с целью блокады афферентов сопровождалось снижением уровня МДА в крови на 45 %, диенов — на 51 %, увеличением содержания глутатиона на 93 % и активности СОД на 76 %. На уровень лактата и пирувата более выраженное действие оказывало введение трекрезана внутрибрюшинно: содержание лактата в крови

снижалось в 2,6 раза, пирувата в 2 раза (табл. 5). Введение трекрезана внутрь и на фоне действия лидокаина в равной степени снижало уровень лактата (на 32 и 35 %) и пирувата (в 2 и 2,3 раза).

На фоне действия трекрезана, вводимого крысам с воспалительно-дегенеративным поражением мягких тканей пародонта разными путями, наблюдается тенденция к восстановлению иммунологических показателей (табл. 6).

Внутрибрюшинное введение трекрезана крысам с воспалительно-дегенеративным поражением мягких тканей пародонта приводило к достоверному повышению лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с Кон-А на 67 % и с ФГА — на 73 %. Фагоцитарная активность нейтрофилов увеличивалась на 24 %. Фагоцитарное число, равное среднему числу микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом, и показатель завершенности фагоцитоза снижались на 26 и 14 % соответственно.

■ Таблица 6. Изменение иммунологических показателей у крыс с воспалительно-дегенеративным поражением мягких тканей пародонта ( $M \pm m$ ,  $n=8$ )

Показатели	Контроль 2 (воспаление)	Введение трекрезана		
		Внутрибрюшинно	Внутри	На фоне лидокаина
РТМЛ с КонА, %	51,21 ± 13,3	85,63 ± 7,63*	69,28 ± 3,09	60,37 ± 3,98
РТМЛ с ФГА, %	34,50 ± 9,98	59,75 ± 12,30*	45,46 ± 1,64	42,80 ± 2,37
ФП, %	65,49 ± 4,09	81,17 ± 1,81*	75,91 ± 3,92	75,56 ± 3,40
ФЧ	15,78 ± 1,16	11,62 ± 0,51*	8,95 ± 0,29*	8,94 ± 1,03*
ПЗФ, %	27,39 ± 2,95	23,46 ± 0,96	18,53 ± 0,93*	15,28 ± 0,68*
ЛКТ, усл. ед.	1,29 ± 0,03	1,59 ± 0,02*	1,43 ± 0,02*	1,38 ± 0,03*
НСТ спонтанный, усл. ед.	0,39 ± 0,04	0,16 ± 0,02*	0,28 ± 0,04*	0,27 ± 0,04*
НСТ стимулированный, усл. ед.	0,73 ± 0,04	0,47 ± 0,07*	0,45 ± 0,03*	0,47 ± 0,02*

РТМЛ — реакция торможения миграции лимфоцитов; Кон-А — конканавалин А; ФГА — фитогемагглютинин; ПЗФ — показатель завершенности фагоцитоза; ФП — фагоцитарный показатель; ФЧ — фагоцитарное число; ЛКТ — лизосомально-катионный тест; НСТ — тест восстановления нитросинего тетразолия, \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем

При введении крысам трекрезана внутрь функциональная активность лимфоцитов повышалась в реакции торможения миграции лейкоцитов с Кон-А на 35 %, с ФГА — на 328 %. Фагоцитарная активность нейтрофилов увеличивалась на 16 %, фагоцитарное число снижалось на 43 % и показатель завершенности фагоцитоза на 32 %.

Применение трекрезана на фоне предварительного введения лидокаина сопровождалось увеличением реакции торможения миграции лейкоцитов с Кон-А на 18 %, с ФГА на 24 %. Величина фагоцитарной активности возрастала на 15 %, значение фагоцитарного числа снижалось на 43 % и показателя завершенности фагоцитоза на 44 %.

Разные пути введения трекрезана приводили к изменению активности кислородзависимых антиинфекционных систем лимфоцитов, характеризующих степень активации гексозомонофосфатного шунта и связанное с этим образование свободных радикалов.

В группе животных, получавших трекрезан внутривенно, показатели спонтанного НСТ-теста снижались по сравнению с контролем на 59 %, а стимулированного НСТ-теста — на 26 % ( $p < 0,05$ ). У животных, получавших трекрезан внутрь, значения спонтанного НСТ-теста снижались на 28 %, а стимулированного — на 38 %. Животные, получавшие трекрезан внутрь на фоне действия лидокаина, демонстрировали увеличение значения в спонтанном НСТ тесте на 31 %, в стимулированном — на 36 % по сравнению с контролем. При этом активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов (ЛКТ тест) увеличивалась при внутривенном введении трекрезана на 15 %, при применении внутрь — на 26 % и на фоне лидокаина — на 7 %.

## ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что при моделировании воспалительно-дегенеративного поражения мягких тканей пародонта на первый план выходят не столько местные изменения, которые мы описывали ранее [7, 9, 20], сколько системные сдвиги в оксидативном и иммунном статусе. Система перекисного окисления липидов при данном виде воспаления весьма реактивна, и на 3 сутки воспаления мы регистрировали в крови увеличение содержания МДА и диеновых конъюгатов в 3–6 раз. Параллельно меняется иммунный статус крыс. В частности, угнетается лимфокинпродуцирующая функция лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А (на 39 %) и с фитогемагглютинином (на 37 %). Функция фагоцитоза также меняется: активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов снижается, увеличивается значение фагоцитарного числа (на 26 %) и показателя завершенности фагоцитоза (на 22 %) при снижении числа нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе (на 31 %). Показатели спонтанного и стиму-

лированного НСТ-теста повышаются, соответственно, на 63 и 35 %. Все это указывает на динамические изменения в организме, которые могут рассматриваться как соответствующая база для оценки противовоспалительного и иммуностимулирующего действия иммуномодуляторов. В качестве такого средства мы выбрали отечественный препарат трекрезан, представляющий собой триэтаноламмониевую соль 2-метилфеноксиуксусной кислоты. Препарат создан в Иркутском институте органической химии СО РАН в 1990-х гг. и проходил изучение в Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ. Первоначально он был позиционирован как синтетический адаптоген и изучался именно с этих позиций [18], но позднее у трекрезана была выявлены иммуностимулирующие, энергостабилизирующие (антиастенические), противовоспалительные, антиоксидантные и антитоксические свойства [16], что заставило пересмотреть возможные направления его практического применения. В большей степени нас заинтересовала его иммуностимулирующая и интерферогенная активность, позволяющая использовать препарат для профилактики и лечения ОРВИ и других видов бронхолегочных заболеваний [17].

Касательно выбранного нами направления исследований важным аспектом их было оценить, в какой степени действие трекрезана зависит от способа его применения. В данной работе было подтверждено, что трекрезан в оптимальных дозах (50 мг/кг) оказывает свое положительное противовоспалительное и иммуностимулирующее действие независимо от способа применения — внутрь или внутривенно, хотя при внутривенном введении эффекты трекрезана были выражены несколько сильнее, чем при приеме внутрь (сопоставительные данные не достоверны). Этим было доказано, что фармакодинамика трекрезана существенно не отличается при его введении в организм разными способами. Вторым аспектом был связан с возможным действием трекрезана на желудочные афференты, активация которых приводит к неспецифическим адаптогенным эффектам, например, при введении медиаторных субстанций внутрижелудочно [14]. Этот вопрос также был разрешен: предварительная инактивация желудочных афферентов введением внутрь местного анестетика лидокаина не блокировала действие трекрезана, также вводимого внутрь после анестетика. Из этого можно заключить, что эффекты трекрезана развиваются только после его всасывания в кровь, то есть тип действия трекрезана описывается как традиционный и ожидаемый и не включает активации рефлексогенных зон желудка. При этом по выраженности противовоспалительный и иммуностимулирующий эффект трекрезана следует оценить как выраженный, а его механизм действия как метаболический, связанный с прямым влиянием на процессы энергообразования, оксидации/антиоксидации и иммунитета.

## ВЫВОДЫ

1. Воспалительно-дегенеративное поражение тканей пародонта у крыс сопровождается изменением оксидативного статуса животных в форме резкого увеличения содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов и угнетения систем антиоксидантной защиты (восстановленный глутатион, активность СОД) в крови.
2. При моделировании данной формы воспаления угнетается лимфокинпродуцирующая функция лимфоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов с конканавалином А (на 39%) и с фитогемагглютинином (на 37%). Функция фагоцитоза также меняется: активность кислороднезависимых микробицидных систем фагоцитов снижается, увеличивается значение фагоцитарного числа (на 26%) и показателя завершенности фагоцитоза (на 22%) при снижении числа нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе (на 31%). Показатели спонтанного и стимулированного НСТ-теста повышаются.
3. Трекрезан при подостром введении (3 дня) оказывает противовоспалительное действие, оцениваемое по снижению в крови содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов и восстановления систем антиоксидантной защиты (восстановленный глутатион, активность СОД) в крови. При этом наблюдается повышение лимфокинпродуцирующей функции лимфоцитов и восстановление фагоцитарной активности нейтрофилов.
4. Эффекты трекрезана мало зависят от способа введения препарата: при внутрибрюшинном введении они несколько более выражены, чем при введении внутрь, однако действие трекрезана не связано с вовлечением желудочных афферентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. А., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов в плазме крови человека. Лаб. дело. 1983; 10: 30–3.
2. Зарубина И. В., Лысак В. Ф., Кузьмина Г. А. Модификация способа определения молочной кислоты в крови. Усовершенствование методов и аппаратуры, применяемых в учебном процессе, медико-биологических исследованиях и клинической практике. Л.: ВМедА, 1984; 15: 87.
3. Клиническая иммунология и аллергология: учебное пособие / Под ред. А. В. Караулова. М.: МИА, 2002. 651 с.
4. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки и нейтрофиле и макрофаге. 2-е изд., перераб. и доп. Новосибирск: Наука, 1989. 344 с.
5. Маянский А. Н., Галиуллин А. Н. Реактивность нейтрофила. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1984. 158 с.
6. Миронова О. П., Зарубина И. В. Способ определения конъюгатов гидроперекисей липидов и индексов окисленности липидов из одной пробы. Усовершенствование методов и аппаратуры, применяемых в учебном процессе, медико-биологических исследованиях и клинической практике. Сб. изобретений и рац. предложений. СПб.: ВМедА, 1998; 29: 25.

7. Мокренко Е. В., Зарубина И. В., Шабанов П. Д. Модель воспалительно-дегенеративных повреждений тканей пародонта для оценки действия фармакологических средств. Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. 2013; 11 (Спецвып): 106–7.
8. Мокренко Е. В., Шабанов П. Д. Модель воспалительно-дегенеративных повреждений тканей пародонта для оценки действия фармакологических средств Обозр. психиатрии и мед. психологии им. В. М. Бехтерева. 2014; (Прил): 118–9.
9. Мокренко Е. В., Шабанов П. Д. Лечение зубными пастами воспалительно-дегенеративных поражений мягких тканей пародонта у крыс. Педиатр. 2015; 6(2): 81–5.
10. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований (методы оценки Т- и В-систем иммунитета). Л., 1980. 44 с.
11. Оценка иммунного статуса организма в лечебных учреждениях Советской Армии и Военно-морского Флота / Под ред. Е. В. Гембицкого. М., 1987. 62 с.
12. Потемкина Е. Е., Позднякова Р. З., Манукян Л. М. Пособие по лабораторной клинической иммунологии. М.: Изд-во РУДН, 2003. 287 с.
13. Путилина Ф. Е., Галкина О. В., Ещенко Н. Д., Диге Г. П. Практикум по свободнорадикальному окислению. СПб.: Из-во СПбГУ, 2006. С. 3–10.
14. Сердюк С. Е., Гмиро В. Е. Мезатон потенцирует антидепрессивное и устраняет седативное действие amitriptilina. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2014; 100(1): 18–26.
15. Стальная И. Д. Метод определения диеновых конъюгатов ненасыщенных высших кислот. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
16. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Мокренко Е. В. Фармакология трекрезана — нового иммуномодулятора и адаптогена. Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. 2014; 12 (2): 12–27.
17. Шабанов П. Д., Мокренко Е. В. Новый иммуномодулятор и адаптоген трекрезан как средство профилактики и лечения воспалительных заболеваний // Вестник Смоленской гос. мед. академии. 2014; 13 (2): 61–5.
18. Шабанов П. Д., Мокренко Е. В. Состояние оксидативного статуса крови и тканей при воспалительно-дегенеративных поражениях мягких тканей пародонта у крыс после применения зубных паст и их отдельных компонентов. Мед. акад. журн. 2015; 15 (2): 55–61.
19. Marbach E. P., Weil M. H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. J. Clin. Chem. 1967; 13: 314–25.
20. Shabanov P. D., Mokrenko E. V. Immune modulators of natural and synthetical origin in treatment of bronchial, prostatic and gingival inflammation. Obz. klin. farmacol. i lek. ter. 2014; 11 (Suppl): 59.

#### ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNE STIMULATING EFFECTS OF TREKREZAN IN TREATMENT OF OF INFLAMMATORY AND DEGENERATIVE DAMAGES OF THE SMOOTH PARODONT TISSUE

*P. D. Shabanov, E. V. Mokrenko*

◆ **Summary:** The oxidative and immune status was assessed in a rat model of inflammatory and degenerative damages of the smooth parodont tissue due to administration of 2% formaldehyde water solution (0.3 ml) into the smooth parodont tissues. The lipid peroxidation in-

dexes (malonic dialdehyde and dienic conjugates level) were 3.6–5.8-fold higher in the blood serum and parodont tissue in 3 days after inflammation beginning. The inflammation was accompanied by inhibition of lymphokin-producing function of lymphocytes in reaction of inhibition of leucocytes migration with concanavalin A (Con A) by 39 % and with phytohaemagglutinin (PGA) by 37 %. The activity of oxygen-independent microbicide system of phagocytes was decreased by 13 %, that was typical for subacute duration of inflammatory process. The phagocyte number was increased by 26 % and the phagocytosis index by 22 % with decrease of phagocytes participating in phagocytosis by 31 %. The spontaneous NBT-test index was increased by 63 %, and stimulating one by 35 %. Trekrezan administered for 3 days decreased malonic dialdehyde level by 61 %, dienic conjugates level by 68 %, in 2.9-fold increased the concentration of recovered glutathione and superoxide dismutase activity by 79 %. Simultaneously, the elevation of lymphokin-producing function of lymphocytes in reaction of inhibition of leucocytes migration with Con A by 67 % and with PGA by 73 % was registered. Phagocyte activity of neutrophils was increased by 24 %. Phagocyte number equal to middle number of microorganisms phaged by one active neutrophil and phagocytosis index were decreased by 26 % and 14 % respectively. Trekrezan administered orally revealed the same but less significant action. Preliminary administration of lidocaine intragastrally for blockade of gastric afferents did not affect the trekrezan action. Therefore, trekrezan possesses both anti-inflammatory and immune stimulating action. Oral administration of trekrezan induced more weak effect than after intraperitoneal administration and did not depend on activation of gastric afferents.

◆ **Key words:** parodont; inflammation; oxidative stress; immune status; trekrezan; anti-inflammatory and immune stimulating action.

## REFERENCES

- Dubinina E. E., Salnikova L. A., Efimova L. F. Aktivnost' i izofermentnyy spektr SOD eritrotsitov v plazme krovi cheloveka [Activity and isoenzyme spectrum of SOD of red blood cells in the human blood serum]. *Lab. Delo*. 1983; 10: 30–3. (in Russian).
- Zarubina I. V., Lysak V. F., Kuzmina G. A. Modifikatsiya sposoba opredeleniya molochnoy kisloty v krovi. Usovershenstvovanie metodov i apparatury, primenyaemykh v uchebnom protsesse, mediko-biologicheskikh issledovaniyakh i klinicheskoy praktike [Modification of a method for determination of lactic acid in the blood. Development of Methods and Apparature for Learning, Medical and Biological Investigations and Clinical Practice]. Leningrad: VMedA, 1984; 15: 87. (in Russian).
- Klinicheskaya immunologiya i allergologiya: uchebnoe posobie [Clinical Immunology and Allergology: Learning Edition]. Ed. by A. V. Karaulov. Moscow: MIA Publ., 2002. 651 p. (in Russian).
- Mayanskii A. N., Mayanskii D. N. Ocherki i neytrofile i makrofage [Essays of Neutrophil and Macrophage]. 2nd Ed. Novosibirsk: Nauka, 1989. 244 p. (in Russian).
- Mayanskii A. N., Galiullin A. N. Reaktivnost' neytrofila [Reactivity of Neutrophil]. Kazan: Kazan Univ. press, 1984. 158 p.
- Mironova O. P., Zarubina I. V. Sposob opredeleniya kon''yugatov gidroperekisey lipidov i indeksov oksislennosti lipidov iz odnoy probe. Usovershenstvovanie metodov i apparatury, primenyaemykh v uchebnom protsesse, mediko-biologicheskikh issledovaniyakh i klinicheskoy praktike [Method for determination of conjugates of lipid hydroperoxides and oxidative lipid indexes in a one probe. Development of Methods and Apparature for learning, medical and biological investigations and clinical practice]. Leningrad: VMedA, 1998; 29: 25. (in Russian).
- Mokrenko E. V., Zarubina I. V., Shabanov P. D. Model' vospalitel'no-degenerativnykh povrezhdeniy tkaney parodonta dlya otsenki deystviya farmakologicheskikh sredstv [A model of inflammatory and degenerative damages of parodont tissue for assessment of effects of pharmacological drugs]. *Obz. Klin. Farmacol. I lek. Ter.* 2013; 11 (Suppl.): 106–7. (in Russian).
- Mokrenko E. V., Shabanov P. D. Model' vospalitel'no-degenerativnykh povrezhdeniy tkaney parodonta dlya otsenki deystviya farmakologicheskikh sredstv [A model of inflammatory and degenerative damages of parodont tissue to determine action of pharmacological drugs]. *Obozr. Psikhatrii I Med. Psikhologii Im VM Bekhtereva*. 2014; Suppl.: 118–9. (in Russian).
- Mokrenko E. V., Shabanov P. D. Lechenie zubnymi pastami vospalitel'no-degenerativnykh porazheniy myagkikh tkaney parodonta u krysa [Treatment of inflammatory and degenerative damages of parodont tissue by tooth pastes]. *Pediatr.* 2015; 6 (2): 81–5. (in Russian).
- Morozov V. G., Khavinson V. Kh. Metodicheskie rekomendatsii po provedeniyu immunologicheskikh issledovaniy (metody otsenki T- i V-sistem immuniteta) [Methodic recommendations to process immunological investigations (methods for assessment of T- and B-systems of immunity)]. Leningrad, 1980. 44 p. (in Russian).
- Otsenka immunnogo statusa organizma v lechebnykh uchrezhdeniyakh Sovetskoy Armii i VoЕННО-morskogo Flota [Assessment of immune status of the organism in therapeutic organizations of the Soviet Army and Navy]. Ed. by E. V. Gembitskii. Moscow, 1987. 62 p. (in Russian).
- Potemkina E. E., Pozdnyakova R. Z., Mahukyan L. M. Posobie po laboratornoy klinicheskoy immunologii [Guide to laboratory clinical immunology]. Moscow: RUDN Press, 2003. 287 p. (in Russian).
- Putilina F. E., Galkina O. V., Eshchenko N. D., Dizhe G. P. Praktikum po svobodnoradikal'nomu okisleniyu [Practical guide to free radicals oxidation]. St. Petersburg: St. Petersburg Univ. Press, 2006: 3–10. (in Russian).
- Serdyuk S. E., Gmiro V. E. Mezaton potentsiruet antidepressivnoe i ustranyaet sedativnoe deystvie amitriptilina [Mesaton potentiates antidepressant and abolishes sedative action of amitriptyline]. *Ross. Fiziol. Zhurn Im IM Sechenova*. 2014; 100 (1): 18–26. (in Russian).
- Stalnaya I. D. Metod opredeleniya dienovykh kon''yugatov nenasyshchennykh vysshikh kislot [Method of determination of dienic conjugates of unsaturable polienic acids]. *Modern Methods in Biochemistry*. Ed. by V. N. Orekhovich. Moscow: Meditsina, 1977: 66–68. (in Russian).
- Shabanov P. D., Zarubina I. V., Mokrenko E. V. Farmakologiya trekrezana – novogo immunomodulyatora i adaptogena [Pharmacology of trekrezan, a new immune modulator and adaptogen]. *Obz. Klin. Farmacol. I lek. Ter.* 2014; 12 (2): 12–27. (in Russian).
- Shabanov P. D., Mokrenko E. V. Novyy immunomodulyator i adaptogen trekrezan kak sredstvo profilaktiki i lecheniya vospalitel'nykh zabolevaniy [A new immune modulator and adaptogen trekrezan as a drug of prevention and treatment of inflammatory diseases]. *Vestnik Smolensk. Gos. Med. Akademii*. 2014; 13 (2): 61–5. (in Russian).
- Shabanov P. D., Mokrenko E. V. Sostoyanie oksidativnogo statusa krovi i tkaney pri vospalitel'no-degenerativnykh porazheniyakh myagkikh tkaney parodonta u krysa posle primeneniya zubnykh past i ikh otdel'nykh komponentov [Oxidative status of the blood and tissues in inflammatory and degenerative damages of the parodont sooth tissues in rats after using toothpastes and separate their

- components]. Med. Akad. Zhurn. 2015; 15 (2): 55–61. (in Russian).
19. Marbach E.P., Weil M.H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. J. Clin. Chem. 1967; 13: 314–25.
20. Shabanov P.D., Mokrenko E.V. Immune modulators of natural and synthetical origin in treatment of bronchial, prostatic and gingival inflammation. Obz. Klin. Farmacol. I lek. Ter. 2014; 11 (Suppl.): 59.

## ◆ Информация об авторах

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

*Мокренко Евгений Владимирович* — к. м. н., соискатель кафедры фармакологии. ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, Иркутский гос. медицинский университет. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6.

*Shabanov Petr Dmitriyevich* — Professor, Head, Dept. of Pharmacology. S. M. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia.  
E-mail: pdshabanov@mail.ru.

*Mokrenko Eugeny Vladimirovich* — PhD (Stomatology), Post-Doc Fellow, Departement of Pharmacology. S. M. Kirov Military Medical Academy, Irkutst State Medical University. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia.