

**ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ДЕНТАЛЬНЫХ ПЛЁНОК НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

М.К. Искакова, Е.А. Соловьева, У.А. Куватбаева
НУО «Казахстанско-Российский медицинский университет»,
(ректор- д.м.н., проф. Джайнакбаев Н.Т.)
г. Алматы, Казахстан

Резюме. В статье приведены результаты изучения фармакологической активности дентальной плёнки на основе гиалуроновой кислоты в эксперименте. Изучение общетоксического действия дентальной плёнки проводилось путем создания экспериментальной модели гингивита и пародонтита у половозрелых белых крыс. Местно-раздражающее и аллергизирующее действия дентальной плёнки изучалось на морских свинках. Положительные результаты лечения были подтверждены данными патоморфологических исследований. Полученные результаты доклинических исследований позволяют рекомендовать испытываемую дентальную плёнку на основе гиалуроновой кислоты с метронидазолом и хлоргексидином для дальнейших клинических исследований.

Ключевые слова: эксперимент, гиалуроновая кислота, дентальная пленка, токсичность, модель.

**STUDY OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF DENTAL FILMS
BASED ON HYALURONIC ACID (EXPERIMENTAL STUDY)**

M.K. Iskakova, E.A. Solovyova, U.A. Kuvatbaeva
NUO "Kazakh-Russian Medical University",
(Rector - MD, Prof. Dzhaïnakbaev N.T.)
Almaty, Kazakhstan

Resume. The article presents the results of studying the pharmacological activity of a dental film based on hyaluronic acid in an experiment. The study of the general toxic effect of the dental film was carried out by creating an experimental model of gingivitis and periodontitis in mature white rats. The locally irritating and allergenic effects of the dental film were studied on guinea pigs. The positive results of treatment were confirmed by the data of pathomorphological studies. The obtained results of preclinical studies allow us to recommend the tested dental film based on hyaluronic acid with metronidazole and chlorhexidine for further clinical studies.

Keywords: experiment, hyaluronic acid, dental film, toxicity, model.

Введение

На сегодняшний день в стоматологической практике наиболее распространенной патологией являются заболевания пародонта, которые представляют не только общемедицинскую, но и социальную проблему. В последние годы наблюдается тенденция увеличения частоты заболеваний среди лиц более молодого возраста [1,2,3,4,5]. По данным ВОЗ

(1990), уровень заболеваний пародонта колеблется от 55-98%. В возрастной группе (15-19 лет) составляет 55-89%, а у лиц 35-44 лет – 65-98%. В связи с увеличением роста заболеваемости пародонтитом среди населения в практике врача-стоматолога все чаще возникают вопросы, связанные с развитием, клиническими проявлениями и выбором рациональных методов лечения. Разработка новых лекарственных средств,

требуют проведения опытов *in vitro* с целью получения достоверных результатов и оценки эффективности лечения [6].

Для получения достоверных результатов исследования и оценки эффективности лечения была применена экспериментальная модель гингивита и пародонтита. Экспериментальная модель гингивита и пародонтита была получена в эксперименте на лабораторных животных (белые крысы). Одним из факторов, способствующих развитию патологических процессов в тканях пародонта, является малобелковость пищевого рациона (В.П. Пакалнс, 1965).

Материалы и методы

Работа была выполнена на базе Института фундаментальных и прикладных наук им. Б.Атчабарова при КазНМУ. Для создания модели гингивита и пародонтита на белых половозрелых крысах (самцы) в количестве 15 штук была использована малобелковая диета (из рациона животных был исключен белок) на протяжении 72 дней.

Уход за животными осуществлялся в соответствии с требованиями «Правил проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в РК» (от 25 июля 2007 года N 442). С целью снижения риска бактериальной контаминации соблюдалась барьерная система: доставка всех материалов, перемещение сотрудников и обслуживание животных осуществлялись через барьеры по "чистому" и "грязному" коридору. Температура окружающей среды – 20-25°C, влажность 60%, кормовой рацион – типовой рацион лабораторных животных типа кормовой смеси, утвержден по приказу МЗ СССР №1179 от 10 октября 1983 г.

Индивидуальная масса животных практически не отличалась от средней массы животных одного пола, имеющиеся различия составляли не более 10%. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, на этикетке клетки указывали группу, номер животного, код исследования.

Лабораторным животным ежедневно

проводился визуальный осмотр и осмотр состояния полости рта. В результате экспериментальных исследований была создана модель гингивита и пародонтита и доказана взаимосвязь развития заболеваний пародонта вследствие отсутствия белка в пище или его малого содержания в пищевом рационе.

Всем животным ежедневно производилась фиксация стоматологических плёнок на десну в течение 14 дней. Для изучения стоматологической плёнки на наличие острой токсичности были взяты 6 белых крыс (самцы). Местно-раздражающее и аллергизирующее действие стоматологической плёнки испытывалось на морских свинках.

Результаты и их обсуждение

В ходе экспериментального исследования были изучены и получены данные по определению острой токсичности, местно-раздражающего и аллергизирующего действия. Острая токсичность изучалась на 6 белых крысах - самцах. Путь введения стоматологической плёнки на слизистую оболочку десны - метод адгезии. Общая продолжительность наблюдения за животными составила 14 дней, причем с первого дня от начала эксперимента животные находились под непрерывным наблюдением. Ежедневно фиксировали: общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, координация движений, тонус скелетных мышц, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители; частота и глубина дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние шерстного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, размер зрачка, положение хвоста, потребление корма и воды, изменение массы тела.

В ходе экспериментального исследования на протяжении 14 дней наблюдения было установлено, что общее состояние экспериментальных животных не нарушено. Поведение обычное, интенсивность и характер двигательной активности не изменены. Тремор и судороги не определялись, координация

движений не нарушена. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители адекватная. Глубина дыхательных движений и частота сердечных сокращений без отклонения от нормы. Шерстный и кожный покров без видимых изменений, отсутствуют патологические элементы. Окраска слизистых оболочек полости рта и конъюнктивы глаза бледно-розового цвета, реакция зрачка на свет положительная, количество и консистенция фекальных масс, частота мочеиспускания и окраска мочи в норме, температура тела без изменений, потребление корма и воды в таком же количестве, как и до фиксации стоматологических плёнок, масса тела не изменилась.

На 3,7,10,14 дни проводился забой животных с взятием тканей внутренних органов для гистологического исследования.

Каждый образец ткани был маркирован с указанием группы, номера животного и фиксирован в 10-% нейтральном формалине. Тканевые блоки заливались в парафин, изготавливались при помощи микротомы срезы, которые окрашивались гематоксилин-эозином по Майеру и по Ван-Гизону. Изучение и микрофотографирование исследуемых препаратов проводили под микроскопом фирмы LEICA с видеонасадкой и программой для обработки видеоизображения Biovision version 5. При макроскопическом исследовании видимых патологических изменений внутренних органов и нарушений кровообращения не обнаружено.

Общим принципом оценки патоморфологических изменений при испытаниях любых лекарственных средств, поступающих в организм различными путями, дается описание и оценка гистоархитектоники печени. В это

понятие входит динамическая морфологическая оценка состояния главных компонентов гистоархитектоники: порталы с включенными в нее кровеносными сосудами и желчными протоками, небольшое количество полиморфноядерных клеток (до 10-15 в поле зрения); тяж, трабекулы или печеночные балки (гепатоциты, расположенные в один слой); центральная вена. Гепатоциты, прилегающие к порталным трактам относятся, к так называемой, замыкательной пластинке. В связи с особенностями кровотока в печени токсическое действие веществ может сказываться на различных структурных компонентах, входящих в структуру дольки печени по-разному.

Микроскопическое исследование печени выявило в препаратах различные компенсаторно-восстановительные и другие морфологические процессы, характерные для печени крыс в интактном состоянии.

У животных контрольной группы порталы включают междольковые желчные протоки, мелкие печеночные артерии, мелкие ветви воротной вены и фиброзную строму с незначительным количеством мононуклеарных клеток (рисунок 2). Дольки формируются из однослойных тяжей (балок) гепатоцитов. Слой гепатоцитов, непосредственно прилегающий к порталному тракту, называется замыкающей пластинкой. Клетки печени разделяются синусоидами, выстланными эндотелиальными клетками и клетками Купфера, которые выполняют функцию местных макрофагов. Центральные вены, называемые также терминальными печеночными венулами, собирают кровь, протекающую через печеночные дольки, и несут ее в более крупные печеночные вены (рисунок 1).

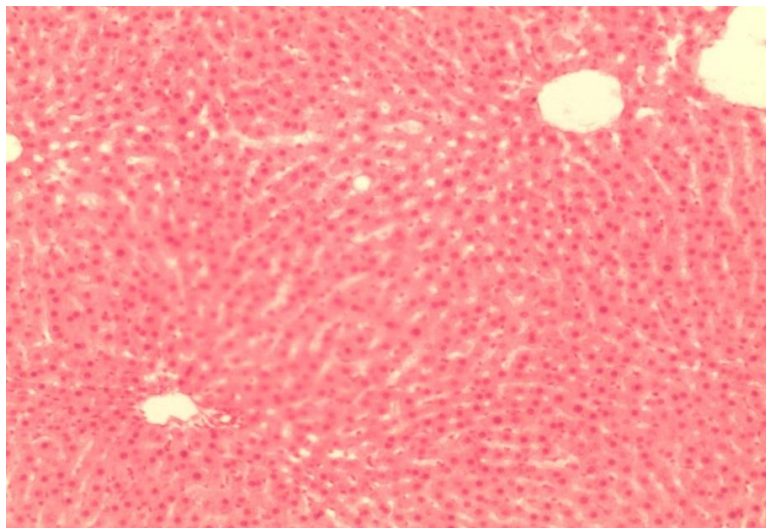


Рис. 1. Контрольная группа животных Печень. Гистоархитектоника печеночной ткани сохранена. Видны 3 центральные вены с расширенными просветами, тяжи гепатоцитов с обычными тинкториальными свойствами, отдельные расширенные синусоиды с единичными эритроцитами. Гематоксилин-эозин. Увеличение x100.

В группе животных, где производилось определение острой токсичности дентальной плёнки на основе гиалуроновой кислоты с метронидазолом и хлоргексидином обнаружены различные морфологические изменения: в стенках сосудов портальных трактов, звездчатых макрофагах, гепатоцитах, в перипортальных и центральных зонах долики печени перманентно выявлялись гистологические картины очаговых регенеративных физиологических изменений, связанных с функцией клеточных и сосудистых элементов. В сосудистой системе печени

изменения в системе притока, циркуляции и оттока крови от классической печеночной долики не выявлены. В просветах сосудов портальных трактов единичные эритроциты и клетки лейкоцитарно-моноцитарного происхождения. В портальных трактах отмечается спорадически умеренная лимфомоноцитарная периваскулярная инфильтрация. Перипортальные гепатоциты замыкательной пластинки без признаков патологии, цитоплазма их окрашена оксифильно, они гипертрофированы (рисунок 2).

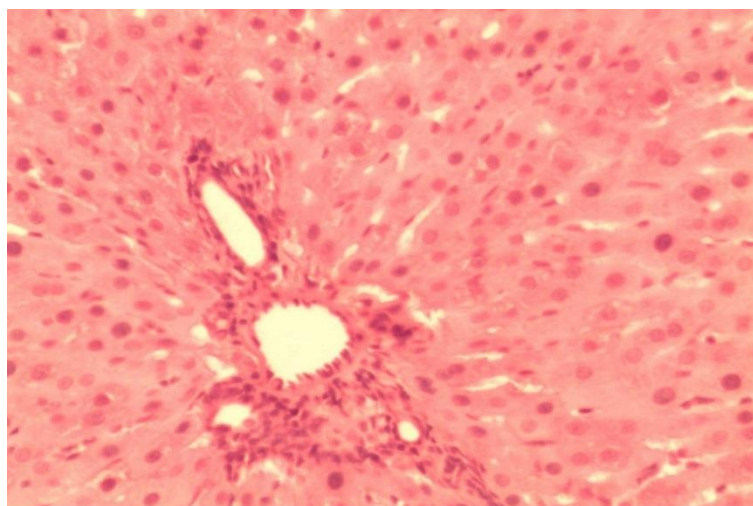


Рис. 2. Опытная группа животных. Печень. Портальный тракт. Умеренная лимфомоноцитарная периваскулярная инфильтрация. Перипортальные гепатоциты замыкательной пластинки без признаков патологии. Гематоксилин-эозин x220.

В некоторых участках печеночной ткани спорадически отмечены умеренное полнокровие и стаз. В междольковых артериях эндотелиальные и гладкомышечные клетки местами гипертрофированы, в их просветах располагаются лейкоциты и лимфоциты.

Эндотелиальные клетки гипертрофированы, гиперхромны, подэндотелиальный слой разрыхлен. Эпителий междольковых желчных протоков выстлан однослойным эпителием с гипертрофированными, гипохромными ядрами. В перикапиллярной соединительнотканной ткани отмечается наличие крупных тучных клеток с базофильной метакроматической зернистостью. В просвете желчных протоков и в окружающей их соединительной ткани - остатки окрашенной желчи. В междольковой соединительной ткани

перипортальных зон в отдельных полях зрения наблюдаются полиморфноцитарные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, макрофагов, а также нейтрофилов, единичных тучных и плазматических клеток. Вокруг инфильтратов располагаются фибробласты, фиброциты, которые имеют уплощенные ядра и базофильную цитоплазму. Между фибробластами видны довольно толстые коллагеновые волокна, состоящие из фибрилл. Просветы центральных вен расширены, эндотелиальные клетки в них гипертрофированы, отмечается небольшое число лейкоцитов и моноцитов. Подэндотелиальный слой содержит много волокнистых структур, лимфоцитов. Вокруг центральных вен располагаются тяжи гепатоцитов с оксифильной цитоплазмой и гиперхромными ядрами (рисунок 3).

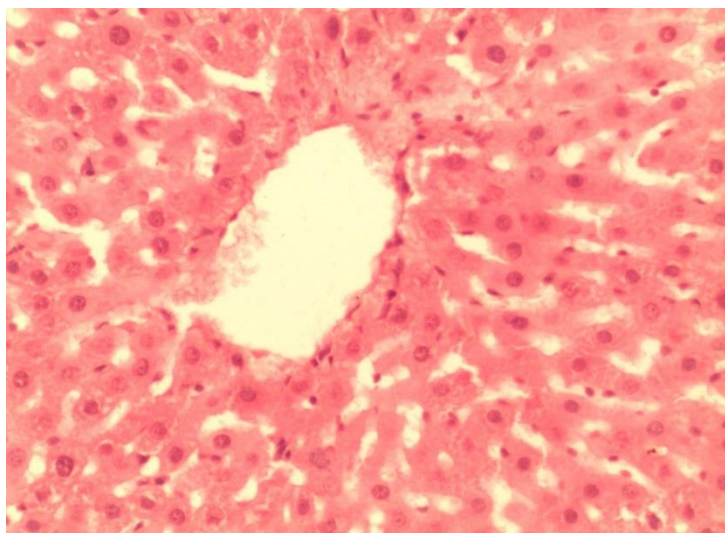


Рис. 3. Опытная группа животных.

Печень. В просвете центральной вены остатки окрашенной плазмы крови.

Гепатоциты обычной структуры, находятся в составе тяжей.

Очаговая пролиферация клеток Купфера.

Гематоксилин-эозин x400.

Синусоидные капилляры и пространства Диссе расширены, в их просветах выявляются гипертрофированные клетки Купфера и отмечается небольшое число лимфоцитов, плазмостаз (рисунок 4).

Внутри печеночных долек встречаются небольшие фокусы клеточных инфильтратов, состоящие из лимфоцитов, макрофагов единичных нейтрофилов и плазматических клеток.

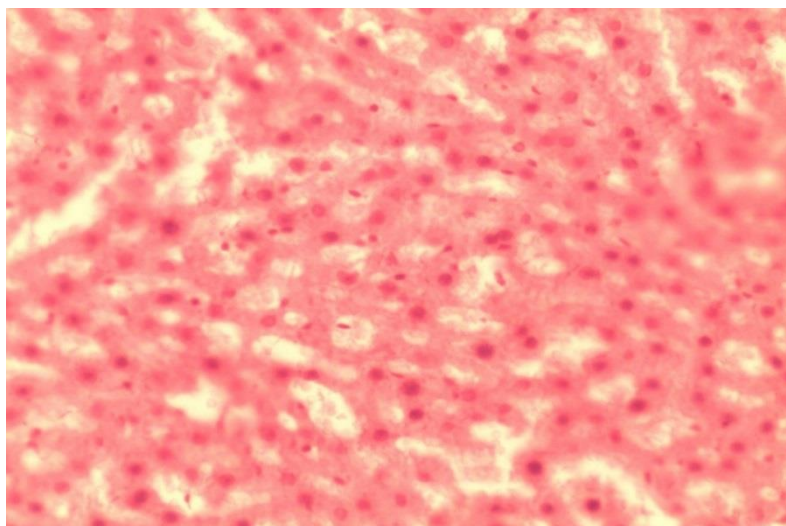


Рис. 4. Опытная группа животных.
Печень. Дискомлексация балочного строения гепатоцитов.
Синусоиды расширены с остатками окрашенной плазмы.
Фокальный апоптоз гепатоцитов без воспалительной реакции стромы.
Гематоксилин-эозин x220.

В тканях печени выявляются очаговые некрозы, рядом с ними наблюдается увеличение числа двуядерных гепатоцитов, особенно на периферии долек. В гепатоцитах имеются картины ложной «вакуольной» дистрофии, которая связана с

использованием спирта в качестве обезвоживающего средства при технологии парафиновой заливки, который вымывает и растворяет гликоген в клетках печени (рисунок 5).

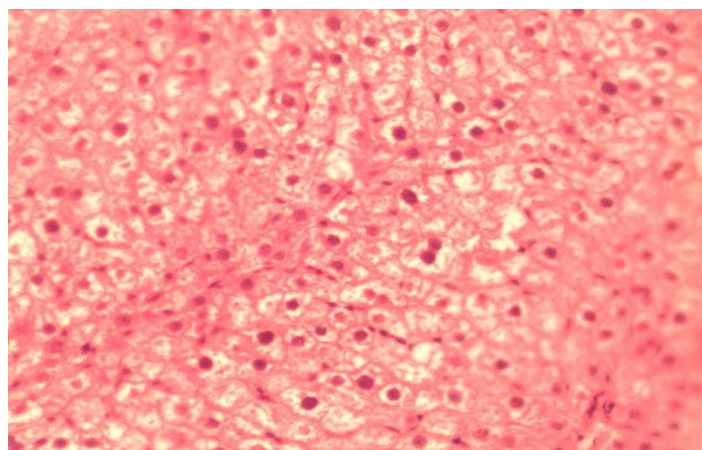


Рис. 5. Опытная группа животных.
Печень. «Вакуольная» дистрофия гепатоцитов перипортальной зоны
с фокальной гипертрофией клеток Купфера.
Гематоксилин-эозин x220.

Почки крысы представляют собой гладкие однососочковые, бобовидные образования, красно-коричневого цвета. Почки располагаются в поясничной области, на уровне двенадцатого грудного - второго поясничного сегментов. Дольчатость почек слабо выражена. Краниальные и каудальные

края органа притуплены. На почке различают выпуклый латеральный и несколько вогнутый медиальный край. Почка покрыта плотной фиброзной соединительнотканной и слабо выраженной жировой оболочками, а также серозной оболочкой, лежащей на вентральной поверхности органа.

Микроскопия препаратов почек в этой опытной группе выявляет нормальные юктагломерулярные клубочки, иногда отмечаются картины нерегулярного расширения мезангия, фокальные утолщения капсулы клубочков, участки гиперклеточности мезангия, пролиферация эндотелия. В то же время субкапсулярные клубочки выглядят неизмененными и

сохраняют привычную структуру (рисунок 6). Эритроцитарные цилиндры иногда обнаруживаются в интерстиции и просветах отдельных канальцев. В мозговом веществе почек тубулоинтерстициальные гистоструктуры без особых изменения, иногда в отдельных полях зрения встречаются очаговые пролифераты интерстициальных клеток (рисунок 7).

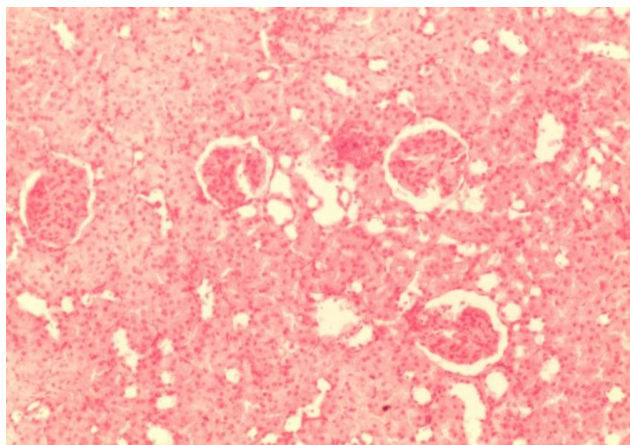


Рис. 6. Опытная группа животных. Почки. Кортикальное вещество. Клубочки обычной структуры в просветах капсулы Боумена-Шумлянского. Проксимальные отделы канальцев дискретны, видны отдельные просветы с эпителием дистальных отделов нефрона. Гематоксилин-эозин. Увеличение x100.

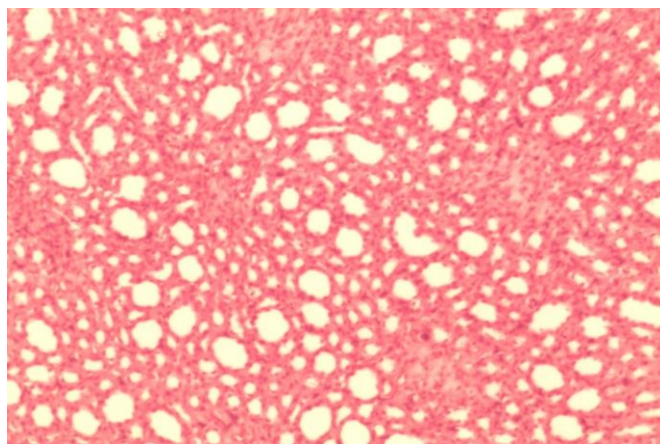


Рис. 7. Опытная группа животных. Почки. Мозговое вещество. Видны многочисленные расширенные и зияющие просветы собирательных трубок. Гематоксилин-эозин. Увеличение x 100.

Аллергизирующее действие разрабатываемой дентальной плёнки были изучены на 6 морских свинках. На выстриженный участок кожи туловища (самцы и самки) наносили по 3 капли раствора испытуемого вещества (раствор с основными компонентами гиалуроновой кислотой с метронидазолом и хлоргексидином). Раствор испытуемого

вещества наносили на протяжении 2 недель, ежедневно один раз в день. На 14 день наносили раствор с двойной концентрацией основных компонентов (гиалуроновая кислота, метронидазол и хлоргексидин). Реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале оценки кожных проб. Кожная реакция – отрицательная.

Заключение

Исследуемые вещества при адгезии плёнки на слизистую оболочку десны не оказывали общетоксического действия на организм животных, т.е. разработанные средства являются безвредными для организма. Этот факт свидетельствует о том, что, несмотря на микроскопические изменения в печени, которые нельзя считать, с высокой долей вероятности, типами повреждения печеночных клеток, желчных протоков, паренхимы и дольки печени, а значит, не могут быть квалифицированы как маркеры гистологического повреждения печени и почек.

Результаты изучения острой токсичности, местно-раздражающего и аллергизирующего действия доказали, что испытуемые дентальные плёнки на основе гиалуроновой кислоты с метронидазолом и

хлоргексидином являются нетоксичными, не обладают аллергизирующим действием. Положительные результаты лечения были подтверждены данными патоморфологических исследований. Также плёнки не оказывали местно-раздражающего действия при ежедневном нанесении на слизистую оболочку десны в течение всего периода лечения. Полученные результаты доклинических исследований позволяют рекомендовать испытуемые дентальные плёнки на основе гиалуроновой кислоты с метронидазолом и хлоргексидином для дальнейших клинических исследований.

Таким образом, разработанная нами дентальная плёнка не обладает аллергизирующим и токсическим действием и может быть рекомендована для клинических исследований.

Литература

1. Гордиенко В.Г. Распространенность кариеса зубов и заболеваний пародонта среди калининградских моряков. *Стоматология*. 1999;2:65-67.
2. Кузьмина Э.М. Профилактика стоматологических заболеваний у беременных женщин и детей раннего возраста. Москва: МГМСУ;1999. 36 с.
3. Grossner CG, Unell L. Longitudinal study of dental health from the age of 14 to 41. *Sweed Dent J*. 2007;31 (2):65-74.
4. Mastrangelo MJ, Berd D, Nathan FE, Lattime EC. Gene therapy for human cancer: An assay for clinicians. *Semin. Oncol*. 1996;23:4-21.
5. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *Periodontol*. 1998;69:269-278.
6. Жулев Е.Н., Кочубейник А.В., Лапшин Р.Д. Экспериментальное моделирование воспалительных заболеваний пародонта. *Fundamental research*. 2015;1:744-747.

Благодарность

Выражаем слова благодарности за оказание помощи в проведении экспериментального исследования заведующей виварием Рахмиевой З.А. и её сотрудникам, а также профессору Рыс-улы М.Р.