

ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-12-36-40

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ ИНДОЛИЦИДИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ У КРЫС

И. В. Кутепов¹, Ю. Д. Ляшев¹, Е. Б. Артюшкова¹, А. В. Солин¹,
В. С. Сериков¹, А. Ю. Ляшев¹, Абдул Рахман Шехине²

На 7 сут после моделирования экспериментального пародонтита отмечено уменьшение относительного числа макрофагов в перитонеальном смыве у крыс с пародонтизом, но увеличение количества адгезированных клеток. Снижение адгезивной способности макрофагов установлено только на 14 сут эксперимента. Фагоцитарная активность нейтрофилов уменьшалась у животных с пародонтизом, что проявлялось снижением фагоцитарного и опсоно-фагоцитарного индексов на 40 и 43 %, соответственно, на 7 сут эксперимента ($p < 0,0$) и фагоцитарного индекса на 31 % на 14 сут ($p < 0,01$). Через 21 сут количество фагоцитирующих нейтрофилов не отличалось достоверно от аналогичного показателя у интактных крыс. При этом не установлено угнетения поглотительной способности фагоцитов у животных с пародонтизом. Аналоги индолицидина в дозе 500 мкг/кг внутривнутрибрюшинно однократно в течение 7 дней оказывали стимулирующее влияние как на относительное количество макрофагов в перитонеальном смыве (индолицидин № 7 — на 24 % и индолицидин № 8 — на 20 %, $p < 0,001$), так и на процентное содержание адгезированных макрофагов: начиная с 14 сут эксперимента их увеличение составило 22 и 17 % при применении индолицидина № 7 и индолицидина № 8, соответственно, у крыс с пародонтизом по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,05$). Изучаемые аналоги индолицидина оказывали стимулирующее влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов на всех сроках наблюдения, что проявлялось увеличением всех исследуемых показателей: фагоцитарного индекса на 43–50 % ($p < 0,001$), фагоцитарного числа на 12–50 % ($p < 0,05$) и опсоно-фагоцитарного индекса на 77–173 % ($p < 0,05$). Стимулирующее действие индолицидина № 7 на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови и адгезивную активность перитонеальных макрофагов было выше по сравнению с действием индолицидина № 8. В частности, на 21 сут только индолицидин № 7 вызывал увеличение фагоцитарного числа и относительного количества адгезированных перитонеальных макрофагов.

Ключевые слова: пародонтит; аналоги индолицидина; нейтрофилы; макрофаги; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время пародонтит рассматривается как важная медицинская и социальная проблема. Так, эта патология отмечается не менее чем у 50 % населения в возрасте от 40 до 50 лет, а в старших возрастных группах — практически у каждого [6]. Распространенность хронического пародонтита среди работоспособного населения достигает 75 % [9]. Развитие пародонтита не только приводит к потере большого количества интактных зубов, но создает очаг хронической инфекции, что способствует возникновению общесоматиче-

ской патологии [9]. На основании вышесказанного поиск новых методов лечения и профилактики пародонтита является актуальной проблемой.

Несмотря на то, что возникновение пародонтита является результатом совокупного действия целого ряда неблагоприятных факторов, не вызывает сомнения ведущая роль бактериальной инфекции в развитии этой патологии [8]. Между тем, применение антибиотиков при пародонтизме сопряжено с целым рядом проблем: низкая чувствительность микробов, так как большинство возбудителей относится к грамотрицательной флоре, формирование устойчивости микроорганизмов к лекарственному воздействию, развитие аллергических реакций [6].

В последние годы установлено, что фагоцитирующие клетки организма человека продуцируют вещества, обладающие бактерицидной активностью, которые

¹ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Россия, 305041, Курск, ул. Карла Маркса, д. 3.

² ЭйБиСи Медикал Имэйджинг, ЭйБиСи Лэбораториз, Ливан, Бейрут, Корнише Ал-Мазраа.

получили название антимикробные пептиды, одной из групп которых являются индолицидины [1]. Установлено, что индолицидины проявляют бактерицидную активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов [2, 13]. Важнейшей особенностью бактерицидного действия этих веществ является низкая вероятность развития устойчивости [2, 13]. В этой связи представляет интерес перспектива использования антимикробных пептидов для коррекции пародонтита.

Цель исследования — изучение фармакологических эффектов синтетических аналогов индолицидина на функциональную активность макрофагов и нейтрофилов при пародонтите в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 80 крысах-самцах Вистар массой 180 – 220 г (питомник РАМН, “Столбовая”, Москва). Исследования проводили с соблюдением положений, изложенных в Хельсинской 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.).

Животные были разделены на следующие группы: интактная ($n = 8$), контрольная (моделирование пародонтита + введение физраствора, $n = 24$), 2 опытные группы (моделирование пародонтита + введение исследуемых аналогов индолицидина, по 24 особи каждая). Пародонтит моделировали по методу [3]. Животных наркотизировали хлоралгидратом (0,015 мг/кг внутривенно). Местную анестезию в области нижних резцов проводили 2 % раствором новокаина. Накладывали нить из шовного материала в виде восьмерки на резцы нижней челюсти с последующим погружением лигатуры в зубодесневой желобок и ее фиксацией дополнительными узлами [3]. Нить оставляли на 14 дней, а затем удаляли. Животных выводили из эксперимента на 7, 14 и 21 сут после снятия лигатуры, поскольку именно в эти сроки по данным литературы наблюдается последовательное развитие воспалительных процессов в десне.

Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали по общепринятой методике [5] в нашей модификации, для чего в пробирку с 0,5 мл гепаринизированной крови добавляли бактериальную взвесь *Staphylococcus aureus* (10^9 микробных тел/мл) из расчета 10 микробов на 1 нейтрофил. Кровь, смешанную с бактериями, инкубировали 30 мин в термостате при температуре 37 °С. Приготовленные мазки фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому — Гимза. При микроскопии препаратов определяли следующие показатели, характеризующие фагоцитарную активность нейтрофилов: фагоцитарный индекс — число активно фагоцитирую-

щих нейтрофилов из 100 клеток; фагоцитарное число — среднее число микробных тел, захваченных 1 фагоцитирующим нейтрофилом, опсоно-фагоцитарный индекс — среднее количество поглощенных микробных тел в расчете на 100 нейтрофилов.

Принято считать, что адгезивная способность макрофагов является интегративным показателем их функциональной активности [12]. Адгезивные свойства макрофагов исследовали нединамическим методом, который основан на способности клеток прикрепляться к чистой стеклянной поверхности [10]. Крысам внутривенно вводили 10 мл стерильной среды 199. Через 3 – 5 мин вскрывали брюшную полость и осуществляли забор париетального смыва. Затем объем полученной суспензии доводили до 10 мл и вносили в чашку Петри. В течение 1 ч инкубировали полученную взвесь в термостате при 37 °С [10]. После инкубации трехкратным промыванием удаляли неадгезированные макрофаги. Готовили мазки исходной взвеси макрофагов и взвеси неадгезированных клеток. Полученные мазки, а также адгезированные клетки в чашке Петри окрашивали по методу Романовского — Гимза. В препаратах определяли процентное содержание макрофагов от общего числа клеток в мазке и относительное количество прилипающих к стеклу макрофагов в популяции.

В работе использованы синтетические аналоги природного индолицидина № 7 (H-Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Lys-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂) и № 8 (H-Ile-

Таблица 1. Влияние аналогов индолицидина № 7 и 8 в дозе 500 мкг/кг на адгезивную способность перитонеальных макрофагов крыс с пародонтитом ($M \pm m$)

Группа	Время после снятия лигатуры, сут	Относительное количество, %	
		перитонеальных макрофагов в смыве	адгезированных перитонеальных макрофагов
Интактная		95,4 ± 0,8	65,5 ± 2,1
Контрольная	7	79,9 ± 2,2***	71,8 ± 1,3*
	14	52,4 ± 2,0***	54,9 ± 2,8**
	21	69,5 ± 2,4***	70,9 ± 2,0
Индолицидин № 7	7	76,0 ± 2,3	70,8 ± 1,6
	14	65,0 ± 2,1 ^{xxx}	66,8 ± 2,4 ^x
	21	78,0 ± 2,0 ^x	79,3 ± 1,8 ^x
Индолицидин № 8	7	77,5 ± 2,5	70,3 ± 2,1
	14	62,9 ± 2,1 ^{xxx}	64,3 ± 2,1 ^x
	21	75,3 ± 2,0	76,1 ± 2,0

Примечание: за 100 % принимали общее количество клеток в смыве при расчете относительного количества перитонеальных макрофагов в смыве, и общее количество перитонеальных макрофагов (адгезированных и неадгезированных) при расчете относительного количества перитонеальных макрофагов.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с интактной группой.

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

Lys-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂) (ООО “НПФ “Верта”, Санкт-Петербург, Россия). Как и природный пептид, синтетические аналоги обладают высокой антибактериальной активностью, при этом не проявляют присущее природному индолицидину гемолитическое действие [2, 13]. Пептиды предварительно растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально в дозе 500 мкг/кг в объеме 0,2 мл 1 раз в день в течение 7 дней, начиная со дня снятия нити. В применяемых дозах эти вещества обладают высокой антимикробной активностью [11]. Крысам контрольной группы аналогичным образом вводили физиологический раствор.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров с помощью программного обеспечения MS Excel и Statistica 10. Статистически значимыми принимали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 7 сут у крыс с пародонтитом отмечается снижение относительного количества макрофагов в перитонеальном смыве на 16,2 % ($p < 0,001$), но повышение их адгезивной способности — процентное содержание адгезированных макрофагов — увеличилось на 9,6 % ($p < 0,05$) (табл. 1).

Значительное уменьшение как относительного числа макрофагов, так и процентного содержания адгезированных клеток отмечено в контрольной группе на 14 сут после снятия лигатуры. На 21 сут исследуемые показатели увеличиваются: на 32,6 и 29,1 %, соответственно, по сравнению с предыдущим сроком. При этом относительное число макрофагов в перитонеальном смыве остается достоверно более низким ($p < 0,001$), а процентное содержание адгезированных

клеток существенно не отличается от аналогичного значения у интактных животных.

Применение аналогов индолицидина животным с пародонтитом не оказывало существенного влияния на относительное количество макрофагов в перитонеальном смыве и процентное содержание адгезированных макрофагов на 7 сут после снятия лигатуры по сравнению с контрольной группой. На 14 сут оба аналога оказывали стимулирующее влияние как на относительное количество макрофагов в перитонеальном смыве (индолицидин № 7 — на 24 % и индолицидин № 8 — на 20 %, $p < 0,001$), так и на их адгезивную способность — увеличение процентного содержания адгезированных клеток составило 21,7 и 17,1 % при применении индолицидина № 7 и индолицидина № 8, соответственно, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). На 21 сут эксперимента только индолицидин № 7 оказывал стимулирующее действие на количество и функциональную активность макрофагов, относительное число клеток превышало аналогичный показатель в контрольной группе на 12,2 % ($p < 0,05$), а процентное содержание адгезированных клеток — на 11,8 % ($p < 0,05$).

У животных, которым моделировали пародонтит, отмечается уменьшение фагоцитарной активности нейтрофилов, что проявляется снижением фагоцитарного индекса на 40,1 % ($p < 0,001$) и опсоно-фагоцитарного индекса на 42,9 % ($p < 0,05$) на 7 сут после снятия лигатуры, по сравнению с интактными крысами (табл. 2). При этом не установлено угнетения поглощательной способности фагоцитов у животных с пародонтитом. На 14 сут отмечается значительное увеличение фагоцитарного числа (на 42 %), по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Статистически достоверное повышение этого показателя у животных контрольной группы наблюдалось и на 21 сут эксперимента (на 46 %, $p < 0,05$).

Таблица 2. Влияние аналогов индолицидина № 7 и 8 в дозе 500 мкг/кг на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови крыс с пародонтитом ($M \pm m$)

Группа	Время после снятия лигатуры, сут	Фагоцитарный индекс, n	Фагоцитарное число, n	Опсоно-фагоцитарный индекс, n
Интактная		45,1 ± 2,3	1,63 ± 0,2	75,5 ± 10,9
Контрольная	7	27,0 ± 1,4***	1,50 ± 0,19	43,1 ± 6,2*
	14	31,5 ± 1,4**	2,13 ± 0,30	69,6 ± 11,8
	21	46,0 ± 1,7	2,38 ± 0,18*	110,9 ± 12,0
Индолицидин № 7	7	39,9 ± 1,6 ^{xxx}	3,00 ± 0,33 ^{xx}	117,9 ± 16,4 ^{xx}
	14	47,3 ± 1,4 ^{xxx}	3,13 ± 0,30 ^{xx}	150,0 ± 17,6 ^{xx}
	21	69,0 ± 1,3 ^{xxx}	3,38 ± 0,26 ^x	217,3 ± 23,1 ^{xx}
Индолицидин № 8	7	38,6 ± 1,7 ^{xxx}	2,63 ± 0,26 ^{xx}	104,4 ± 15,2 ^{xx}
	14	47,1 ± 1,5 ^{xxx}	2,75 ± 0,31 ^x	132,5 ± 18,9 ^{xx}
	21	67,6 ± 1,4 ^{xxx}	2,88 ± 0,30	196,8 ± 23,3 ^x

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

Применение изучаемых аналогов индолицидина сопровождалось стимулирующим влиянием на фагоцитарную активность нейтрофилов на всех сроках наблюдения, что проявлялось статистически достоверным увеличением всех исследуемых показателей: фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа и опсонофагоцитарного индекса. Стимулирующий эффект индолицидина № 7 в отношении фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови и адгезивной способности перитонеальных макрофагов был выше, по сравнению с эффектом индолицидина № 8. В частности, на 21 сут только индолицидин № 7 вызывал статистически достоверное увеличение фагоцитарного числа и относительного количества адгезированных перитонеальных макрофагов.

Полученные результаты подтверждают данные о снижении фагоцитарной активности нейтрофилов в ранний период развития пародонтита [4]. Установлено, что фагоцитарная активность нейтрофилов уменьшалась на 7 и 14 сут эксперимента, что проявлялось уменьшением фагоцитарного и опсонофагоцитарного индексов. Моделирование пародонтита приводило к уменьшению относительного числа макрофагов в перитонеальном смыве, при этом снижение их адгезивной способности установлено только на 14 сут эксперимента, а на 7 сут наблюдается даже увеличение числа адгезированных клеток. Ранее показано, что изменение адгезивных свойств макрофагов при различных патологических процессах имеет фазовый характер [11]. Учитывая тот факт, что макрофаги являются центральным звеном межклеточного взаимодействия при воспалительных заболеваниях, можно утверждать, что подобное изменение их функциональной активности является результатом воздействия широкого спектра активных факторов.

Применение аналогов индолицидина приводило к выраженному увеличению числа фагоцитирующих нейтрофилов и их поглотительной способности уже на 7 сут после снятия лигатуры. Установленный в работе стимулирующий эффект исследуемых индолицидинов на фагоцитарную активность нейтрофилов, по-видимому, объясняется особенностями бактерицидного действия антимикробных пептидов, а именно, быстрым повреждением клеточных мембран микроорганизмов с последующим повышением их проницаемости [2]. Такие клетки активно поглощаются фагоцитами. Помимо быстрого и выраженного бактерицидного эффекта природный индолицидин и его аналоги, оказывают иммуномодулирующее действие [1], что, учитывая тесную кооперацию иммунокомпетентных клеток, макрофагов и нейтрофилов в развитии защитных реакций, также способствует увеличению функциональной активности нейтрофилов и макрофагов.

Известно, что природный индолицидин обладает низкой устойчивостью к действию пептидаз [1, 13]. Изученные синтетические аналоги имеют больший

период полураспада, по сравнению с природным пептидом индолицидином, что приводит к увеличению времени их действия, что, вероятно, и обуславливает их выраженный эффект.

Сравнение эффектов исследованных индолицидинов на функциональную активность макрофагов и нейтрофилов позволяет сделать вывод о том, что стимулирующий эффект индолицидина № 7 более выражен, что объясняется особенностями его структуры и более высоким положительным зарядом: индолицидин № 7 имеет заряд +7, а индолицидин № 8 — +6 [7]. Ранее установлено, что увеличение общего положительного заряда молекулы способствует усилению антимикробных свойств [14].

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментального пародонтита у крыс сопровождается снижением фагоцитарной активности нейтрофилов в течение 14 сут; изменение функциональной активности макрофагов носит двуфазный характер: увеличение на 7 сут и снижение — на 14 сут.

2. Синтетические аналоги индолицидина № 7 (H-Ile-Leu-Pro-Trp-Lys-Lys-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂) и № 8 (H-Ile-Lys-Pro-Trp-Lys-Trp-Pro-Trp-Lys-Pro-Trp-Arg-Arg-NH₂) в дозе 500 мкг/кг внутрибрюшинно однократно ежедневно в течение 7 дней оказывают стимулирующее влияние на функциональную активность нейтрофилов в среднем на 85 % и макрофагов на 47 % ($p < 0,05$) при экспериментальном пародонтите у крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ю. Артамонов, С. Н. Шанин, Д. С. Орлов и др., *Мед. иммунология*, **11**(1), 101 – 104 (2009).
2. А. Ю. Артамонов, Д. С. Орлов, О. В. Шамова и др., *Инфекция и иммунитет*, № 5, 65 – 68 (2014).
3. А. И. Воложин, С. И. Виноградова, *Патол. физиол. и эксперим. тер.*, № 6, 49 – 51 (1990).
4. Л. В. Вохминцева, С. С. Рымарь, Н. Н. Маянская, П. А. Железный, *Стоматология*, № 2, 4 – 7 (2009).
5. В. Н. Галанкин, Э. Х. Юнусходжаев, А. М. Токмаков и др., *Архив патол.*, **49**(6), 77 – 79 (1987).
6. В. К. Леонтьев, Л. А. Фаустов, П. А. Галенко-Ярошевский, В. Л. Попков, *Хронический генерализованный пародонтит. Клиническая и экспериментальная фармакотерапия метаболическими корректорами*, Просвещение-Юг, Краснодар (2012).
7. М. П. Смирнова, В. Г. Афонин, В. М. Шпень и др., *Биоорг. химия*, **30**(5), 458 – 465 (2004).
8. Л. М. Цепов, Н. А. Голева, *Пародонтология*, **14**(1), 7 – 12 (2009).
9. Л. М. Цепов, Е. Л. Цепова, А. Л. Цепов, *Пародонтология*, **19**(3), 3 – 6 (2014).
10. Г. Фримель (ред.), *Иммунологические методы*, Медицина, Москва (1987).
11. Н. И. Шевченко, Ю. Д. Ляшев, В. Н. Мишустин, *Мед. акад. ж.*, **12**(3), 96 – 98 (2012).
12. P. Andre, B. Caro, A. M. Benoliel и др., *Cell Biophys.*, **16**(1 – 2), 13 – 34 (1990).

13. E. Guani-Guerra, T. Santos-Mendoza, S. O. Lugo-Reyes, L. M. Teran, *Clin. Immunol.*, **135**(1), 1 – 11 (2010); doi: 10.1016 / j.clim.2009.12.004.
14. A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, *Biopolymers (Peptide Sci.)*, **55**(1), 4 – 30 (2000); doi: 10.1002 / 1097-0282(2000)55:1%3C4::AID-BIP30%3E3.0.CO;2-M.

Поступила 21.09.19

THE EFFECT OF INDOLICIDIN ANALOGS ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MACROPHAGES AND NEUTROPHILS UNDER EXPERIMENTAL PERIODONTITIS CONDITIONS IN RATS

I. V. Kutepov¹, Y. D. Lyashev¹, E. B. Artyushkova¹, A. V. Solin¹, V. S. Serikov¹, A. Y. Lyashev¹, and Abdul Rahman Chahine²

¹ Department of pathophysiology, Kursk State Medical University, ul. K. Marksa 3, Kursk, 305041 Russia

² ABC Medical Imaging, ABC Laboratories, Kornishe-Al-Mazraa, Beirut, Lebanon

On the 7th day after the modelling of periodontitis, there was a decrease in the relative number of macrophages in peritoneal washout, but with an increase in the number of adhered cells. A decrease in the macrophage adhesive capability was established on the 14th day of experiment only. The phagocytic activity of neutrophils was reduced in the animals with periodontitis as manifested by decrease in the phagocytic and opsono-phagocytic indices by 40.1 and 42.9%, respectively, on the 7th day of experiment ($p < 0.05 - 0.001$) and phagocytic index by 31.5% on the 14th day. The amount of phagocytosing neutrophils did not differ significantly from the same value in naive animals on the 21st day. The inhibition of phagocyte absorption capability was not established in the animals with periodontitis. The administration of indolicidin analogs to the animals with periodontitis at the dose 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneally once within 7 days had a stimulatory influence on both the relative amount of macrophages in the peritoneal washout (for indolicidin No. 7, by 24.0% and for indolicidin No.8, by 20.0%, $p < 0.001$) and the percentage content of adhered macrophages: beginning with the 14th day of experiment, the increase of percentage content of adhered cells was 21.7 and 17.1% upon the administration of indolicidin No. 7 and indolicidin No. 8, respectively, as compared to the control group ($p < 0.05$). The investigated indolicidin analogs produced a stimulatory effect on the phagocytic activity of neutrophils during all the time of observation, as manifested by significant increase in all the investigated indices: phagocytic index by 43.0 – 50.0% ($p < 0.001$), phagocytic number by 12.6 – 50.0% ($p < 0.05 - 0.01$) and opsono-phagocytic index by 77.5 – 173.5% ($p < 0.05 - 0.01$). The stimulatory effect of indolicidin No. 7 on the phagocytic activity of neutrophils of peripheral blood and the adhesive capability of peritoneal macrophages was higher than that of indolicidin No. 8. In particular, only indolicidin No. 7 caused an increase in phagocytic number and relative amount of adhered peritoneal macrophages on the 21st day, and the growth of opsono-phagocytic index was also more significant after indolicidin No. 7 administration.

Keywords: periodontitis; indolicidin analogs; neutrophils; macrophages; rats.