



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **67897** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**A61P 31/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

|  |   |
|--|---|
| (21) Номер заявки: <b>u 2011 09537</b>                                       | (72) Винахідник(и):<br><b>Ткаченко Євгенія Костянтинівна (UA),<br/>Косенко Костянтин Миколаєвич (UA),<br/>Новосельська Наталія Германівна (UA),<br/>Мокшина Олена Георгіївна (UA)</b> |
| (22) Дата подання заявки: <b>29.07.2011</b>                                  |   |
| (24) Дата, з якої є чинними<br>права на корисну<br>модель: <b>12.03.2012</b> |   |
| (46) Публікація відомостей<br>про видачу патенту: <b>12.03.2012, Бюл.№ 5</b> | (73) Власник(и):<br><b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ<br/>СТОМАТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ",<br/>вул. Французький бульвар, 49/51, м. Одеса,<br/>65061 (UA)</b>                                   |

## (54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ПАРОДОНТИТУ З УРАЖЕННЯМ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ПАРОДОНТА

### (57) Реферат:

Спосіб моделювання пародонтиту з ураженням сполучної тканини пародонта полягає у введенні ксенобіотиків. Щурам з питною водою вводять ксенобіотик купреніл в дозі 20 мг/кг маси тіла щурів протягом 55 діб (підряд протягом 5 днів, перерва 2 дні).

UA 67897 U



Корисна модель належить до медицини, конкретно до стоматології, і може бути використана для створення моделі пародонтиту з ураженням сполучної тканини пародонта, для експериментального вивчення патогенезу пародонтиту і розробки методів профілактики і медикаментозного лікування даного захворювання.

- 5 Тканини пародонта багаті сполучною тканиною (СТ). Особливості процесів метаболізму й катаболізму СТ пов'язані з особливостями її будови. Характерною рисою цієї тканини є наявність у ній, окрім клітин (фібробласти, гладкі клітини, макрофаги), сполучнотканинного матриксу (СТМ), що займає значно більший обсяг за клітини. Основними компонентами СТМ є фібрилярні білки (колагени та еластини) і полісахариди (протеоглікани та глікопротеїни).
- 10 Процеси запалення супроводжуються деструктивними змінами в сполучній тканині. Запальні захворювання пародонта призводять до деградації СТ ясен й руйнування альвеолярної кістки. Перехід від гінгівіту до пародонтиту також супроводжується лізисом сполучнотканинного прикріплення ясен. В той же час не викликає сумнівів активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у мембранах клітин при пародонтиті (Воскресенский О.Н., Ткаченко Е.К. Роль перекисного окислення ліпідів в патогенезі пародонтита. / Стоматология. - 1991. - № 4. - С. 5-10).

Сьогодні відомі різні способи моделювання змін у пародонті експериментальних тварин, які відображають структурно-функціональні зсуви, характерні для пародонтиту людини.

- 20 Найбільш близьким до пропонованого способу моделювання пародонтиту є експериментальна модель пародонтиту, за якою тваринам перорально вводять ксенобіотик делалгін і етилендіамінтетраацетат. Однак при використанні цього способу у експериментальних тварин відбувається комплекс перекисних та кальцій-дефіцитних змін (виявляється роль вікового фактору - перекисних механізмів старіння тканин) без впливу на сполучну тканину.

- 25 Сьогодні відомий препарат групи ксенобіотиків - купреніл.

- Купреніл (D-пеніциламін) - синтетичний препарат, що являє собою за структурою частину молекули пеніциліну, є диметильним похідним амінокислоти цистеїну. Застосовується у вигляді D-форми, тому що L-форма й рацемат більш токсичні. Основною властивістю пеніциламіну є його висока комплексоутворююча активність відносно іонів металів. Крім того, купреніл впливає на метаболізм колагену, блокуючи його синтез, а зв'язування й видалення з організму міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ), у свою чергу, веде до значної активації колагенази та ушкодження тканин. Під дією купренілу відбувається також інгібування зв'язування поперечних волокон колагену. Пеніциламін застосовують при гострих і хронічних отруєннях металами. Він зв'язує, головним чином, іони міді, ртуті, свинцю й заліза, а також кальцію та магнію [Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М.: Медицина, 1993. - Т. II. - С. 229-231]. Іон  $\text{Mg}^{2+}$  важливий для метаболізму СТ. Він перебуває на четвертому місці по поширеності в організмі людини (після натрію, калію й кальцію). Брак  $\text{Mg}^{2+}$  призводить до активації гіалуронідаз, так як цей іон входить до активного центру гіалуронансинтеза, що сприяє погіршенню механічних властивостей ланок гіалуронану й часткової деградації гелю, що утворює основу СТМ (Effects of magnesium on the production of extracellular matrix metalloproteinases in culture rat vascular smooth muscle cells. / [Yue E, Lee G.D., Shimizu H, Uzui H., Mitsuke Y., Ueda T.] // Atherosclerosis.-2003. - 166 (2). - P. 271-277).
- 30
- 35
- 40

- В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення експериментальної моделі пародонтиту шляхом використання як ксенобіотика купренілу (D-пеніциламін), за рахунок чого відбувається вплив на сполучнотканинний матрикс (СТМ), основними компонентами якого є фібрилярні білки (колагени та еластини) і полісахариди (протеоглікани та глікопротеїни), що дозволить отримати модель пародонтиту з ураженням сполучної тканини пародонта.
- 45

- Поставлена задача вирішується тим, що в способі моделювання пародонтиту з ураженням сполучної тканини пародонта, що полягає у введенні ксенобіотиків, згідно з корисною моделлю, щуром з питною водою вводять ксенобіотик купреніл в дозі 20 мг/кг маси тіла щурів 5 днів (підряд, з перервою, два дні) на тиждень протягом 55 діб.
- 50

Причинно-наслідкові зв'язки:

Використання купренілу:

- обумовлено його високою комплексоутворюючою активністю відносно іонів металів тому числі  $\text{Cu}^{2+}$ , та  $\text{Mg}^{2+}$ , які є важливішими компонентами кісткової тканини пародонта, купреніл впливає на метаболізм колагену, блокуючи його синтез, а зв'язування й видалення з організму міді ( $\text{Cu}^{2+}$ ), у свою чергу, веде до значної активації колагенази та ушкодження сполучної тканини пародонта;
- 55

- під дією купренілу відбувається також інгібування, зв'язування поперечних волокон колагену.
- 60

Опис способу.

Спосіб був здійснений в експериментальному відділі ГУ "ИС АМНУ". В експерименті було 2 групи щурів: 1 інтактна - 6 щурів утримувались на стандартному раціоні віварію, основна - 8 щурів протягом 55 діб (5 днів на тиждень з перервою 2 дні) отримували з питною водою купреніл в дозі 20 мг/кг маси тіла щурів.

По завершенні експериментів тварин виводили з експериментів шляхом тотального кровопускання із серця, проведеного під наркозом (тіопентал натрію 40 мг/кг). Попередньо відокремивши ясна, виділяли верхні та нижні щелепи.

Об'єктами біохімічних досліджень були сироватка крові, надосадова рідина гомогенатів, кістки альвеолярного відростка та ясен (25 мг/мол). Надосадову рідину одержували шляхом центрифугування в центрифугі РС-6 упродовж 15 хвилин при 3000 об/хв при температурі +4 °С.

Для оцінки стану тканин щурів визначали біохімічні показники сироватки крові уніфікованими методами, використовуючи комерційні набори реактивів: активність лужної фосфатази (сер. 35/100); вміст кальцію (сер. 18/200); вміст фосфору (сер. 20/200); вміст магнію (сер. 18/100); вміст міді (сер. 14/50).

Рівень процесів перекисного окислювання ліпідів (ПОЛ) оцінювали по вмісту малонового діальдегіду (МДА) тіобарбітуровим методом [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].

Активність кислої фосфатази (КФ) визначали за методом Bessay et.al у модифікації А.П. Левицкого и соавт. [Левицкий А.П. Сравнительная оценка трёх методов определения активности фосфатаз слюны человека / А. Левицкий, А. Марченко, Т. Рыбак // Лаб. дело.-1972. - № 10. - С. 624-625]. Стан мінерального обміну в кістці альвеолярного відроста щурів визначали по активності лужної фосфатази (ЛФ) [Левицкий А.П. і др., 1972]., вмісту кальцію й фосфору, за допомогою комерційних наборів реактивів.

Стан сполучної тканини оцінювали по вмісту сіалових кислот у сироватці крові за допомогою набору (сер. 0910), глікозаміногліканів (ГАГ) у тканинах ротової порожнини [Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях. / [П. Шараев, В. Пишков, Н. Соловьева, Т. Широкова, Н. Зворыгина, А. Солопаев, Н. Алексеева] // Лаб. дело.-1987. - 5. - С. 330-332.], стан колагену - по вмісту оксипроліну в яснах щурів [Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. / П. Шараев. // Лаб. дело. - 1981. - 5. - С. 283-285].

Виділені щелепи щурів піддавали морфометричному дослідженню. Ступінь резорбції кістки альвеолярних відростків нижньої та верхньої щелеп щурів оцінювали методом А.В. Ніколаєвої [Николаева А.В. Влияние некоторых нейротропных средств на состояние тканей при раздражении верхнего шейного симпатического узла: Автореф. дис. канд. мед. наук / А. Николаева - Харьков. - 1967. - 29 с.]. Для цього за допомогою бінокулярної лупи визначали ступінь оголення кожного кореня молярів і підраховували збиток кісткової тканини, що виражали у відсотках.

Результати експериментів обробляли загальноприйнятими методами з визначенням критеріїв вірогідності розходжень по Стьюденту.

Результати досліджень.

Розглянемо, як змінювався стан тканин пародонта й сполучнотканинних структур ротової порожнини щурів під впливом купренілу. Дослідження показали, що під дією купренілу, що вводять у дозі 20 мг/кг маси тіла щурів упродовж 55 днів, виявлене посилення резорбції кісткових структур пародонта: на 23,5 % - на нижній щелепі ( $p=0,002$ ) і на 37,8 % - на верхній ( $p=0,002$ ) (від 100 % в інтактних групах табл. 1).

Таблица 1

Показник резорбції (%) кістки альвеолярного відростка щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Нижня щелепа          | Верхня щелепа         |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| Інтактна      | 30,7±1,5              | 22,2±0,9              |
| Купреніл (ДО) | 37,9±1,1<br>$p=0,002$ | 30,6±2,1<br>$p=0,002$ |

Примітка: У табл. 1-13 показник вірогідності  $p$  розрахований відносно інтактної групи.

Під дією купренілу в тканинах пародонта спостерігалася активація кислій фосфатази: в 4,7 рази в яснах ( $p=0,07$ ) і в кості альвеолярного відростка - в 2,2 рази ( $p=0,05$ , табл. 2), що говорить про посилення катаболічних процесів у яснах і кісткових структурах пародонта.

Таблиця 2

Активність кислій фосфатази в тканинах ротової порожнини щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Активність КФ (рН 4,8) (мкмоль/г) |                                |
|---------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|               | Ясна                              | Кістка альвеолярного відростка |
| Інтактна      | $3,51 \pm 1,27$                   | $1,01 \pm 0,45$                |
| Купреніл (ДО) | $16,6 \pm 6,27$<br>$p=0,07$       | $2,19 \pm 0,31$<br>$p=0,05$    |

5

Вміст сіалових кислот у сироватці збільшувався на 25 % відносно інтактної групи (табл. 3), що свідчить про посилення запальних явищ у тканинах. Відомо, що сіалові кислоти, що є похідними нейрамінової кислоти, утворюються під дією нейромінідази при розпаді глікопротеїнів сполучнотканного матрикса (СТМ).

10

Таблиця 3

Вміст сіалових кислот у сироватці крові щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Вміст сіалових кислот (ммоль/л) |
|---------------|---------------------------------|
| Інтактна      | $1,79 \pm 0,27$                 |
| Купреніл (ДО) | $2,24 \pm 0,16$<br>$p=0,11$     |

У яснах експериментальних тварин спостерігалася тенденція до зниження вмісту ГАГ в 1,5 рази в порівнянні з інтактною групою. Вміст ГАГ у кості альвеолярного відростка перебувало на рівні інтактної групи (табл. 4).

15

Таблиця 4

Вміст глікозаміногліканів і оксипроліну в тканинах ротової порожнини щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Вміст ГАГ (мг/г)            |                                |
|---------------|-----------------------------|--------------------------------|
|               | Ясна                        | Кістка альвеолярного відростка |
| Інтактна      | $6,76 \pm 0,0044$           | $21,1 \pm 0,41$                |
| Купреніл (ДО) | $4,39 \pm 1,27$<br>$p=0,08$ | $21,4 \pm 2,37$                |

Стан колагену ясен під впливом купренілу визначали по двох фракціях оксипроліну: вільній й зв'язаній. Так, виявлене значне зниження вмісту вільного оксипроліну, і в меншому ступені - зв'язаного оксипроліну в яснах щурів (табл. 5).

20

Таблиця 5

Вміст вільного й зв'язаного оксипроліну в яснах щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Вміст оксипроліну (мкмоль/г) |                              |
|---------------|------------------------------|------------------------------|
|               | вільний                      | зв'язаний                    |
| Інтактна      | $32,8 \pm 12,8$              | $39,25 \pm 8,42$             |
| Купреніл (ДО) | $2,88 \pm 0,56$<br>$p=0,05$  | $14,4 \pm 0,56$<br>$p<0,001$ |

Вміст іонів  $Mg^{2+}$  вірогідно знижувався на 22,2 % у кості альвеолярного відростка (від 100 % в інтактній групі: табл. 6).

Таблиця 6

Вміст  $Mg^{2+}$  у сироватці крові й тканинах ротової порожнини щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Вміст $Mg^{2+}$ (ммоль/л; ммоль/г) |              |                                |
|---------------|------------------------------------|--------------|--------------------------------|
|               | Сироватка крові                    | Ясна         | Кістка альвеолярного відростка |
| Інтактна      | 31,83±0,51                         | 0,037±0,0048 | 0,18±0,0029                    |
| Купреніл (ДО) | 34,66±0,42                         | 0,047±0,0039 | 0,14±0,015<br>$p=0,03$         |

- 5 У сироватці крові щурів під впливом купренілу в 4,2 рази знижувався вміст іонів  $Cu^{2+}$  ( $p=0,02$ ; табл. 7). Значну зміну концентрації іонів металів цілком пояснено у зв'язку з комплексоутворювальною здатністю купренілу, особливо у відношенні  $Cu^{2+}$ , тому що недостатній вміст  $Cu^{2+}$  супроводжує деградацію СТМ.

Таблиця 7

Вміст міді в сироватці крові щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Вміст міді (мкг/л)   |
|---------------|----------------------|
| Інтактна      | 500±96,8             |
| Купреніл (ДО) | 119±77,5<br>$p=0,02$ |

- 10 Хронічне введення купренілу викликало посилення процесів ПОЛ в сироватці крові й тканинах ротової порожнини щурів. Вміст МДА збільшувався в сироватці крові в 1,5 разу; у кості альвеолярного відростка - в 2,1 разу ( $p=0,04; 0,001$ ; табл. 8).

Таблиця 8

Вміст МДА в сироватці крові й печінки щурів при експериментальних впливах ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин  | Вміст МДА (нмоль/г) |                                |  |
|---------------|---------------------|--------------------------------|--|
|               | Ясна                | Кістка альвеолярного відростка | Сироватка крові, нмоль/см <sup>3</sup> |
| Інтактна      | 19,3±2,24           | 5,70±0,60                      | 0,96±0,17                              |
| Купреніл (ДО) | 21,3±7,29           | 12,3±0,96<br>$p=0,001$         | 1,074±0,016                            |

- 15 Під дією купренілу стан мінерального обміну змінювалося в сироватці крові й кістки альвеолярного відростка (табл. 9.). Так, у сироватці крові значно (в 1,7 разу) знижувалася активність ЩФ ( $p=0,003$ ) і значно знижувався вміст фосфату (в 1,6 рази;  $p=0,05$ ). У кості альвеолярного відростка спостерігалася зниження в 2,3 рази вмісту кальцію ( $p=0,01$ ; табл. 9).

Таблиця 9

Стан мінерального обміну в сироватці крові й кістковій тканині пародонта щурів при моделюванні пародонтиту ( $M \pm m$ ;  $p$ )

| Групи тварин    | Активність                                     | Вміст  |  |
|-----------------|--|--|--|
|                 | ЩФ<br>(нмоль/с·см <sup>3</sup> ,<br>нмоль/с·г) | Са<br>(ммоль/с·см <sup>3</sup> ,<br>ммоль/с·г) | Р<br>(ммоль/с·см <sup>3</sup> , ммоль/с·г) |
| Сироватка крові |  |  |  |
| Інтактна        | 73,9±5,35                                      | 0,90±0,090                                     | 1,17±0,11                                  |
| Варфарин (В)    | 34,1±1.90                                      | 0.92±0.026                                     | 0.90±0.022                                 |

|                                |                                |                                |                                   |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
|                                | $p < 0,001$                    |                                | $p = 0,04$                        |
| Купреніл (ДО)                  | $42,8 \pm 3,55$<br>$p = 0,003$ | $0,95 \pm 0,12$                | $0,74 \pm 0,14$<br>$p = 0,05$     |
| Кістка альвеолярного відростка |                                |                                |                                   |
| Інтактна                       | $0,60 \pm 0,22$                | $0,023 \pm 0,0038$             | $0,0040 \pm 0,0012$               |
| Варфарин (В)                   | $0,64 \pm 0,080$               | $0,020 \pm 0,00$               | $0,0096 \pm 0,0024$<br>$p = 0,07$ |
| Купреніл (ДО)                  | $0,66 \pm 0,075$               | $0,010 \pm 0,00$<br>$p = 0,01$ | $0,0072 \pm 0,0020$               |

Таким чином, за допомогою купренілу була відтворена експериментальна модель пародонтиту, з ураженням СТ. Про це свідчило посилення резорбції кісткових структур пародонта під дією купренілу; мінерального обміну, під дією якого в кості альвеолярного відростка спостерігалось також істотне зниження вмісту кальцію. Збільшення активності кислої фосфатази й вмісту МДА говорить про посилення запальних явищ у тканинах пародонта щурів під впливом купренілу. Про деградацію СТМ свідчило: 1) руйнування колагену ясен, про що судили по значному зниженню вмісту оксипроліну; 2) значне зниження рівня глікозаміногліканів у яснах. Посилення катаболічних процесів СТМ на рівні організму підтверджують дані про збільшення рівня сіалових кислот у сироватці крові щурів під дією купренілу, а також істотне зниження іонів міді в сироватці крові й іонів магнію в кості альвеолярного відростка під впливом купренілу.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання пародонтиту з ураженням сполучної тканини пародонта, що полягає у введенні ксенобіотиків, який **відрізняється** тим, що щурам з питною водою вводять ксенобіотик купреніл в дозі 20 мг/кг маси тіла щурів протягом 55 діб (підряд протягом 5 днів, перерва 2 дні).

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601