

Шулятникова О.А., Рогожников Г.И., Косарева П.В., Даймонд Т.А., Кумаланина И.В., Рогожников А.Г.

Влияние низкомолекулярного катионного пептида варнерина на показатели периферической крови экспериментальных животных (экспериментально-лабораторное исследование)

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь

Shuliatnikova O.A., Rogoznikov G.I., Kosareva P.V., Daimond T.A., Kumalanina I.V., Rogoznikov A.G.

Influence of low-molecular cationic peptide of a varnerin on indicators of peripheral blood of experimental animals (experimental and laboratory research)

Резюме

Цель исследования: оценка показателей периферической крови экспериментальных животных при внутримышечной имплантации образцов наноструктурированного диоксида титана, обработанного низкомолекулярным катионным пептидом варнерином. Образцы диоксида титана, дополнительно обработанные пептидом варнерином с различными дозировками, имплантировали внутримышечно экспериментальным животным (крысам). По истечении периода эксперимента проводили забор крови. Результаты исследования периферической крови животных показали следующее: имплантация экспериментальных образцов диоксида титана с наномодифицированным покрытием и обработкой пептидом варнерином не оказывает влияния на показатели красной крови, не приводит к изменениям тромбоцитарных показателей, не сопровождается статистически значимым увеличением количества лейкоцитов венозной крови экспериментальных животных. Результаты исследований могут быть использованы для дальнейших экспериментально-клинических исследований по профилактике воспалительных явлений со стороны мягкотканного пародонта и слизистой оболочки полости рта в послеоперационном периоде у пациентов с приобретенными дефектами, деформациями челюстно-лицевой области и дефектами зубных рядов путем ингибирования образования бактериальных пленок с использованием пептида варнерина.

Ключевые слова: эксперимент, имплантация, животные, наномодифицированный диоксид титана, пептид варнерин

Summary

Research objective: an assessment of indicators of peripheral blood of experimental animals at intramuscular implantation of samples of the nanostructured dioxide of the titanium processed by low-molecular cationic peptide warnerin. The samples of dioxide of the titan which are in addition processed by peptide warnerin with various dosages implanted to intramuscularly experimental animal (rats). After the period of an experiment carried out blood sampling. Results of a research of peripheral blood of animals have shown the following: implantation of experimental samples of dioxide of the titan with the nanomodified covering and processing by peptide warnerin doesn't exert impact on indicators of red blood, the trombotsitarynykh of indicators doesn't lead to changes, isn't followed by statistically significant increase in quantity of leukocytes of blue blood of experimental animals. Results of researches can be used for further experimental clinical trials on prevention of the inflammatory phenomena from a parodont and a mucous membrane of an oral cavity in the postoperative period at patients with the acquired defects, deformations of maxillofacial area and defects of tooth alignments by inhibition of formation of bacterial films with use of peptide of a warnerin.

Keywords: experiment, implantation, animals, titan, nanomodified dioxide of the titan, peptide warnerin

Введение

Проблема развития осложнений воспалительного характера со стороны мягкотканного пародонта и слизистой оболочки полости рта в послеоперационном периоде у пациентов с приобретенными дефектами и деформациями челюстно-лицевой области и зубных рядов не теряет своей актуальности и связана с их высоким процентом встречаемости, в том числе после операций дентальной имплантации. Так, в результате проведения исследований некоторыми авторами, развитие перимплантита описано у 28—56%, а мукозита – у 80% обследованных лиц, имеющих имплантаты [1]. В большинстве случаев, развитие осложнений подобного характера связано с наличием микробной пленки на поверхности конструкционного материала, которая неизбежно образуется в агрессивной среде полости рта, особенно при наличии нарушенного микробиоценоза [2]. На сегодняшний день, проблему решения биопленкообразования предлагается путем нанесения на поверхность конструкционного материала компонентов, обладающих антибактериальными эффектами, таких как ионы серебра или антибиотиков и др. [3]. Предварительно проведенные нами исследования *in vitro*, свидетельствуют о возможности ингибирования бактериального прикрепления путем использования конструкционного материала с наноструктурированной поверхностью, в частности диоксида титана [4]. Данные исследования позволили нам перейти на экспериментальные исследования в условиях *in vivo* для более глубокого изучения влияния наноструктурированного диоксида титана на показатели периферической крови животных при внутримышечной имплантации экспериментальных образцов [5]. При этом, в наших же исследованиях *in vitro* доказано, что дополнительная обработка наноструктурированного диоксида титана низкомолекулярным катионным пептидом варнерином приводит к значительному снижению общей биомассы и количества живых клеток в биопленке [6].

В связи с этим, целью данной исследовательской работы являлась оценка показателей периферической крови экспериментальных животных при внутримышечной имплантации образцов наноструктурированного диоксида титана, обработанного низкомолекулярным катионным пептидом варнерином.

Материалы и методы

Образцы для экспериментальной части работы представляли собой диоксид титана с наноструктурированной поверхностью в форме анатаз, которые изготавливали на кафедре «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета (д.т.н., проф. С.Е. Порозова).

Лабораторно-экспериментальное исследование выполнено по разрешению Этического комитета ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России» на белых нелинейных крысах (самцы) четырехмесячного возраста, с массой тела 180–230 г. Эксперимент выполнен в соответствии с «Правилами лабораторной

практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.III.1986 (текст изменен в соответствии с положениями Протокола (ETS № 170), после его вступления в силу 2 декабря 2005 года; Лиссабонский договор о внесении изменений в Договор о Европейском союзе и Договор об учреждении Европейского сообщества вступили в силу 1 декабря 2009 года). Животных содержали в стандартных условиях экспериментально-биологической клиники – вивария, разделив их на четыре группы: одна контрольная и три экспериментальных. Для определения рациональной дозировки пептида варнерина, в эксперименте исследовали различные его дозировки.

1 группа (контрольная). Внутримышечная имплантация образцов диоксида титана (n=15);

2 группа (экспериментальная). Внутримышечная имплантация образцов, диоксида титана, обработанных пептидом варнерином в дозировке 120 мг/мл (n=15);

3 группа (экспериментальная). Внутримышечная имплантация образцов диоксида титана, обработанных пептидом варнерином в дозировке 60 мг/мл (n=15);

4 группа (экспериментальная). Внутримышечная имплантация образцов диоксида титана, обработанных пептидом варнерином в дозировке 30 мг/мл (n=15).

Имплантацию экспериментальных образцов осуществляли в мышечную ткань задней внешней поверхности бедра животных после 3–5 минут ингаляционного наркоза, дополненным местной анестезией «Ультраканом».

Эксперимент длился в течении 28 дней, что соответствует ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Оценка биологического действия медицинских изделий» и международному стандарту ИСО/ДИС 10993 «Биологический контроль материалов и изделий медицинского назначения». Животных выводили из эксперимента путем перерезки спинного мозга под ингаляционным наркозом с соблюдением правил эвтаназии, руководствуясь положением ISO 10993-2.

Кровь забирали из полости сердца в пробирку с раствором гепарина (50 ЕД/мл) после выведения животных из эксперимента. Анализ показателей периферической крови экспериментальных животных выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе Medonic M20 (Boule Medical A.B., Швеция) и сравнивали с международными нормами для крыс [Sharp P.E., M.C. La Regina. The laboratory rat. By CRC Press LLC. – 1998. – 214 p. doi.org/10.1201/9780849377198]. Определяли количество эритроцитов (1012 клеток в 1 л), лейкоцитов и лейкоформулу (109 клеток в 1 л), концентрацию гемоглобина (г/дл), гематокрит (%), количество тромбоцитов (109 клеток в 1 л), тромбокрит (%).

Статистически обрабатывали результаты эксперимента с использованием программного пакета Biostat и приложения Microsoft® Excel полнофункционального офисного пакета Microsoft Office 2007. При проведении

Таблица 1. Количество эритроцитов, гематокрит и концентрация гемоглобина в крови экспериментальных животных по окончании эксперимента (M ± m)

Группа исследования	Количество эритроцитов (x10 ¹² в 1 л крови, M±m)	Концентрация Hb (г/л, M±m)	Гематокрит, %, M±m
Контрольная 1 (TiO ₂ нано), n=15	7,21±0,28 p=0,369 t=-0,911	138,87±4,47 p=0,648 t=-1,483	40,72±1,54 p=0,611 t=-0,513
Экспериментальная 2 (TiO ₂ нано+варнерин 120 мг/мл), n=15	7,85±0,13 p=0,001* t=-3,568	139,54±2,37 p=0,051 t=-2,031	40,17±0,87 p=0,779 t=-0,283
Экспериментальная 3 (TiO ₂ нано+варнерин 60 мг/мл), n=15	7,99±0,11 p=0,000* t=-4,206	137,88±1,88 p=0,093 t=-1,734	41,71±0,63 p=0,174 t=-1,390
Экспериментальная 4 (TiO ₂ нано+варнерин 30 мг/мл), n=21	8,37±0,15 p=0,000*# t=-5,690	144,60±2,31 p=0,002** t=-3,426	43,59±0,84 p=0,010* ^b t=-2,713

*p<0,05; для проведения статистического анализа использован критерий Стьюдента, по отношению к контролю.
#, b: для проведения статистического анализа использован однофакторный дисперсионный анализ, сравнение групп.

исследований, характеризуя выборки, определяли выборочные средние величины, ошибку среднего и выборочное стандартное отклонение. Сравнение выборочных средних между собой осуществляли при помощи критерия Стьюдента. Для оценки различий между несколькими случайными выборками использовали метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимал равным p<0,05.

Результаты и обсуждение

При проведении экспериментального исследования не отмечено случаев гибели животных; поведение, аппетит, кожные покровы, физиологические функции у животных опытных групп не отличались от таковых у животных группы контроля.

Полученные и статистически обработанные результаты экспериментального исследования представлены в таблицах 1-3.

Как видно из таблицы 1, у животных экспериментальных групп, количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и гематокрит статистически выше, чем у животных контрольной группы, хотя средние значения в этих группах (с обработкой пептидом варнерином) находились в пределах средних значений нормальных величин.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что низкомолекулярный катионный пептид варнерин, несомненно, оказывает влияние на эритроцитарный росток, изменяя, возможно, синтез гемоглобина или его структуру, что требует дальнейших исследований. Выявленный феномен может быть объяснен стимуляцией эритропоэза антибактериальным пептидом варнерином. Так известно, что антибактериальные пептиды стимулируют тромбоцитопоз [7] и эритропоэз [8], чему не противоречат полученные нами экспериментальные данные.

При исследовании тромбоцитарных показателей (таблица 2) отмечался рост тромбоцитарных показателей,

Таблица 2. Тромбоцитарные характеристики у экспериментальных животных (M ± m)

Группа исследования	Количество тромбоцитов (x10 ⁹ в 1 л крови, M±m)	Тромбокрит, %, M±m
Контрольная 1 (TiO ₂ нано), n=15	666,75±73,09 p=0,920, t= 0,102	42,0±4,0 p=0,301, t= -1,052
Экспериментальная 2 (TiO ₂ нано+варнерин 120 мг/мл), n=15	780,81±57,00 p=0,103, t= -1,682	47,0±3,0 p=0,005*, t= -3,059
Экспериментальная 3 (TiO ₂ нано+варнерин 60 мг/мл), n=15	560,00±46,5 p=0,048*, t= 2,055	31,0±2,0 p=0,002*, t= 3,293
Экспериментальная 4 (TiO ₂ нано+варнерин 30 мг/мл), n=21	611,20±71,08 p=0,449, t= 0,764#	36,0±4,0 p=0,654, t= 0,452*

*p<0,05; для проведения статистического анализа использован критерий Стьюдента, по отношению к контролю.
#, a для проведения статистического анализа использован однофакторный дисперсионный анализ; сравнение групп.

Таблица 3. Количество лейкоцитов и показатели лейкоцитарной формулы крови у экспериментальных животных по окончании эксперимента, М±m

группа исследования	Нейтрофилы %	Лимфоциты %	моноциты %	Эозинофилы %	лейкоциты x 10 ⁹ /л
Контрольная 1 (TiO ₂) n=15	16,88±1,73 p=0,121	71,75±2,99 p=0,158	7,0±1,61 p=0,351	4,0±0,88 p=0,545	9,48±0,74 p=0,857
Эксп-ная 2 (TiO ₂ +варнерин 120 мг/мл) n=18	19,55±1,94 p=0,278	66,91±2,61 p=0,654	5,73±0,69 p=0,764	7,0±1,48 p=0,385	<u>15,6±1,45</u> <u>p=0,004*</u>
Эксп-ная 3 (TiO ₂ +варнерин 60 мг/мл) n=15	15,78±2,86 p=0,101	77,38±1,58 <u>p=0,006</u>	6,78±0,86 p=0,218	2,56±0,71 p=0,142	14,79±1,48 <u>p=0,004*</u>
Эксп-ная 4 (TiO ₂ +варнерин 30 мг/мл), n=15	14,0±1,81 p=0,025*#	75,8±2,3 <u>p=0,015**</u>	5,6±1,33 p=0,919 b	2,6±0,62 p=0,345 c	15,05±1,28 <u>p=0,001* d</u>

* $p < 0,05$; для проведения статистического анализа использован критерий Стьюдента, по отношению к контролю.
#, a, b, c, d: для проведения статистического анализа использован однофакторный дисперсионный анализ; сравнение групп.

что не противоречит данным, приведенным выше, а увеличение находилось в пределах нормальных значений. При этом, количество тромбоцитов статистически достоверно в 4-й экспериментальной группе было меньшим (611,20±71,08), чем в группе контроля (666,75±73,09). То же самое наблюдалось и при сравнении показателей тромбоцита: в контрольной группе показатель тромбоцита составил 42,0±4,0, а в 3-й и 4-й экспериментальных группах наименьший - 31,0±2,0 и 36,0±4,0 соответственно, наибольший показатель тромбоцита определяли во 2-й группе (с максимальной концентрацией пептида варнерина 120 мг/мл) - 47,0±3,0.

Результаты изучения количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы венозной крови животных представлены в таблице 3. Данные эксперимента свидетельствуют о снижении относительных показателей нейтрофилов во всех экспериментальных группах, но особенно выражено их уменьшение в 4-й группе с обработкой образцов пептидом варнерином активностью 30 мг/мл (14,0±1,81) по сравнению с группой контроля (16,88±1,73). При этом, показатель количества нейтрофилов статистически достоверно снижается с уменьшением дозировки активности пептида варнерина.

Относительные величины моноцитов показали увеличение в контрольной группе (7,0±1,61), а обработка экспериментальных образцов пептидом варнерином в дозировке 30 мг/мл выявила их уменьшение (5,6±1,33).

При сравнении относительных показателей количества эозинофилов в 3-й и 4-й экспериментальных группах наблюдается их снижение (2,56±0,71 и 2,6±0,62 соответственно) в сравнении с контрольной группой, за исключением 2-й группы, где наблюдается максимальное значение (7,0±1,48). Данный факт может служить основанием предполагать отсутствие аллергической реакции организма на чужеродный белок, которым является пептид варнерин с использованием дозировки 30 и 60 мг/мл.

В группах, получавших варнерин, отмечается увеличение абсолютного количества лимфоцитов, за исключением 2-й группы. Возможно, это обусловлено мо-

билизацией молодых, незрелых лимфоцитов из костного мозга и тимуса под действием варнерина.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа ANOVA подтверждают результаты Стьюдент-теста, то есть, во всех экспериментальных группах, отмечается нарастание общего количества лейкоцитов венозной крови. Данный факт можно объяснить, как общую реакцию организма экспериментальных животных на оперативное вмешательство в процессе эксперимента. В настоящее время этот тезис не противоречит современным данным – фундаментальными исследованиями в области стоматологии показано, что при имплантации зубных протезов может возникать лейкоцитоз и сопровождаться повышением СОЭ, что объясняется нормальной реакцией организма на повреждающее действие во время операции имплантации [9].

Выводы

1. Имплантация экспериментальных образцов диоксида титана с наномодифицированным покрытием и обработкой пептидом варнерином не оказывает влияния на показатели красной крови экспериментальных животных.

2. Исследуемые образцы не приводят к изменениям тромбоцитарных показателей при их внутримышечной имплантации экспериментальным животным.

3. Имплантированные образцы диоксида титана с наномодифицированным покрытием и обработкой пептидом варнерином не сопровождается статистически значимым увеличением количества лейкоцитов венозной крови экспериментальных животных.

Полученные экспериментальные результаты по изучению влияния низкомолекулярного катионного пептида варнерина на показатели периферической крови экспериментальных животных в перспективе дальнейшей работы имеют практическое значение для использования их экспериментально-клинических исследованиях как способа профилактики воспалительных явлений со стороны мягкотканного пародонта и слизистой оболочки

полости рта в послеоперационном периоде у пациентов с приобретенными дефектами, деформациями челюстно-лицевой области и дефектами зубных рядов путем ингибирования образования бактериальных пленок, на поверхностях конструкционных материалов из диоксида титана [10]. ■

О.А. Шулятникова – к.м.н., доцент кафедры ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России), инженер кафедры «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета (ФГБОУ ВО ПНИПУ); **Г.И. Рогожников** – д.м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России); **П.В. Косарева** – д.м.н., профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнеде-

ятельности Пермского государственного национального исследовательского университета (ФГБОУ ВО ПГНИУ) **Т.А. Даймонд** – к.м.н., старший научный сотрудник иммунологической лаборатории Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России); **И.В. Кумаланина** – к.м.н., старший научный сотрудник иммунологической лаборатории Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России); **А.Г. Рогожников** – к.м.н., доцент кафедры ортопедической стоматологии Пермского государственного медицинского университета им. академика Е.А. Вагнера (ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России), инженер кафедры «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета (ФГБОУ ВО ПНИПУ). Автор, ответственный за переписку - Шулятникова Оксана Александровна, г. Пермь, 614007, ул. Революции, д.18, кв.15, e-mail: anasko06@mail.ru

Литература:

1. Глушченко В.П., Гильмиярова Ф.Н., Головина Е.С. и др. Доклиническая диагностика дентального периимплантита. *Российский стоматологический журнал*. 2011; № 2: С. 28-29.
2. Арутюнов С.Д., Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Апресян С.В., Трефилов А.Г. Формирование биопленки на временных зубных протезах: соотношение процессов первичной микробной адгезии, коагрегации и колонизации. *Стоматология*. 2012; № 5: С.5-10.
3. Сухорукова И.В., Швейко А.Н., Штанский Д.В. Влияние состава и шероховатости поверхности покрытия TiCaPCON-Ag на кинетику выхода Ag в физиологический раствор. *Известия вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия*. 2015; № 3: С. 53-61.
4. Шулятникова О.А., Порозова С.Е. и др. Ингибирование образования микробной пленки при наноструктурировании поверхности конструкционного материала. *Уральский медицинский журнал*. 2016; № 7 (140): С. 20-24.
5. Шулятникова О.А., Косарева П.В., Рогожников Г.И., Порозова С.Е., Горячев П.А. Экспериментально-лабораторное исследование показателей периферической крови животных при внутримышечной имплантации опытных образцов наномодифицированного диоксида титана. *Проблемы стоматологии*. 2016; том 12 (№4): С. 61-66.
6. Шулятникова О.А., Коробов В.П., Лемкина Л.М., Рогожников Г.И. Пептид варнерин как способ ингибирования образования бактериальных пленок на инновационных конструкционных материалах. Сборник трудов Национального конгресса с международным участием «Паринские чтения 2016». Минск, Беларусь. 5-6 мая, 2016: С. 115-118.
7. Жогин А.В., Зурочка А.В. Исследование роли нейтрофилокинов в регуляции агрегатного состояния крови доноров. *Цитокины и воспаление*. 2002; № 2 (1): С. 67.
8. Долгушин И.И. Иммунорегуляторные пептиды нейтрофилов. *Цитокины и воспаление*. 2002; № 2 (1): С. 66.
9. Abd El Salam El Askary. *FUNDAMENTALS OF ESTHETIC IMPLANT DENTISTRY*. 2007. by Blackwell Munksgaard, a Blackwell Publishing Company.Ltd.: http://samples.sainsburysebooks.co.uk/9780470376331_sample_386638.pdf
10. Шулятникова О.А., Рогожников Г.И., Коробов В.П., Рогожников А.Г., Лемкина Л.М. Способ профилактики и лечения послеоперационного воспаления полости рта. Патент РФ № 2582228 от 30.03.2016.