

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

УДК 577.15.016+616.31:599.323

С. А. Шнайдер, д. мед. н.Государственное учреждение «Институт стоматологии
Национальной академии медицинских наук Украины»**ЗАЩИТНЫЕ АДАПТАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ КВЕРЦЕТИНА
В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ПАТОГЕННЫХ ФАКТОРОВ**

В опытах на 21 белой крысе-самце 1,5-мес. возраста изучено влияние кверцетина в условиях действия делягила, хронического эмоционально-болевого стресса и бесполифенольного рациона. Кверцетин проявил адаптационные, пародонтопротекторные, заместительные свойства, восстанавливая последствия действия комбинации патогенных факторов – делягила и хронического эмоционально-болевого стресса на фоне рациона, лишённого растительных полифенолов.

Ключевые слова: полифенолы, делягил, хронический эмоционально-болевого стресс, бесполифенольный рацион, кверцетин, защитные эффекты.

С. А. ШнайдерДержавна установа «Інститут стоматології
Національної академії медичних наук України»**ЗАХИСНІ АДАПТАЦІЙНІ ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНУ
В УМОВАХ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ПАТОГЕННИХ ФАКТОРІВ**

В дослідях на 21 білому щурі-самці 1,5-міс. віку вивчено вплив кверцетину в умовах дії делягилу, хронічного емоційно-больового стресу та бесполіфенольного раціону. Кверцетин виявив адаптаційні, пародонтопротекторні, замісні властивості, які відтворюють наслідки дії комбінації патогенних факторів – делягилу та хронічного емоційно-больового стресу на тлі раціону, позбавленого рослинних поліфенолів.

Ключові слова: поліфеноли, делягил, хронічний емоційно-больовий стрес, бесполіфенольний раціон, кверцетин, захисні ефекти.

S. A. ShnaiderState Establishment “The Institute of Stomatology
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”**THE PROTECTIVE ADAPTIVE EFFECTS OF QUERCETHIN UNDER
THE CONDITIONS OF THE COMBINED INFLUENCE OF PATHOGENIC FACTORS**

The aim of the investigation. The study of the protective effects of quercethin under the combined influence of toxic agent chloroquine and chronic emotional and pain stress at alimentary deficiency of polyphenols.

The materials and the methods. At the experiments with 21 white he-rats of 1.5 months old the influence of quercethin under affection of chloroquine, chronic emotional and pain stress and polyphenol-free diet was studied.

The findings. The obtained data speak of the considerable pathogenic influence of the investigated factors – prooxidant toxic agent chloroquine and chronic emotional and pain stress and polyphenol-free diet – upon oral mucous membrane and osseous tissue of rat's periodontium. Quercethin is the most widely spread nutrition polyphenol, had stress-protective effect, expressed by the normalizing of cellular content of periphery blood; decrease in frequency of affection and growth of the thickness of stomachic mucous membrane of rats. Periodontoprotective antioxidant characteristics of quercethin have displayed by the considerable reduction of the content of peroxide products and activation of the enzymes of glutathione metabolism in oral mucous membrane; in periodontal osseous tissue – by the considerable decrease of osteoresorptive processes and strengthening of antioxidant protection.

In whole, quercethin has shown the expressed adaptive effect, pointing at the considerable value of polyphenol compounds in the provision of periodontal tissues with resistance to the pathogenic effect of harmful factors.

Key words: polyphenols, chloroquine, chronic emotional and pain stress, polyphenol-free diet, quercethin, protective effects.

Возникновение стоматологической патологии зависит от уровня общей и местной резистентности организма к локальным (микрофлора) и системным (стресс, токсиканты и др.) факторам. К таким заболеваниям в полной мере можно отнести воспалительные заболевания пародонта.

Эпителий слизистой оболочки полости рта (СОПР) относится к тканям высокой пролиферативной активности, нарушения постоянного обновления которых составляют начальное звено его патологии. В этой связи в качестве комплекса патогенных воздействий избраны политропный токсикант-прооксидант делагил и эмоционально-болевого стресс (ЭБС), индуцирующий активацию процессов неферментативного перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Поиск новых адаптогенов и пародонтопротекторов привел к изучению полифенолов (ПФ) – флавоноидов, фенольных кислот и их производных в обеспечении оптимального уровня резистентности тканей ротовой полости к патогенным агентам.

Главными функциональными группами, определяющими химическую активность, биохимическое и фармакологическое действие, являются фенольные гидроксилы. Чем большее количество гидроксильных групп у ПФ, тем мощнее он как антиоксидант [1]. Кверцетин – один из самых сильных флавоноидов, содержит 5 ОН-групп, имеет широкий спектр биологической активности. Особенное внимание привлекают его антиоксидантные и антирадикальные свойства, на основе которых разрабатываются высокоэффективные лекарственные средства. Кверцетин локализуется возле поверхностного липидного бислоя мембран, в связи с чем он оказывает более сильный антиоксидантный эффект [2]. Кверцетин, найденный во фруктах и овощах, конъюгирует *in vivo*, его производные циркулируют в крови, создавая тем самым общий пул антиоксидантов в организме [3].

Цель исследования. Изучение защитных эффектов кверцетина при комбинированном влиянии токсиканта делагила и хронического эмоционально-болевого стресса в условиях алиментарной недостаточности полифенолов.

Материалы и методы. В опыт была взята 21 крыса-самец 1,5-мес. возраста. Длительность эксперимента составила 60 дней. 7 крыс интактной группы содержались на стандартном рационе вивария. Крысы 2-й группы (7 особей) – контрольной, получали рацион, лишенный растительных ПФ или бесполифенольный рацион (БПР) [4]. Рацион включал: пшеничную муку в.с. – 15 %, обезжиренное сухое молоко – 25 %, картофельный крахмал – 35 %, маргарин как источ-

ник жиров – 1,2 %, целлюлоза (фильтровальная бумага) – 5 %, смесь солей – 5 %, дрожжи сухие как источник витаминов группы В – 1,5 %, витамины А – 20 000 ЕД/1кг и D₂ – 2000 ЕД на 1 кг корма. Спустя 30 дней от перевода на диету крысы этой группы подвергались комбинированному воздействию делагила («Алкалоида», Венгрия) *per os* в дозе 5 мг/кг массы тела крыс и стрессу тревожного ожидания, определяемый как эмоционально-болевого стресс (ЭБС) в клетке конструкции Дезидерато [5]. Случайная подача постоянного тока силой 5-6 мА на пол, либо на расположенную на нем платформу, воспроизводила состояние тревожного ожидания болевого воздействия. Такая ситуация воспроизводилась на протяжении 4 часов 3 раза в неделю в течение всего второго месяца содержания крыс на БПР. Таким образом, контрольная группа (К) подвергалась комбинированному патогенному воздействию.

Защитные эффекты кверцетина (гранулы производства Борщаговского ХФЗ, Украина) изучали в этих экспериментальных условиях. Для этого 7 крысам 3-й группы, спустя 30 дней от начала перевода крыс на БПР, ежедневно *per os* вводили кверцетин с помощью зонда на протяжении 30 дней в дозе 50 мг/кг массы тела крыс.

По завершению эксперимента животных забивали под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг) путем кровопускания из сердца. Предварительно отделив слизистую оболочку полости рта (СОПР), выделяли верхние и нижние челюсти, выделяли печень, селезенку и надпочечники. Влияние патогенных воздействий оценивали морфометрически. Определяли относительную массу селезенки и надпочечников [масса органа (мг)/масса крысы (г)] x 100.

Для оценки ulcerогенного эффекта определяли: 1) толщину слизистой оболочки желудка (СОЖ) по большой кривизне (мм), 2) частоту поражений (в %), 3) множественность поражений (число эрозий и язв).

Прижизненное морфологическое исследование крови крыс из хвостовой вены включало определение числа палочкоядерных (п) и сегментоядерных (с) нейтрофилов (Н) (%), эозинофилов (Э) (Гл), моноцитов (М) (%), лимфоцитов (Лф) (%) и лейкоцитов (Ле) (Гл).

Выделенные челюсти крыс подвергались морфометрическому исследованию [6].

Объектами биохимических исследований служили печень, кость альвеолярного отростка, СОПР. Уровень ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) тиобарбитуровым методом [7]. Состояние физиологической антиоксидантной системы (ФАС) оценивали по

активности глутатион-редуктазы (ГР) [8], глутатион-пероксидазы (ГПО) [9] и супероксиддисмутазы (СОД) [10]. Активность кислой фосфатазы определяли методом Bessey et al. в модификации А.П. Левицкого с соавт. [11].

Результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами с определением *t*-критериев достоверности различий по Стьюденту.

Результаты исследования. Рассмотрим, как повлияло комбинированное патогенное воздействие – пероральное введение токсиканта-прооксиданта делагила, а также хронический ЭБС на фоне алиментарной полифенольной недостаточности на организм крыс и локально – на ткани ротовой полости.

Относительная масса надпочечников в результате комбинированного патогенного воздействия достоверно увеличивалась: $25,0 \pm 1,0$ мг/100 г ($p < 0,001$) по сравнению с интактной группой: $17,0 \pm 1,6$ мг/100 г. Относительная масса селезенки в контрольной группе также несколько увеличивалась: $436 \pm 27,0$ мг/100г ($p = 0,08$) против $353 \pm 37,0$ мг/100 г в интактной группе.

В слизистой оболочке желудка (СОЖ) экспериментальных животных наблюдали 100 % частоту поражений. При изучении множественности поражений СОЖ число эрозий и язв у крыс контрольной группы достоверно увеличивалось: $1,3 \pm 0,4$ ($p = 0,011$) и $3,0 \pm 1,5$ ($p = 0,06$), соответственно, при полном отсутствии поражений на СОЖ интактных крыс. При этом толщина СОЖ (мм) в контрольной группе несколько истончалась: $0,6 \pm 0,05$ мм ($p = 0,05$) по сравнению с интактной группой: $0,8 \pm 0,08$ мм.

В табл. 1 представлены результаты прижизненного исследования периферической крови крыс из хвостовой вены. Так, при комбинированном влиянии патогенных факторов количество палочкоядерных нейтрофилов увеличивалось в 2,1 раза (тенденция; $p = 0,09$) по сравнению с интактной группой. В контрольной группе выявлена значительная лейкоцитопения – количество лейкоцитов снижалось в 2,9 раза ($p < 0,001$; табл. 1).

При введении делагила и влиянии хронического ЭБС в условиях БПР содержание МДА значительно увеличивалось: в печени – в 2 раза ($p = 0,012$); в кости альвеолярного отростка – в 1,7 раза ($p = 0,030$); в СОПР – в 4,9 раза ($p < 0,001$), что свидетельствует об интенсификации перекисных процессов на уровне организма и в тканях пародонта (табл. 2). Уровень активности антиоксидантных ферментов в СОПР достоверно снижался по сравнению с интактной группой: глутатион-редуктазы – вдвое ($p = 0,002$); СОД – в 1,5 раза ($p < 0,001$). Такое значительное снижение активности глутатион-зависимого фермента

вполне объяснимо в связи со снижением под действием делагила в цитозоле клеток восстановленного глутатиона (G-SH).

Комбинация патогенных воздействий при содержании крыс на БПР вызвала существенное увеличение активности провоспалительного фермента – кислой фосфатазы в слизистой оболочке полости рта крыс: $2,66 \pm 0,26$ мккат/г ($p = 0,011$) относительно интактной группы: $1,74 \pm 0,12$ мккат/г, что говорит об усилении воспалительных явлений в данном объекте исследования.

Комбинированное патогенное воздействие вызвало усиление резорбции кости альвеолярного отростка верхней челюсти крыс на 21,4 % (от 100 % в интактной группе): $25,0 \pm 1,9$ % ($p = 0,07$) против $20,6 \pm 1,3$ %. На нижней челюсти существенного увеличения резорбции выявлено не было: $33,9 \pm 1,3$ % по сравнению с интактной группой: $31,7 \pm 0,95$ %.

Таким образом, в результате проведения хронического ЭБС на фоне рациона, лишенного ПФ, у экспериментальных животных наблюдали изменения состава крови; в СОЖ проявился ulcerогенный эффект. Делагил частично инактивировал глутатионзависимые ферменты. Комбинированное воздействие делагила и хронического ЭБС активировало процессы ПОЛ на уровне организма, а также локально усиливало воспалительные и перекисные процессы в мягких тканях пародонта; в кости альвеолярного отростка – усиливало остеорезорбцию.

На фоне патогенных воздействий и алиментарной полифенольной недостаточности кверцетин препятствовал увеличению относительной массы селезенки: $346 \pm 8,0$ мг/100 г ($p = 0,008$), наблюдавшуюся в контрольной группе: $436 \pm 27,0$ мг/100 г. Относительная масса надпочечников соответствовала данным интактной группы: $27,0 \pm 1,00$ мг/100 г против $25,0 \pm 1,00$ мг/100 массы.

Кверцетин снижал на 28,6 % частоту поражений в слизистой оболочке желудка крыс: 71,4 % против 100 % в контрольной группе. И хоть применение кверцетина не повлияло на изменение количества эрозий и язв в СОЖ крыс, толщина СОЖ (мм) в данной группе достоверно увеличивалась: $0,9 \pm 0,10$ мм ($p = 0,02$) против $0,6 \pm 0,05$ мм в контрольной группе и нормализовалась относительно интактной группы: $0,8 \pm 0,08$ мм.

Кверцетин предупреждал относительную лейкопению, наблюдавшуюся в условиях комбинации патогенных факторов (табл. 1). Остальные показатели морфологического исследования периферической крови крыс находились на уровне интактных групп.

Таблица 1

**Влияние кверцетина на показатели морфологического исследования крови крыс
в условиях комбинированного действия патогенных факторов (M±m; p; p₁)**

Группы крыс	Форменные элементы крови					
	Нейтрофилы (%)		Э (Гл)	М (%)	Лф (%)	Ле (Гл)
	n	c				
Интактная	0,8±0,2	21±2,3	3,2±0,7	6,0±1,5	69±2,8	28,8±1,5
Контрольная (К)	1,7±0,3 p=0,04	23,6±7,0	3,8±0,9	3,0±0,5 p=0,09	68,2±7,4	9,8±0,8 p<0,001
К+Кверцетин	1,8±0,6	27±2,7	2,0±0,7	3,8±0,4	65,8±2,8	21,8±2,1 p ₁ <0,001

Примечание. В табл. 1 и 2 показатель достоверности p рассчитан по сравнению с интактной группой;
p₁ – относительно контрольной группы (К).

Таблица 2

**Влияние кверцетина на содержание МДА и активность антиоксидантных ферментов в тканях крыс
в условиях комбинированного действия патогенных факторов (M±m; p; p₁)**

Группы крыс	Содержание МДА (мкмоль/г)			Активность ферментов в СОПР		
	Печень	СОПР	Кость альвеолярного отростка	ГР, нмоль/с*г	ГПО, нмоль/с*г	СОД, у.е.
Интактная	108±7,80	25,0±6,90	27,0±3,20	4,68±0,45	40,0±8,13	1,47±0,03
Контрольная (К)	217±34,0 p=0,012	122±17,2 p<0,001	45,0±6,60 p=0,03	2,29±0,32 p=0,002	50,0±6,73	0,97±0,08 p<0,001
К+Кверцетин	119±9,50 p ₁ =0,02	-	16,0±7,10 p ₁ =0,02	3,89±0,38 p ₁ =0,011	87,2±15,1 p ₁ =0,04	1,08±0,11

Под действием кверцетина в печени крыс содержание МДА снижалось на 42,2 % ($p_1=0,02$); в кости альвеолярного отростка – на 64,4 % ($p_1=0,02$; табл. 2). Активность СОД в слизистой оболочке полости рта нормализовалась относительно интактной группы; активность глутатион-пероксидазы и глутатион-редуктазы увеличивалась в 1,7 раза, что говорит об активации ферментов обмена глутатиона в СОПР под действием кверцетина. В то же время активность глутатион-пероксидазы превышала таковую в интактной группе в 2,2 раза (табл.2)

В результате проведенных исследований были выявлены пародонто-протекторные свойства кверцетина на фоне патогенных воздействий. Резорбция кости альвеолярного отростка нижней челюсти крыс снижалась на 26,0 %: $25,1 \pm 1,0$ % ($p_1 < 0,001$) против $33,9 \pm 1,3$ % в контрольной группе (100 %). Снижение резорбции кости альвеолярного отростка верхней челюсти крыс под действием кверцетина составило: $19,4 \pm 0,9$ % ($p_1=0,02$) против $25,0 \pm 1,9$ % в контрольной группе (100 %), т.е. на 22,4 %.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о значительном патогенном влиянии изученных факторов – токсиканта-прооксиданта делагила, хронического ЭБС и бесполифенольного рациона на слизистую оболочку полости рта и костную ткань пародонта крыс. В принятых экспериментальных условиях кверцетин – наиболее распространенный полифенол пищи, оказал стресс-протекторное действие, выразившееся в нормализации клеточного состава периферической крови; снижении частоты повреждений и увеличении толщины слизистой оболочки желудка крыс. Пародонтопротекторные антиоксидантные свойства кверцетина проявились существенным уменьшением содержания перекисных продуктов и активацией ферментов обмена глутатиона в слизистой оболочке полости рта; в костной ткани пародонта – значительным снижением остеорезорбтивных процессов и усилением антиоксидантной защиты.

В целом, кверцетин проявил выраженное адаптационное действие, указывающее на существенное значение полифенольных соединений в обеспечении резистентности тканей пародонта к патогенному действию повреждающих факторов.

Список литературы

1. **Rice-Evans C. A.** Antioxidant properties of phenolic compounds / C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga // Trends in Plant Science. – 1997. – № 2 (4). – P. 152-159.
2. **Hollman P.C.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man / P.C. Hollman, M.P. John, M.N. Buysman // FEBS Lett. – 1997. – № 418. – P. 152-156.
3. **Rice-Evans C.** Flavonoid Antioxidants / C. Rice-Evans // Curr. Med. Chem. – 2001. – № 8. – P. 797-807.
4. **Прохончуков А. А.** Руководство по терапевтической стоматологии / А. Прохончуков, Н. Жижица // Под ред. А.И. Евдокимова. – М.: Медицина. – 1967. – 572 с.
5. **Desiderato O.** Development of gastric ulcers in rats following stress termination / O. Desiderato, J. MacKinnon, H. Hissom // J Comp. Physiol. Psychol. – 1974. – № 87. – P. 208-214.
6. **Николаева А. В.** Влияние некоторых нейротропных средств на состояние тканей при раздражении верхнего шейного симпатического узла: Автореф. дис. канд. мед. наук / А.В. Николаева – Харьков. – 1967. – 29 с.
7. **Стальная И. Д.** Метод определения диеновых конъюгаций ненасыщенных высших жирных кислот / И. Стальная, Т. Гаришвили // Современные методы биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М. – 1977. – С. 63-64.
8. **Путилина Е. Ф.** Определения активности глутатион-редуктазы / Е.Ф. Путилина // Методы биохимического исследования. – М.: Ин. Лит. – 1982. – С. 181-183.
9. **Пахомова В. А.** Способ определения активности глутатион-пероксидазы в биологических тканях / В. Пахомова, Н. Козлянина, Г. Крюкова // Патент А.С.922637 СССР. МКИ 01 33/48. – Оpubл. 25.04.82, Бюл. № 15. – 2 с.
10. **Чевари С.** Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
11. **Левицкий А. П.** Сравнительная оценка трёх методов определения активности фосфатаз слюны человека / А.П. Левицкий, А.И. Марченко, Т.Л. Рыбак // Лаб. дело. – 1972. – № 10. – С. 624-625.

Поступила 16.06.14

