

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МОРДОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.П. ОГАРЁВА»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Мазов Ян Алексеевич

**Эффективность топического применения солей N-ацетил-6-аминогексановой  
кислоты при повреждениях периодонта в эксперименте**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.1.7. Стоматология

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

Семелева Елена Владимировна

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

Васильев Юрий Леонидович

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ И СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПОРАЖЕНИЙ МАРГИНАЛЬНОГО И АПЕКАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТА. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	19
1.1 Противомикробная терапия периодонтита: проблема микробной резистентности .....	21
1.2 Инновационные терапевтические стратегии лечения заболеваний периодонта .....	23
1.2.1 Факторы вирулентности патогенов и фармакологические методы борьбы с ними.....	24
1.2.2 Компоненты клеточной поверхности как противовирулентная мишень против начальной инфекции .....	25
1.2.3 Воздействие на лейкотоксины.....	26
1.2.4 Ферментативные факторы вирулентности и их антагонисты.....	27
1.2.5 Ингибирование биопленок.....	29
1.3 Механизмы генетической регуляции «Quorum sensing» и «quorum quenching» в реализации патологии периодонта.....	30
1.4 Модуляция иммунной системы и воспаления как перспективный терапевтический подход в лечении заболеваний периодонта .....	32
1.5 Замещение микробиоты как эффективный путь лечения заболеваний периодонта.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Общая характеристика дизайна и плана экспериментального исследования...	41
2.2 Нормативные и этические аспекты выполнения экспериментально- лабораторного исследования .....	44
2.3 Характеристика исследуемых в работе фармакологических веществ, лекарственных форм .....	46

2.4 Основные сведения о лабораторных животных, характеристика экспериментальных групп .....	48
2.5 Метод воспроизведения лигатурного периодонтита верхнего второго моляра лабораторной крысы .....	51
2.6 Метод исследования состояния костной ткани зуба и альвеолярного отростка верхней челюсти .....	52
2.7 Метод патоморфологического исследования .....	53
2.8 Методы иммуногистохимического окрашивания препаратов.....	54
2.9 Метод иммунофлюоресценции .....	54
2.10 Метод количественного иммуноферментного анализа (ИФА) .....	55
2.11 Метод изучения местноанестезирующей активности .....	56
2.12 Метод определения амплитуды потенциала действия изолированного нерва.....	57
2.13 Метод определения проводимости изолированных натриевых каналов .....	58
2.14 Статистические методы обработки данных.....	60
ГЛАВА 3. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПРОГНОЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ .....	61
3.1 Прогнозирование фармакологических свойств некоторых соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты .....	61
3.2 Цитотоксические свойства диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17).....	69
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТОПИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ЛХТ-9-17 И ЛХТ-6-17 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИОДОНТИТЕ .....	72
4.1 Влияние соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на потерю костной ткани при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс.....	73
4.2 Влияние соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на микроструктуру альвеолярного отростка и тканей десны при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс .....	78

4.3 Влияние соединения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата на воспалительный процесс, активность оксидативного стресса и некоторые внутриклеточные маркеры при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс .....	81
ГЛАВА 5. МЕСТНОАНЕСТЕЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ ЛХТ-9-17 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ .....	89
5.1 Особенности течение инфраорбитальной анестезии лабораторной крысы на фоне экспериментального периодонтита .....	90
5.2 Некоторые механизмы развития местного обезболивающего эффекта диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединения ЛХТ-9-17).....	94
ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	98
6.1 Итоги выполнения диссертационной работы .....	112
6.2 Перспективы развития темы диссертационного исследования .....	113
ВЫВОДЫ .....	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Пародонтит – одно из основных хронических воспалительных заболеваний зубочелюстного аппарата, представляющее наиболее распространенную форму патологии костей у человека [1]. Установлено, что большинство взрослых страдают пародонтитом средней степени тяжести, при этом до 15% населения планеты страдают тяжелым генерализованным пародонтитом с развитием периодонтита и вовлечением костной ткани челюсти и зубов [2].

Для этого заболевания характерно наличие инфекционного фактора, приводящего к возникновению деструкции соединительных тканей, опосредованной локальной выработкой иммуновоспалительных маркеров в ответ на патогены и их продукты [3]. В результате клеточных ответов на пародонтопатогены в ткани десен или в жидкости десен были идентифицированы многочисленные про- и противовоспалительные медиаторы [4-6]. Показано, что среди медиаторов организма-хозяина, продуцируемых после распознавания микроорганизмов, провоспалительный цитокин интерлейкин (ИЛ)-1 играет важную роль в патогенезе периодонтита, поскольку он связан с миграцией воспалительных клеток и прогрессированием остеокластогенеза [7, 8]. В отличие от деструктивного механизма, в котором участвуют провоспалительные цитокины, регуляторные пути, опосредованные противовоспалительными медиаторами, такими как ИЛ-10, могут защищать ткани периодонта и пародонта. Было доказано, что мыши, полученные путем редактирования генома (ИЛ-10(-/-)) обладают повышенной восприимчивостью к потере альвеолярной кости, вызванной *P. gingivalis*, что указывает на роль ИЛ-10 в контроле деструктивного воспаления [9]. С топографической точки зрения прикрепительный аппарат делится на маргинальный, альвеолярный и апикальный периодонт. Так же как различия в структуре, различия в формах загрузки найдены в различных

сегментах. Восстановление вызывает различную нагрузку на естественный зуб и, следовательно, различные сегменты периодонта.

В этом контексте в многочисленных исследованиях в последние годы изучены перспективные стратегии модуляции иммунно-воспалительной реакции организма-хозяина, связанной с заболеваниями периодонта. В ряде доклинических и клинических исследований было показано, что как классические нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), так и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) способны модулировать иммунно-воспалительную реакцию организма человека [10-15]. Однако системное применение этих препаратов обычно связано с побочными эффектами, ухудшающими соблюдение пациентами режима их употребления [16]. Хотя местное применение НПВП и других противовоспалительных средств изучалось в некоторых исследованиях, многие из них выявили неудовлетворительные результаты в контроле воспаления при местном применении этих препаратов [17]. Кроме того, в последние годы были идентифицированы природные молекулы, которые способны как напрямую воздействовать на патогенные микроорганизмы, так и на ассоциированные процессы – образование биопленок, факторы вирулентности.

### **Степень разработанности темы исследования**

Производные N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащие в своей структуре ионы металлов, в частности, серебра и церия, а также различные органические заместители были разработаны и синтезированы совместно исследователями Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева и учеными Всесоюзного научного центра по безопасности биологически активных веществ [18].

В проведенных ранее исследованиях Пахомовым Д.В. и Мироновым М.А. было показано, что производные N-ацетил-6-аминогексановой кислоты обладают широким спектром фармакологического действия, в том числе активны по

сдерживанию воспалительных реакций, модулируют свободнорадикальные реакции, обладают ранозаживляющим эффектом [19, 20]. В этой связи было чрезвычайно интересно изучить терапевтические возможности топического применения двух новых оригинальных соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащих остатки 3-гидроксипиридина и диметилфенилацетамида (лидокаина) в своей структуре, при повреждении периодонта – экспериментальном лигатурном периодонтите у лабораторных крыс. Указанная модель стоматологической патологии была выбрана неслучайно – ввиду высокой распространенности социальной значимости воспалительного поражения периодонта, влияния патологического состояния на качество жизни пациентов.

Гипотеза настоящего исследования строилась на предположении о том, что топическое применение 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) вследствие ограничения воспалительной реакции и активации антиоксидантных механизмов позволит предотвратить вызванные патологическим процессом пародонта резорбцию костной ткани зуба и альвеолярного отростка, деструкцию окружающих мягких тканей, позволит оптимизировать реализацию местнообезболивающей активности амидных местных анестетиков.

### **Цели и задачи**

Определить терапевтический потенциал 3-гидроксипиридиновой и диметилацетамидной солей N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при их топическом применении в лечении экспериментального лигатурного периодонтита, а также установить некоторые механизмы действия соединений.

1. Провести внеэкспериментальное прогнозирование видов активности и спектра биологических мишеней 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-

аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17), а также изучить цитотоксичность субстанций в культуре фибробластов.

2. Изучить влияние топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в виде 2% геля на линейную и объемную потерю костной массы зуба и альвеолярного отростка при лигатурном периодонтите второго верхнего моляра у крыс.

3. Определить гистопатологические изменения ткани пародонта у животных с лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра на фоне топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в виде 2% геля.

4. Изучить особенности экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-K, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1), фактора подавления миграции макрофагов (MIF), фосфодиэстеразы Р13К, концентрации ИЛ-1бета и ФНОальфа в ткани пародонта у крыс с лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра на фоне топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17).

5. Исследовать местноанестезирующую активность диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) при дентальной инфраорбитальной анестезии крысы с лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра в виде 2% раствора.

6. Определить влияние диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,001 мкМ на проводимость одиночных натриевых каналов и проводимость нервного проводника при нормальных значениях рН и на фоне ацидоза.

## Научная новизна

Проведено комплексное исследование фармакологических свойств оригинальных веществ – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – в качестве потенциальных кандидатов в лекарственные средства для топического лечения периодонтита и оптимизации местноанестезирующего действия при воспалительно-деструктивном поражении периодонта.

При проведении внеэкспериментального скрининга «структура – активность» были впервые определены потенциальные мишени и виды активности, среди которых с высокой вероятностью – противовоспалительная и местноанестезирующая (ЛХТ-9-17). Впервые было установлено, что исследуемые вещества – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от от 0,0001 и до 1000 мкМ, при этом соединение ЛХТ-6-17 в концентрациях 100 мкМ и выше стимулирует пролиферацию фибробластов в клеточной культуре.

Показано, что на модели экспериментального лигатурного периодонтита верхнего второго моляра у лабораторных крыс 10-суточная местная аппликация 2% геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в качестве действующего вещества, приводит к предотвращению резорбции костной ткани как по линейному так и по волюметрическому показателю, при этом, наибольшей активностью обладает вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17).

При патоморфологическом исследовании препаратов верхней челюсти экспериментальных животных было установлено, что экспериментальная терапия в течение 10 суток с применением 2% геля, содержащего соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, уменьшала тяжесть течения патологического процесса, что выражалось в ограничении воспалительной реакции, сохранении костной основы зуба и альвеолярного отростка. Наибольший эффект установлен у

3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17): на фоне назначения содержащего его геля нейтрофильная инфильтрация тканей была минимально выражена, сохранялся цемент второго моляра и костная основа альвеолярного отростка, в меньшей степени, чем на фоне диметилацетамидной соли страдали окружающие патологический процесс мягкие ткани десны.

При изучении молекулярной основы установленного протекторного эффекта впервые показано, что 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) при топическом применении в виде 2% гидрогеля подавлял клеточную экспрессию матриксной металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-κВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, что свидетельствовало об ингибировании активности остеокластов, ограничивало активность свободнорадикальных процессов, что в совокупности со снижением тканевой концентрации провоспалительных ИЛ-1β и ФНО-α обосновывало наличие противовоспалительного эффекта в спектре действия вещества.

При инфраорбитальном однократном введении лабораторной крысе с экспериментальным пародонтитом и без такового диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) в виде 2% раствора обладает местноанестезирующим действием, которое характеризуется медленным развитием достаточной по глубине анестезии продолжительностью до 120 минут, и обусловлено в том числе ингибированием одиночных натриевых каналов и подавлением проводимости нервного проводника. Реализация местного обезболивающего эффекта соединения на фоне острого воспалительного процесса сдерживает формирование местноанестезирующего эффекта. Это проявляется как снижением глубины, так и продолжительности действия на 25%.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные научные результаты о цитотоксичности, спектре терапевтической активности и потенциальных биологических мишенях могут

быть использованы для расширения представлений о фармакологии производных N-ацетил-6-аминогексановой кислоты с органическими заместителями.

При проведении доклинических исследований кандидата в лекарственное средство из группы соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты необходимо учитывать полученные результаты о противовоспалительном, остеопротекторном и местноанестезирующем действии соединений ЛХТ-6-17 и ЛХТ-9-17.

Форма 2% геля может рассматриваться как перспективная лекарственная форма кандидата в лекарственное средство, содержащего диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) в качестве действующего вещества, для топического лечения местнораспространенного воспалительно-деструктивного процесса периодонта.

Настоящее экспериментальное лабораторное неклиническое исследование получило частичную финансовую поддержку гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых кандидатов наук, молодых докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3, при частичном научно-методическом сопровождении ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Основные положения и выводы диссертации используются в учебной работе (при чтении курса лекций и проведении практических занятий со студентами) кафедр фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, общественного здоровья и здравоохранения, стоматологии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (Саранск) и клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва), а также используются в научно-исследовательской работе (научного семинара)

лабораторий Центра доклинических исследований инновационных лекарственных средств медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (Саранск).

### **Методология и методы исследования**

Проведено экспериментально-лабораторное неклиническое исследование, методологической основой которого явились принципы единства и неделимости исследовательской концепции, целостность, комплексность и мультидисциплинарность методических подходов, включающих методы молекулярной и фундаментальной фармакологии и фармхимии, экспериментальной стоматологии, молекулярной биологии, патологической анатомии, биохимии и биофизики.

*In silico* прогнозированию спектра биологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) было проведено с помощью математических методов, заложенных в основу специального программного продукта – PASSonline.

Цитотоксические характеристики исследуемых соединений определяли путем оценки выживаемости клеток в культуре фибробластов человека с помощью калориметрического метода с использованием триметилфенилтетразолия хлорида.

В качестве базовой модели повреждения периодонта выбрали лабораторную модель экспериментального лигатурного периодонтита второго верхнего моляра у крыс-самцов линии Wistar. Каждая экспериментальная группа включала по 5 лабораторных животных. С помощью методов микроКТ определили влияние топического применения гелей, содержащих 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) на линейную потерю костной ткани при патологии и, по данным трехмерной реконструкции, - на объем костной массы / общий вес тканей. Также выполняли

микроморфологическое исследование тканей пародонта в области патологического процесса при окрашивании препаратов гематоксилином и эозином. Для количественной оценки степени повреждения тканей применяли специальную морфологическую шкалу.

Поскольку при изучении влияния соединений на морфологию и структуру кости и мягких тканей пародонта наибольший эффект был установлен у геля, содержащего 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17), молекулярный раздел работы по определению экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1) методом иммуногистохимии, экспрессии фактора подавления миграции макрофагов (MIF), фосфодиэстеразы Р3К методом иммунофлуоресценции, концентрации ИЛ-1бета и ФНОальфа методом количественного иммуноферментного анализа провели только для указанного соединения.

Местноанестезирующую активность диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) изучали на модели проводниковой инфраорбитальной анестезии нерва верхнего второго моляра лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового. В аспекте определения возможных механизмов локального обезболивающего воздействия соединения были проведены исследования *in vitro* по определению ионной проводимости изолированных натриевых каналов методом точечной фиксации потенциала на одиночных нейронах, выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) и на живых свежих препаратах седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*), помещенных в специальную перфузионную камеру, позволяющую при изменении рН перфузионного раствора воспроизводить условия, подобные воспалительной реакции.

Анализ и обобщение полученных экспериментальных результатов выполняли с помощью методов описательной и сравнительной статистики с применением пакета программ STATA 17.0.

### **Личный вклад автора**

Диссертант самостоятельно выдвинул научную гипотезу и сформулировал научный вопрос, в соответствии с которым лично автором были поставлены цель и задачи исследования. Автор лично на основе богатого реферативного материала написал литературный обзор, выбрал и определил методологическую основу работы. Автор лично выполнил внеэкспериментальное прогнозирование активности соединений и изучил их цитотоксичность. Автором было предложено в качестве базовой модели патологического процесса периодонта использовать модель лигатурного пародонтита у крыс. Лично автор выполнил все эксперименты на лабораторных крысах. Автором самостоятельно проводилось топическое применение гелей исследуемых соединений. Лично автор забирал ткани для исследования, осуществлял их консервацию, проводку. При непосредственном участии автора проводилась микроКТ с обработкой изображений и вычислением показателей. Автор погруженно участвовал в выполнении иммуногистохимического, иммунофлюоресцентного и иммуноферментного исследований. Автор самостоятельно выполнял изучение местного анестезирующего действия соединения ЛХТ9-17 и производил инфраорбитальные инфекции. При непосредственном и включенном участии автора выполнялись исследования на изолированных клетках и препаратах седалищного нерва. Автор лично проводил анализ полученных результатов, непосредственно и деятельно участвовал в написании научных публикаций. Лично подготовил настоящую рукопись и автореферат диссертации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. При внеэкспериментальном анализе структура – активность у диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) был выявлен широкий спектр биологических мишеней и видов действия, позволяющих в том числе, предполагать и противовоспалительную активность. Оба вещества не обладают цитотоксическим действием в отношении фибробластов человека в широком диапазоне концентраций.

2. Установлено, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) вследствие подавления тканевой экспрессии металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К ограничивают остеокластогенез и обеспечивают сохранение целостности костной ткани при лигатурном периодонтите второго верхнего моляра; ограничение на фоне их топического применения продукции MIF, в также провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНОальфа сопровождается развитием местного противовоспалительного и антирадикального эффекта.

3. Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) подавляет натриевый ток и ингибирует проведение импульса по нервному волокну, что, наряду с его умеренным цитопротекторным эффектом обуславливает наличие у вещества свойств местного анестетика.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, областям исследований по п. 3 «Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически

активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro, ex vivo u in vivo*», п.44. Исследование зависимости «структура–активность» в различных классах фармакологических веществ. Целенаправленный синтез и скрининг фармакологических веществ, п. 5. Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток и паспорту научной специальности 3.1.7. Стоматология п.3 Изучение проблем хирургической стоматологии с разработкой методов диагностики и лечения заболеваний челюстей и полости рта, п.8. 8. Экспериментальные исследования по изучению этиологии, патогенеза, лечения и профилактики основных стоматологических заболеваний.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность положений и выводов диссертации определяется тем следующим: 1) выбор базовой модели патологического состояния соответствует мировой практике неклинических исследований в фундаментальной фармакологии и экспериментальной стоматологии; 2) дизайн и протокол исследования прошли рассмотрение и признаны соответствующими этическим требованиям при работе с лабораторными животными; 3) экспериментальные группы составлены из животных одного вида, полученных из сертифицированного питомника и прошедших карантинизацию; 4) количество животных в группах позволяет получить репрезентативные результаты; 5) использованное лабораторное оборудование и расходные материалы, реактивы находились в надлежащем состоянии, сроки годности соответствовали установленным; 6) методы анализа результатов соответствовали современному уровню развития статистической науки.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном межучрежденческом заседании кафедр общественного здоровья и

организации здравоохранения, педиатрии, фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, стоматологии Медицинского института федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» и кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) протокол №1 от 9.10.2023.

Результаты проведенного диссертационного исследования обсуждались и докладывались на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Морфологические школы сегодня (Воронеж, 2022), XXIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2021), XXIV Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2022).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных журналов Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки Россия, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 5 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer (из них 1-обзорная), получен 1 патент на изобретение РФ.

## **Структура и объём диссертации**

Диссертация написана по традиционному плану, имеет четкую структуру, включающую введение; первую главу – литературный обзор; вторую главу с описанием материалов и методов исследования; третьей, четвертой и пятой глав с описанием результатов исследования; шестой главы заключения, обобщающей и критически анализирующей полученные результаты; выводов; практических рекомендаций; списка сокращений и условных обозначений; списка литературы.

Диссертация изложена на 139 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 17 рисунками и 3 таблицами. Список литературы содержит выходные данные 200 работ, из которых 11 работ отечественных и 189 – зарубежных авторов.

# **ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ И СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПОРАЖЕНИЙ МАРГИНАЛЬНОГО И АПЕКАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТА. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

Заболевания апикального пародонта — одно из наиболее распространенных хронических воспалительных заболеваний человека, которым страдают до 90% населения планеты [21, 22]. Это патологический процесс, поражающий краевой, маргинальный периодонт и, в том числе распространяется на костные структуры челюсти, альвеолярный и верхушки корня зуба, апикальный. Необратимые изменения в маргинальном периодонте, как правило, начинаются с воспалительных изменений в десне с достаточно быстрым вовлечением в патологический процесс связочного аппарата зуба. Пародонт – это общий термин, используемый для описания заболеваний, в основе которых лежит повреждение тканей пародонта, поддерживающих зуб, включая десну, периодонтальную связку, цемент и альвеолярную кость.

Согласно рекомендациям Американской (AAP) и Европейской (EFP) федераций пародонтологии, заболевания и состояния маргинального периодонта классифицируются на следующие категории: здоровый пародонт, заболевания и состояния десен; пародонтит; и другие состояния, влияющие на связочный аппарат. В зависимости от тяжести и сложности заболевания маргинального периодонта можно разделить на I-IV стадии [23, 24]. Наиболее распространенными формами заболеваний маргинального периодонта являются гингивит и пародонтит. Эти состояния связаны с группой оральных патогенов, которые могут образовывать биопленки на поверхности зубов и в пародонтальном кармане и вызывать развитие воспалительной реакции хозяина [23].

Гингивит, вызванный дентальной биопленкой, включает накопление биофильма и клинически характеризуется отеком, покраснением и кровоточивостью десневого края [23,25]. У больных гингивитом альвеолярная

кость и периодонтальные связки не повреждаются [23,26]. Напротив, маргинальный периодонтит или пародонтит характеризуется разрушением альвеолярной кости и периодонтальных связок [23,25]. Клинические проявления пародонтита включают пародонтальный карман, идеальное место для колонизации бактерий [23, 27].

К основным возбудителям воспаления в ротовой полости, способствующим инициированию и прогрессированию пародонтита, пародонтопатогенам, относятся *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*. Эти бактерии известны как красный комплекс, поскольку они обнаруживаются вместе в пародонтальных карманах, где очевидно наблюдается обширное повреждение тканей маргинального периодонта [23,28]. Другие бактерии, ассоциированные с пародонтитом, включают *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Prevotella intermedia* [23,29]. Помимо патогенных бактерий, на прогрессирование заболевания влияют факторы риска, специфичные для хозяина и окружающей среды.

Физическая элиминация биопленок и зубных отложений путем удаления зубного камня были наиболее широко используемыми клиническими вариантами лечения воспалительных заболеваний пародонта [23,30]. Хотя гингивит, вызванный зубной биопленкой, можно ликвидировать путем улучшения гигиены полости рта и удаления наддесневого зубного камня, хирургические процедуры на пародонте проводятся при более тяжелых стадиях, сопровождающихся деструкцией кортикальной пластинки и формированием пародонтальных карманов.

Антимикробные препараты, такие как хлоргексидин и системно вводимые антибиотики, иногда используются в сочетании с хирургическим лечением заболеваний пародонта. Наиболее часто используемые системные антибиотики и синтетические противомикробные средства включают амоксициллин или метронидазол и доксициклин пролонгированного действия. Антимикробные средства часто назначают пациентам в профилактических целях после инвазивных операций на пародонте. Однако, в соответствии с современной тенденцией увеличения устойчивости к противомикробным препаратам у

патогенов человека, в последние годы возросла устойчивость к антибиотикам среди пациентов с заболеваниями пародонта [31]. Уникальная пародонтальная среда образование биопленок делает эти бактерии менее чувствительными к антибиотикам [32]. Профессиональное сообщество столкнулось с рядом современных вызовов и пришло к выводу о том, что для лечения заболеваний пародонта в настоящее время необходимы новые терапевтические стратегии.

В последние годы появилось несколько новых подходов к лечению и профилактике заболеваний пародонта благодаря прогрессу в понимании бактериального и небактериального патогенеза, микробиома человека и взаимодействия хозяин – микроорганизм. Современные стратегии включают: противовирусную терапию, которая направлена на нейтрализацию вирулентных свойств пародонтальных патогенов, представляя собой многообещающую альтернативу лечению противомикробным препаратами [23,33]. Иммунная модуляция организма-хозяина с помощью фитосоединений и подходы, основанные на микробиоме, такие как замена микробиоты полости рта, являются перспективными новыми разработками в области лечения и профилактики заболеваний пародонта.

### **1.1 Противомикробная терапия периодонтита: проблема микробной резистентности**

Антибиотики и синтетические противомикробные средства используются для лечения инфекций полости рта и назначаются в определенных случаях с профилактической целью во время внутриротовых процедур, когда ожидается возникновение бактериемии [34]. Местная доставка означает, что антимикробные препараты вводятся непосредственно в пораженный пародонтальный карман, а антибиотики для системной доставки обычно вводятся перорально.

Устойчивость пародонтопатогенов к противомикробным препаратам вызывает растущую обеспокоенность во всем мире. Бактериальные патогены становятся устойчивыми к антибиотикам посредством нескольких центральных

механизмов, включая деградацию антибиотиков, изменение мишеней антибиотиков и активный вывод лекарств из клетки [23,35].

Патогены приобретают устойчивость к антибиотикам, содержащим  $\beta$ -лактамное кольцо, за счет продукции  $\beta$ -лактамаз, которые могут разрушать или модифицировать  $\beta$ -лактамные антибиотики [36]. Исследования показали продукцию  $\beta$ -лактамаз патогенами пародонта, включая виды *Porphyromonas*, *Prevotella* и *Fusobacterium* [23,37]. Для *P. gingivalis* уровень продукции  $\beta$ -лактамаз (на основе амоксициллина) в клинических изолятах составляет около 7,6% [38]. Woker и др. сообщили, что из 406 образцов, взятых из десневой жидкости пациентов с заболеваниями пародонта, свойство продуцировать  $\beta$ -лактамазы было обнаружено у 64% возбудителей пациентов с пародонтитом [39].  $\beta$ -лактамазы часто обнаруживаются в пародонтальных карманах глубиной более 3 мм [39]. Ферес и др. продемонстрировали, что виды бактерий из поддесневых очагов показали устойчивость к метронидазолу и амоксицилину [23,40]. Сообщалось, что 21,6% изолятов *P. gingivalis* у пациентов с пародонтитом были устойчивы к метронидазолу [23,41]. Сообщалось также о различных уровнях устойчивости к антибиотикам у *A. actinomycetemcomitans* в зависимости от географического распространения [23,42].

Известно, что ген *tet* отвечает за устойчивость к тетрациклину. Большинство *tet*-генов произошли от пародонтальных патогенов, таких как *P. gingivalis* и *F. nucleatum* [43]. Процент устойчивых к тетрациклину изолятов среди бактерий, ассоциированных с зубными очагами, высок у детей из Южной Азии и Японии [44]. Сообщалось также об изолятах *T. denticola*, устойчивых к тетрациклину [45]. Устойчивость к тетрациклину является частым сопутствующим маркером среди устойчивых к пенициллину видов микробов перорального происхождения [46]. Устойчивость к эритромицину обычно возникает вследствие приобретения двух значимых генов: *ermF* и *erm*. Основные пародонтальные бактерии, такие как *T. forsythia* и *P. gingivalis*, могут нести гены устойчивости как к *erm*, так и к *tet* [23,47]. Устойчивость к клиндамицину

демонстрирует высокую распространенность среди пародонтальных изолятов *F. nucleatum* (36%), *P. gingivalis* (23%) и *Prevotella melaninogenica* (22%) [42].

Бактерии, связанные с заболеваниями пародонта, естественным образом образуют биопленки. Образование биопленок также способствует устойчивости антибиотиков к пародонтальным возбудителям. Исследования продемонстрировали повышенный обмен генами, кодирующими устойчивость к антибиотикам, в биопленках [48], что вызывает распространение устойчивости к антибиотикам среди видов пародонтальных бактерий [23,49].

Матрикс биопленок обычно включает внеклеточные полимерные вещества, которые препятствуют диссеминации антибиотиков в бактериальные биопленки [50]. Организованная структура биопленок и ее матрикса также обеспечивает ингибирование диффузионно-реакционных реакций на антибиотики, что приводит к толерантности к антибиотикам. Сублетальные концентрации антибиотиков в биопленках также могут приводить к селекции лекарственной устойчивости [51]. Медленный рост некоторых бактериальных клеток в биофильмах и наличие клеток-персистеров являются основными факторами, способствующими снижению чувствительности биопленок к антибиотикам. Сообщалось, что бактериальные клетки в биопленке могут быть в 1000 раз более устойчивыми к антибиотикам, чем планктонные клетки [23,52].

## **1.2 Инновационные терапевтические стратегии лечения заболеваний пародонта**

В связи с растущей устойчивостью пародонтопатогенов к антибиотикам основная цель противовоспалительной терапии в последние годы сместилась на восстановление гомеостаза в микробиоте полости рта и ее гармоничном балансе с тканями пародонта хозяина. Такой сдвиг в цели лечения и проблема лекарственной устойчивости требуют альтернативных подходов к традиционной терапии антибиотиками, которые неселективно уничтожают резидентные комменсальные или патогенные бактерии.

Пародонтальные патогены используют факторы вирулентности, чтобы инициировать заболевание пародонта и способствовать его прогрессированию. Перспективной альтернативой антибиотикотерапии является воздействие на факторы вирулентности патогенных бактерий и их регуляторные системы, контролирующие патогенность [23,33]. Такой подход направлен на ингибирование бактериальных факторов вирулентности и, таким образом, на предотвращение воздействия вредных бактериальных патогенов на хозяина и снижение вызванного патогеном иммунного ответа хозяина, уменьшая повреждение тканей хозяина. Агенты с антивирулентными свойствами потенциально могут остановить патогенную активность пародонтальных бактерий [53, 54], лишив их способности вызывать заболевания пародонта. Также могут быть разработаны стратегии воздействия на биопленки, поскольку формирование биопленок пародонтальными бактериями вызывает устойчивость к антибиотикам и позволяет им уклоняться от иммунных ответов хозяина [55, 56]. Поскольку воспалительная реакция хозяина играет жизненно важную роль в заболеваниях пародонта, модуляторы врожденного иммунитета хозяина являются еще одной многообещающей стратегией борьбы с заболеваниями пародонта. Новая заместительная терапия пероральной микробиоты, ставшая результатом последних достижений в исследованиях микробиома человека, потенциально может стать альтернативной мерой профилактики и лечения.

### **1.2.1 Факторы вирулентности патогенов и фармакологические методы борьбы с ними**

Факторы вирулентности — это либо клеточные компоненты, либо секретируемые продукты патогена, которые позволяют патогену проникать в хозяина, уклоняться от иммунного ответа хозяина или вызывать повреждение хозяина. В последнее время было исследовано несколько терапевтических подходов, нацеленных на критические факторы вирулентности для разрушения патогенных процессов пародонтальных бактерий.

### 1.2.2 Компоненты клеточной поверхности как противовирусная мишень против начальной инфекции

Капсулы необходимы для прикрепления микробов к поверхности тканей хозяина, что является первым шагом в развитии бактериальных инфекций.

Совместная агрегация *P. gingivalis* и *F. nucleatum* в поддесневой бляшке опосредуется капсульным полисахаридом и липополисахаридом [23, 58]. Повышенная инкапсуляция хорошо коррелирует с повышенным уклонением от фагоцитоза и снижением иммунного ответа хозяина [59]. Капсулярный полисахарид *Actinobacillus actinomycetemcomitans* усиливает экспрессию интерлейкина (ИЛ)-1 $\beta$  путем активации пути JNK в макрофагах. Повышенный уровень ИЛ-1 $\beta$  приводит к воспалению и резорбции кости. Такие результаты подтверждают возможную терапевтическую стратегию борьбы с этим пародонтальным патогеном путем воздействия на его капсулу [60]. ИЛ-1 $\beta$  также может быть ассоциирован с утяжелением заболевания пародонта, поскольку он способствует патологии пародонта и выработке протеиназы, которая может способствовать разрушению тканей пародонта [61].

Природные соединения, альфа-мангостин и экстракты проантоцианидина виноградных косточек, могут ингибировать повреждающее действие липополисахарида [15]. Кроме того, растворимая пленка альфа-мангостина проявляла антимикробную и противовоспалительную активность в отношении пародонтопатогенов, особенно *P. gingivalis* [62]. Виноградные косточки содержат проантоцианидин, который помогает замедлить прогрессирование заболеваний пародонта за счет ингибирования внеклеточной коллагеназы [63].

$\alpha$ -Токоферол снижает количество воспалительных цитокинов, одновременно увеличивая количество антимикробных пептидов и  $\beta$ -дефензинов, которые могут модулировать иммунный ответ и противодействовать вредному воздействию липополисахарида [64, 65]. Торментовая кислота может быть потенциальным терапевтическим средством против заболеваний пародонта,

поскольку она ингибирует продукцию ИЛ-6 и ИЛ-8 в фибробластах десен человека [15, 66].

Фимбрии — это белковые выросты, которые локализуются на внешней мембране бактерий и помогают микробам прикрепляться к поверхности клеток-хозяев и другим микробным поверхностям. *P. gingivalis* обладает двумя антигенно различными субъединицами фимбрий: FimA и Mfa1. FimA обнаружен в коротких фимбриях, а Mfa1 — в длинных фимбриях [15]. Иммунизация очищенным фимбриальным белком массой 43 кДа обеспечивает защиту от повреждения пародонта, вызванного *P. gingivalis*, на модели стерильных крыс [67]. В недавнем исследовании Alaei et al. Было показано, что пептиды, происходящие из консервативных С-концевых субъединиц FimA и Mfa1, предотвращают сборку компонентов фимбрий *P. gingivalis* и препятствуют образованию биопленок. Исследование также показало, что обработка этими пептидами снижает адгезию *P. gingivalis* к *Streptococcus gordonii* в двухвидовой модели [23,68].

### 1.2.3 Воздействие на лейкотоксины

Токсины играют важную роль в патогенезе заболеваний пародонто- и периодонта. Грамотрицательные бактерии *A. actinomycetemcomitans*, связанные с заболеваниями пародонта, продуцируют лейкотоксин (LtxA) во время колонизации в организме хозяина, чтобы избежать иммунного ответа хозяина [69]. Еще одним токсином, продуцируемым этими бактериями, является цитолетальный расширяющий токсин (CDT). Оба токсина играют роль в нарушении иммунной системы хозяина, воздействуя на различные клетки [70]. LtxA является критическим фактором вирулентности *A. actinomycetemcomitans*, который убивает лейкоциты путем узнавания холестерина и  $\beta$ 2-цепей интегрина антигена-1, ассоциированного с функцией лимфоцитов (LFA-1) [71]. Повышенная устойчивость *A. actinomycetemcomitans* к антибиотикам требует разработки альтернативных методов лечения [72]. Сообщалось, что небольшие синтетические рецептор-специфичные пептиды могут препятствовать LtxA-опосредованной

цитотоксичности путем связывания с  $\beta$ -доменом трансмембранного белка LFA-1 [73]. Исследования показали, что воздействие на факторы вирулентности, такие как LtxA, может эффективно предотвращать заболевания пародонта [23,74, 75]. Катехины, один из классов флавоноидов, могут ингибировать активность LtxA в растворимой форме и в форме, связанной с везикулами внешней мембраны (OMV) [76]. В то же время Чанг и др. показали, что катехины реструктурируют растворимую форму LtxA, что предотвращает его взаимодействие с холестерином на поверхности клетки-хозяина [69].

#### **1.2.4 Ферментативные факторы вирулентности и их антагонисты**

Протеазы, включая гингипаины, аминопептидазы IV и коллагеназы, играют роль в бактериальной адгезии, деградации белков хозяина (таких как иммуноглобулины), модуляции воспалительных реакций и повреждении тканей организма-хозяина [77]. Таким образом, ограничение функциональности этих важнейших факторов вирулентности будет коллективно подавлять патогенность микробов.

Микробные протеазы играют решающую роль в прогрессировании заболеваний пародонта, напрямую повреждая ткани хозяина или косвенно активируя множество протеаз хозяина и инактивируя ингибиторы протеаз в организме хозяина [23,57]. Внеклеточные протеазы можно разделить на следующие группы: аспарагиновые протеазы, цистеиновые протеазы, сериновые протеазы и металлопротеазы [57]. Микробные протеазы могут служить важными терапевтическими мишенями при лечении заболеваний пародонта. Ингибиторы микробных протеаз могут предотвратить инфекцию. Эти ингибиторы могут быть неорганическими или синтетическими агентами или модифицированными «продуктами-хозяевами» [57]. Слюнной гистатин представляет собой пептид с антипротеазной активностью против многих протеаз, участвующих в заболеваниях пародонта. Гистатин доставлялся под десну для лечения инфекций [78, 79]. Другие неорганические или синтетические ингибиторы протеаз, включая

хелаторы, такие как этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), которые ингибируют металлопротеиназы, и тиол-блокирующие агенты, которые ингибируют сериновые и цистеиновые протеазы, являются потенциальными агентами для ингибирования патогенности пародонтальных патогенов [23,57].

Представители семейства цистеиновых протеиназ *P. gingivalis* называются «трипсиноподобными ферментами», поскольку они расщивают остаток аргинина или лизина на С-конце полипептида [15,23]. Эти ферменты известны под общим названием гингипаины, которые могут быть одного из двух типов: 1) специфичные для аргинина, включающие RgpA, RgpB, и 2) специфичные для лизина, известные как KgpA [57]. Гингипаины гидролизуют широкий спектр внеклеточных и клеточных белков, кодируемых *P. gingivalis* [80].

На мышинной модели лечение *P. gingivalis* до заражения Kgp-специфичным ингибитором (A71561), разработанным Curtis et al. значительно снижал вирулентность *P. gingivalis*. Напротив, Rgp-специфичный ингибитор лейпептин не влиял на патогенность [81]. Установлено, что лейпептин способен ослаблять деградацию антимикробного пептида (LL-37), подавлять агрегацию тромбоцитов, предотвращать ингибирование хемоаттрактантных белков моноцитов, вызываемое аргинин-специфичными гингипаинами. Соединение также предотвращает разрушение коллагенов и восстанавливает уровень ИЛ-2 [23,82].

Сообщалось, что соединение из корней ревеня, называемое реином, может вызывать подавление обоих генов, rgpA и kgp, у *P. gingivalis* при синергическом сочетании с полифенолами [83]. Другой двойной ингибитор протеаз, имеющий синтетическую природу, КУТ-41, может ингибировать протеазы rgpA и kgp и проявлять противовоспалительный ответ [84]. Недавние исследования показали, что синтетическая молекула 2-дезоксиде-2,3-дидегидро-N-ацетилнейраминавая кислота, широко известная как DANA, помогает ингибировать рост и образование биопленки *P. gingivalis* за счет снижения активности гингипаинов на модели *in vivo* [23,85].

Основной компонент черного чая, теофлавин, оказывает двойное воздействие на экспрессию генов и каталитическую активность этих протеаз.

Теофлавин не только подавляет экспрессию генов протеаз *rgpA* и *kgp* на суб-МПС, но также дозозависимо ингибирует гидролитическую активность гингипаинов [86, 87]. Фракции полифенолов клюквы ингибировали активность *rgpA* и *kgp* у *P. gingivalis* в концентрации 1 мкг/мл [88]. Макрокарпалы, обнаруженные в листьях глобул эвкалипта, дозозависимо ингибировали как Arg-, так и Lys-специфичные гингипаины у *P. gingivalis* [89].

### 1.2.5 Ингибирование биопленок

Формирование дентальной биопленки в наддесневой и поддесневой областях необходимо для развития кариеса зубов, пародонтита и периодонтита [90]. Бактерии в биопленках проявляют повышенную устойчивость к антимикробной терапии по сравнению с планктонными микробами. Биопленки трудно лечить с помощью антибиотиков по нескольким причинам, включая снижение проникновения антибиотиков к микробам в биопленках, усиление экспрессии множественных эффлюксных насосов, снижение роста и метаболизма, индукцию микробной реакции на стресс и изменения в экспрессии белков внешней мембраны [90]. Недавние рандомизированные клинические исследования показали, что управляемая биопленочная терапия в сочетании с использованием порошка эритрита и ультразвукового пьезоэлектрического аппарата эффективна против биопленок при заболеваниях пародонта [23,91]. Кроме того, было показано, что некоторые лекарственные травы и растительные соединения ингибируют образование биопленок и уменьшают воспаление; поэтому они изучались как потенциальные средства лечения заболеваний полости рта, включая пародонтит и периодонтит [92].

Показано, что оксиресвератол или транс-2,4,3',5'-тетрагидроксистильтбен, основной биоактивный элемент тропического дерева *Artocarpus lakoocha*, обладает антиоксидантными свойствами [93]. Это соединение нарушает целостность клеточной стенки бактерий и предотвращает рост и образование биопленки пародонтального патогена *A. actinomycetemcomitans* [94].

Пандуратин А, природное соединение, обнаруженное в *Kaempferia pandurate*, обладает антибиопленочной и бактерицидной активностью [95]. Эпигаллокатехин галлат (EGCG), полифенол, содержащийся в зеленом чае, обладает сильными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [96]. Это соединение представляет собой производное катехина с присоединенной галлоильной группой, которая прерывает адгезию пародонтальных бактерий к месту инфекции [97]. Исследования показали, что галлат эпигаллокатехина может значительно ингибировать образование биопленок значимого пародонтального патогена *P. gingivalis* [98].

Экстракт клюквы, содержащий биоактивные соединения, такие как ликокальхон А и проантоцианидины, также демонстрирует многообещающие преимущества против гингивита за счет уменьшения воспаления, образования биопленок и ингибирования протеолитической активности пародонтальных патогенов [99, 100]. Экстракт граната препятствует передаче сигналов кворума, что приводит к разрушению биопленок и нарушению подвижности бактерий [101]. Кроме того, экстракт граната, богатый флавоноидами, уменьшает воспаление за счет снижения окислительного стресса и вмешательства в активность NF-κB [102].

### **1.3 Механизмы генетической регуляции «Quorum sensing» и «quorum quenching» в реализации патологии периодонта**

Бактериальная коммуникация играет жизненно важную роль в успешном установлении процесса заражения организма-хозяина [103]. Связь между биопленками полости рта была продемонстрирована в многочисленных исследованиях. Чувство кворума (QS) — наиболее распространенная и изученная бактериальная коммуникация, которая помогает бактериям пародонта взаимодействовать друг с другом посредством сигнальных молекул и координации поведения [23,104]. Экспрессия и передача сигналов гена QS в основном ограничены пародонтальными патогенами, включая *P. gingivalis* и *A.*

*actinomycetemcomitans*, выделенными от пациентов с заболеваниями, связанными с зубными биопленками [105].

*P. gingivalis* использует сигнальные молекулы для межвидового взаимодействия, чтобы способствовать микробному дисбактериозу, который приводит к заболеваниям пародонта [106]. Таким образом, воздействие на эти сигнальные пути служит новым способом профилактики заболеваний пародонта [106]. Исследование, проведенное Azakami et al. показало, что гомологичный ген *luxS* (необходимый для синтеза аутоиндукторов-2), обнаруженный у других пародонтальных патогенов, *P. intermedia* и *F. nucleatum*, а также у *Eikenella corrodens*, инициирует образование биопленок в полости рта посредством *LuxS*-зависимого пути [107]. *A. actinomycetemcomitans* также может образовывать зрелую биопленку посредством аутоиндуктора-2-зависимого определения кворума [108]. Опосредованный QS, такой как *Aliivibrio fischeri*, не был зарегистрирован у пародонтальных патогенов [23,105].

В последние годы внимание уделяется разработке препаратов, которые могли бы ингибировать чувство кворума. Подавление кворума, широко известное как ингибирование сигнального пути восприятия кворума, может быть привлекательным решением для воздействия на пародонтальные бактерии путем разрушения бактериальной коммуникации, критического аспекта формирования биопленки и экспрессии фактора вирулентности [109, 110]. Планчак и др. обнаружили встречающиеся в природе ингибирующие соединения и синтетические производные, которые классифицируются на основе их структурных свойств кворума [108]. Исследования показали, что *Delisea pulchra*, морская водоросль, производит различные компоненты для подавления кворума. Также этим свойством обладают в разной степени экстракт ванили, чеснок, галогенированные фураноны. Эти соединения обладают свойствами подавления кворума, которые помогают блокировать выделение кворума у пародонтальных патогенов [111–114]. Сообщалось, что добавление производных рибозы в культуральную среду отрицательно влияет на образование биопленок у *A. actinomycetemcomitans* [115].

Сходными функциональными свойствами обладают рибозосвязывающий белок и аутоиндуктор-2; рибозосвязывающий белок действует как антагонист рецепторов аутоиндуктора-2 [115]. Бромированные фураноны оказывают негативное влияние на биопленки *P. gingivalis*, хотя и не влияют на рост *P. gingivalis* [114]. Исследования показали, что ацилаза, лактоназа и оксиредуктаза являются потенциальными агентами подавления кворума, которые инактивируют ацил-гомосерин-лактон, потенциально воздействуя на пародонтальные патогены [116]. Таким образом, ингибирование аутоиндуктора-2 является привлекательной мишенью терапевтического вмешательства для лечения заболеваний пародонта.

#### **1.4 Модуляция иммунной системы и воспаления как перспективный терапевтический подход в лечении заболеваний пародонта**

В последнее время большое внимание уделяется иммуномодулирующей терапии, регулирующей иммунный ответ. Иммуномодулирующая терапия является перспективным вариантом лечения заболеваний пародонта [117]. Иммуномодуляторы помогают уменьшить потерю костной массы, контролируя остеолитический и воспалительный процесс [118], предотвращая или препятствуя прогрессированию заболеваний пародонта.

Иммунное микроокружение тканей, связанных с периодонтитом, имеет решающее значение для заболеваний пародонта. Повышенная инфильтрация лейкоцитов и высвобождение воспалительных молекул могут эффективно устранить воспаление. Однако чрезмерная амплитуда этой воспалительной реакции может нанести серьезный вред тканям пародонта и альвеолярной кости. Модуляция этой микросреды может не только дополнять традиционные методы лечения заболеваний пародонта, но также может способствовать регенерации пародонта [117]. Для модуляции лейкоцитов и других воспалительных цитокинов в микроокружении были предприняты различные подходы, включая иммуномодулирующую лекарственную терапию, терапию стволовыми клетками и генную терапию.

Среди лейкоцитов значительную роль на различных стадиях периодонтита играют макрофаги [119]. Нейтрофилы являются ключевыми игроками в поддержании гомеостаза здоровья пародонта и считаются первой линией защиты от пародонтита [118, 120, 121]. Моноциты также вносят вклад в защитную систему, и моноцитарные клетки присутствуют в большем количестве на промежуточной стадии заболеваний пародонта [122]. В то же время Т-лимфоциты могут играть жизненно важную роль в здоровье десен и резорбции альвеолярной кости [123–125].

Медикаментозная терапия, направленная на иммунный ответ, перспективна для лечения заболеваний пародонта. Ресвератрол является природным полифенолом и может ингибировать активацию NF- $\kappa$ B в макрофагах, а также оказывает иммуномодулирующее действие на *F. nucleatum* за счет активации антиоксидантного пути [126, 127].

Метформин может ингибировать выработку синтазы оксида азота в моноцитах, влияя на периодонтит [128]. Метформин уменьшает воспаление за счет регуляции ИЛ-1 $\beta$  [129]. Катехин – еще один полифенол, используемый в качестве иммуномодулятора. На модели мышей катехин эффективен против гингивита за счет снижения уровня ИЛ-1 $\beta$  в макрофагах [130]. Гликлазид обладает антиоксидантными свойствами и может уменьшать инфильтрацию нейтрофилов и макрофагов, как показано на крысиной модели с заболеванием пародонта [131]. Более того, он может уменьшить воспаление за счет снижения уровня TNF- $\alpha$  [131].

Недавние исследования показали, что куркумин может выделять провоспалительные молекулы, которые эффективны против пародонтальных патогенов [132]. СМС2.24 представляет собой модифицированную версию куркумина, которая снижает фагоцитарную активность макрофагов, а его противовоспалительные свойства были показаны при заболеваниях пародонта [133, 134].

Транскоричный альдегид также используется в качестве препарата для лечения *A. actinomycetemcomitans*, который включает подавление цитокинов

ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  [135]. Кава-205Ме снижает уровень IFN- $\gamma$  и ИЛ-12 и эффективен против *P. gingivalis*. Другая лекарственная терапия включает препараты карнозиновой кислоты, глибурида и висмута, которые проявляют свою иммуномодуляцию за счет проникновения в воспалительные клетки и снижения количества провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  [136, 137].

Генная терапия, связанная с иммунитетом, — еще один новый подход, направленный на иммунитет хозяина. Было показано, что снижение уровня кДНК7 Т-клеточного иммунного ответа (TIRC7) приводит к снижению количества Т-клеток в ткани десны, что влияет на заболевания пародонта [138]. Было показано, что плазмидная ДНК, кодирующая миР-200с, инъецированная в десну, предотвращает воспаление десен [139]. Катепсин-К (Ctsk) может уменьшать воспаление и активность остеокластов за счет снижения уровня ФНО- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-12, регулируя тем самым здоровье пародонта [140]. Рецептор P2X7 (P2X7R) может модифицировать локальное микроокружение пародонтита и улучшать регенерацию костной ткани [141]. Механизм действия рецептора ФНО и иммуноглобулина Fc (TNFR: Fc) включает инфильтрацию лейкоцитов и снижение цитокинов, особенно ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-10 [142].

Терапия стволовыми клетками имеет значительный потенциал для воздействия на здоровье пародонта. Различные мезенхимальные стволовые клетки могут модулировать микроокружение в сочетании с воспалительной реакцией лейкоцитов и цитокинов, связанных с заболеваниями пародонта. Эти стволовые клетки исследуются как многообещающее терапевтическое средство при заболеваниях пародонта. Стволовые клетки периодонтальной связки (PDLSC) могут взаимодействовать с иммунными клетками, модулируя их активность и, таким образом, работать в качестве потенциального терапевтического подхода для лечения заболеваний пародонта [143]. PDLSc может усиливать регенерацию тканей путем преобразования макрофагов в противовоспалительные фенотипы и подавлять иммунный ответ путем инактивации В-клеток [144, 145]. PDLSc может быть резко повышен при лечении ресвератролом. У пациентов с пародонтом

лечение ресвератролом частично уменьшает потерю костной массы и ингибирует инфильтрацию Т-клеток [146]. Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из десны (GMSC), способствуют поляризации макрофагов M1 и M2, снижают инфильтрацию нейтрофилов и уменьшают количество провоспалительных цитокинов [147-149].

Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из расслаившихся временных зубов человека, показали снижение уровней ФНО- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и ИЛ-2 и способствовали противовоспалительному ответу в макрофагах [150, 151]. Стволовые клетки зубного фолликула (DFSC) регулируют мононуклеарные клетки периферической крови, повышая уровни ИЛ-10, но снижая уровни IFN- $\gamma$  и ИЛ-4, и, таким образом, могут играть важную роль в качестве иммуномодуляторов в лечении заболеваний пародонта [152, 153]. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и стволовые клетки пульпы зуба (DPSCs) снижают уровень ФНО- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и ИЛ-17 у пародонтальных патогенов [151, 154, 155]. Кроме того, DPSC могут стимулировать регенерацию различных тканей, включая кость, и эти клетки легко хранить [156]. Таким образом, этим подходам уделяется большое внимание при лечении заболеваний периодонта.

Низкие дозы антибиотиков представляют собой еще одну группу агентов, которые могут модулировать иммунный ответ хозяина, потенциально способствуя прогрессированию или разрешению заболеваний пародонта. Доксициклин в низких дозах, то есть в субингибирующих концентрациях, подавляет активность матриксной металлопротеиназы-8 (ММП-8), которая в избытке присутствует при пародонтите [157]. В своем пилотном исследовании Ryan et al. исследовали химически модифицированный тетрациклин-3 у пациентов с пародонтитом, которым проводилось удаление зубного камня. Введение этого противомикробного препарата в низкой дозе (10 мг/сут) умеренно снижало уровни интерлейкина-1-бета и матриксной металлопротеиназы-8 в жидкости десневой борозды [158]. Несколько других исследований показали снижение глубины кармана (PD) и увеличение уровня клинической привязанности (CAL) у пациентов с заболеваниями пародонта при назначении

субантимикробной дозы доксициклина [159, 160]. Также исследования репортировали значительное улучшение клинических параметров и уменьшение воспаления десен у пациента [159, 161, 162].

### **1.5 Замещение микробиоты как эффективный путь лечения заболеваний пародонта**

В отличие от традиционного взгляда на отдельные патогены, ответственные за возникновение заболевания, новый взгляд на заболевания пародонта предполагает, что переход от состояния здоровья к состоянию заболевания объясняется сдвигом в глобальном балансе микробной флоры (т.е. нарушением микробного гомеостаза). Заболевания пародонта считаются результатом нарушения микробного гомеостаза и микробно-опосредованного нарушения гомеостаза хозяина. Такая перспектива открыла новые пути лечения заболеваний пародонта, включая восстановление гомеостаза микробиоты, связанного со здоровьем пародонта.

Недавние исследования предложили пробиотическую терапию в полости рта для лечения заболеваний пародонта [163, 164]. Пробиотики помогают контролировать заболевание, предположительно, посредством иммунной модуляции и колонизационной устойчивости к патогенам. Выбор микробного штамма имеет решающее значение для результата лечения пробиотиками. Большинство выбранных пробиотиков были получены из кишечной микробиоты или ферментированных продуктов [165]. Недавние клинические исследования показали, что назначение пробиотиков улучшает бактериальный дисбиоз у пациентов с патологией пародонта [166]. Полезные бактерии создают существенный барьер против колонизации эндогенных и экзогенных патогенов [28]. Бактерии-антагонисты пробиотиков обладают потенциалом борьбы с бактериями пародонта [57]. Исследование Вана и др. показали, что клинические изоляты, собранные от здоровых пациентов, значительно ингибировали рост *P. intermedia* или *P. gingivalis*, который был высоким в образце больных пациентов

[167]. К таким изолятам, ингибирующим патогены, относятся *Bifidobacterium*, *Streptococcus* и *Actinomyces*. Было показано, что коммерчески доступные диетические пробиотики обладают более существенными ингибирующими свойствами в отношении бактерий периодонта [28]. Успешный подход к пародонтологической терапии характеризуется облегчением воспаления периодонта, которое связано с изменениями микрофлоры, и в этом аспекте пробиотическая терапия потенциально может играть роль [28, 168].

Исследование, сравнивающее распространенность пероральных лактобацилл у здоровых людей и пациентов с пародонтитом (хроническим), показало, что *Lactobacillus Fermentum* и *Lactobacillus gasseri* были наиболее распространенными видами у здоровых людей. Напротив, *Lactobacillus plantarum* был наиболее распространенным видом у пациентов с пародонтитом [169]. Кроме того, четыре вида лактобактерий обладают наибольшими антимикробными свойствами, что подтверждается международными рекомендациями по оценке пробиотиков. Эти изоляты включают *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus paracasei*, которые можно использовать в качестве пробиотиков для поддержания здоровья полости рта [170]. Отчет показал, что *Lactobacillus reuteri* может быть столь же эффективным, как и пробиотики, для уменьшения зубной биопленки, вызванной системными или местными факторами риска [171]. Исследования пятидесяти одного пациента показали, что йогурт с добавлением *Bifidobacterium Animalis* значительно влияет на параметры воспаления десен и бактериального налета [172].

Заместительная микробиотная терапия – это новая мера лечения/профилактики заболеваний, при которой микробиота от здоровых доноров трансплантируется больным пациентам. Заместительная терапия успешно используется для лечения инфекций, вызванных *Clostridium difficile*. Кроме того, он показал эффективность при лечении одного класса воспалительных заболеваний кишечника, известных как болезнь Крона [173, 174]. Заместительная микробиотная терапия в настоящее время изучается в качестве альтернативного подхода к лечению заболеваний пародонта [57]. Природные и

лабораторные бактерии полости рта могут быть использованы в заместительной терапии заболеваний пародонта. Предложены протоколы передачи микробиоты от здорового донора пациенту с заболеваниями пародонта [175, 176]. Протокол недавнего исследования показал, что терапия трансплантацией микробиоты полости рта может эффективно лечить заболевания пародонта путем модуляции микробиоты полости рта. Для терапии трансплантацией микробиоты полости рта важны подробности истории болезни донора и анализ микробиоты [177]. Ожидается, что с развитием микробиома человека и лучшим пониманием взаимосвязи между микробиотой полости рта и заболеваниями полости рта в будущем станут доступны более практичные и более эффективные подходы к заместительной микробиотной терапии при заболеваниях пародонта.

Таким образом, разработка эффективных и безопасных терапевтических подходов для борьбы с воспалительными и деструктивными процессами зубочелюстной области остается одной из актуальных и востребованных тем современной фармакологии, клинической фармакологии и стоматологии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как известно, пародонтит – одно из основных хронических воспалительных заболеваний, представляющее наиболее распространенную форму патологии костей у человека [1]. Действительно, большинство взрослых страдают пародонтитом средней степени тяжести, при этом до 15% населения страдают тяжелым генерализованным периодонтитом, при котором в патологический процесс вовлекаются костные структуры челюсти и зубов [2]. Для этого заболевания характерно наличие инфекционного фактора, приводящего к возникновению деструкции соединительных тканей, опосредованной локальной выработкой иммуновоспалительных маркеров в ответ на патогены и их продукты [3]. В распространенный патологический процесс всегда вовлекается периодонтальная связка – периодонт. В результате клеточных ответов на пародонтопатогены в ткани десен или в жидкости десен были идентифицированы многочисленные про- и противовоспалительные медиаторы [4-6]. Было описано, что среди медиаторов организма-хозяина, продуцируемых после распознавания микроорганизмов, провоспалительный цитокин интерлейкин (ИЛ)-1 играет важную роль в патогенезе периодонтита, поскольку он связан с миграцией воспалительных клеток и прогрессированием остеокластогенеза [7, 8]. В отличие от деструктивного механизма, в котором участвуют провоспалительные цитокины, регуляторные пути, опосредованные противовоспалительными медиаторами, такими как ИЛ-10, могут защищать ткани периодонта и пародонта. Фактически, было доказано, что генноинженерные мыши ИЛ-10(-/-) обладают повышенной восприимчивостью к потере альвеолярной кости, вызванной *P. gingivalis*, что указывает на роль ИЛ-10 в контроле деструктивного воспаления [9].

В этом контексте в многочисленных исследованиях изучены стратегии модуляции иммунно-воспалительной реакции организма-хозяина, связанной с заболеваниями пародонта. Некоторые предыдущие доклинические и клинические исследования показали, что как классические нестероидные

противовоспалительные препараты (НПВП), так и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) способны модулировать иммунно-воспалительную реакцию организма человека [10-15]. Однако системное применение этих препаратов обычно связано с побочными эффектами, ухудшающими соблюдение пациентами режима их употребления [16]. Хотя местное применение НПВП и других противовоспалительных средств изучалось в некоторых исследованиях, многие из них выявили неудовлетворительные результаты в контроле воспаления при местном применении этих препаратов [17-19].

В проведенных ранее исследованиях было показано, что производные N-ацетил-6-аминогексановой кислоты обладают широким спектром фармакологического действия, в том числе активны по сдерживанию воспалительных реакций, модулируют свободнорадикальные реакции, обладают ранозаживляющим эффектом. В этой связи было чрезвычайно интересно изучить терапевтические возможности топического применения двух новых оригинальных соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащих остатки 3-гидроксипиридина и диметилфенилацетамида (лидокаина) в своей структуре, при повреждении периодонта, возникающем при экспериментальном лигатурном периодонтите у лабораторных крыс. Указанная модель стоматологической патологии была выбрана неслучайно – ввиду высокой распространенности социальной значимости воспалительного поражения периодонта, влияния патологического состояния на качество жизни пациентов.

Гипотеза настоящего исследования строилась на предположении о том, что топическое применение 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) вследствие ограничения воспалительной реакции и активации антиоксидантных механизмов позволит предотвратить вызванные патологическим процессом пародонта резорбцию костной ткани зуба и альвеолярного отростка, деструкцию окружающих мягких тканей, позволит оптимизировать реализацию местнообезболивающей активности амидных местных анестетиков.

Для ответа на поставленный научный вопрос было запланировано и проведено экспериментально-лабораторное неклиническое исследование, методологической основой которого явились принципы единства и неделимости исследовательской концепции, целостность, комплексность и мультидисциплинарность метододических подходов, включающих методы молекулярной и фундаментальной фармакологии и фармхимии, экспериментальной стоматологии, молекулярной биологии, патологической анатомии, биохимии и биофизики.

## **2.1 Общая характеристика дизайна и плана экспериментального исследования**

Принципиальная схема дизайна настоящего экспериментально-лабораторного неклинического исследования представлена на рисунке 1.

По типу запланированное исследование представляло собой экспериментально-лабораторное неклиническое исследование, которое включало постановку экспериментов на лабораторных животных – крысах-самцах, а также исследование *in silico* и *in vitro*.

На **первом этапе** исследование были сформулированы научная гипотеза, поставлен исследовательский вопрос, в полном соответствии с которыми также на данном этапе были обозначены цель и задачи исследования. Для достижения цели на первом этапе провели глубокий анализ доступной методологической базы и остановились на экспериментальной модели лигатурного периодонтита второго верхнего моляра. Указанная модель стоматологической патологии была выбрана неслучайно – ввиду высокой распространенности социальной значимости воспалительного поражения периодонта, влияния патологического состояния на качество жизни пациентов. Кроме того, мероприятия первого этапа включали также реферирование доступных литературных источников и подготовку литературного обзора, позволившего определить актуальность и место исследования в общем научном контексте.

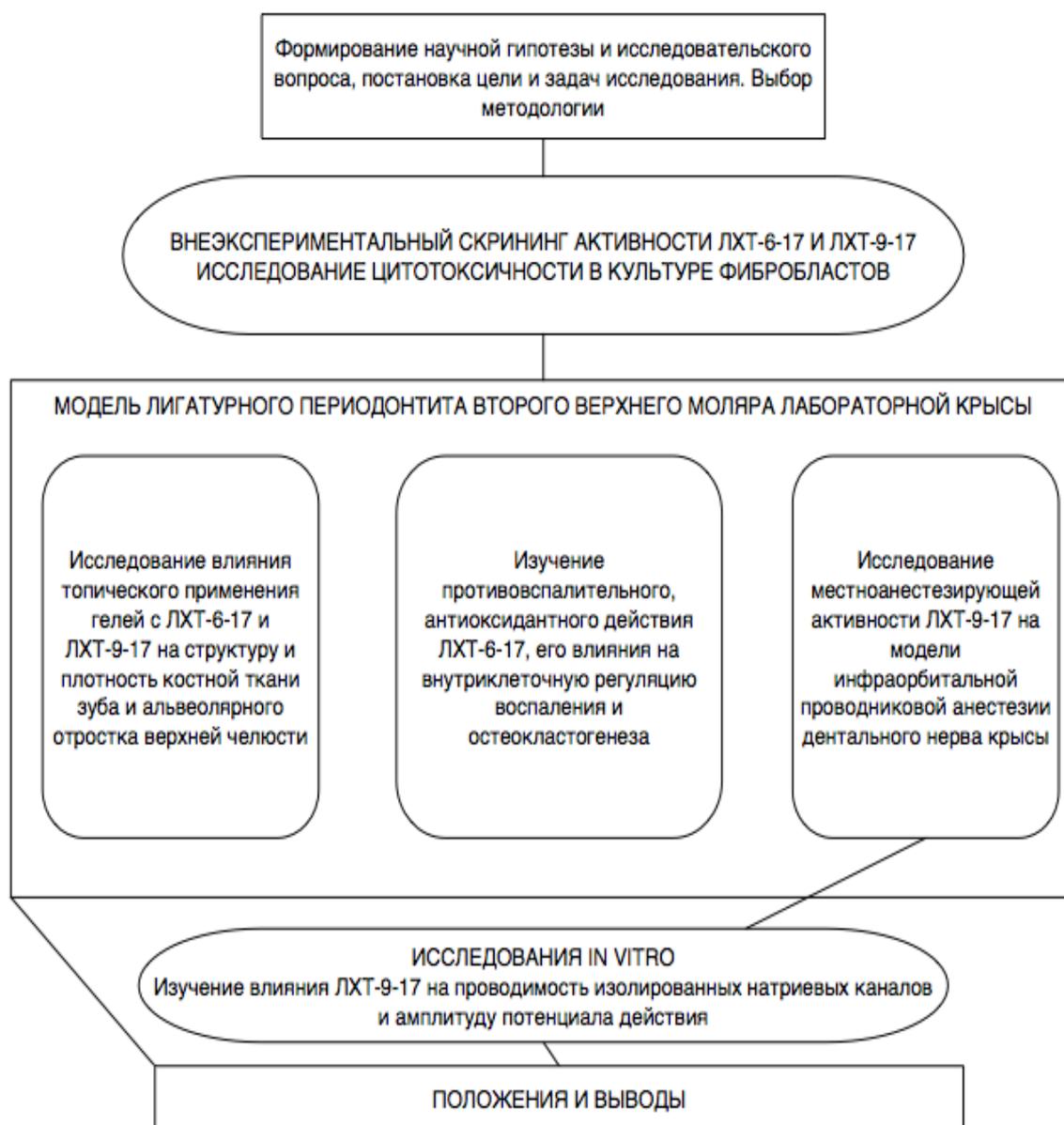


Рисунок 1 – Общая схема дизайна и плана экспериментально-лабораторного неклинического исследования

**Второй этап** работы был посвящен *in silico* прогнозированию спектра биологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) с помощью математических методов, заложенных в основу специального программного продукты – PASSonline. На этом же этапе определили цитотоксические характеристики исследуемых соединений, что было

необходимо для определения возможности последующего проведения животного эксперимента.

На **третьем этапе** провели комплекс опытов на лабораторных крысах с экспериментальным лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра. Каждая экспериментальная группа включала по 5 лабораторных животных. С помощью методов микроКТ определили влияние топического применения гелей, содержащих 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) на линейную потерю костной ткани при патологии и, по данным трехмерной реконструкции, - на объем костной массы / общий вес тканей. Также в рамках данного раздела провели микроморфологическое исследование тканей пародонта в области патологического процесса.

Поскольку при изучении влияния соединений на морфологию и структуру кости и мягких тканей пародонта наибольший эффект был установлен у геля, содержащего 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17), молекулярный раздел работы по определению экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1) методом иммуногистохимии, экспрессии фактора подавления миграции макрофагов (MIF), фосфодиэстеразы Р13К методом иммунофлюоресценции, концентрации ИЛ-1бета и ФНОальфа методом количественного иммуноферментного анализа провели только для указанного соединения.

**Четвертый этап** экспериментально-лабораторного исследования был посвящен исследованию местноанестезирующих свойств диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) на модели проводниковой инфраорбитальной анестезии верхнего второго моляра лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового. В аспекте определения возможных механизмов локального обезболивающего воздействия соединения были проведены исследования *in vitro* на одиночных нейронах,

выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) и на живых свежих препаратах седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*), помещенных в специальную перфузионную камеру, позволяющую при изменении рН перфузионного раствора воспроизводить условия, подобные воспалительной реакции.

На заключительном этапе работы провели обобщение и анализ полученных экспериментальных результатов, сформировали основные положения диссертационной работы, выводы и практические рекомендации, а также наметили перспективы дальнейшего развития темы.

## **2.2 Нормативные и этические аспекты выполнения экспериментально-лабораторного исследования**

После формирования научной гипотезы исследования был написан протокол неклинического исследования с участием в качестве объекта лабораторных животных. Протокол прошел рассмотрение на заседании Локального этического комитета (ЛЭК) медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева».

При планировании, выполнении исследования, архивировании данных и их анализе, а также обнародовании результатов диссертационной работы неукоснительно соблюдали требования и положения следующих национальных и международных нормативных правовых актов:

Федеральным законом №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в действующей редакции);

Федеральным законом №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (в действующей редакции);

приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) №224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях,

испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок» (в действующей редакции);

приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (в действующей редакции);

ГОСТом 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»; ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»;

Хельсинкской декларацией «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» (1964 год; в действующей редакции);

интегрированным дополнением к Руководству по надлежащей клинической практике ICH E6(R1), E6(R2) (9.11.2016 года) и

Директивой Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС).

При проведении всех манипуляций с лабораторными грызунами (получение, карантинизация, размещение, уход, кормление, подача воды, контроль состояния, наркотизация, забор крови, тканей, иного биологического материала, выведение из эксперимента) следовали положениям Стандартных операционных процедур Центра доклинических исследований инновационных лекарственных средств медицинского факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» и экспериментальной операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ИКМ им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Все болезненные процедуры выполняли под общей анестезией, для чего применяли уретан (800 мг/кг) внутривенно. Выведение из эксперимента проводили с помощью ингаляционной наркозной приставки для аппарата ИВЛ

RWD для грызунов (Китай) и препарата для ветеринарного наркоза изофлуран (Германия).

### **2.3 Характеристика исследуемых в работе фармакологических веществ, лекарственных форм**

В работе исследованы два соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17). Дизайн химической структуры, синтез и лабораторная технология получения чистой субстанции разработаны в отделе химии, технологии и аналитического контроля АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области) и любезно предоставлены нам разработчиками<sup>1</sup>. Принципиальные химические структуры соединений представлены на рисунке 2.

Оба соединения были представлены субстанциями с чистотой 99,8% в виде белого с кремоватым оттенком мелкокристаллического порошка. Оба вещества растворяли в воде при небольшом нагревании.

Для достижения цели и задач настоящего диссертационного проекта вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) использовали в одной лекарственной форме – в виде 2% геля, в то время как вещество диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) применяли как в виде 2% геля, так и в инъекционной лекарственной форме – в виде 2% водного раствора с рН 7,3. Для приготовления водного инъекционного раствора использовалась дважды дистиллированная вода. В 1 мл инъекционной формы содержалось 20 мг действующего вещества ЛХТ-9-17.

---

<sup>1</sup> Автор признателен профессору С.Я. Скачиловой за предоставленные соединения и лекарственные формы ЛХТ-6-17 и ЛХТ-9-17

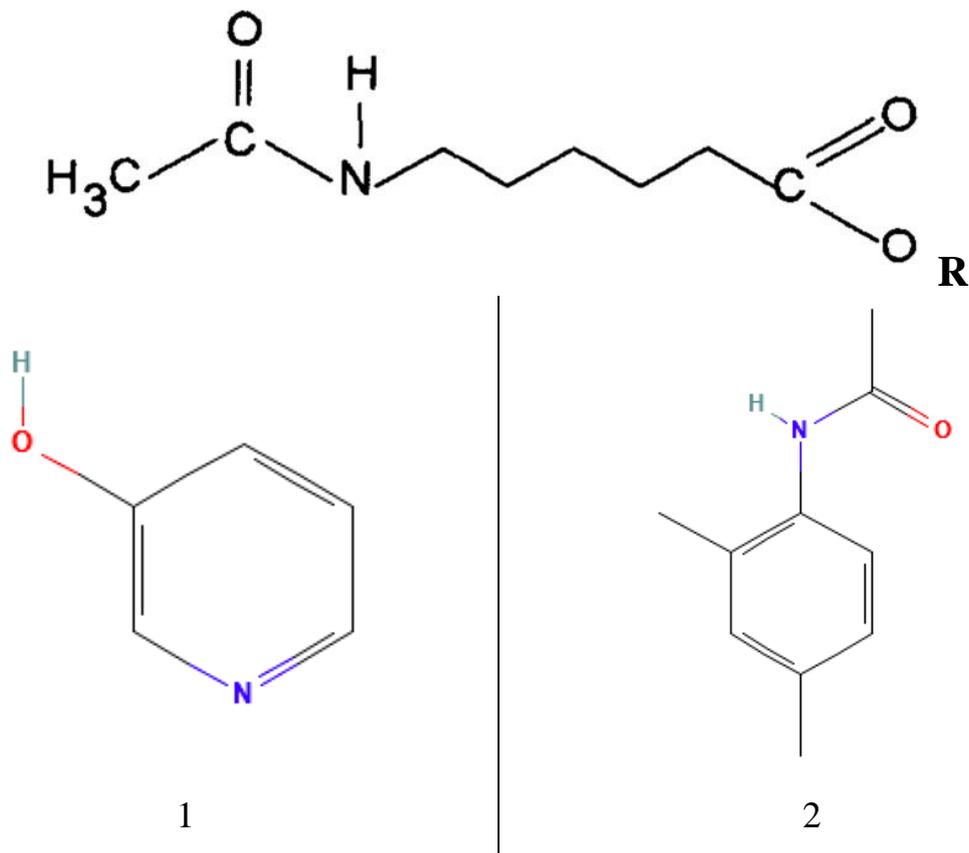


Рисунок 2 – Химическая структура соединений N-ацетил-6-аминогексаноиной кислоты: R – заместитель (1 – 3-гидроксипиридин; 2 – 2,4-(N-диметилфенилацетамид)

Как уже упоминали, 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) в опытах на животных применяли в форме 2% гидрогеля. Технологически его изготавливали следующим образом (АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ», Россия): в 50 мл дважды дистиллированной воды растворяется натриевая соль гиалуроновой кислоты 1 г в виде порошка до достижения 1% концентрации (по соотношению масса – объем). К раствору гиалуроновой кислоты осторожно прибавляли 2,67% масса/объем раствора натрия периодата в молярном соотношении 1:1. Таким образом запускали окислительную реакцию, которая протекала в течение 24 ч при температуре 25°C, после чего ее останавливали и в реакционную смесь прибавляли диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение

ЛХТ-9-17) в массовом соотношении 2 к 100 в закрытой камере. Реакционная смесь гомогенизировалась при 500 об/мин при помощи магнитного шейкера на протяжении получаса при температуре 65°C с последующим центрифугированием при 700 об/мин на протяжении 5 минут с целью удаления пузырьков воздуха.

В качестве препаратов сравнения на этапах работы, в которых изучалась роль веществ в локальном контроле лигатурного периодонтита, использовали гель гиалуроновой кислоты. При изучении местноанестезирующего действия раствора диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) при лигатурном периодонтите в качестве препарата сравнения использовали 2% раствор лидокаина гидрохлорида, изготавливаемый *ex tempore* непосредственно перед применением с использованием дважды дистиллированной стерильной воды и субстанции лидокаина гидрохлорида (Merck SIGMA-Aldrich, Германия).

## **2.4 Основные сведения о лабораторных животных, характеристика экспериментальных групп**

Эксперименты поставлены на 60 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 200-220 г, приобретенных в филиале «Электрогорский» ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России.

Животные содержались в экспериментально-биологической клинике (учебном виварии) медицинского факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» и виварии Центра биомедицинских технологий ФГАОУ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

После прохождения процедур карантинизации в течение двух недель после поступления животных в виварий они переводились в основное отделение, где содержались в пластиковых клетках по 5 особей в каждой, снабженных решетчатыми крышками из нержавеющей стали и экипированных специальными поилками и приспособлениями для подачи пищи при естественном световом

режиме, температуре окружающей среды 18-22°C, относительной влажности воздуха 50-55%.

Для кормления лабораторных крыс использовали сбалансированный гранулированный корм производства ООО «Лабораторкорм» по специальной прописи. Подстил представлял собой стружку лиственных пород древесины, которую меняли 1 раз в неделю. Животные имели неограниченный свободный доступ к питью и еде за исключением дня постановки эксперимента, когда накануне животных ограничивали в доступе к пище, а в день исследования – к воде. После постановки эксперимента – формирования лигатурного периодонтита – животных рассаживали в одиночные клетки для предотвращения эпизодов агрессии.

В работе также использовали одиночные нейроны, выделенные из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) и живые свежие препараты седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*). Пресноводные моллюски и земноводные были любезно предоставлены коллегами из Института биофизики клетки – обособленного структурного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» и транспортировались в специальных охлаждаемых контейнерах для сохранения жизнеспособности особей.

При постановке опытов были сформированы экспериментальные группы, каждая из которых состояла не менее, чем из 5 особей. Основные сведения об экспериментальных группах представлены в таблице 1. Такое количество животных было необходимо для получения репрезентативных результатов и соответствовало общемировому тренду к максимальному ограничению использования теплокровных животных в медико-биологических исследованиях. Маркировка животных проводилась при помощи цветных пометок на холке.

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных групп

Этап работы	Группа	n	Изучаемые показатели
<i>Исследования на лабораторных крысах</i>			
Оценка структуры костной ткани, патоморфология	Интактные*	20*	Линейная потеря костной ткани, объем костной массы / общий вес тканей, гистопатологическая структура пародонта
	Контроль	5	
	Гель гиалуроновой кислоты	5	
	Гель ЛХТ-6-17	5	
	Гель ЛХТ-9-17	5	
Оценка воспалительной реакции, внутриклеточной сигнализации	Интактные*	20*	Экспрессия MMP-2, RANKL, RANK, катепсина-К, СОД-1, MIF, PI3K , ИЛ-1бета и ФНОальфа
	Контроль	5	
	Гель гиалуроновой кислоты	5	
	Гель ЛХТ-6-17	5	
	Гель ЛХТ-9-17	5	
Оценка местно- анестезирующего действия	Контроль	5	Время начала, глубина и длительность проводниковой дентальной анестезии второго верхнего моляра
	Лидокаин	5	
	ЛХТ-9-17	5	
	ЛХТ-9-17**	5	
<i>Опыты in vitro</i>			
Оценка цитотоксичности	ЛХТ-6-17	18***	Подавление роста фибробластов в культуре
	ЛХТ-9-17	18***	
Проводимость натриевых каналов	ЛХТ-9-17	20***	INa, nA
Амплитуда потенциала действия	ЛХТ-9-17	20***	АПД на фоне pH 7,3 и pH 6,0

Примечания: \* – интактная контрлатеральная область верхней челюсти животных; \*\* – без периодонтита; \*\*\* – число клеток (культур клеток, препаратов нерва)

## 2.5 Метод воспроизведения лигатурного периодонтита верхнего второго моляра лабораторной крысы

Для воспроизведения экспериментального повреждения тканей маргинального периодонта использовали модель лигатурного периодонтита второго верхнего моляра.

Половозрелую особь – самца крысы линии Wistar весом 200-220 г анестезировали при помощи внутрибрюшинного введения уретана в дозе 800 мг/кг и укладывали на подогреваемый операционный ветеринарный столик. Накануне животное ограничивали в доступе к пище, а в день постановки эксперимента – к воде. Моделирование экспериментальной патологии проводили в первой половине дня.

Голову животного фиксировали в стереотаксической установке в положении ретрофлексии, ротовую полость раскрывали и фиксировали при помощи специального расширителя с силиконизированными браншами, обнажали правую половину верхней челюсти. На шейку второго верхнего моляра справа накладывали нейлоновую стерильную лигатуру 3-0 (Ethicon, США), предварительно обнажив ее от прилегающей десны.

Контралатеральная половина верхней челюсти оставалась интактной и формировала группу интактных тканей.

После чего животное оставляли на подогреваемом столике до выхода из состояния наркоза. Каждую крысу с воспроизведенным патологическим процессом сепарировали в индивидуальную клетку на 11 суток для формирования микробной биопленки в области наложения лигатуры и развития индуцированного этим воспалительного процесса.

В течение 11 суток наблюдения ежедневно в зубодесневой карман закладывали 0,1 г геля гиалуроновой кислоты (контрольная серия), 2% геля, содержащего 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) или диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) (опытные группы).

На 12 сутки от начала эксперимента животных повторно наркотизировали, выполняли компьютерную микротомографию, после чего выводили из эксперимента, биологический материал области интереса забирали для проведения микроскопического, биохимического, иммуногистохимического, иммунофлуоресцентного, иммуноферментного и молекулярного исследования.

## **2.6 Метод исследования состояния костной ткани зуба и альвеолярного отростка верхней челюсти**

Верхнюю челюсть крыс сканировали на аппарате микроКТ SkyScan (модель 1172, Kontich, Бельгия). Файлы микроКТ были преобразованы в формат Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM) и импортированы в пакет программного обеспечения Dolphin® (Dolphin Imaging, США) для анализа линейной потери костной массы. Верхняя челюсть была ориентирована со вторым моляром, цементная эмаль определялась в аксиальной плоскости, а линейные расстояния между костями в сагиттальной плоскости были зарегистрированы для второго верхнего моляра от цементно-эмалевого соединения до гребня альвеолярной кости. Два дополнительных мезиальных небных измерения вторых моляров были сделаны на расстоянии 0,3 мм от середины коронки.

Образцы объема кости / объема ткани (BV / TV) ориентировали с использованием пакета программного обеспечения DataViewer (версия 1.5.2; Bruker, США) для трехмерного анализа. Верхняя челюсть была ориентирована так, чтобы цементно-эмалевые соединения вторых моляров были параллельны друг другу в сагиттальной и корональной плоскостях. В аксиальной плоскости были видны коронки первого, второго и третьего моляров. После ориентации файлы были импортированы в программную среду CTAn (версия 1.16; Bruker, США) для объемного анализа. Областью, представляющей интерес для анализа, считался объем из 40 срезов, установленный на пороге 75. Анализ начинался со среза, на котором впервые появилась фуркация, и продвигался апикально.

Процентные значения BV / TV записывались и усреднялись для каждой группы ( $n \geq 4$  / группа для всех анализов микроКТ).

## 2.7 Метод патоморфологического исследования

Образцы альвеолярных отростков верхней челюсти забирали, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (в течение 24 часов) и деминерализовывали в 5% азотной кислоте в течение 14 суток. Затем образцы обезжировали, заливали в парафин, делали срезы вдоль коренных зубов во фронтальной плоскости и окрашивали гематоксилином и эозином по методу Хеллендахеля. Срезы толщиной 4 мкм анализировали методом световой микроскопии (увеличение 200x) с помощью микроскопа Olympus (Япония).

При патоморфологическом описании оценивали инфильтрацию тканей воспалительными клетками (нейтрофилы, макрофаги), а также целостность альвеолярной кости и цемента с помощью специальной патоморфологической шкалы.

Баллы были присвоены следующим образом: 0 — отсутствие или незначительная воспалительная инфильтрация тканей, ограниченная маргинальной десной, с сохранением альвеолярного отростка и цемента; 1 — умеренная воспалительная клеточная инфильтрация всей десневой пластинки с незначительной альвеолярной резорбцией и интактным цементом; 2 — выраженная воспалительно-клеточная инфильтрация десны и периодонтальной связки с выраженной деградацией альвеолярного отростка и частичным разрушением цемента; и 3 — выраженная воспалительная клеточная инфильтрация с полной резорбцией альвеолярного отростка и выраженным разрушением цемента. Для сравнения вычисленных средних значений использовали тест Манна-Уитни. Значение  $p < 0,05$  считалось репрезентативным для статистической значимости полученных скоринговых результатов.

## 2.8 Методы иммуногистохимического окрашивания препаратов

Ткань верхней челюсти депарафинизировали и регидратировали. Срезы ткани десны и пародонта толщиной 4 мкм промывали 0,3% Тритоном X-100 в фосфатном буфере, обрабатывали эндогенной пероксидазой (3% перекисью водорода) и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами против следующих молекулярных маркеров (все антитела использовали в разведении 1:400): рецептор-активатор лиганда NF-κB (RANKL), супероксиддисмутаза-1 (СОД-1), рецептор-активатор NF-κB (RANK), матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2, желатиназа), катепсин-К, использовали антитела производства Santa Cruz Biotechnology Interprise (США). После чего препараты инкубировали в течение 30 минут со вторичным антителом, конъюгированным со стрептавидином / пероксидазой хрена производства Biocare Medical (США).

Иммуноокрашивание визуализировали с помощью колориметрического обнаружения (Biocare Medical, США). Статус окрашивания определялся как отрицательный или положительный; положительное окрашивание определялось как наличие коричневого хромогена. Интенсивность окрашивания и доля иммунопозитивных клеток исследовались независимо двумя патологами с помощью световой микроскопии и записывались. Интенсивность окрашивания (IS) оценивали по шкале от 0 до 2 в соответствии со следующей полуколичественной оценкой: 0 – окрашивание не обнаруживается, 1 – слабое окрашивание; 2 – сильное окрашивание [22].

## 2.9 Метод иммунофлюоресценции

Три среза периодонтальной ткани от каждого животного ( n=3 / группа) депарафинизировали в ксилоле и промывали в серии концентраций этанола и фосфатно-солевого буфера (PBS). Извлечение антигена осуществляли путем помещения срезов в 10 мМ раствор цитрата натрия с 0,05% Твин 20 на 40 мин при 95°C. Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с кроличьими первичными

антителами к фактору ингибирования миграции макрофагов (MIF) и PI3K (1:100 в 1% нормальной козьей сыворотке (Santa Cruz Biotechnology, США).

Образцы инкубировали с козьими антикроличьими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:500 в 1% бычьим сывороточном альбумине), и контрастно окрашивали DAPI (Sigma, США). Затем получали флуоресцентные изображения (лазерный сканирующий микроскоп 710, объектив 20X; Carl Zeiss, Йена, Германия). Реактивность тканей с помощью лазерного сканирования оценивали с помощью компьютерного денситометрического анализа цифровых изображений.

## **2.10 Метод количественного иммуоферментного анализа (ИФА)**

Полученные ткани помещали в стерильные пробирки, содержащие 400 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) с 0,05% Твин-20. Все образцы хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  (морозильная камера Sanyo, Корея). После трехкратного замораживания / оттаивания (для разрушения клеток) ткань взвешивали, затем разрезали ножницами на небольшие кусочки (1-2 мм<sup>3</sup>) и растворяли в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 100 мг ткани / мл. После экстракции на миксере Vortex в течение 10 мин каждый образец центрифугировали при 370 g в течение 5 мин, супернатант собирали, разделяли на небольшие порции и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до использования.

Чтобы избежать повышения активности тканевых протеаз, всю процедуру проводили при  $4^{\circ}\text{C}$ . Уровни ИЛ-1бета и ФНОальфа определяли методом количественного ИФА с использованием коммерчески доступных наборов CUSABIO BIOTECH (Китай) согласно инструкциям производителя. В образцы добавляли разбавители из наборов, и разбавление учитывали при расчете концентрации каждого вещества. Эту концентрацию рассчитывали с помощью стандартной кривой, построенной с использованием стандартных белков из коммерческого набора. Диапазон стандартной кривой, используемый для измерения ИЛ-1бета, составлял 15,6–1000 пг/мл, а для ФНОальфа — 31,2–1000

пг/мл. ИФА проводили в двух повторностях, и средние значения использовали для расчета концентраций каждого маркера.

### **2.11 Метод изучения местноанестезирующей активности**

На 8 сутки эксперимента половозрелую особь – самца крысы линии Wistar весом 200-220 г анестезировали при помощи внутрибрюшинного введения уретана в дозе 800 мг/кг и укладывали на подогреваемый операционный ветеринарный столик. Накануне животное ограничивали в доступе к пище, а в день постановки эксперимента – к воде. Моделирование экспериментальной патологии проводили в первой половине дня.

Голову животного фиксировали в стереотаксической установке в положении ретрофлексии, ротовую полость раскрывали и фиксировали при помощи специального расширителя с силиконизированными браншами, обнажали правую половину верхней челюсти.

Определение местноанестезирующей активности проводили методом, описанным в работе к.м.н. А.В. Новикова [20]. Использовали портативную зуботехническую бормашину марки БМ-1.0 производства ЭКО ОПТИМУМ (Россия), при помощи которой во втором верхнем моляре высверливали два отверстия глубиной 0,2-0,3 мм с диаметром 0,5 мм, в образовавшуюся таким образом полость помещали оголенные концы серебряного электрода (стимулирующего). Для предотвращения выпадения концов электрода их фиксировали в полости зуба пломбировочной пластмассой.

Дистальный конец электрода был выведен на холку лабораторной крысы через отверстие в щеке, на холке его фиксировали к коже при помощи шва. После проведения описанной манипуляции крысу помещали в отдельную клетку. Через четверо суток после выполнения вышеописанной манипуляции бодрствующую лабораторную крысу укладывали в специальный держатель и выполняли процедуру по определению порога болевой чувствительности. Его определяли путем подачи стимулирующего тока с частотой 100 имп/с с нарастающей силой (в

диапазоне от 0,1 и до 10 мА) через электростимулятор Кордэлектро (Латвия) прямоугольными импульсами длительностью 0,5 мс в течение 1 с до появления вокализации и двигательной реакции.

Раствор (2%) диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) или 2% лидокаина гидрохлорида с рН 7,3 вводили инфраорбитально в объеме не более 0,2 мл. После чего вновь осуществляли фиксацию болевой чувствительности. Период наблюдения составлял 180 мин с фиксацией показателя через каждые полчаса.

## **2.12 Метод определения амплитуды потенциала действия изолированного нерва**

После иммобилизации под эфирным наркозом у живой особи озерной лягушки (*Rana radibunda*) проводили препарирование седалищного нерва, отпрепарированный нерв длиной 20-30 мм при комнатной температуре укладывали в раствор Рингера на 50-60 мин.

Регистрацию потенциала действия (ПД) осуществляли в специальной перфузионной камере для изолированных органов производства компании «БИОРАС» (США), снабженную устройством для подачи и регистрации электрических импульсов и присоединенную к блоку электростимулятора «БИОРАС» (США) и регистрирующему блоку. Камеру для электрической стимуляции перфузировали при температуре 22-24 °С модифицированным раствором Тироде (мМ: хлорид натрия – 145,0; хлорид калия – 4,0; магния хлорид – 1,0; хлорид кальция – 1,80; Tris – 5,0; глюкоза – 10,0; рН раствора доводили соляной кислотой до значения 7,3-7,35). Перфузионный раствор насыщали чистым O<sub>2</sub>, обновляли каждые 100 сек. Для этого использовали перистальтический насос Ugo Basile (Италия).

Диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) прибавляли в перфузионную среду в концентрациях в диапазоне от 0,00001 до 0,01 мкМ. Препарата седалищного нерва стимулировали электрическими

линейными импульсами через специальный хлорсеребряный электрод производства World Precision Instruments (США), который был фиксирован в перфузионной камере и на который помещался один из кончиков препарата седалищного нерва. Определяли максимальную амплитуду ПД путем увеличения силы стимулирующего тока до получения максимального ответа с помощью стимулирующего блока системы биорегистрации «ВЮРАС». Обработывали полученные результаты опытов при помощи оригинального программного обеспечения «ВЮРАС».

Исходя из цели и задач настоящего экспериментально-лабораторного исследования нам было необходимо воссоздать условия, которые были бы приближены к реальным обстоятельствам действия местного анестезирующего средства при воспалении. Для этого после отмывки препарат нерва от диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) рН перфузионного раствора снижали до 6,2 путем добавления соляной кислоты. После этого серию стимулирующих опытов повторяли.

### **2.13 Метод определения проводимости изолированных натриевых каналов**

На одном из этапов экспериментально-лабораторного исследования для изучения одного из ключевых механизмов местноанестезирующего действия диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) на модели проводниковой инфраорбитальной анестезии дентального нерва верхнего второго моляра лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового были проведены исследования *in vitro* на одиночных нейронах, выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) по регистрации проводимости одиночных натриевых каналов с использованием техники «patch-clamp» [178]. Указанный этап диссертации проводили совместно с сотрудниками лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки РАН – обособленного подразделения ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр

«Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»» (г. Пушкино Московской области).

Выделенные и трипсинизированные гигантские нейроны ганглионарного параарингеального кольца брюхоногого пресноводного моллюска – прудовика большого – были помещены при комнатной температуре в раствор Тироде.

На рисунке 3 представлена принципиальная схема постановки эксперимента в различных конфигурациях, обеспечивающая оптимальный контакт и получение достоверных данных о проводимости натриевого канала.

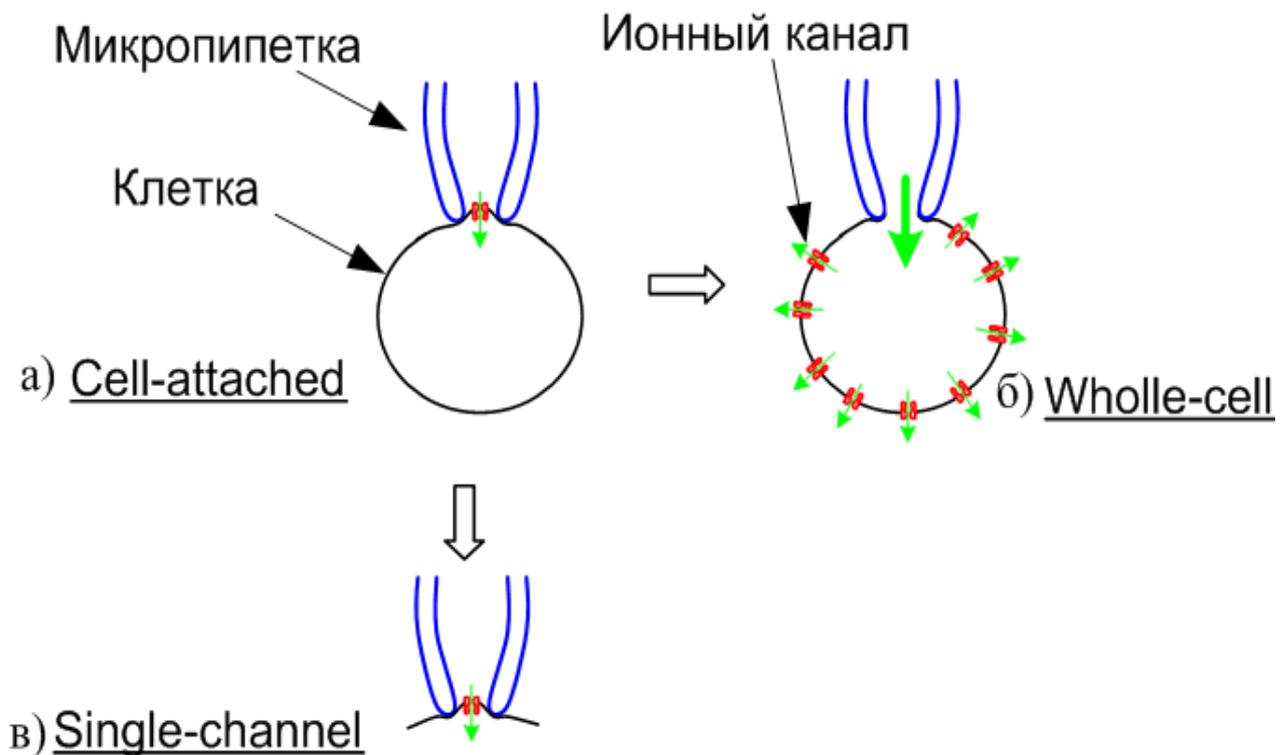


Рисунок 3 – Принципиальная схема постановки микроэлектродного эксперимента по изучению проводимости ионных каналов

В своей работе использовали только конфигурацию «single channel», поскольку нам было важно установить влияние диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) на одиночные натриевые каналы.

Сначала формировали плотный контакт с изолированным гигантским нейроном через агарозный мостик до достижения экспериментальной конфигурации «cell-attached». Для этого использовали стеклянные микроэлектроды (внутренний диаметр 1 мкм, Multichannel Systems, США) (Рисунок 3). Тем самым добивались создания нужного нам контакта «single channel» контакта, который позволяет осуществлять регистрацию тока с одного ионного канала.

Перфузионный диализ выделенных и изолированных фрагментов мембраны гигантских нейронов осуществляли оксигенированным чистым  $O_2$  подогретый до температуры  $35^{\circ}C$  модифицированным раствором Тироде. Полную смену раствора обеспечивали в течение 100 с. Состав раствора (мМ: NaCl — 110;  $MgCl_2$  — 1,5; Tris-OH — 2; pH раствора для диализа соляной кислотой доводили до значения 7,4-7,5).

## 2.14 Статистические методы обработки данных

Результаты исследования обобщались в форме непрерывных или дискретных величин. Непрерывные величины в зависимости от однородности статистических совокупностей были представлены средней или медианой (при несимметричном распределении признака). Достоверность различий между средними величинами вычисляли с помощью  $t$  критерия Стьюдента (при сравнении двух групп) или ANOVA (при сравнении 3 и более групп) с применением post-hoc теста Тьюки, или тестов Крускала-Уоллиса или Манна-Уитни при 5% уровне значимости. Анализ данных выполняли в программной среде STATA 17.3 (США).

### ГЛАВА 3. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПРОГНОЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

В основу научного вопроса настоящего экспериментального исследования была положена гипотеза о том, что новые оригинальные отечественные соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащие в качестве радикала фрагменты диметилацетамида и гидроксипиридина способны сдерживать развитие патологических процессов, вызванных патологией периодонта. Для внеэкспериментальной проверки этой гипотезы провели количественный анализ структура – активность при помощи математической программы PASSonline, операционный компонент которой насчитывает базу из более 800000 различных активностей и химических структур. После чего выполнили серию экспериментов по изучению цитотоксических свойств соединений в живых культурах фибробластов человека при экспозиции широкого диапазона концентраций исследуемых соединений.

#### 3.1 Прогнозирование фармакологических свойств некоторых соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты

В таблице 2 суммированы значения вероятностей активирующего ( $P_a$ ) или ингибирующего ( $P_i$ ) действия соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащих в качестве радикала фрагменты диметилацетамида (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина (ЛХТ-6-17), в отношении видов биологической активности и потенциальных мишеней – ферментов и рецепторов, воздействие на которые может сопровождаться формированием фармакологического эффекта.

Для повышения точности прогнозирования и селекции наиболее значимых с точки зрения развития фармакологического эффекта свойств анализировали лишь виды активности с вероятностью развития выше 0,700.

Таблица 2 – Прогнозные показатели видов биологической активности соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащих в качестве радикала фрагменты диметилацетамида (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина (ЛХТ-6-17)

Соединение	$P_a$	$P_i$	Биологический эффект (биологическая мишень)
1	2	3	4
Диметилацетамида	0,914	0,005	Лечение воспаления мягких тканей
N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17)	0,903	0,004	Ингибитор дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона)
	0,891	0,005	Блокатора быстрых натриевых каналов задержанного выпрямления
	0,883	0,009	Лечение фобических расстройств
	0,880	0,007	Ингибитор сахаропепсинов
	0,880	0,007	Ингибитор химозина
	0,880	0,007	Ингибитор акроцилиндропепсина
	0,874	0,003	Ингибитор полиаминтранспортной АТФазы
	0,867	0,004	Ингибитор диметиларгиназы
	0,867	0,004	Ингибитор экзорибонуклеазы II
	0,843	0,005	Ингибитор аргиноновой 2-моноаминоксидазы
	0,845	0,009	Ингибитор ацилкарнитингидролазы
	0,834	0,001	Ингибитор ацетидилспермидинацетилазы
	0,827	0,004	Ингибитор ядерной протеасомной АТФазы

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат	0,825	0,004	Ингибитор метилацетилдеацетилазы
(ЛХТ-9-17)	0,828	0,008	Ингибитор Dcp пептидин-депептидазы
	0,833	0,014	Субстрат системы цитохрома CYP2J
	0,819	0,005	Ингибитор сериновой IgA-специфичной эндопептидазы
	0,813	0,003	Ингибитор желточной рибонуклеазы
	0,818	0,010	Субстрат системы цитохрома CYP2J2
	0,812	0,008	Субстрат системы GST A
	0,805	0,004	Ингибитор метиламин-глутамат трансферазы
	0,812	0,018	Ингибитор полипропепсина
	0,799	0,007	Ингибитор полилизина
	0,790	0,003	Скавенджер активных форм кислорода
	0,791	0,005	Агонист белков
	0,790	0,008	Фузаринин-С орнитиэстеразы ингибитор
	0,789	0,008	Ингибитор фукостеролэпоксид лигазы
	0,787	0,009	Ингибитор омптина
	0,779	0,006	Агонист колониестимулирующего фактора макрофагов

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Диметилацетамида	0,777	0,010	Ингибитор фрагилизина
N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17)	0,772	0,005	Ингибитор пептид-N4-(N-ацетил-бета-глюкозаминил) аспарагиназы амидазы
	0,768	0,004	Ингибитор фибролазы
	0,774	0,012	Ингибитор алкилацетилглицерофосфатазы
	0,765	0,006	Ингибитор фактора свертывания В
	0,767	0,010	Ингибитор Таq карбоксипептидазы
	0,765	0,009	Ингибитор СI-транспортирующей АТФазы
	0,766	0,014	Ингибитор лиазы
	0,766	0,016	Ингибитор протеиновой глутаматметилэстеразы
	0,783	0,034	Ингибитор CDP-глицерол глицерофосфаттрансферазы
	0,756	0,007	Ингибитор гликан эндо-1,3-бета-D-гликозидазы
	0,745	0,005	Антигипоксант
	0,766	0,029	Протектор мембран слизистых оболочек
	0,742	0,007	Ингибитор ретинилпальмитат гидролазы
	0,732	0,005	Стимулятор лейкопоэза
	0,728	0,004	Липотропные свойства
0,728	0,006	Ингибитор энтеропептидаз	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Диметилацетамида	0,729	0,008	Ингибитор формальдегид-транскетолазы
N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17)	0,756	0,038	Ингибитор тестостерон 17β-дегидрогеназы (NADP+)
	0,719	0,002	Ингибитор диамин N-ацетилтрансферазы
3-гидроксипиридина	0,890	0,001	Противовоспалительный эффект
	0,882	0,008	Лечение мукозитов
N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17)	0,874	0,004	Ингибитор дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона)
	0,873	0,006	Активности остеокластов ингибитор
	0,867	0,012	Лечение тревожных расстройств
	0,852	0,003	Полиаминтранспортирующей АТФазы ингибитор
	0,842	0,004	Ингибитор диметиларгиназы
	0,843	0,005	Аргининовой 2-монооксидазы ингибитор
	0,810	0,004	Ингибитор деацетилазы метилумебллиферинацетата
	0,818	0,017	Субстрат системы цитохрома CYP2J
	0,807	0,007	Ингибитор экзорибонуклеазы II
	0,808	0,012	Субстрат системы цитохрома CYP2J2
	0,790	0,004	Антигипоксанта

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
3- гидроксипиридина N-ацетил-6- аминогексаноат (ЛХТ-6-17)	0,799	0,020	Ингибитор сахаропепсина
	0,799	0,020	Ингибитор акроцилиндропепсина
	0,799	0,020	Ингибитор химозина
	0,782	0,009	Ингибитор омптина
	0,783	0,011	Субстрат системы GST A
	0,769	0,006	Ингибитор метиламино-глутамат N-метилтрансферазы
	0,766	0,007	Агонист колониестимулирующего фактора макрофагов
	0,766	0,007	Ингибитор ядерной протеасомной АТФазы
	0,762	0,004	Скавенджер активных форм кислорода
	0,766	0,008	Ингибитор IgA-специфичных сериновых эндопептидаз
	0,764	0,006	Ингибитор плазменного фактора свертывания B
	0,763	0,012	Ингибитор фузарина-С- оринитинэстеразы
	0,747	0,002	Ингибитор ацетиспермидин деацетилазы
	0,746	0,013	Ингибитор Dcp пептидил- депептидазы
	0,739	0,007	Ингибитор ретининилпальмитат гидролазы
0,742	0,017	Ингибитор лизазы	
0,737	0,014	Ингибитор псевдолизина	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
3- гидроксипиридина N-ацетил-6- аминогексаноат (ЛХТ-6-17)	0,728	0,013	Ингибитор фукостерол-эпоксид лиазы
	0,744	0,030	Ингибитор полипропепсина
	0,724	0,013	Ингибитор веномбина АВ
	0,719	0,012	Агонист пептидов
	0,740	0,039	Мукомебранозный протектор
	0,708	0,010	Ингибитор плазменного фактора свертывания С
	0,700	0,003	Ингибитор диамин N- ацетилтрансферазы
	0,708	0,016	Ингибитор фрагилизина

Мы установили, что соединение N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащее в качестве радикала фрагмент диметилацетамида (ЛХТ-9-17), с наибольшей вероятностью проявляет свойства ,локатора быстрых натриевых каналов задержанного выпрямления (0,891), что является предпосылкой наличия у соединения местноанестезирующих свойств. Спрогнозированные высокие коэффициенты для таких биологических свойств как лечение воспаления мягких тканей (0,914), протектор мембран слизистых оболочек (0,766) свидетельствует о высокой вероятности реализации противовоспалительного эффекта диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17). Модификация воспалительной реакции под действием соединения может быть также обусловлена выявленным при прогнозировании агонизмом с колониестимулирующим фактором макрофагов (0,779), ингибированием плазменного фактора свертывания В (0,765), ингибированием фибролазы (0,768), стимуляцией лейкопоэза (0,732).

Не менее важны в аспекте настоящей работы спрогнозированные антиоксидантные свойства молекулы, обусловленные наличием таких видов активности в спектре, как ингибирование дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона) (0,903), скавенджинг активных форм кислорода (0,790), антигипоксантные свойства (0,745). Препятствие потере костной ткани зубов при периодонтите может быть с высокой вероятностью быть обусловлено подавлением активности энтеропептидаз (0,728) и ингибацией сериновой IgA-специфичной эндопептидазы (0,819).

При разработке лекарственных форм, планировании пути введения и определении кратности применения лекарственных форм на основе диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) необходимо учитывать, что соединение по структуре может быть субстратом систем цитохрома CYP2J2 (0,818) и цитохрома CYP2J (0,833).

При прогнозировании фармакологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) нами были получены во-многом схожие предиктивные показатели, обусловленные структурным сходством молекул. Так, в частности, противовоспалительный эффект (0,890), включавший высокий предиктивный потенциал в отношении лечения мукозитов (0,882) может быть также как и в предыдущем случае быть обусловлен мобилизацией лейкоцитарного ростка кроветворения за счет агонизма к колониестимулирующему фактору макрофагов (0,766), мукоембранозной протекции (0,740), а также влиянием на гемостаз вследствие ингибирования плазменного фактора свертывания В (0,764), венобина АВ (0,724), плазменного фактора свертывания С (0,708).

Высокая рассчитанная вероятность ингибирования дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона) (0,874) и метиламино-глутамат N-метилтрансферазы (0,769) наряду со свойствами скавенджера активных форм кислорода (0,762) и антигипоксантной активностью могут придавать молекуле мощные антиоксидантные свойства. А подавление активности остеокластов (0,873), ингибирование IgA-специфичных сериновых эндопептидаз (0,766) –

обуславливать сохранение костно-белкового матрикса ткани зуба при его воспалительном процессе.

Также, как и в случае с ЛХТ-9-17 при разработке лекарственных форм, планировании пути введения и определении кратности применения лекарственных форм на основе 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) необходимо учитывать, что соединение по структуре может быть субстратом систем цитохрома CYP2J2 (0,818) и цитохрома CYP2J (0,808).

### **3.2 Цитотоксические свойства диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17)**

Выполнили серию экспериментов по изучению цитотоксических свойств соединений диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в живых культурах фибробластов человека при экспозиции широкого диапазона концентраций исследуемых соединений. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест с трифенилтетразолия хлоридом (МТТ-тест) с фотометрическим определением продуктов реакции. Результаты экспериментов представлены на рисунках 4 и 5. Каждая серия проведена на 3 культурах, результаты представлены в виде средней арифметической и стандартного отклонения.

Как хорошо видно, инкубирование культуры фибробластов человека в присутствии диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ не сопровождалось гибелью клеток в культуре до достижения концентрации 10 мкМ. Некоторое снижение выживаемости клеток (до 97,5%) при повышении концентрации вещества в среде культивирования до 100 мкМ не выходит за рамки статистической погрешности и не может рассматриваться как значимый цитотоксический эффект вещества.

Инкубирование культуры фибробластов человека в присутствии 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в аналогичном

диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ также не сопровождалось гибелью клеток в культуре до достижения концентрации 10 мкМ. При повышении концентрации вещества в среде культивирования до 100 мкМ наблюдали рост клеток в исходной культуре (в среднем до 106,4%), что было статистически значимым результатом ( $p = 0,03$  по сравнению с предыдущим значением, критерий Уилкоксона).

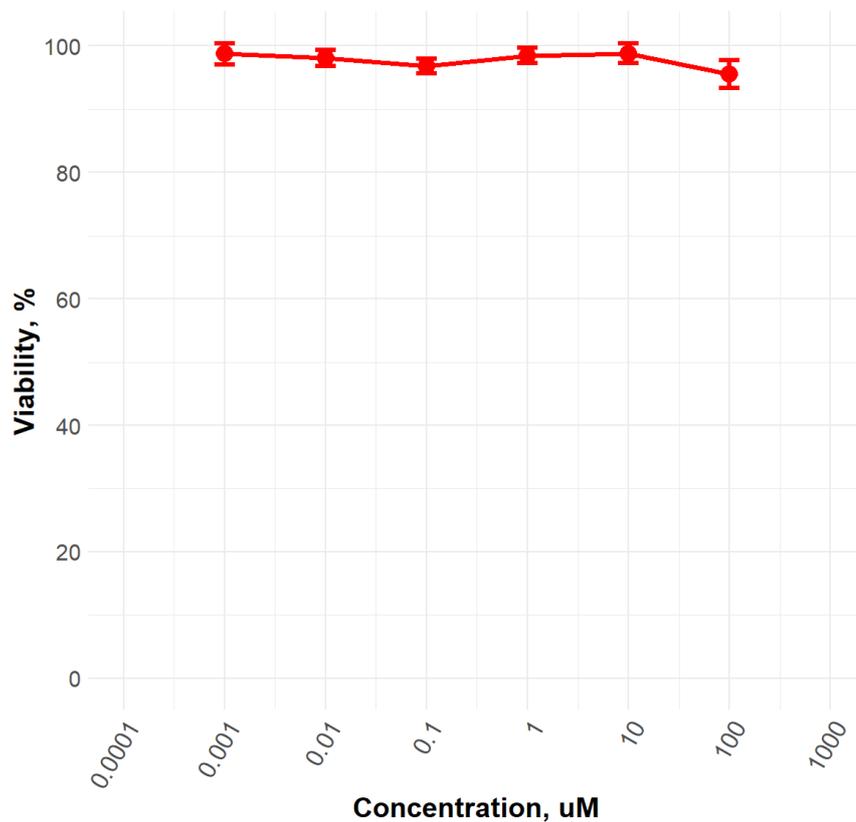


Рисунок 4 – Выживаемость клеток культуры фибробластов через 48 часов после инкубации в присутствии диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ ( $n = 3$ );  $M \pm SD$

Следовательно, исследуемые вещества – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ, при этом соединение ЛХТ-6-17 в концентрациях 100 мкМ и выше стимулирует пролиферацию фибробластов в клеточной культуре.

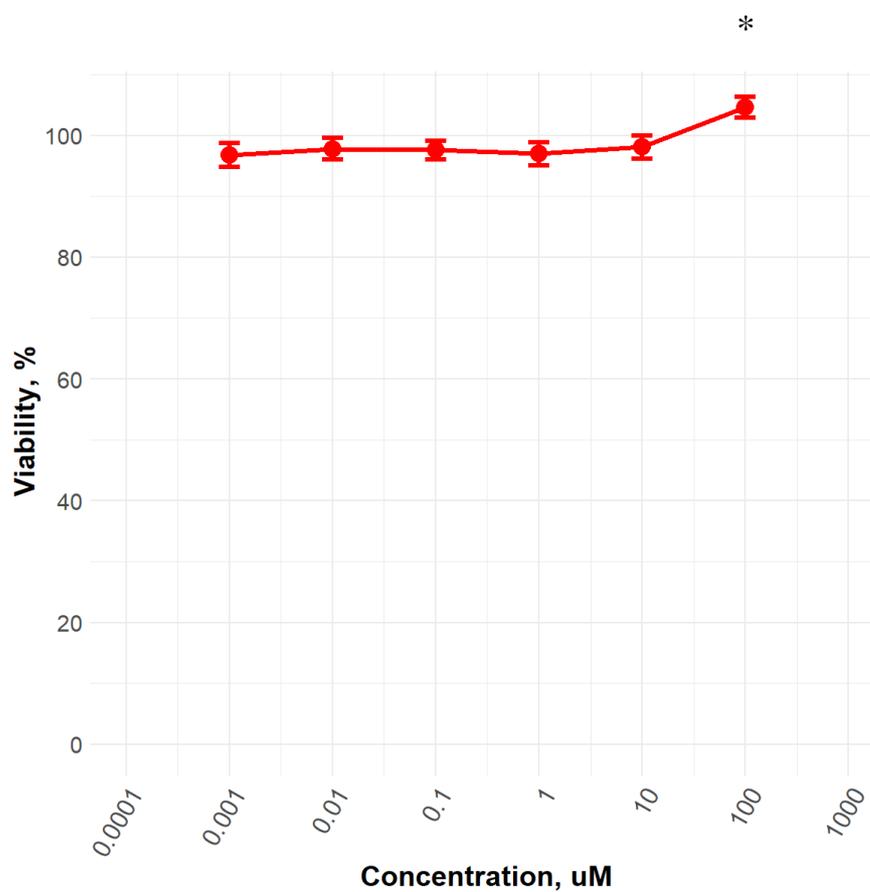


Рисунок 5 – Выживаемость клеток культуры фибробластов через 48 часов после инкубации в присутствии 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ ( $n = 3$ );  $M \pm SD$ ; \*  $p = 0,03$  при сравнении с предыдущим значением (критерий Уилкоксона)

## ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТОПИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ЛХТ-9-17 И ЛХТ-6-17 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИОДОНТИТЕ

На предыдущем этапе нашей работы было показано, что для исследуемых веществ – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) спрогнозирована высокая вероятность противовоспалительного действия.

Развитие воспалительной реакции включает активацию различных путей, участвующих в метаболической регуляции клеточных и тканевых функций, включая каскад фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Сигнальный путь PI3K влияет на воспалительный процесс, способствуя увеличению выживаемости нейтрофилов [181] и паттерну дифференцировки остеокластов [182]. Экспрессия PI3K выше в тканях пациентов с пародонтитом и периодонтитом, чем в здоровой ткани десны [183].

Резорбция периодонтальной кости индуцируется остеокластами. Для соединения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) спрогнозирована способность подавлять активность остеокластов. Рецептор-активатор лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептор RANK и рецептор-ловушка остеопротегерина (OPG) являются ключевыми молекулами, которые регулируют дифференцировку, рекрутирование и функцию остеокластов [184]. Катепсин-К является ведущей протеазой в процессе деградации остеокластов. Существует положительная корреляция между катепсином-К и молекулами костного матрикса.

Уровни RANKL позволяют предположить, что избыточное производство RANKL приводит к образованию активных остеокластов и продукции катепсина-К в остеокластах пародонта пациентов с пародонтитом, что способствует остеокластической резорбции кости [185]. Другими важными протеазами, участвующими в деструктивных заболеваниях пародонта, являются матриксные металлопротеиназы (ММП). Традиционно считалось, что ММП разрушают

компоненты внеклеточного матрикса и группируются в соответствии с их субстратной специфичностью в коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины и др. Поскольку коллаген типа I представляет собой основной компонент периодонтального внеклеточного матрикса, особое внимание при периодонтите уделяется желатиназам MMP-2 [186].

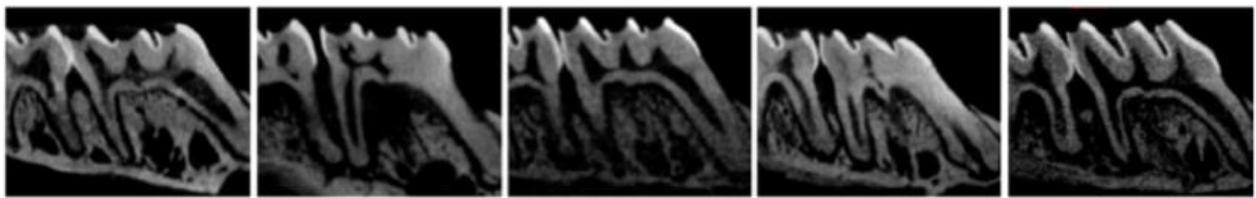
Основными задачами данного раздела исследования было изучение роли диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в воспалении, потере костной массы и активации ряда ассоциированных сигнальных путей на экспериментальной модели периодонтита на крысах.

#### **4.1 Влияние соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на потерю костной ткани при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс**

По данным компьютерной микротомографии (микроКТ) верхних челюстей лабораторных крыс с экспериментальным периодонтитом, рассчитали линейную потерю костной массы, выраженную в миллиметрах между цементно-эмалевым соединением пораженного патологическим процессом зуба и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти.

В интактной группе (контралатеральная сторона верхней челюсти) среднее значение показателя составляло  $0,47 \pm 0,04$  мм. У животных со сформированным экспериментальным периодонтитом (контрольная группа) расстояние между цементно-эмалевым соединением пораженного патологическим процессом зуба и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти в среднем составило  $1,48 \pm 0,07$  мм ( $p = 0,005$  при сравнении с интактной группой) (Рисунок 6).

## А



1

2

3

4

5

## Б

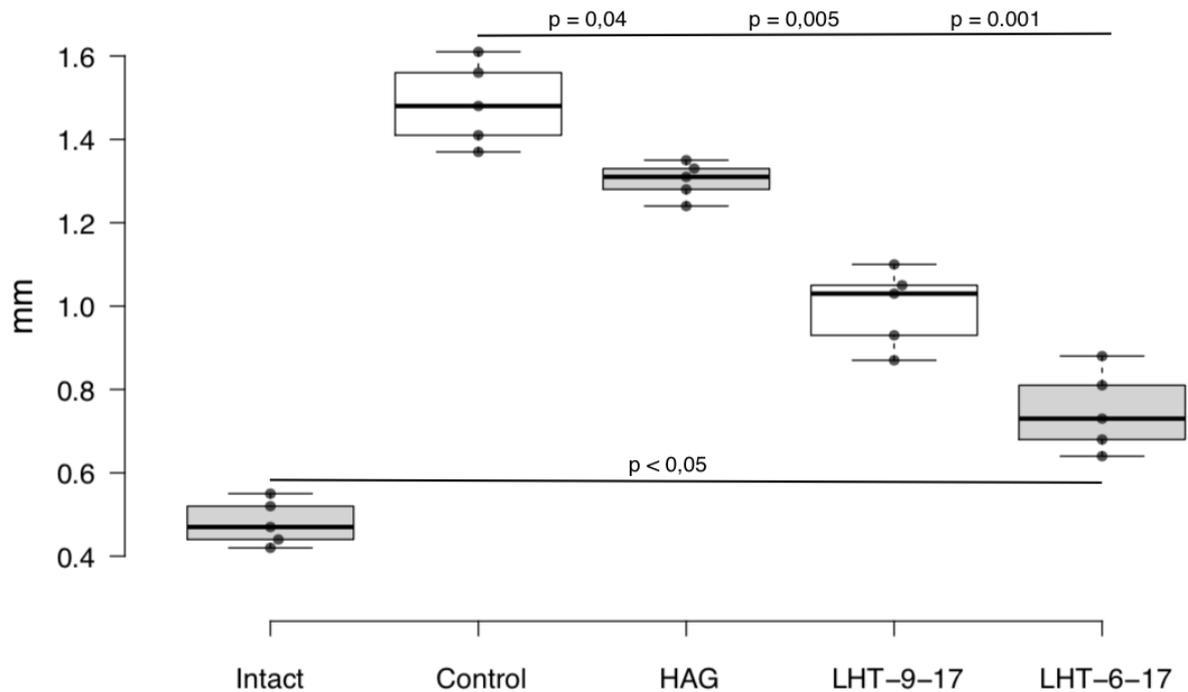


Рисунок 6 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на линейную потерю костной ткани у лабораторных крыс с экспериментальным периодонтитом в области второго моляра: А – микроКТ фрагментов верхней челюсти: 1 – интактная группа; 2 – контроль; 3 – гель с гиалуроновой кислотой; 4 – ЛХТ-9-17; 5 – ЛХТ-6-17; Б – расстояние между цементно-эмалевым соединением и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти: HAG – гель с гиалуроновой кислотой;  $n = 5$  в каждой группе;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи ANOVA, post-hoc тест Тьюки

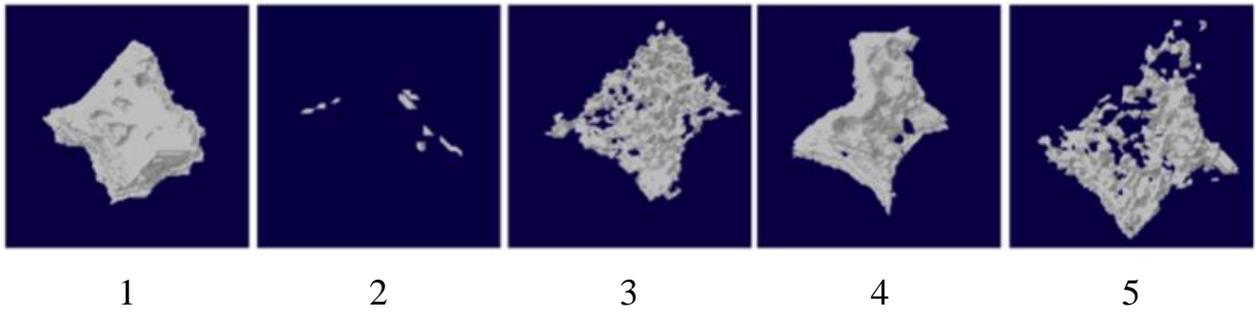
Местное применение геля гиалуроновой кислоты сопровождалось сокращением линейной потери костной массы в среднем до  $1,29 \pm 0,05$  мм ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных), однако показатель не достигал значений интактных участков верхней челюсти лабораторных животных (Рисунок 6).

Топическая аппликация соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в зубодесневой карман в течение 10 суток приводила к статистически достоверному сокращению линейной потери костной массы, отличающейся также от группы животных, получавших в качестве лечения гель гиалуроновой кислоты. Так, в частности, в группе животных, которым с терапевтической целью вводили гель диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) показатель составил  $0,87 \pm 0,05$  мм ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,02$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты, с интактными фрагментами челюсти).

В группе лабораторных крыс, которые получали топическое воздействие гелем, содержащим в качестве действующего вещества 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17), расстояние между цементно-эмалевым соединением и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти составило в среднем  $0,65 \pm 0,04$  мм ( $p = 0,001$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,03$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты, с интактными фрагментами челюсти).

Также, после проведения трехмерной реконструкции полученных микромографических изображений провели анализ соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) лабораторных животных (Рисунок 7). Мы установили, что в интактной группе (контралатеральная сторона верхней челюсти) среднее значение показателя составляло  $84 \pm 3\%$ . У животных со сформированным экспериментальным периодонтитом соотношения веса костной массы / общего веса тканей верхней челюсти в области второго моляра в среднем составило  $3 \pm 1 \%$  ( $p = 0,0001$  при сравнении с интактной группой) (Рисунок 7).

А



Б

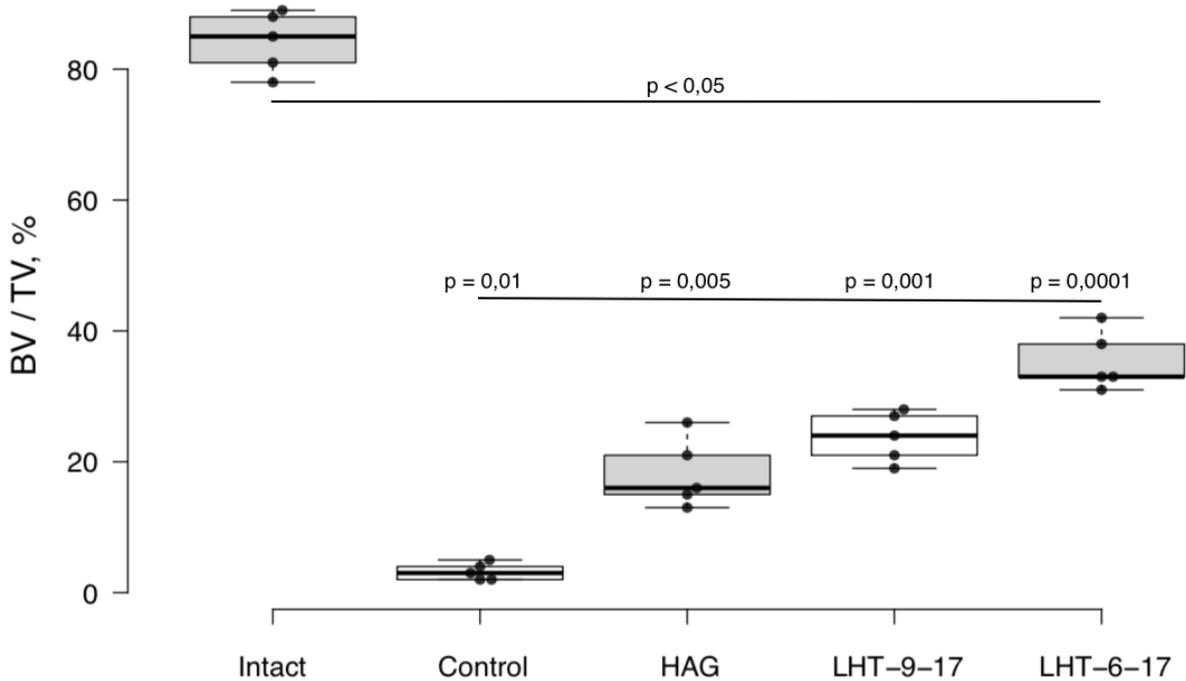


Рисунок 7 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра): А – 3D-реконструкция фрагментов верхней челюсти: 1 – интактная группа; 2 – контроль; 3 – гель с гиалуроновой кислотой; 4 – ЛХТ-9-17; 5 – ЛХТ-6-17; Б – соотношения веса костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) в %: HAG – гель с гиалуроновой кислотой; n = 5 в каждой группе; M ± SD; значимость различий вычислена при помощи ANOVA, post-hoc тест Тьюки

Местное применение геля гиалуроновой кислоты сопровождалось статистически значимым ростом соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) в среднем до  $18 \pm 3$  % (p = 0,01 при сравнении с контрольными

животными), однако показатель не достигал значений интактных участков верхней челюсти лабораторных животных (Рисунок 7).

Топическая аппликация соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в зубодесневой карман в течение 10 суток приводила к статистически достоверному сокращению потери волюметрических показателей костной массы, вместе с тем не отличающейся от группы животных, получавших в качестве лечения гель гиалуроновой кислоты. Так, в частности, в группе животных, которым с терапевтической целью вводили гель диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) исследуемый показатель BV / TV составил  $24 \pm 4 \%$  ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными фрагментами верхней челюсти лабораторных крыс).

В группе лабораторных крыс, которые получали топическое воздействие гелем, содержащим в качестве действующего вещества 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17), волюметрический показатель соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) составил в среднем  $36 \pm 3 \text{ мм}$  ( $p = 0,0001$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,005$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты,  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными фрагментами челюсти).

Следовательно, на модели экспериментального лигатурного периодонтита верхнего второго моляра у лабораторных крыс 10-суточная местная аппликация геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в качестве действующего вещества приводит к предотвращению резорбции костной ткани как по линейному так и по волюметрическому показателю, при этом, наибольшей активностью обладает вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17). Вместе с тем, ни одно из изученных соединений не способно сохранять массу костной ткани при патологическом процессе на уровне неповрежденных фрагментов верхней челюсти.

#### **4.2 Влияние соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на микроструктуру альвеолярного отростка и тканей десны при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс**

Светооптическим методом исследовали окрашенные гематоксилином и эозином срезы верхней челюсти и тканей десны в неповрежденных областях и в области воспроизведения экспериментальной патологии у лабораторных крыс на фоне местной десятисуточной аппликации гелей, содержащих изучаемые соединения.

Гистопатологический анализ показал, что в интактных областях полости рта экспериментальных животных (контралатеральный отдел верхней челюсти) структуры ткани пародонта – маргинальной десны и связок, а также периодонта и альвеолярной кости сохранились в неизменном виде на протяжении всего опыта (Рисунок 8). Значение гистопатологической шкалы тяжести воспалительной реакции составило 0 – 0 (Рисунок 8), что соответствовало нормальному состоянию тканей.

В группе животных, которым проводили моделирование экспериментального периодонтита, в микропрепаратах наблюдалась инфильтрация воспалительными клетками в сочетании с разрушением цемента пораженного патологическим процессом второго моляра и альвеолярного отростка верхней челюсти (Рисунок 8). Средний гистопатологический балл для этой экспериментальной группы составил 4 (диапазон 4 – 4;  $p < 0,05$  при сравнении с интактными контралатеральными областями; рисунок 8).

В группе лабораторных животных, получавших гель гиалуроновой кислоты, наблюдалась инфильтрация воспалительными клетками и обширное разрушение цемента и альвеолярного отростка со средним гистопатологическим баллом 3 (диапазон 3 – 3;  $p < 0,05$  при сравнении с интактными контралатеральными областями и контрольными животными; рисунки 8, 9).

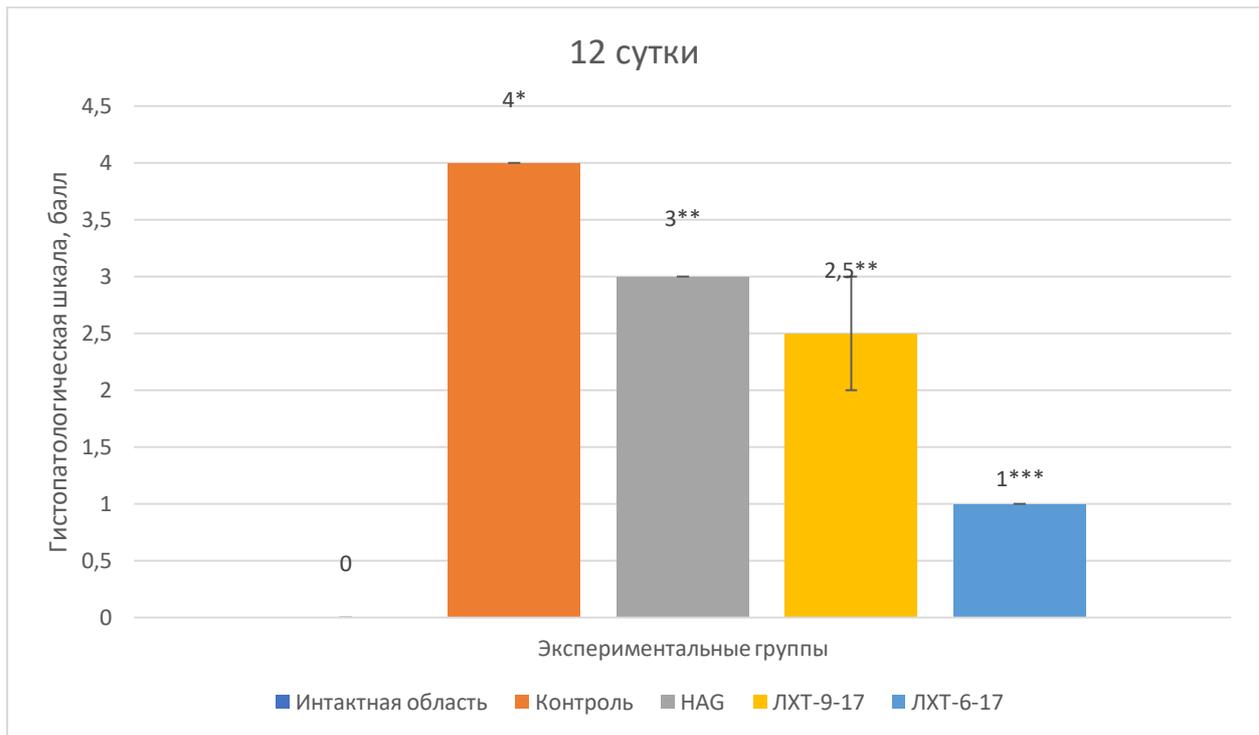


Рисунок 8 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на морфологию исследованных фрагментов верхней челюсти (в области второго моляра): гистопатологическая шкала тяжести поражения в баллах;  $n = 5$  в каждой группе; PL – периодонтальная связка; D – дентин; АВ – альвеолярная кость; С – цемент; а – воспалительный процесс; b – потеря костной массы; с – резорбция цемента; d – уменьшение воспалительного процесса;  $M \pm IQ$ ; значимость различий вычислена при помощи теста Манна-Уитни:  $p < 0,05$  \* при сравнении с интактными областями, \*\* с контролем, \*\*\* с ЛХТ-9-17

Гистопатологическое исследование области интереса, получавших топическое воздействие гелем, содержащим соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, выявило значимую позитивную динамику: в группе животных, получавших в качестве терапевтического средства 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) регистрировали клеточную инфильтрацию легкой степени выраженности, ограниченную областью десны, с сохраненной альвеолярной костью и цементом. Средний гистопатологический балл в этой группе составил 1 (диапазон 1 – 1;  $p < 0,001$  при сравнении с интактными контралатеральными областями и контрольными животными; рисунки 8, 9). На фоне местного воздействия гелем диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17), средний

гистопатологический балл был равен 2,5 (диапазон 2 – 3;  $p < 0,05$  при сравнении с интактными контралатеральными областями; рисунки 8, 9).

Морфологическая оценка тканей десен животных с интактными зубами не выявила изменений: слизистая оболочка покрыта нормальным плоским эпителием. Подслизистая оболочка состоит из соединительных волокон, фибробластов и капиллярных сосудов с ограниченным количеством лимфоцитов. Периодонтальная связка была сохранена (Рисунок 9). Экспериментальный пародонтит проявлялся нейтрофильной инфильтрацией и лизисом тканей пародонта. Топическое введение в зубодесневой карман геля, содержащего 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17), вызывало репарацию мягких тканей вокруг ретенированного верхнего моляра у крыс основной группы. Было установлено, что десна покрыта слизистой оболочкой из плоского эпителия. Подслизистая оболочка и периодонтальная связка содержали зрелую грануляционную ткань с многочисленными фибробластами, лимфоцитами, макрофагами и сосудами капиллярного типа.

Таким образом, экспериментальный лигатурный периодонтит второго верхнего моляра сопровождался глубокими патоморфологическими изменениями тканей зуба, деградацией костного скелета альвеолярного отростка верхней челюсти, выраженной нейтрофильной воспалительной реакцией периодонтальной связки, инфильтрацией подлежащих мягких тканей. Экспериментальная терапия в течение 10 суток с применением геля, содержащего соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты смягчала течение патологического процесса, что выражалось в ограничении воспалительной реакции, сохранении костной основы зуба и альвеолярного отростка. Наибольший эффект установлен у 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17): на фоне назначения содержащего его геля нейтрофильная инфильтрация тканей была минимально выражена, сохранялся цемент второго моляра и костная основа альвеолярного отростка, в меньшей степени, чем на фоне диметилацетеамидной соли страдали окружающие патологический процесс мягкие ткани десны.

### **4.3 Влияние соединения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата на воспалительный процесс, активность оксидативного стресса и некоторые внутриклеточные маркеры при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс**

На данном этапе нашего исследования изучили влияние 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата на воспалительный процесс, активность оксидативного стресса и некоторые внутриклеточные маркеры при экспериментальном периодонтите у лабораторных крыс. Выбор соединения ЛХТ-6-17 обусловлен тем, что в эксперименте на крысах вещество показало наибольшее положительное влияние на торможение процесса разрушения костной ткани и ткани пародонта при воспалительном процессе, сохранение микроструктурной организации области патологического процесса у лабораторных крыс.

С применением метода иммуногистохимии (ИГХ) изучили влияние 10-суточного местного применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в виде геля на экспрессию матричной металлопротеиназы-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1).

На рисунке 9 представлены результаты иммуногистохимического окрашивания тканей в области патологического процесса на MMP-2. Как хорошо видно, ткани пародонта второго верхнего моляра неповрежденной области верхней челюсти лабораторной крысы демонстрировали слабую ИГХ-реакцию на окрашивание анти-MMP-2, анти-RANK, анти-RANKL, анти- катепсин-К, и анти-СОД-1 антителами, что соответствовало слабой активности остеокластов, низкого потенциала резорбции костной основы зуба, низкой напряженности антиоксидантных механизмов.

У животных контрольной группы в области экспериментального лигатурного периодонтита на 12 сутки патологического процесса была

установлена гиперэкспрессия MMP-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-κВ, его рецептора RANKL, катепсина-К и супероксиддисмутазы первого типа, проявляющаяся чрезмерным темно-коричневым окрашиванием

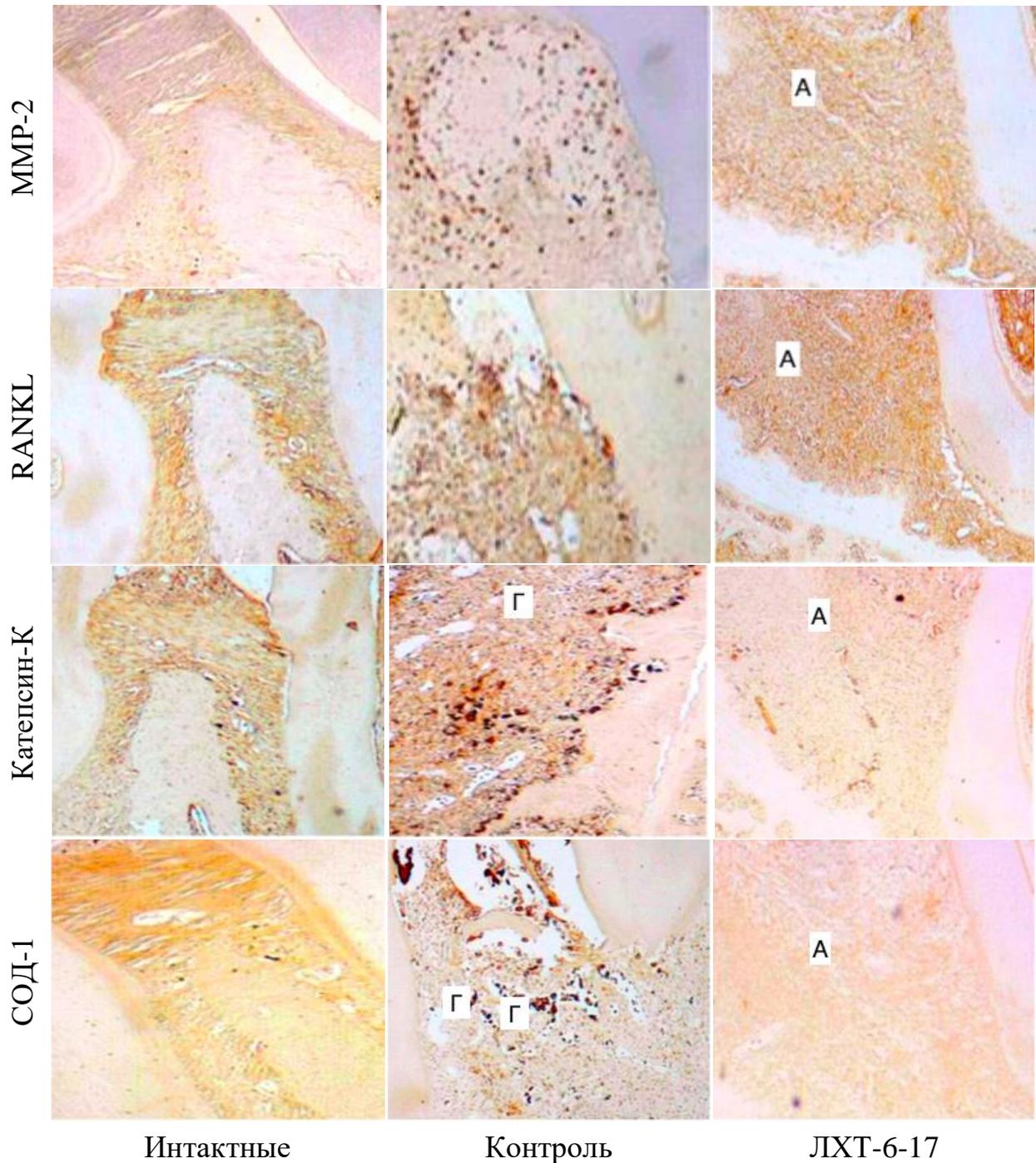


Рисунок 9 – Экспрессия MMP-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-κВ, катепсина-К и супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1) в ткани периодонта: А – области низкой / отсутствия экспрессии; Г – гиперэкспрессия; ИГХ; 200х цитоплазмы клеток или их ядер (в зависимости от исследуемого фактора).

У животных, получавших 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман в области экспериментального лигатурного периодонтита на 12 сутки патологического процесса была установлена гипоэкспрессия либо отсутствие экспрессии матриксной металлопротеазы MMP-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ, его рецептора RANK, катепсина-К и супероксиддисмутазы первого типа (Рисунок 10). Полученные результаты соотносятся с полученными ранее гистоматологическими данными при окрашивании срезов области интереса гематоксилином и эозином, и позволяют заключить, что 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) сдерживает активацию остеокласов, ведущую к резорбции костной основы зуба и кости альвеолярного отростка верхней челюсти, тем самым тормозит развитие периодонтита. В основе эффекта вещества лежит способность модифицировать выработку внутриклеточных регуляторов клеточной активации и факторов – деструкторов межклеточного матрикса.

Одним из ключевых механизмов в реализации воспалительной реакции служит мобилизация макрофагов в очаг воспаления. Подавление миграционного процесса происходит под действием специального хемокина – фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF). Изучили влияние топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) на экспрессию указанного хемокина в ткани пародонта лабораторных грызунов в интактной области, в области второго моляра с явлениями лигатурного периодонтита и у животных, получавших местное воздействие соединением N-ацетил-6-аминогексаноата (Рисунок 10), методом иммунофлюоресценции.

Как видно на рисунке 10 в интактных областях не регистрировалась иммунофлюоресцентная реакция на окрашивание анти-MIF антителами окружающего корень второго моляра пародонта. Напротив, развитие острого воспалительного процесса приводило к ярко-зеленому окрашиванию тканей.

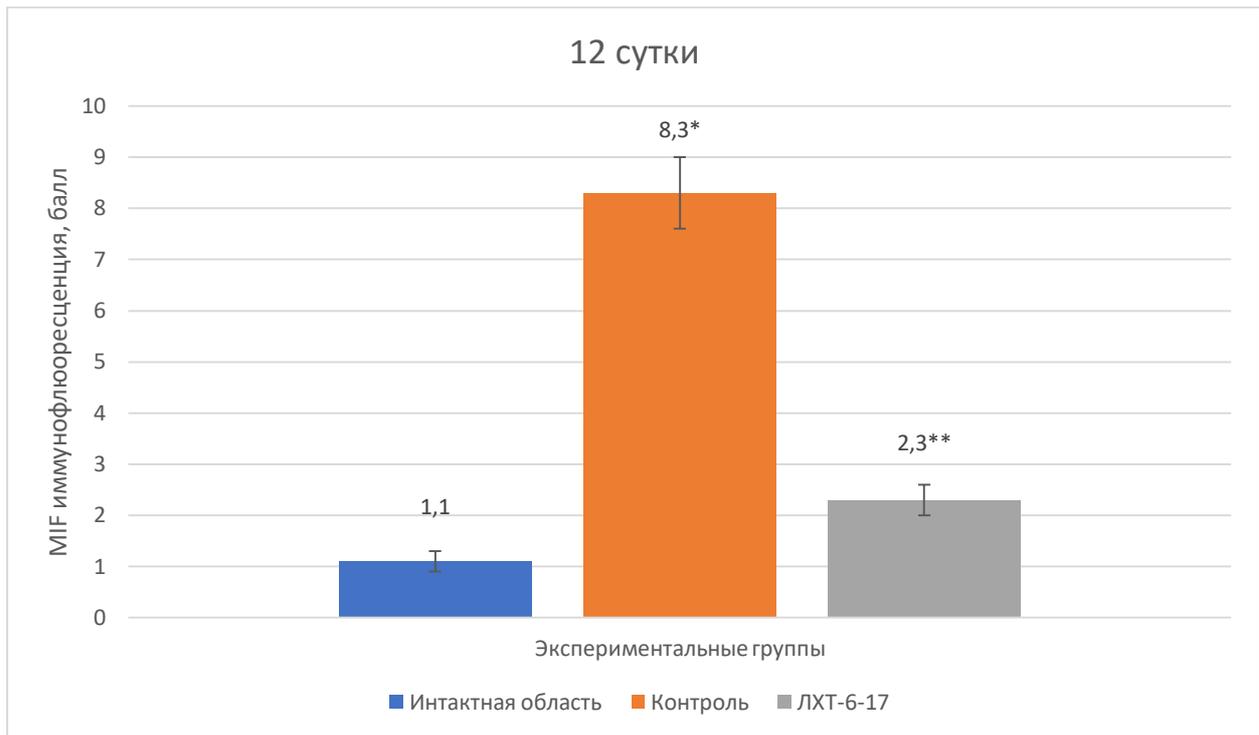


Рисунок 10 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на MIF иммунофлуоресценцию: шкала иммунофлуоресценции в баллах;  $n = 5$  в каждой группе; d – дентин; АВ – альвеолярная кость;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи теста Манна-Уитни:  $p < 0,05$  \* при сравнении с интактными областями, \*\* + с контролем

У животных, получавших 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман в области экспериментального лигатурного периодонтита на 12 сутки патологического процесса было установлено статистически значимое снижение экспрессии фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), до в среднем 2,3 ( $p = 0,001$  при сравнении с контролем,  $p = 0,03$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти).

Поскольку ранее было установлено R13K сигнального пути в реализации патологического процесса при периодонтите, в рамках настоящей диссертационной работы изучили экспрессию маркера также с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

Мы установили, что в неповрежденных патологическим процессом фрагментах верхней челюсти лабораторных крыс (в области второго моляра)

регистрируется слабая иммунофлюоресценция PI3K, в среднем не превышающая  $487 \pm 12$  ед., наблюдающаяся преимущественно в клетках пародонта (Рисунок 11).

При экспериментальном лигатурном периодонтите у лабораторных крыс наблюдается чрезмерный рост экспрессии фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) как в клетках пародонта, так и в области дентина второго моляра (Рисунок 11). Количественный показатель иммунопозитивности возрастает почти двукратно – до  $976 \pm 27$  ед., и наблюдается преимущественно в клетках пародонта (Рисунок 12) ( $p = 0,001$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти).

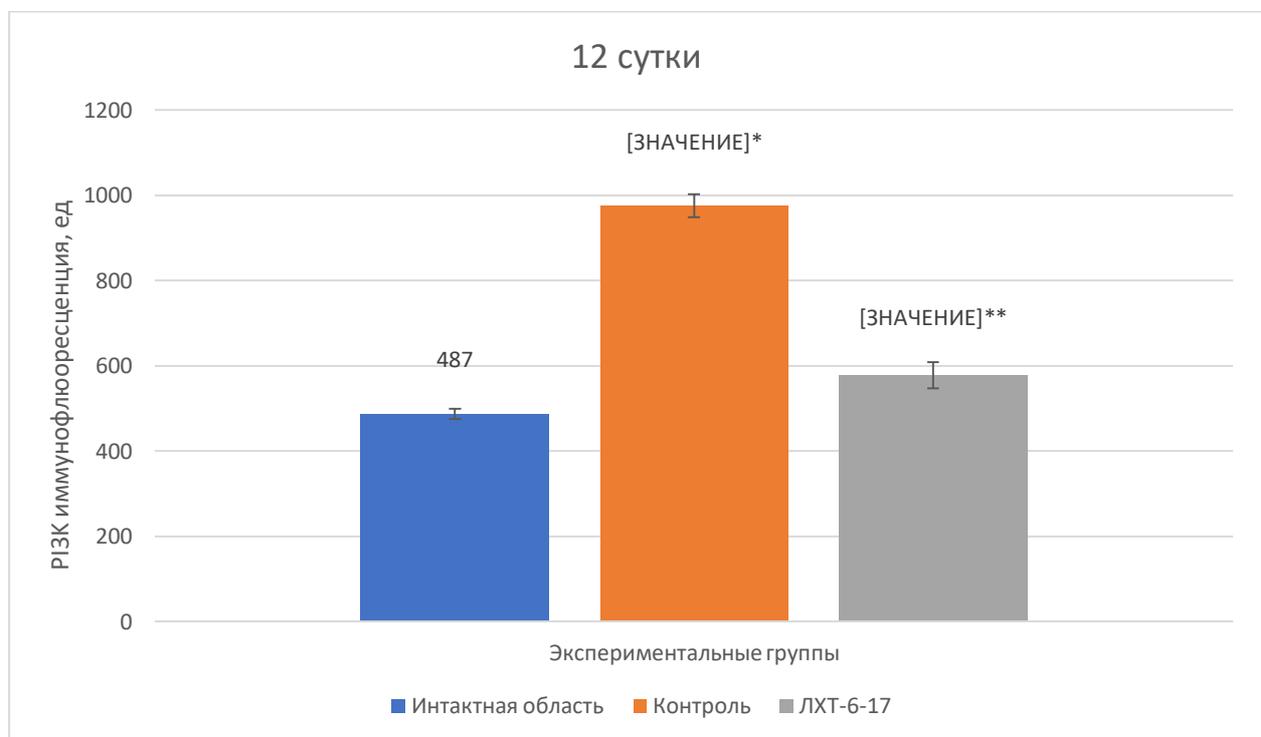


Рисунок 11 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на PI3K иммунофлюоресценцию: шкала иммунофлюоресценции в ед.;  $n = 5$  в каждой группе;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи теста ANOVA и Тьки:  $p < 0,05$  \* при сравнении с интактными областями,  $p < 0,05$  \*\* при сравнении с интактными областями и с контрольной группой = 0,005 при сравнении с интактными областями верхней челюсти;  $p = 0,005$  при сравнении с контролем).

Местное ежесуточное применение при экспериментальном лигатурном периодонтите 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман приводит к тому, что у

лабораторных крыс экспрессия фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) как в клетках пародонта, так и в области дентина второго моляра (Рисунок 11) статистически достоверно снижается до в среднем  $578 \pm 31$  ед. (Рисунок 11)

Методом количественного иммуноферментного анализа (КИФА) определили тканевую концентрацию провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНОальфа в ткани пародонта лабораторных животных экспериментальных групп (Рисунок 12, Рисунок 13).

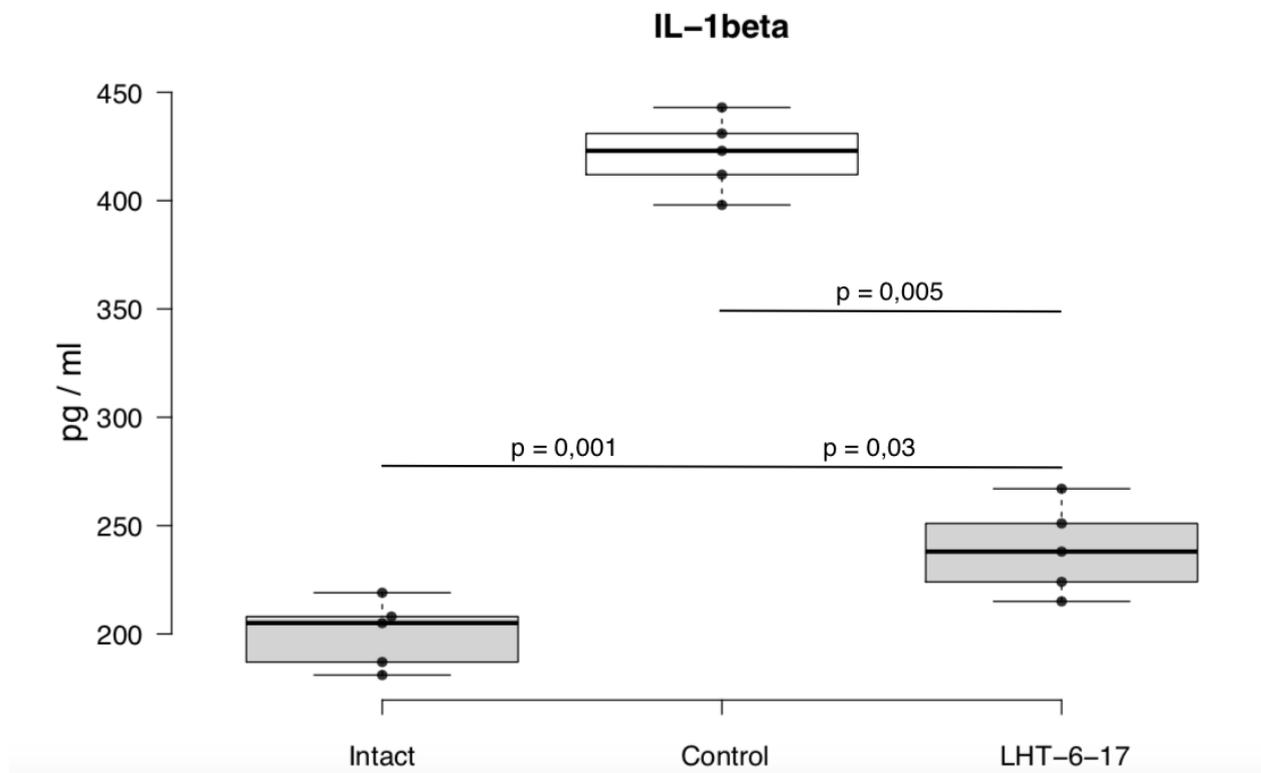


Рисунок 12 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на концентрацию интерлейкина-1 бета (IL-1beta) в ткани пародонта;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи теста ANOVA и Тьюки

В ткани пародонта интактного второго верхнего моляра концентрация ИЛ-1бета составляла в среднем  $200 \pm 21$  пг/мл, ФНОальфа –  $256 \pm 32$  пг/мл. В условиях патологического процесса в контрольных наблюдениях при экспериментальном лигатурном периодонтите у лабораторных крыс наблюдается чрезмерный рост экспрессии обоих провоспалительных цитокинов в области

дентина второго моляра (Рисунок 13, Рисунок 14). Количественный показатель составил для ИЛ-1бета в среднем  $421 \pm 33$  пг/мл ( $p = 0,001$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти), для ФНОальфа –  $3154 \pm 83$  пг/мл (Рисунок 14) ( $p = 0,001$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти).

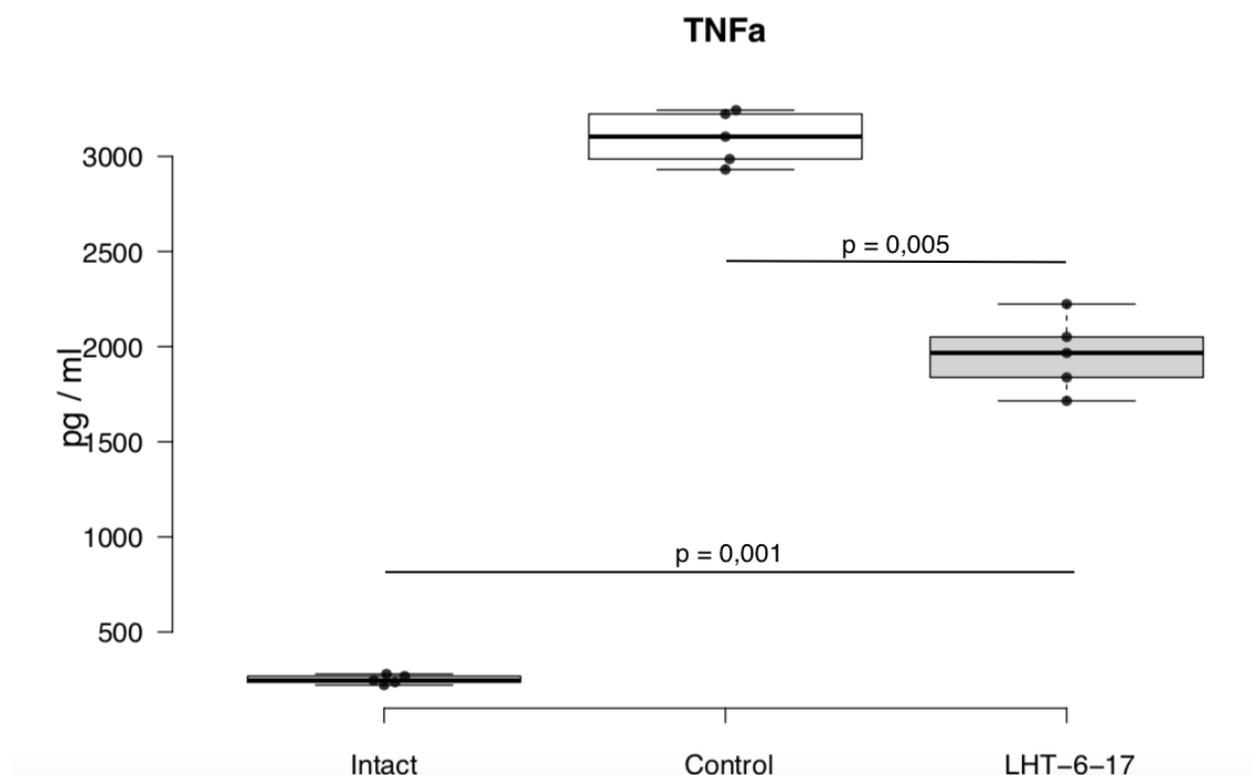


Рисунок 13 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на концентрацию фактора некроза опухолей альфа (TNFα) в ткани пародонта;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи теста ANOVA и Тьюки

Местное ежесуточное применение при экспериментальном лигатурном периодонтите 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман сопровождается снижением концентрации обоих провоспалительных цитокинов в области дентина второго моляра (Рисунок 13, Рисунок 14). Количественный показатель составил для ИЛ-1бета в среднем  $246 \pm 17$  пг/мл ( $p = 0,03$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти;  $p = 0,005$  при сравнении с контрольными областями верхней

челюсти), для ФНОальфа –  $1976 \pm 77$  пг/мл (Рисунок 14) ( $p = 0,001$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти и контролем).

Таким образом, гель 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) является эффективным топическим средством лечения лигатурного периодонтита

## ГЛАВА 5. МЕСТНОАНЕСТЕЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ ЛХТ-9-17 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ

Воспалительный процесс в периодонте и окружающих зуб тканях создают неблагоприятные условия для реализации анестезирующего действия местных анестетиков, особенно имеющих амидную структуру. Практические врачи часто испытывают большие трудности с проведением достаточной глубины и продолжительности анестезии зубов при воспалении при использовании инфильтрационного метода или блокады нерва при пульпите или апикальном периодонтите [187]. Клинические исследования демонстрируют неуспех у 30–45% или низкий успех у 19–56% пациентов с воспалительным процессом нижних моляров при блокаде нижнего альвеолярного нерва даже в случае анестезиологической помощи, оказанной опытным клиницистом [188]. Ни сочетание инфильтрационной анестезии щеки и языка, ни традиционная блокада нерва не сопровождается повышением эффективности манипуляции. Таким образом, проблема адекватного обезболивания в стоматологии в настоящее время является важной задачей как для стоматологов, так и для экспериментальных и клинических фармакологов [188, 189].

В связи с тем, что на этапе внеэкспериментального прогнозирования фармакологической активности у диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) был вычислен высокий коэффициент подавления быстрых натриевых каналов, а также поскольку при создании вещества в структуру молекулы был введен остаток диметилфенилацетамида (основание молекулы лидокаина), есть все основания предполагать, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) может проявлять свойства местного анестетика. Тем более интересно проверить изложенную гипотезу, что данной молекуле свойственно умеренное противовоспалительное действие и способность сдерживать разрушение костной ткани при пародонтите.

## 5.1 Особенности течение инфраорбитальной анестезии лабораторной крысы на фоне экспериментального периодонтита

Исследование проведено на 4 группах животных по 5 особей в каждой группе: контрольные лабораторные крысы с экспериментальным периодонтитом, животные с экспериментальным периодонтитом, которым проводили проводниковую анестезию второго верхнего моляра 2% раствором лидокаина гидрохлорида, и животные с экспериментальным пародонтитом и без такового, которым оказывали анестезиологическое пособие инфраорбитальным введением 2% раствора диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17).

Инфраорбитальное введение 2% раствора лидокаина гидрохлорида приводило к развитию умеренной дентальной анестезии у лабораторных крыс с экспериментальным периодонтитом, продолжавшейся не более  $16,9 \pm 2,4$  мин (Рисунок 14, таблица 3). Начало обезболивающего действия препарата сравнения наступало довольно быстро – в среднем на  $2,3 \pm 0,6$  мин после окончания инфраорбитальной анестезии. Невысокая длительность эффекта обусловлена воспалительным процессом и находит многочисленные подтверждения в научной литературе.

Водный 2% раствор диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) глубоко анестезировал зуб с меньшей скоростью наступления анестезии – начало обезболивающего действия препарата сравнения наступало довольно быстро – в среднем на  $4,7 \pm 0,4$  мин после окончания инфраорбитальной инъекции ( $p = 0,02$  при сравнении с лидокаина гидрохлоридом). Продолжительность обезболивания в среднем составила  $35,3 \pm 2,7$  мин ( $p = 0,001$  при сравнении с лидокаина гидрохлоридом).

Таблица 3 – Изменение регистрируемого порога болевой чувствительности (выраженного в % к исходным значениям) на фоне электростимуляции второго верхнего моляра лабораторных крыс с лигатурным пародонтитом (П (+)) или без такового (П (-)) при проводниковой инфраорбитальной анестезии с применением 2% раствора диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17)

Соединение	Условия эксперимента	Временная точка регистрации порога, мин.						
		0	30	60	90	120	150	180
Контроль	П (+)	17±3 <sup>B</sup>	21±5 <sup>B</sup>	22±4 <sup>B</sup>	27±7 <sup>B</sup>	18±4 <sup>B</sup>	16±5 <sup>B</sup>	13±4 <sup>B</sup>
Лидокаина гидрохлорид	П (+)	18±6	151±8 <sup>*aB</sup>	123±8 <sup>*aB</sup>	78±5 <sup>*aB</sup>	24±5 <sup>B</sup>	20±4	17±5
ЛХТ-9-17	П (-)	19±3	201±2 <sup>*a</sup>	174±5 <sup>*a<sup>б</sup></sup>	126±6 <sup>*a<sup>б</sup></sup>	111±7	102±6	18±6
	П (+)	18±4	171±7 <sup>*aB</sup>	112±6 <sup>*a<sup>б</sup></sup>	98±4 <sup>*a<sup>б</sup></sup>	56±4 <sup>*B</sup>	25±8	19±5

Примечание: \*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем; <sup>б</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с лидокаина гидрохлоридом; <sup>B</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с крысами при лигатурном пародонтите (ANOVA, критерий Тьюки); <sup>a</sup>  $p < 0,05$  при сравнении с исходными данными (критерий Уилкоксона)

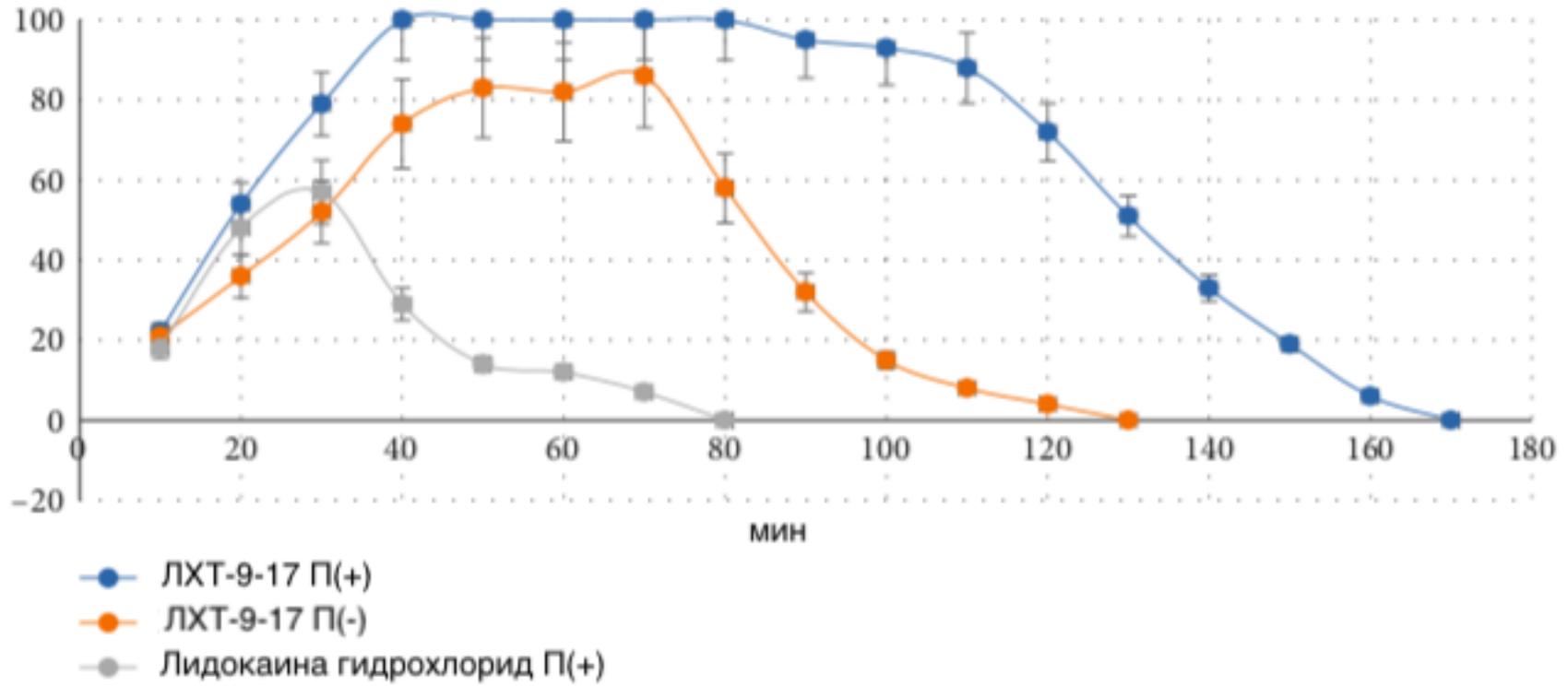


Рисунок 14 – Динамика болевой чувствительности в экспериментальных группах

Применение водного 2% раствора диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) вызывало полную анестезию через  $32,1 \pm 1,7$  мин после подглазничной инъекции у животных без воспаления. Применение водного 2% раствора диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) вызывало полную анестезию через  $32,1 \pm 1,7$  мин после подглазничной инъекции у животных без воспаления.

Крысы этой группы не реагировали на болевые стимулы в течение  $72,1 \pm 2,6$  мин стимуляции ( $p < 0,001$  по сравнению с лидокаина гидрохлоридом и диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17)) (Рисунок 15).

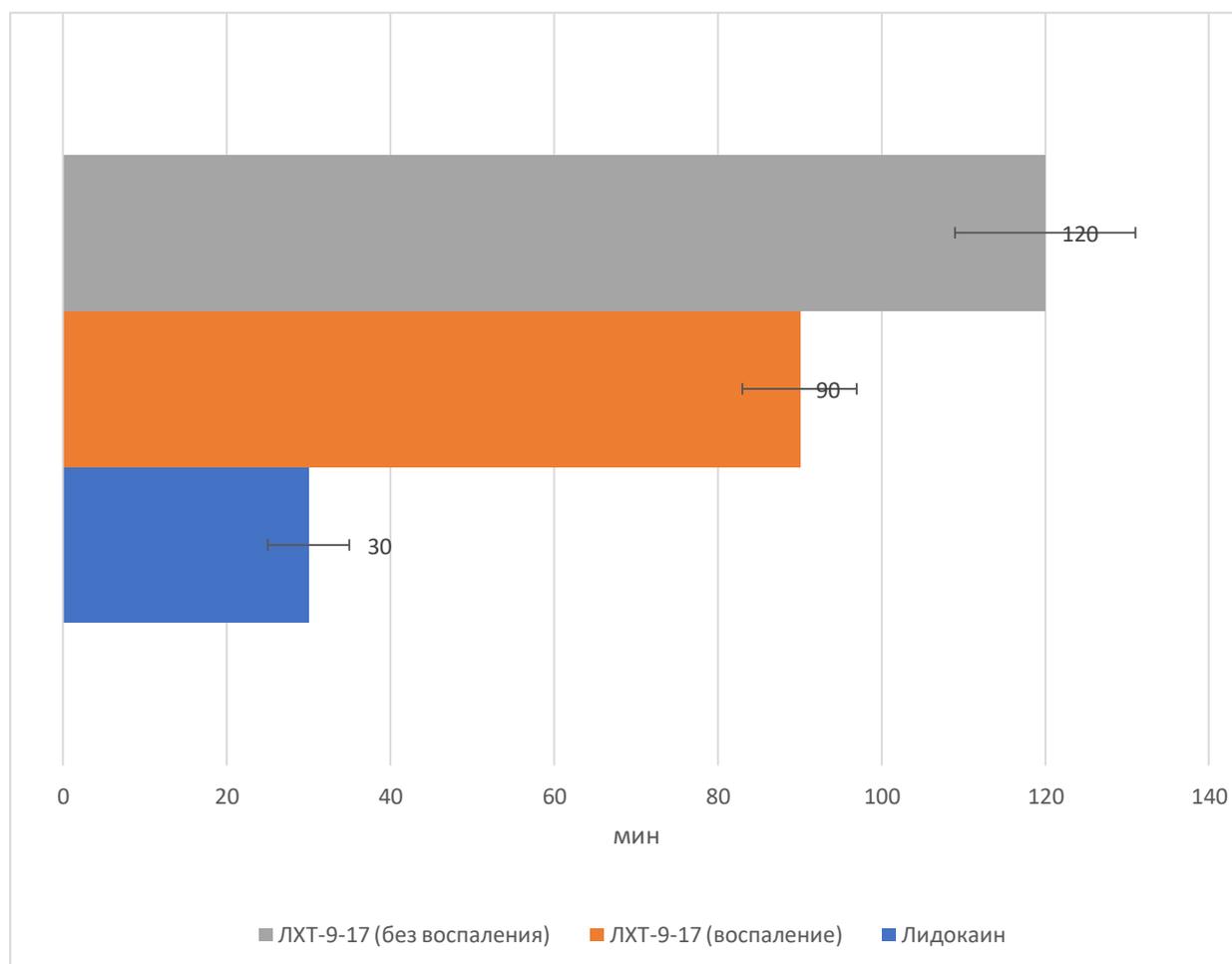


Рисунок 15 – Продолжительность местного обезболивающего действия диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) у лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового при проводниковой (инфраорбитальной) анестезии второго верхнего моляра

Следовательно, диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) обладает местноанестезирующим действием, которое характеризуется медленным развитием достаточной по глубине анестезии продолжительностью до 120 минут. Реализация местного обезболивающего эффекта соединения на фоне острого воспалительного процесса сдерживает формирование местноанестезирующего эффекта. Это проявляется как снижением глубины, так и продолжительности действия на 25%.

## **5.2 Некоторые механизмы развития местного обезболивающего эффекта диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединения ЛХТ-9-17)**

Как было установлено в экспериментах на лабораторных крысах с острым лигатурным периодонтитом и без такового диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) обладает местноанестезирующим действием, очевидно, вследствие наличия в структуре соединения амидного основания диметилфенилацетамида. Вместе с тем, открытым остается вопрос о механизме местного обезболивающего действия вещества и роли остатка N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в его реализации, если таковое имеется. В связи с чем, на заключительном этапе нашей работы мы провели ряд экспериментов, в которых попытались объяснить природу анестезирующего действия ЛХТ-9-17.

С этой целью поставили два лабораторных *in vitro* эксперимента: первый эксперимент был выполнен на одиночных нейронах, выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*). Создание специальных перфузионных условий позволяет изучить проводимость изолированных быстрых натриевых каналов в различных конфигурациях.

Второй эксперимент проводили на живых свежих препаратах седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*), помещенных в специальную

перфузионную камеру, позволяющую при изменении рН перфузионного раствора воспроизводить условия, подобные воспалительной реакции.

На рисунке 17 представлены результаты записи тока через быстрый натриевый канал ( $I_{Na}$ ) изолированного нейрона вегетативного ганглия брюхоногого моллюска *Limnea stagnalis* на фоне перфузии 0,00001 (1), 0,0001 (2), 0,001 (3) и 0,01 (4) мкМ диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17). Как хорошо видно, диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат в зависимости от концентрации подавляет проводимость изолированных натриевых каналов, при этом в максимальной концентрации – 0,01 мкМ проводимость канала для иона натрия ингибируется полностью (Рисунок 16).

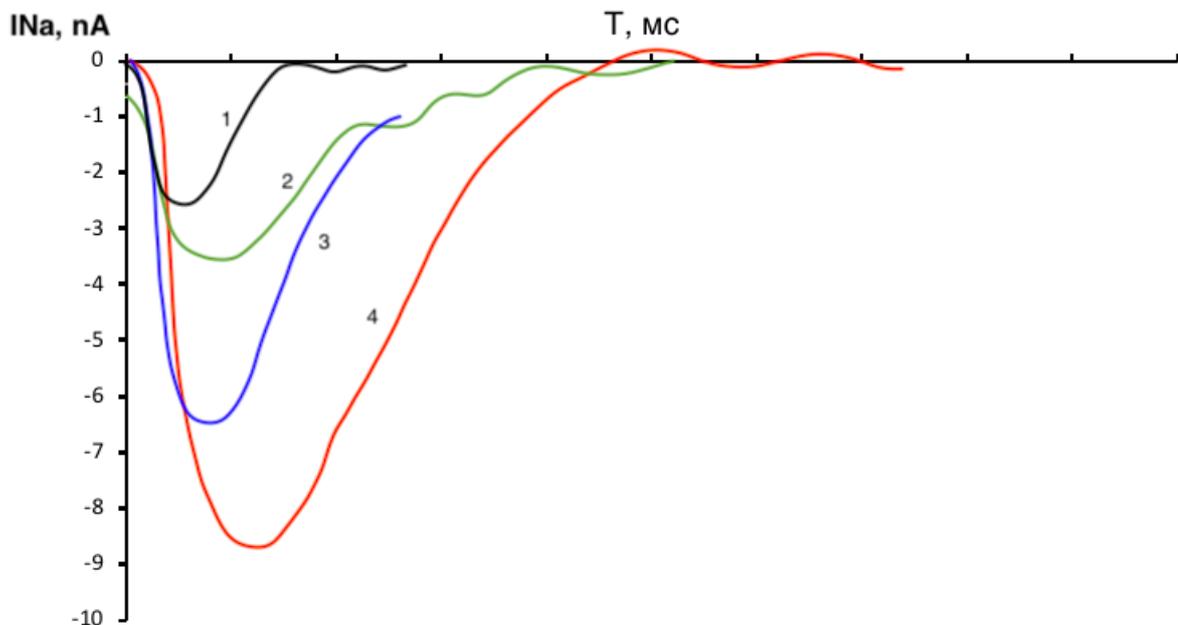


Рисунок 16 – Запись тока через быстрый натриевый канал ( $I_{Na}$ ) изолированного нейрона вегетативного ганглия брюхоногого моллюска *Limnea stagnalis* на фоне перфузии 0,00001 (1), 0,0001 (2), 0,001 (3) и 0,01 (4) мкМ диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17);  $n = 5$  для каждой концентрации

Для перфузии препаратов седалищного нерва лягушки озерной были выбраны те же эффективные концентрации диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17), вызывающие дозозависимое подавление

натриевого тока – в диапазоне от 0,00001 до 0,01 мкМ. В экспериментах регистрировали амплитуду потенциала действия с применением микроэлектродной техники.

Как видно на рисунке 17, перфузия препаратов седалищного нерва лягушки озерной диметилацетамидом N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,01 мкМ при нормальном рН в перфузионной камере (7,3) сопровождалась пропорциональным с результатами предыдущего эксперимента эффективным зависимым от концентрации подавлением амплитуды потенциала действия нервных волокон седалищного нерва.

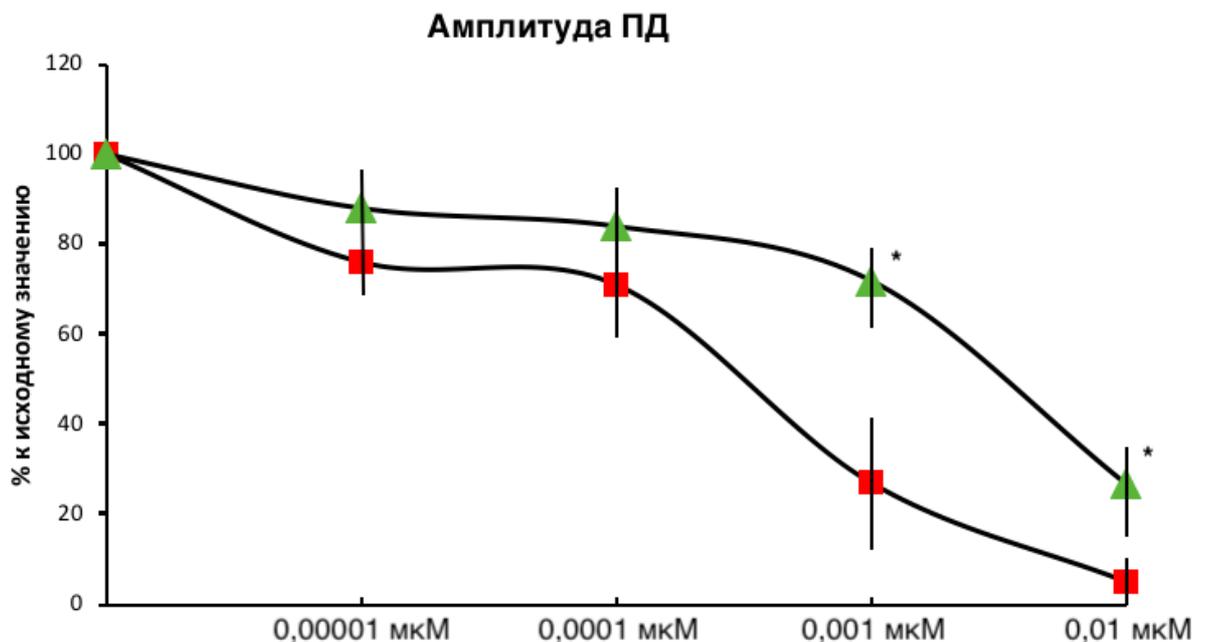


Рисунок 17 – Запись амплитуды потенциала действия изолированного препарата седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*) на фоне перфузии 0,00001, 0,0001, 0,001 и 0,01 мкМ диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) при рН в перфузионной камере 7,3 (красный квадрат) и 6,0 (зеленый треугольник): \*  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующими значениями при нормальном рН (критерий t Стьюдента);  $n = 5$  для каждой концентрации при каждом значении рН

В концентрациях 0,001 – 0,01 мкМ диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) при нормальном рН практически полностью подавлял проведение импульса по изолированному нервному проводнику.

В условиях метаболического ацидоза, воспроизводящих таковые при развитии воспалительной реакции в области зуба и окружающих его тканей, кинетика подавления проводимости импульса по препарату седалищного нерва земноводного менялась: так, в частности, в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,001 мкМ наблюдали лишь незначительное снижение амплитуды ПД (не превышающее 70% от исходно зарегистрированных значений показателя), при увеличении концентрации диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в перфузионном растворе до 0,01 мкМ происходило подавление амплитуды ПД на 73%, что, тем не менее, было статистически значимо меньше, чем в экспериментах без ацидоза ( $p = 0,01$ ).

Таким образом, мы установили, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) обладает местноанестезирующей активностью в том числе и при воспалительном процессе. Обезболивающее действие вещества обусловлено подавлением проводимости натриевых каналов нервных проводников. Сохранение активности на фоне локального воспаления может быть обусловлена способностью вещества сдерживать формирование воспалительной реакции, наличием свойств антиоксиданта.

## ГЛАВА 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Периодонтит — одно из основных хронических воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, представляющее наиболее распространенную форму патологии костей у человека [1]. Действительно, большинство взрослых страдают периодонтитом средней степени тяжести, при этом до 15% населения страдают тяжелым генерализованным периодонтитом [2]. Для этого заболевания характерно наличие инфекционного фактора, приводящего к возникновению деструкции соединительных тканей, опосредованной локальной выработкой иммуновоспалительных маркеров в ответ на патогены и их продукты [3]. В результате клеточных ответов на пародонтопатогены в ткани десен или в жидкости десен были идентифицированы многочисленные про- и противовоспалительные медиаторы [4-6]. Было описано, что среди медиаторов организма-хозяина, продуцируемых после распознавания микроорганизмов, провоспалительный цитокин интерлейкин (ИЛ)-1 играет важную роль в патогенезе периодонтита, поскольку он связан с миграцией воспалительных клеток и прогрессированием остеокластогенеза [7, 8]. В отличие от деструктивного механизма, в котором участвуют провоспалительные цитокины, регуляторные пути, опосредованные противовоспалительными медиаторами, такими как ИЛ-10, могут защищать ткани периодонта и пародонта. Фактически, было доказано, что генноинженерные мыши ИЛ-10(-/-) обладают повышенной восприимчивостью к потере альвеолярной кости, вызванной *P. gingivalis*, что указывает на роль ИЛ-10 в контроле деструктивного воспаления [9].

В этом контексте в многочисленных исследованиях изучены стратегии модуляции иммунно-воспалительной реакции организма-хозяина, связанной с заболеваниями периодонта. Некоторые предыдущие доклинические и клинические исследования показали, что как классические нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), так и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) способны модулировать иммунно-воспалительную реакцию организма человека [10-15]. Однако системное применение этих

препаратов обычно связано с побочными эффектами, ухудшающими соблюдение пациентами режима их употребления [16]. Хотя местное применение НПВП и других противовоспалительных средств изучалось в некоторых исследованиях, многие из них выявили неудовлетворительные результаты в контроле воспаления при местном применении этих препаратов [17].

В проведенных ранее исследованиях было показано, что производные N-ацетил-6-аминогексановой кислоты обладают широким спектром фармакологического действия, в том числе активны по сдерживанию воспалительных реакций, модулируют свободнорадикальные реакции, обладают ранозаживляющим эффектом. В этой связи было чрезвычайно интересно изучить терапевтические возможности топического применения двух новых оригинальных соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащих остатки 3-гидроксипиридина и диметилфенилацетамида (лидокаина) в своей структуре, при повреждении периодонта – экспериментальном лигатурном периодонтите у лабораторных крыс. Указанная модель челюстно-лицевой патологии была выбрана неслучайно – ввиду высокой распространенности социальной значимости воспалительного поражения маргинального периодонта, влияния патологического состояния на качество жизни пациентов.

Гипотеза настоящего исследования строилась на предположении о том, что топическое применение 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) вследствие ограничения воспалительной реакции и активации антиоксидантных механизмов позволит предотвратить вызванные патологическим процессом периодонта резорбцию костной ткани зуба и альвеолярного отростка, деструкцию окружающих мягких тканей, позволит оптимизировать реализацию местнообезболивающей активности амидных местных анестетиков.

Для ответа на поставленный научный вопрос было запланировано и проведено экспериментально-лабораторное неклиническое исследование, методологической основой которого явились принципы единства и неделимости

исследовательской концепции, целостность, комплексность и мультидисциплинарность методических подходов, включающих методы молекулярной и фундаментальной фармакологии и фармхимии, экспериментальной стоматологии, молекулярной биологии, патологической анатомии, биохимии и биофизики.

В работе исследованы два соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17). Дизайн химической структуры, синтез и лабораторная технология получения чистой субстанции разработаны в отделе химии, технологии и аналитического контроля АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области) и любезно предоставлены нам разработчиками. Оба соединения были представлены субстанциями с чистотой 99,8% в виде белого с кремоватым оттенком мелкокристаллического порошка. Оба вещества растворяли в воде при небольшом нагревании.

Для достижения цели и задач настоящего диссертационного проекта вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) использовали в одной лекарственной форме – в виде 2% геля, в то время как вещество диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) применяли как в виде 2% геля, так и в инъекционной лекарственной форме – в виде 2% водного раствора с рН 7,3. Для приготовления водного инъекционного раствора использовалась дважды дистиллированная вода. В 1 мл инъекционной формы содержалось 20 мг действующего вещества ЛХТ-9-17. В качестве препаратов сравнения на этапах работы, в которых изучалась роль веществ в локальном контроле лигатурного пародонтита, использовали гель гиалуроновой кислоты. При изучении местноанестезирующего действия раствора диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) при лигатурном пародонтите в качестве препарата сравнения использовали 2% раствор лидокаина гидрохлорида, изготавливаемый *ex tempore* непосредственно

перед применением с использованием дважды дистиллированной стерильной воды и субстанции лидокаина гидрохлорида (Merck SIGMA-Aldrich, Германия).

Эксперименты поставлены на 60 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 200-220 г, приобретенных в филиале «Электрогорский» ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России. В работе также использовали одиночные нейроны, выделенные из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) и живые свежие препараты седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*). Пресноводные моллюски и земноводные были любезно предоставлены коллегами из Института биофизики клетки – обособленного структурного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» и транспортировались в специальных охлаждаемых контейнерах для сохранения жизнеспособности особей.

При постановке опытов были сформированы экспериментальные группы, каждая из которых состояла не менее, чем из 5 особей. Такое количество животных было необходимо для получения репрезентативных результатов и соответствовало общемировому тренду к максимальному ограничению использования теплокровных животных в медико-биологических исследованиях. Маркировка животных проводилась при помощи цветных пометок на холке.

В основу научного вопроса настоящего экспериментального исследования была положена гипотеза о том, что новые оригинальные отечественные соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащие в качестве радикала фрагменты диметилацетамида и гидроксипиридина способны сдерживать развитие патологических процессов, вызванных патологией периодонта. Для внеэкспериментальной проверки этой гипотезы провели количественный анализ структура – активность при помощи математической программы PASSonline, операционный компонент которой насчитывает базу из более 800000 различных активностей и химических структур. Мы установили, что соединение N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащее в качестве

радикала фрагмент диметилацетамида (ЛХТ-9-17), с наибольшей вероятностью проявляет свойства, локатора быстрых натриевых каналов задержанного выпрямления (0,891), что является предпосылкой наличия у соединения местноанестезирующих свойств. Спрогнозированные высокие коэффициенты для таких биологических свойств как лечение воспаления мягких тканей (0,914), протектор мембран слизистых оболочек (0,766) свидетельствует о высокой вероятности реализации противовоспалительного эффекта диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17). Модификация воспалительной реакции под действием соединения может быть также обусловлена выявленным при прогнозировании агонизмом с колониестимулирующим фактором макрофагов (0,779), ингибированием плазменного фактора свертывания В (0,765), ингибированием фибролазы (0,768), стимуляцией лейкопоэза (0,732).

Не менее важны в аспекте настоящей работы спрогнозированные антиоксидантные свойства молекулы, обусловленные наличием таких видов активности в спектре, как ингибирование дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона) (0,903), сквенджинг активных форм кислорода (0,790), антигипоксантные свойства (0,745). Препятствие потере костной ткани зубов при периодонтите может быть с высокой вероятностью быть обусловлено подавлением активности энтеропептидаз (0,728) и ингибцией сериновой IgA-специфичной эндопептидазы (0,819).

При разработке лекарственных форм, планировании пути введения и определении кратности применения лекарственных форм на основе диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) необходимо учитывать, что соединение по структуре может быть субстратом систем цитохрома CYP2J2 (0,818) и цитохрома CYP2J (0,833). При прогнозировании фармакологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) нами были получены во-многом схожие предиктивные показатели, обусловленные структурным сходством молекул. Так, в частности, противовоспалительный эффект (0,890), включавший высокий предиктивный потенциал в отношении лечения мукозитов (0,882) может быть также как и в

предыдущем случае быть обусловлен мобилизацией лейкоцитарного ростка кроветворения за счет агонизма к колониестимулирующему фактору макрофагов (0,766), мукомебранозной протекции (0,740), а также влиянием на гемостаз вследствие ингибирования плазменного фактора свертывания В (0,764), веномбина АВ (0,724), плазменного фактора свертывания С (0,708).

Высокая рассчитанная вероятность ингибирования дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона) (0,874) и метиламино-глутамат N-метилтрансферазы (0,769) наряду со свойствами скавенджера активных форм кислорода (0,762) и антигипоксантной активностью могут придавать молекуле мощные антиоксидантные свойства. А подавление активности остеокластов (0,873), ингибирование IgA-специфичных сериновых эндопептидаз (0,766) – обуславливать сохранение костно-белкового матрикса ткани зуба при его воспалительном процессе. Также, как и в случае с ЛХТ-9-17 при разработке лекарственных форм, планировании пути введения и определении кратности применения лекарственных форм на основе 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) необходимо учитывать, что соединение по структуре может быть субстратом систем цитохрома CYP2J2 (0,818) и цитохрома CYP2J (0,808).

При оценке цитотоксичности, проведенной на следующем этапе работы, инкубирование культуры фибробластов человека в присутствии диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ не сопровождалось гибелью клеток в культуре до достижения концентрации 10 мкМ. Некоторое снижение выживаемости клеток (до 97,5%) при повышении концентрации вещества в среде культивирования до 100 мкМ не выходит за рамки статистической погрешности и не может рассматриваться как значимый цитотоксический эффект вещества [190].

Затем выполнили серию экспериментов по изучению цитотоксических свойств соединений в живых культурах фибробластов человека при экспозиции широкого диапазона концентраций исследуемых соединений. Инкубирование культуры фибробластов человека в присутствии 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-

аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в аналогичном диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ также не сопровождалось гибелью клеток в культуре до достижения концентрации 10 мкМ. При повышении концентрации вещества в среде культивирования до 100 мкМ наблюдали рост клеток в исходной культуре (в среднем до 106,4%), что было статистически значимым результатом ( $p = 0,03$  по сравнению с предыдущим значением, критерий Уилкоксона).

Следовательно, исследуемые вещества – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от от 0,0001 и до 1000 мкМ, при этом соединение ЛХТ-6-17 в концентрациях 100 мкМ и выше стимулирует пролиферацию фибробластов в клеточной культуре.

Развитие воспалительной реакции при периодонтите включает активацию различных путей, участвующих в метаболической регуляции клеточных и тканевых функций, включая каскад фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Сигнальный путь PI3K влияет на воспалительный процесс, способствуя увеличению выживаемости нейтрофилов [12] и паттерну дифференцировки остеокластов [13]. Экспрессия PI3K выше в тканях пациентов с пародонтитом, чем в здоровой ткани десны [14].

Резорбция кости зуба и альвеолярного отростка индуцируется остеокластами. Для соединения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) спрогнозирована способность подавлять активность остеокластов. Рецептор-активатор лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептор RANK и рецептор-ловушка остеопротегерина (OPG) являются ключевыми молекулами, которые регулируют дифференцировку, рекрутирование и функцию остеокластов [15]. Катепсин-К является ведущей протеазой в процессе деградации остеокластов. Существует положительная корреляция между катепсином-К и молекулами костного матрикса.

Уровни RANKL позволяют предположить, что избыточное производство RANKL приводит к образованию активных остеокластов и продукции катепсина-К в остеокластах пародонта пациентов с пародонтитом, что способствует

остеокластической резорбции кости [16]. Другими важными протеазами, участвующими в деструктивных заболеваниях периодонта, являются матриксные металлопротеиназы (ММП). Традиционно считалось, что ММП разрушают компоненты внеклеточного матрикса и группируются в соответствии с их субстратной специфичностью в коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины и др. Поскольку коллаген типа I представляет собой основной компонент пародонтального внеклеточного матрикса, особое внимание при периодонтите уделяется желатиназам ММР-2 [17].

Основными задачами следующего раздела исследования было изучение роли диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в воспалении, потере костной массы и активации ряда ассоциированных сигнальных путей на экспериментальной модели пародонтита на крысах.

По данным компьютерной микрофотографии (микроКТ) верхних челюстей лабораторных крыс с экспериментальным пародонтитом, рассчитали линейную потерю костной массы, выраженную в миллиметрах между цементно-эмалевым соединением пораженного патологическим процессом зуба и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти.

Топическая аппликация соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в зубодесневой карман в течение 10 суток приводила к статистически достоверному сокращению линейной потери костной массы, отличающейся также от группы животных, получавших в качестве лечения гель гиалуроновой кислоты. Так, в частности, в группе животных, которым с терапевтической целью вводили гель диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) показатель составил  $0,87 \pm 0,05$  мм ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,02$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты, с интактными фрагментами челюсти). В группе лабораторных крыс, которые получали топическое воздействие гелем, содержащим в качестве действующего вещества 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17), расстояние между цементно-эмалевым соединением и гребнем альвеолярного отростка верхней

челюсти составило в среднем  $0,65 \pm 0,04$  мм ( $p = 0,001$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,03$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты, с интактными фрагментами челюсти).

Также, после проведения трехмерной реконструкции полученных микромографических изображений провели анализ соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) лабораторных животных. Топическая аппликация соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в зубодесневой карман в течение 10 суток приводила к статистически достоверному сокращению потери волюметрических показателей костной массы, вместе с тем не отличающейся от группы животных, получавших в качестве лечения гель гиалуроновой кислоты. Так, в частности, в группе животных, которым с терапевтической целью вводили гель диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) исследуемый показатель BV / TV составил  $24 \pm 4$  % ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными фрагментами верхней челюсти лабораторных крыс).

В группе лабораторных крыс, которые получали топическое воздействие гелем, содержащим в качестве действующего вещества 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17), волюметрический показатель соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) составил в среднем  $36 \pm 3$  мм ( $p = 0,0001$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,005$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты,  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными фрагментами челюсти).

Следовательно, на модели экспериментального лигатурного периодонтита верхнего второго моляра у лабораторных крыс 10-суточная местная аппликация геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в качестве действующего вещества приводит к предотвращению резорбции костной ткани как по линейному так и по волюметрическому показателю, при этом, наибольшей активностью обладает вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат

(ЛХТ-6-17). Вместе с тем, ни одно из изученных соединений не способно сохранять массу костной ткани при патологическом процессе на уровне неповрежденных фрагментов верхней челюсти.

Светооптическим методом исследовали окрашенные гематоксилином и эозином срезы верхней челюсти и тканей десны в неповрежденных областях и в области воспроизведения экспериментальной патологии у лабораторных крыс на фоне местной десятисуточной аппликации гелей, содержащих изучаемые соединения.

Гистопатологическое исследование области интереса, получавших топическое воздействие гелем, содержащим соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, выявило значимую позитивную динамику: в группе животных, получавших в качестве терапевтического средства 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) регистрировали клеточную инфильтрацию легкой степени выраженности, ограниченную областью десны, с сохраненной альвеолярной костью и цементом. Средний гистопатологический балл в этой группе составил 1 (диапазон 1 – 1;  $p < 0,001$  при сравнении с интактными контралатеральными областями и контрольными животными). На фоне местного воздействия гелем диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17), средний гистопатологический балл был равен 2,5 (диапазон 2 – 3;  $p < 0,05$  при сравнении с интактными контралатеральными областями). Экспериментальный лигатурный периодонтит второго верхнего моляра сопровождался глубокими патоморфологическими изменениями тканей зуба, деградацией костного скелета альвеолярного отростка верхней челюсти, выраженной нейтрофильной воспалительной реакцией, инфильтрацией подлежащих мягких тканей. Экспериментальная терапия в течение 10 суток с применением геля, содержащего соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты смягчала течение патологического процесса, что выражалось в ограничении воспалительной реакции, сохранении костной основы зуба и альвеолярного отростка. Наибольший эффект установлен у 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17): на фоне назначения содержащего его геля

нейтрофильная инфильтрация тканей была минимально выражена, сохранялся цемент второго моляра и костная основа альвеолярного отростка, в меньшей степени, чем на фоне диметилацетеамидной соли страдали окружающие патологический процесс мягкие ткани десны.

С применением метода иммуногистохимии (ИГХ) изучили влияние 10-суточного местного применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в виде геля на экспрессию матриксной металлопротеиназы-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1). У животных, получавших 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман в области экспериментального лигатурного периодонтита на 12 сутки патологического процесса была установлена гипоэкспрессия либо отсутствие экспрессии матриксной металлопротеазы MMP-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ, его рецептора RANK, катепсина-К и супероксиддисмутазы первого типа. Полученные результаты соотносятся с полученными ранее гистоматологическими данными при окрашивании срезов области интереса гематоксилином и эозином, и позволяют заключить, что 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) сдерживает активацию остеокласов, ведущую к резорбции костной основы зуба и кости альвеолярного отростка верхней челюсти, тем самым тормозит развитие периодонтита. В основе эффекта вещества лежит способность модифицировать выработку внутриклеточных регуляторов клеточной активации и факторов – деструкторов межклеточного матрикса.

Одним из ключевых механизмов в реализации воспалительной реакции служит мобилизация макрофагов в очаг воспаления. Подавление миграционного процесса происходит под действием специального хемокина – фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF). Изучили влияние топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) на экспрессию указанного хемокина в ткани пародонта лабораторных грызунов в

интактной области, в области второго моляра с явлениями лигатурного пародонтита и у животных, получавших местное воздействие соединением N-ацетил-6-аминогексаноата, методом иммунофлюоресценции. У животных, получавших 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман в области экспериментального лигатурного пародонтита на 12 сутки патологического процесса было установлено статистически значимое снижение экспрессии фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), до в среднем 2,3 ( $p = 0,001$  при сравнении с контролем,  $p = 0,03$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти).

Поскольку ранее было установлено PI3K сигнального пути в реализации патологического процесса при пародонтите, в рамках настоящей диссертационной работы изучили экспрессию маркера также с помощью иммунофлюоресцентного анализа. Мы установили, что Местное ежедневное применение при экспериментальном лигатурном пародонтите 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман приводит к тому, что у лабораторных крыс экспрессия фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) как в клетках пародонта, так и в области дентина второго моляра статистически достоверно снижается до в среднем  $578 \pm 31$  ед. ( $p = 0,005$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти;  $p = 0,005$  при сравнении с контролем).

Методом количественного иммуноферментного анализа (КИФА) определили тканевую концентрацию провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНОальфа в ткани пародонта лабораторных животных экспериментальных групп применение при экспериментальном лигатурном пародонтите 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман сопровождается снижением концентрации обоих провоспалительных цитокинов в области дентина второго моляра. Количественный показатель составил для ИЛ-1бета в среднем  $246 \pm 17$  пг/мл ( $p = 0,03$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти;  $p = 0,005$  при

сравнении с контрольными областями верхней челюсти), для ФНОальфа –  $1976 \pm 77$  пг/мл ( $p = 0,001$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти и контролем).

Воспалительный процесс в периодонте и окружающих зуб тканях создают неблагоприятные условия для реализации анестезирующего действия местных анестетиков, особенно имеющих амидную структуру. Практические врачи часто испытывают большие трудности с проведением достаточной глубины и продолжительности анестезии зубов при воспалении при использовании инфльтрационного метода или блокады нерва при пульпите или апикальном периодонтите [3]. Клинические исследования демонстрируют неуспех у 30–45% или низкий успех у 19–56% пациентов с воспалительным процессом нижних моляров при блокаде нижнего альвеолярного нерва даже в случае анестезиологической помощи, оказанной опытным клиницистом [4]. Ни сочетание инфльтрационной анестезии щеки и языка, ни традиционная блокада нерва не сопровождается повышением эффективности манипуляции. Таким образом, проблема адекватного обезболивания в стоматологии в настоящее время является важной задачей как для стоматологов, так и для экспериментальных и клинических фармакологов [1, 4].

В связи с тем, что на этапе внеэкспериментального прогнозирования фармакологической активности у диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) был вычислен высокий коэффициент подавления быстрых натриевых каналов, а также поскольку при создании вещества в структуру молекулы был введен остаток диметилфенилацетамида (основание молекулы лидокаина), есть все основания предполагать, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) может проявлять свойства местного анестетика. Тем более интересно проверить изложенную гипотезу, что данной молекуле свойственно умеренное противовоспалительное действие и способность сдерживать разрушение костной ткани при периодонтите [191, 192].

Применение водного 2% раствора диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) вызывало полную анестезию через

32,1±1,7 мин после подглазничной инъекции у животных без воспаления. Крысы этой группы не реагировали на болевые стимулы в течение 72,1±2,6 мин стимуляции ( $p < 0,001$  по сравнению с лидокаином гидрохлоридом и диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17)) [191, 192].

На заключительном этапе нашей работы мы провели ряд экспериментов, в которых попытались объяснить природу анестезирующего действия ЛХТ-9-17. С этой целью поставили два лабораторных *in vitro* эксперимента: первый эксперимент был выполнен на одиночных нейронах, выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*). Создание специальных перфузионных условий позволяет изучить проводимость изолированных быстрых натриевых каналов в различных конфигурациях. Второй эксперимент проводили на живых свежих препаратах седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*), помещенных в специальную перфузионную камеру, позволяющую при изменении рН перфузионного раствора воспроизводить условия, подобные воспалительной реакции [191, 192].

Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат в зависимости от концентрации подавляет проводимость изолированных натриевых каналов, при этом в максимальной концентрации – 0,01 мкМ проводимость канала для иона натрия ингибируется полностью. Для перфузии препаратов седалищного нерва лягушки озерной были выбраны те же эффективные концентрации диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17), вызывающие дозозависимое подавление натриевого тока – в диапазоне от 0,00001 до 0,01 мкМ. В экспериментах регистрировали амплитуду потенциала действия с применением микроэлектродной техники [191, 192].

Перфузия препаратов седалищного нерва лягушки озерной диметилацетамидом N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,01 мкМ при нормальном рН в перфузионной камере (7,3) сопровождалась пропорциональным с результатами

предыдущего эксперимента эффективным зависимым от концентрации подавлением амплитуды потенциала действия нервных волокон седалищного нерва. В концентрациях 0,001 – 0,01 мкМ диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) при нормальном рН практически полностью подавлял проведение импульса по изолированному нервному проводнику. В условиях метаболического ацидоза, воспроизводящих таковые при развитии воспалительной реакции в области зуба и окружающих его тканей, кинетика подавления проводимости импульса по препарату седалищного нерва земноводного менялась: так, в частности, в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,001 мкМ наблюдали лишь незначительное снижение амплитуды ПД (не превышающее 70% от исходно зарегистрированных значений показателя), при увеличении концентрации диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в перфузионном растворе до 0,01 мкМ происходило подавление амплитуды ПД на 73%, что, тем не менее, было статистически значимо меньше, чем в экспериментах без ацидоза ( $p = 0,01$ ) [191, 192].

### **6.1 Итоги выполнения диссертационной работы**

Проведено комплексное исследование фармакологических свойств оригинальных веществ – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – в качестве потенциальных кандидатов в лекарственные средства для топического лечения периодонтита и оптимизации местноанестезирующего действия при воспалительном поражении краевого периодонта.

При внеэкспериментальном анализе структура – активность у обоих соединений был выявлен широкий спектр биологических мишеней и видов действия, позволяющих в том числе, предполагать и противовоспалительную активность. Оба вещества не обладают цитотоксическим действием в отношении фибробластов человека в широком диапазоне концентраций.

Установлено, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) вследствие подавления тканевой экспрессии металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-κВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К ограничивают остеокластогенез и обеспечивают сохранение целостности костной ткани при лигатурном пародонтите второго верхнего моляра; ограничение на фоне их топического применения продукции MIF, в также провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ФНОα сопровождается развитием местного противовоспалительного и антирадикального эффекта.

Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) подавляет натриевый ток и ингибирует проведение импульса по нервному волокну, что, наряду с его умеренным цитопротекторным эффектом обуславливает наличие у вещества свойств местного анестетика.

## **6.2 Перспективы развития темы диссертационного исследования**

Полученные результаты открывают самые широкие перспективы для продолжения исследований. Научный поиск может быть продолжен в области проверки спрогнозированных видов фармакологической активности диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и их воздействия на потенциальные биологические мишени.

Не менее важным представляется углубление исследований в области реализации противовоспалительного действия соединений и установленных свойств по предотвращению деструкции костной ткани, а также установлению роли в реализации этого эффекта остеобластов. Также большой научный интерес представляет проверка наличия местноанестезирующего действия диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) на моделях терминальной и инфилтративной анестезии, в том числе зубов при воспалительном процессе.

С практической точки зрения необходимо проведение исследований по разработке готовой лекарственной формы геля для топического лечения периодонтита на основе кандидата в лекарственное средство – 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17).

## ВЫВОДЫ

1. Исследуемые вещества – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) – не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от от 0,0001 и до 1000 мкМ, при этом соединение ЛХТ-6-17 в концентрациях 100 мкМ и выше стимулирует пролиферацию фибробластов в клеточной культуре.

2. На модели экспериментального лигатурного периодонтита верхнего второго моляра у лабораторных крыс 10-суточная местная аппликация геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в качестве действующего вещества приводит к предотвращению резорбции костной ткани как по линейному так и по волюметрическому показателю, при этом, наибольшей активностью обладает вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17).

3. Экспериментальная терапия в течение 10 суток с применением геля, содержащего соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты смягчала течение патологического процесса, что выражалось в ограничении воспалительной реакции, сохранении костной основы зуба и альвеолярного отростка. Наибольший эффект установлен у 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17): на фоне назначения содержащего его геля нейтрофильная инфильтрация тканей была минимально выражена, сохранялся цемент второго моляра и костная основа альвеолярного отростка, в меньшей степени, чем на фоне диметилацетамидной соли страдали окружающие патологический процесс мягкие ткани десны.

4. 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) при топическом применении в виде 2% гидрогеля подавлял клеточную экспрессию матриксной металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-κВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, что свидетельствовало

об ингибировании активности остеокластов, ограничивало активность свободнорадикальных процессов.

5. Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) обладает местноанестезирующим действием, которое характеризуется медленным развитием достаточной по глубине анестезии продолжительностью до 120 минут, и обусловлено в том числе ингибированием одиночных натриевых каналов и подавлением проводимости нервного проводника. Реализация местного обезболивающего эффекта соединения на фоне острого воспалительного процесса сдерживает формирование местноанестезирующего эффекта. Это проявляется как снижением глубины, так и продолжительности действия на 25%.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении доклинических исследований кандидата в лекарственное средство из группы соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты необходимо учитывать полученные результаты о противовоспалительном, остеопротекторном и местноанестезирующем действии соединений ЛХТ-6-17 и ЛХТ-9-17.

2. Форма 2% геля может рассматриваться как перспективная лекарственная форма кандидата в лекарственное средство, содержащего диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) в качестве действующего вещества, для топического лечения местнораспространенного воспалительного процесса периодонта.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ИГХ – иммуногистохимия

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

НПВС – нестероидное противовоспалительное средство

ПД – потенциал действия

ФНО – фактор некроза опухолей

INa – натриевый ток

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. The periodontal war: microbes and immunity / J.L. Ebersole, D. Dawson, P. Emecen-Huja et al. // *Periodontol.* – 2000. – Vol. 75(1). – P. 52-115.
2. Nedzi-Góra, M. The immune response in periodontal tissues / Nedzi-M. Góra, J. Kowalski, R. Gorska // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* – 2017. – Vol. 65(5). – P. 421-9.
3. Cardoso, E.M. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases / E.M. Cardoso, C. Reis, M.C. Manzanares-Céspedes // *Postgrad Med.* – 2018. – Vol. 130(1). – P. 98-104.
4. Nazir, M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention / M.A. Nazir // *Int J Health Sci (Qassim).* – 2017. – Vol. 11(2). – P. 72-80.
5. Periodontitis, edentulism and glycemic control in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study / Z.A. Taboza, K.L. Costa, V.R. Silveira et al. // *BMJ Open Diabetes Res Care.* – 2018. – Vol. 6(1).
6. Human beta cell mass and function in diabetes: recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis / C. Chen, C.M. Cohrs, J. Stertmann et al. // *Mol Metab.* – 2017. – Vol. 6(9). – P. 943-57.
7. Kothari, V. GHypoglycemic agents and potential anti-inflammatory activity / V. Kothari, J.A. Galdo, S.T. Mathews // *J Inflamm Res.* – 2016. – Vol. 9. – P. 27-38.
8. Impaired inflammatory response to LPS in type 2 diabetes mellitus / L. Khondkaryan, S. Margaryan, D. Poghosyan, G. Manukyan // *Int J Inflamm.* – 2018.
9. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion / P. Proks, F. Reimann, N. Green et al. // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51. – P. 68-76.
10. Kumar, N. Gliclazide increases insulin receptor tyrosine phosphorylation but not p38 phosphorylation in insulin-resistant skeletal muscle cells / N. Kumar, C.S. Dey // *J Exp Biol.* – 2002. – Vol. 205. – P. 3739-46.

11. Beneficial effects of gliclazide modified release compared with glibenclamide on endothelial activation and low-grade inflammation in patients with type 2 diabetes / A. Rakel, C. Renier, A. Roussin et al. // *Diabetes Obes Metab.* – 2007. – Vol. 9(1). – P. 127-9.
12. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF-kappaB survival pathways in neutrophil granulocytes / A. Sarkar, L. Hellberg, A. Bhattacharyya et al. // *Infect Immun.* – 2012. – Vol. 80(4). – P. 1615-23.
13. MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice / M.F. Madeira, C.M. Queiroz-Junior, G.M. Costa et al. // *Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 14(2). – P. 198-206.
14. Increased visfatin expression is associated with nuclear factor-kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase in periodontal inflammation / E. Ozcan, N.I. Saygun, R. Ilikçi et al. // *Clin Oral Investig.* – 2017. – Vol. 21(4). – P. 1113-21.
15. RANK/RANKL/OPG signalization implication in periodontitis: new evidence from a RANK transgenic mouse model / B. Sojod, D. Chateau, C.G. Mueller et al. // *Front Psychol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 338.
16. Mogi, M. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis / M. Mogi, J. Ootogoto // *Arch Oral Biol.* – 2007. – Vol. 52(9). – P. 894-8.
17. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation / C. Franco, H.R. Patricia, S. Timo et al. // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18(2).
18. Cerium-containing N-acetyl-6-aminohexanoic acid formulation accelerates wound reparation in diabetic animals / E. Blinova, D. Shimanovsky, M. Kilmyashkina et al. // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11(6). – P.1-21.
19. Пахомов, Д.В. Фармакологические подходы к активации регенерации мягких тканей при сахарном диабете / Д.В. Пахомов // *Саранск.* – 2022. – С. 129.
20. Новиков, А.В. Местноанестезирующее действие фармацевтических композиций, содержащих производное диметилацетеаида, антиоксидант и

вазоконстриктор, при остром и хроническом воспалительном процессе / А.В. Новиков // Белгород. – 2018. – С. 154.

21. Pihlstrom, B.L. Periodontal diseases / B.L. Pihlstrom, B.S. Michalowicz, N.W. Johnson // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366(9499). – P.180920.

22. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions / P.N. Papapanou, M. Sanz, N. Buduneli et al. // *J Periodontol*. – 2018. – Vol. 89. – P. 173-82.

23. Advances in novel therapeutic approaches for periodontal diseases/ Md Mahamudul Haque , Katherine Yerex , Anastasia Kelekis-Cholakis et al. // *BMC Oral Health* – 2022 . – Vol. 22:492. – P. 1-23.

24. Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline / M. Sanz, D. Herrera, M. Kerschull et al. // *J Clin Periodontol*. – 2020. – Vol. 47. – P. 4-60.

25. How, K.Y. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line / K.Y. How, K.P. Song, K.G. Chan// *Front Microbiol*. – 2016. – Vol. 7. – P. 53.

26. Williams, R.O. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis / R.O. Williams, M. Feldmann, R.N. Maini // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1992. – Vol. 89(20). – P. 9784-8.

27. Kinane, D.F. Periodontal diseases / D.F. Kinane, P.G. Stathopoulou, P.N. Papapanou // *Nat Rev Dis Primers*. – 2017. – Vol. 3. – P. 17038.

28. Suzuki, N. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis / N. Suzuki, M. Yoneda, T. Hirofuji // *Int J Dent*. – 2013.

29. Genco, R.J. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors / J.R. Genco // *Ann Periodontol*. – 1996. – Vol. 1(1). – P. 926-932.

30. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients / D. Herrera, M. Sanz, S. Jepsen et al. // *J Clin Periodontol*. – 2002. – Vol. 2. – P. 136-159.

31. Rams, T.E. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota / T.E. Rams, J.E. Degener, J.A. van Winkelhoff // *J Periodontol.* –2014. – Vol. 85(1). – P. 160-9.
32. ARF RF Antibiotic resistance among patients with severe gum disease is increasing / ARF RF, C.D.C. Brack // In: *BDJ Team. Nature.* – 2018. – Vol. 5.
33. Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition / O. Fleitas Martinez, M.H. Cardoso, S.M. Ribeiro, O.L. Franco // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 74.
34. Isola, G. Antibiotics and Antimicrobials for Treatment of the Oral Microbiota: Myths and Facts in Research and Clinical Practice / G. Isola // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol. 9(2).
35. Reygaert, W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria / W.C. Reygaert // *AIMS Microbiol.* – 2018. – Vol. 4(3). P. 482-501.
36. Wilke, M.S. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective / M.S. Wilke, A.L. Lovering, N.C. Strynadka // *Curr Opin Microbiol.* – 2005. – Vol. 8(5). – P. 525-33.
37. Beta-Lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* / L.A. Bernal, E. Guillot, C. Paquet, C. Mouton // *Oral Microbiol Immunol.* – 1998. – Vol. 13(1). – P. 36-40.
38. Eick, S. Antimicrobial susceptibility of anaerobic and capnophilic bacteria isolated from odontogenic abscesses and rapidly progressive periodontitis / S. Eick, W. Pfister, E. Straube // *Int J Antimicrob Agents.* – 1999. – Vol. 12(1). – P. 41-6.
39. Penicillin-degrading enzymes in sites associated with adult periodontitis / C.B. Walker, K.Z. Tyler, S.B. Low, C.J. King // *Oral Microbiol Immunol.* – 1987. – Vol. 2(3). – P. 129-31.
40. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy / M. Feres, A.D. Haffajee, K. Allard et al. // *J Clin Periodontol.* –2002. – Vol. 29(8). – P. 724-35.

41. Ardila, C.M. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients / C.M. Ardila, M.I. Granada, I.C. Guzman // *J Periodontal Res.* – 2010. – Vol. 45(4). – P. 557-63.
42. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens / A.C. Veloo, K. Seme, E. Raangs et al. // *Int J Antimicrob Agents.* – 2012. – Vol. 40(5). – P. 450-4.
43. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis / A.J. van Winkelhoff, D. Herrera Gonzales, E.G. Winkel et al. // *A comparison between The Netherlands and Spain. J Clin Periodontol.* – 2000. – Vol. 27(2). – P. 79-86.
44. Antibiotic resistance in the cultivable plaque microbiota of children from different ethnic groups / D. Ready, H. Lancaster, P. Mullany et al. // *Int J Antimicrob Agents.* – 2006. – Vol. 27(5). – P. 376-82.
45. Roberts, M.C. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance determinants in *Treponema denticola* / M.C. Roberts, W.O. Chung, D.E. Roe // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1996. – Vol. 40(7). – P.1690-4.
46. Bidault, P. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology / P. Bidault, F. Chandad, D. Grenier // *J Can Dent Assoc.* – 2007. – Vol. 73(8). – P. 721-5.
47. Distribution of erm(F) and tet(Q) genes in 4 oral bacterial species and genotypic variation between resistant and susceptible isolates / W.O. Chung, J. Gabany, G.R. Persson, M.C. Roberts // *J Clin Periodontol.* – 2002. – Vol. 29(2). – P. 152-8.
48. Bowler, P. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship / P. Bowler, C. Murphy, R. Wolcott // *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2020. – Vol. 9(1). – P. 162.
49. Wang, B.Y. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms / B.Y. Wang, B. Chi, H.K. Kuramitsu // *Oral Microbiol Immunol.* – 2002. – Vol. 17(2). – P. 108-12.
50. Novel approaches to detect and treat biofilms within the root canals of teeth: a review / L.J. Walsh // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol. 9(3). – P. 129.

51. Biofilms: an emergent form of bacterial life / H.C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk et al. // *Nat Rev Microbiol.* – 2016. – Vol. 14(9). – P. 563-75.
52. Donlan, R.M. Role of biofilms in antimicrobial resistance / R.M. Donlan // *ASAIO J.* – 2000. – Vol. 46(6). – P. 47-52.
53. Heras, B. Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials / B. Heras, M.J. Scanlon, J.L. Martin // *Br J Clin Pharmacol.* – 2015. – Vol. 79(2). – P. 208-15.
54. Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether / J.K. Rudkin, R.M. McLoughlin, A. Preston, R.C. Massey // *PLoS Pathog.* – 2017. – Vol. 13(9).
55. In Vitro and In Vivo Activity of Peptidomimetic Compounds That Target the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis* / J. Tan, P.C. Patil, F.A. Luzzio, D.R. Demuth // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 62(7).
56. Membrane Microdomain Disassembly Inhibits MRSA Antibiotic Resistance / E. Garcia-Fernandez, G. Koch, R.M. Wagner et al. // *Cell.* – 2017. – Vol. 171(6). – P. 1354-1367.
57. Allaker, R.P. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases / R.P. Allaker, C.W. Douglas // *Int J Antimicrob Agents.* – 2009. – Vol. 33(1). – P. 8-13.
58. Rosen, G. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide / G. Rosen, M.N. Sela // *FEMS Microbiol Lett.* – 2006. – Vol. 256(2). – P. 304-10.
59. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence / A. Singh, T. Wyant, C. Anaya-Bergman et al. // *Infect Immun.* – 2011. – Vol. 79(11). – P. 4533-2.
60. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 alpha production in mouse marrow cultures / T. Nishihara, N. Ueda, K. Amano, et al. // *Infect Immun.* – 1995. – Vol. 63(5). – P. 1893-8.

61. Interleukin-1beta is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review / R. Cheng, Z. Wu, M. Li et al. // *Int J Oral Sci.* – 2020. – Vol. 12(1). – P. 2.
62. Antimicrobial and Anti-inflammatory Effects of alpha-Mangostin Soluble Film / P. Tangsuksan, T. Srichana, M. Kettratad, W. Nittayananta // *J Int Soc Prev Community Dent.* – 2022. – Vol. 12(2). – P. 189-98.
63. Antimicrobial efficacy of grape seed extract in terminating the ramifications of plaque microorganisms: a randomized control study / A.C. Koregol, N.B. Kalburgi, T. Puttarevanna et al. // *Med Pharm Rep.* – 2022. – Vol. 95(2). – P. 185-90.
64. Oral antimicrobial peptides and new therapeutic strategies for plaquemediated diseases / N. Izadi, M. Keikha, K. Ghazvini, M. Karbalaei // *Gene Reports.* – 2020. – Vol. 21.
65. Alpha-tocopherol decreases interleukin-1beta and -6 and increases human beta-defensin-1 and -2 secretion in human gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide / A. Derradjia, H. Alanazi, H.J. Park et al. // *J Periodontal Res.* – 2016. – Vol. 51(3). – Vol. 295-303.
66. Tormentic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts via inhibition of TLR4-mediated NF-kappaB and MAPK signalling pathway / C.X. Jian, M.Z. Li, W.Y. Zheng et al. // *Arch Oral Biol.* – 2015. – Vol. 60(9). – P. 1327-32.
67. Immunization with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction / R.T. Evans, B. Klausen, H.T. Sojar et al. // *Infect Immun.* – 1992. – Vol. 60(7). – P. 2926-35.
68. Peptide-based inhibitors of fimbrial biogenesis in *Porphyromonas gingivalis* / S.R. Alaei, J.H. Park, S.J. Walker, D.G. Thanassi // *Infect Immun.* – 2019. – Vol. 87(3).
69. Catechin-mediated restructuring of a bacterial toxin inhibits activity / E.H. Chang, J. Huang, Z. Lin, A.C. Brown // *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* – 2019. – Vol. 1863(1). – P. 191-8.

70. Vega, B.A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin (LtxA; Leukothera((R))): Mechanisms of Action and Therapeutic Applications / B.A. Vega, B.A. Belinka Jr, S.C. Kachlany // *Toxins (Basel)*. – 2019. – Vol. 11(9). – P. 489.
71. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin induces cytosol acidification in LFA-1 expressing immune cells / N. Balashova, A. Dhingra, K. Boesze-Battaglia, E.T. Lally // *Mol Oral Microbiol*. – 2016. – Vol. 31(1). – P. 106-14.
72. Deas, D.E. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment / D.E. Deas, B.L. Mealey // *Periodontol*. – 2000. – Vol. 53. – P. 154-66.
73. Receptor-Based Peptides for Inhibition of Leukotoxin Activity / E. Krueger, S. Hayes, E.H. Chang // *ACS Infect Dis*. – 2018. – Vol. 4(7). – P. 1073-81.
74. New frontiers on adjuvants drug strategies and treatments in peri-odontitis / G. Isola, A. Polizzi, S. Santonocito et al. // *Scientia Pharmaceutica*. – 2021. – Vol. 89(4). – P. 46.
75. Krueger, E. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: From mechanism to targeted anti-toxin therapeutics / E. Krueger, A.C. Brown // *Mol Oral Microbiol*. – 2020. – Vol. 35(3). – P. 85-105.
76. Kato, S. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin / S. Kato, Y. Kowashi, D.R. Demuth // *Microb Pathog*. – 2002. – Vol. 32(1). – P. 1-13.
77. Grenier, D. Proteases of *Porphyromonas gingivalis* as important virulence factors in periodontal disease and potential targets for plant-derived compounds: a review article / D. Grenier, V.D. La // *Curr Drug Targets*. – 2011. – Vol. 12(3). – P. 322-31.
78. Sztukowska, M.N. Peptide and non-peptide mimetics as potential therapeutics targeting oral bacteria and oral biofilms / M.N. Sztukowska, M. Roky, D.R. Demuth // *Mol Oral Microbiol*. – 2019. – Vol. 34(5). – P. 169-82.
79. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease / H. Gusman, J. Travis, E.J. Helmerhorst et al. // *Infect Immun*. – 2001. – Vol. 69(3). – P. 1402-8.

80. Li, N. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* - Complex domain structures confer diverse functions / N. Li, C.A. Collyer // *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. – 2011. – Vol. 1(1). – P. 41-58.

81. Attenuation of the virulence of *Porphyromonas gingivalis* by using a specific synthetic Kgp protease inhibitor / M.A. Curtis, J. Aduse Opoku, M. Rangarajan et al. // *Infect Immun*. – 2002. – Vol. 70(12). – P. 6968-75.

82. Jain, H. Inhibition and attenuation of pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* by leupeptin: A review / H. Jain // *Frontiers in Biology*. – 2017. – Vol. 12. – P. 192-8.

83. Azelmat, J. LarThe anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis* / J. Azelmat, J.F. Larente, D. Grenier // *Arch Oral Biol*. – 2015. – Vol. 60(2). – P. 342-6.

84. A novel, potent dual inhibitor of Arg-gingipains and Lys-gingipain as a promising agent for periodontal disease therapy / S. Kataoka, A. Baba, Y. Suda et al. // *FASEB J*. – 2014. – Vol. 28(8). – P. 3564-78.

85. The sialidase inhibitor, DANA, reduces *Porphyromonas gingivalis* pathogenicity and exerts anti-inflammatory effects: An in vitro and in vivo experiment / S. Yu, X. Fan, S. Zheng et al. // *J Periodontol*. – 2021. – Vol. 92(2). – P. 286-97.

86. Ben Lagha, A. Black tea theaflavins attenuate *Porphyromonas gingivalis* virulence properties, modulate gingival keratinocyte tight junction integrity and exert anti-inflammatory activity / A. Ben Lagha, D. Grenier // *J Periodontal Res*. – 2017. – Vol. 52(3). – P. 458-70.

87. Theaflavins inhibit pathogenic properties of *P. gingivalis* and MMPs production in *P. gingivalis* stimulated human gingival fibroblasts / L. Kong, X. Qi, S. Huang et al. // *Arch Oral Biol*. – 2015. – Vol. 60(1). – P. 12-22.

88. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis* / A. Yamanaka, T. Kouchi, K. Kasai et al. // *J Periodontal Res*. – 2007. – Vol. 42(6). – P. 589-92.

89. Inhibitory effects of macrocarpals on the biological activity of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontopathic bacteria / H. Nagata, Y. Inagaki, Y. Yamamoto et al. // *Oral Microbiol Immunol.* – 2006. – Vol. 21(3). – P. 159-63.
90. Kouidhi, B. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment / B. Kouidhi, Y.M. Al Qurashi, K. Chaieb // *Microb Pathog.* – 2015. – Vol. 80. – P. 39-49.
91. A novel biofilm removal approach (Guided Biofilm Therapy) utilizing erythritol airpolishing and ultrasonic piezo instrumentation: A randomized controlled trial / I. Vouros, G.N. Antonoglou, S. Anoixiadou, S. Kalfas // *Int J Dent Hyg.* – 2022. – Vol. 20(2). – P. 381-90.
92. Isola, G. Current evidence of natural agents in oral and periodontal health / G. Isola // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12(2). – P. 585.
93. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action / Y.M. Kim, J. Yun, C.K. Lee et al. // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277(18). – P. 16340-16344.
94. Teanpaisan, R. In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of *Artocarpus lakoocha* (Moraceae) extract against some oral pathogens / R. Teanpaisan, S. Senapong, J. Puripattavong // *Trop J Pharm Res.* – 2014. – Vol. 13(7). – P. 1149-55.
95. Activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* Roxb. against multi-species oral biofilms in vitro / Yanti, Y. Rukayadi, K.H. Lee, J.K. Hwang // *J Oral Sci.* – 2009. – Vol. 51(1). – P. 87-95.
96. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate-stearate inhibits the growth of *Streptococcus mutans*: a promising new approach in caries prevention / A.L. Melok, L.H. Lee, S.A. Mohamed Yussof, T. Chu // *Dent J (Basel).* – 2018. – Vol. 6(3). – P. 38.
97. Sakanaka, S. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis* / S. Sakanaka, J. Okada. // *J Agric Food Chem.* – 2004. – Vol. 52(6). – P. 1688-92.

98. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms / Y. Asahi, Y. Noiri, J. Miura et al. // *J Appl Microbiol.* – 2014. – Vol. 116(5). – P. 1164-71.
99. Philip, N. Cranberry polyphenols: Natural weapons against dental caries / N. Philip, L.J. Walsh // *Dent J (Basel).* – 2019. – Vol. 7(1). – P. 20.
100. Inhibitory effect of cranberry extract on periodontopathogenic biofilm: An integrative review / A.K.B. Medeiros, L.A. de Melo, R.A.H. Alves et al. // *J Indian Soc Periodontol.* – 2016. – Vol. 20(5). – P. 503-8.
101. Koh, K.H. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity / K.H. Koh, F.Y. Tham // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2011. – Vol. 44(2). – P. 144-8.
102. Prasad D, Punica granatum: A review on its potential role in treating periodontal disease / D. Prasad, R. Kunnaiah // *J Indian Soc Periodontol.* – 2014. – Vol. 18(4). – P. 428-32.
103. Defoirdt, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy / D. Prasad, R. Kunnaiah // *Trends Microbiol.* – 2018. – Vol. 26(4). – P. 313-28.
104. Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms / M. Basavaraju, V.S. Sisnity, R. Palaparthi, P.K. Addanki // *J Dent Sci.* – 2016. – Vol. 11(4). – P. 349-52.
105. Frias, J. Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules / J. Frias, E. Olle, M. Alsina // *Infect Immun.* – 2001. – Vol. 69(5). – P. 3431-4.
106. Hajishengallis, G. *Porphyromonas gingivalis*: Immune subversion activities and role in periodontal dysbiosis / G. Hajishengallis, P.I. Diaz // *Curr Oral Health Rep.* – 2020. – Vol. 7(1). – P. 12-21.
107. Characterization of autoinducer 2 signal in *Eikenella corrodens* and its role in biofilm formation / H. Azakami, I. Teramura, T. Matsunaga et al. // *J Biosci Bioeng.* – 2006. – Vol. 102(2). – P. 110-7.
108. Plancak, D. Quorum Sensing of Periodontal Pathogens / D. Plancak, L. Music, I. Puhar // *Acta Stomatol Croat.* – 2015. – Vol. 49(3). – P. 234-41.

109. Lieberman, J.M. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance / J.M. Lieberman // *Pediatr Infect Dis J.* –2003. – Vol. 22(12). – P. 1143-51.
110. Bhardwaj, A.K. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance / A.K. Bhardwaj, K. Vinothkumar, N. Rajpara // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* – 2013. – Vol. 8(1). – P. 68-83.
111. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover / M. Manefield, T.B. Rasmussen, M. Henzter et al. // *Microbiology (Reading).* – 2002. – Vol. 148(Pt 4). – P. 1119-27.
112. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid / S.F. Bodini, S. Manfredini, M. Epp et al. // *Lett Appl Microbiol.* –2009. – Vol. 49(5). – P. 551-5.
113. Choo, J.H. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract / J.H. Choo, Y. Rukayadi, J.K. Hwang // *Lett Appl Microbiol.* – 2006. – Vol. 42(6). – P. 637-41.
114. Quorum sensing inhibitor brominated furanone affects *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation / L. Zhang, S. Wang, X. Zhou, Y. Xui // *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* – 2011. – Vol. 29(5). – P. 469-72.
115. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ribose binding protein RbsB interacts with cognate and heterologous autoinducer 2 signals / D. James, H. Shao, R.J. Lamont, D.R. Demuth // *Infect Immun.* – 2006. – Vol. 74(7). – P. 4021-9.
116. Kim, W.J. Recent Advances of Therapeutic Targets for the Treatment of Periodontal Disease / W.J. Kim, Y. Soh, S.M. Heo // *Biomol Ther (Seoul).* – 2021. – Vol. 29(3). – P. 263-7.
117. Immunomodulation in the Treatment of Periodontitis: Progress and Perspectives / B. Yang, X. Pang, Z. Li et al. // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12.
118. Sima, C. Macrophage immunomodulation in chronic osteolytic diseases-the case of periodontitis / C. Sima, A. Viniegra, M. Glogauer // *J Leukoc Biol.* – 2019. – Vol. 105(3). – P. 473-87.

119. Macrophage polarization in human gingival tissue in response to periodontal disease / L.N. Zhou, C.S. Bi, L.N. Gao // *Oral Dis.* – 2019. – Vol. 25(1). – P. 265-73.
120. Hajishengallis, G. New developments in neutrophil biology and periodontitis / G. Hajishengallis // *Periodontol.* – 2020. – Vol. 82(1). – P. 78-92.
121. Filifactor alocis manipulates human neutrophils affecting their ability to release neutrophil extracellular traps induced by PMA / C.L. Armstrong, C.K. Klaes, A. Vashishta et al. // *Innate Immun.* – 2018. – Vol. 24(4). – P. 210-20.
122. Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients / T. Nagasawa, H. Kobayashi, M. Aramaki et al. // *J Periodontal Res.* – 2004. – Vol. 39(1). – P. 72-8.
123. Figueredo, C.M. T and B Cells in Periodontal Disease: New Functions in A Complex Scenario / C.M. Figueredo, R. Lira-Junior, R.M. Love // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20(16).
124. Interleukin-17-producing T cells and interleukin-17 mRNA expression in periodontitis and long-standing gingivitis lesions / S. Thorbert-Mros, L. Larsson, J. Kalm, T. Berglundh // *J Periodontol.* – 2019. – Vol. 90(5). – P. 516-21.
125. Gonzales, J.R. T- and B-cell subsets in periodontitis / Gonzales, J.R. // *Periodontol.* – 2015. – Vol. 69(1). – P. 181-200.
126. Pterostilbene complexed with cyclodextrin exerts antimicrobial and anti-inflammatory effects / Y.R.I. Lim, P.M. Preshaw, L.P. Lim et al. // *Sci Rep.* 2020. – Vol. 10(1). – P. 9072.
127. Ben Lagha, A. Resveratrol attenuates the pathogenic and inflammatory properties of *Porphyromonas gingivalis* / A. Ben Lagha, E. Andrian, D. Grenier // *Mol Oral Microbiol.* – 2019. – Vol. 34(3). – P. 118-30.
128. Intracanal Metformin Promotes Healing of Apical Periodontitis via Suppressing Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Monocyte Recruitment / H.W. Wang, E.H. Lai, C.N. Yang // *J Endod.* – 2020. – Vol. 46(1). – P. 65-73.
129. Metformin ameliorates experimental diabetic periodontitis independently of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition by reducing NIMA-related

kinase 7 (Nek7) expression / X. Zhou, P. Zhang, Q. Wang et al. // *J Periodontol.* – 2019. – Vol. 90(9). – P. 1032-42.

130. Catechin ameliorates *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation via the regulation of TLR2/4 and inflammasome signaling / H.A. Lee, Y.R. Song, M.H. Park et al. // *J Periodontol.* – 2020. – Vol. 91(5). – P. 661-70.

131. Gliclazide reduced oxidative stress, inflammation, and bone loss in an experimental periodontal disease model / A.A. Araujo, H.B. Morais, C. Medeiros et al. // *J Appl Oral Sci.* – 2019. – Vol. 27.

132. Curcumin as a natural approach of periodontal adjunctive treatment and its immunological implications: a narrative review / S.M. Solomon, C.S. Stafie, I.G. Sufaru et al. // *Pharmaceutics.* – 2022. – Vol. 14(5). – P. 982.

133. Dose-response assessment of chemically modified curcumin in experimental periodontitis / B.D. de Almeida, L.C. Spolidorio, F. Johnson // *J Periodontol.* – 2019. – Vol. 90(5). – P. 535-45.

134. Curcumin for the Management of Periodontal Diseases: A Review / F. Forouzanfar, A. Forouzanfar, T. Sathyapalan // *Curr Pharm Des.* – 2020. – Vol. 26(34). – P. 427-84.

135. Trans-cinnamic aldehyde inhibits *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced inflammation in THP-1-derived macrophages via autophagy activation / J. Chung, S. Kim, H.A. Lee et al. // *J Periodontol.* – 2018. – Vol. 89(10). – P. 1262-71.

136. Effects of Sulfonylureas on Periodontopathic Bacteria-Induced Inflammation / Y. Kawahara, T. Kaneko, Y. Yoshinaga et al. // *J Dent Res.* – 2020. – Vol. 99(7). – P. 830-8.

137. Bismuth drugs tackle *Porphyromonas gingivalis* and attune cytokine response in human cells / T. Cheng, Y.T. Lai, C. Wang // *Metallomics.* – 2019. – Vol. 11(7). – P. 1207-18.

138. RNAi-mediated silencing of *Atp6i* and *Atp6i* haploinsufficiency prevents both bone loss and inflammation in a mouse model of periodontal disease / H. Jiang, W. Chen, G. Zhu et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8(4).

139. Plasmid encoding microRNA-200c ameliorates periodontitis and systemic inflammation in obese mice / T. Krongbamee, M. Zhu, Q. Qian et al. // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2021. – Vol. 23. – P. 1204-16.

140. The silencing of cathepsin K used in gene therapy for periodontal disease reveals the role of cathepsin K in chronic infection and inflammation / W. Chen, B. Gao, L. Hao et al. // *J Periodontal Res*. – 2016. – Vol. 51(5). – P. 647-60.

141. Exosomes derived from P2X7 receptor gene-modified cells rescue inflammation-compromised periodontal ligament stem cells from dysfunction / X.Y. Xu, B.M. Tian, Y. Xia et al. // *Stem Cells Transl Med*. – 2020. – Vol. 9(11). – P. 1414-30.

142. AAV2/1-TNFR: Fc gene delivery prevents periodontal disease progression / J.A. Cirelli, C.H. Park, K. MacKool et al. // *Gene Ther*. – 2009. – Vol. 16(3). – P. 426-36.

143. Metabolic Reconfiguration Activates Stemness and Immunomodulation of PDLSCs / P. Arora, W. Li, X. Huang et al. // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23(7).

144. Macrophage polarization in periodontal ligament stem cells enhanced periodontal regeneration / J. Liu, B. Chen, J. Bao et al. // *Stem Cell Res Ther*. – 2019. – Vol. 10(1). – P. 320.

145. Periodontal ligament stem cells regulate B lymphocyte function via programmed cell death protein / O. Liu, J. Xu, G. Ding et al. // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31(7). – P. 1371-82.

146. Activation of Functional Somatic Stem Cells Promotes Endogenous Tissue Regeneration / W. Li, X. Huang, W. Yu et al. // *J Dent Res*. – 2022. – Vol. 101(7). – P. 802-11.

147. Gingival mesenchymal stem cells attenuate pro-inflammatory macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and modulate lipid metabolism / R. Hong, Z. Wang, A. Sui et al. // *Arch Oral Biol*. – 2019. – Vol. 98. – P. 92-8.

148. Systematically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells regulate lipid metabolism and inflammation in hyperlipidemic mice with

periodontitis / X. Liu, Z. Wang, W. Song et al. // *Exp Ther Med.* – 2020. – Vol. 19(1). – P. 672-82.

149. Role of gingival mesenchymal stem cell exosomes in macrophage polarization under inflammatory conditions / R. Wang, Q. Ji, C. Meng et al. // *Int Immunopharmacol.* – 2020. – Vol. 81. – P. 106030.

150. Immunomodulatory Role of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth on Periodontal Regeneration / X. Gao, Z. Shen, M. Guan et al. // *Tissue Eng Part A.* – 2018. – Vol. 24(17–18). – P. 1341-53.

151. Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters / L.L. Zhou, W. Liu, Y.M. Wu et al. // *Stem Cells Int.* – 2020.

152. Dental follicle progenitor cells responses to *Porphyromonas gingivalis* LPS / K. Chatzivasileiou, C.A. Lux, G. Steinhoff, H. Lang // *J Cell Mol Med.* – 2013. – Vol. 17(6). – P. 766-73.

153. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles / S. Yildirim, N. Zibandeh, D. Genc et al. // *Stem Cells Int.* – 2016.

154. The therapeutic role of bone marrow stem cell local injection in rat experimental periodontitis / L. Lu, Y. Liu, X. Zhang, J. Lin // *J Oral Rehabil.* – 2020. – Vol. 47(Suppl 1). – P. 73-82.

155. Chitosan hydrogel incorporated with dental pulp stem cell-derived exosomes alleviates periodontitis in mice via a macrophage-dependent mechanism / Z. Shen, S. Kuang, Y. Zhang et al. // *Bioact Mater.* – 2020. – Vol. 5(4). – P. 1113-26.

156. Tatullo, M. Stem Cells from Dental Sources: Translational Applications in Medicine and Novel Approaches / M. Tatullo, M.J. Gandolfi // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23(8).

157. Modulating the Immune Response in Periodontitis / B. Bezerra, S. Monajemzadeh, D. Silva, F.Q. Pirih // *Frontiers in Dental Medicine.* – 2020. – Vol. 33

158. Golub, L.M. Periodontal therapeutics: Current host-modulation agents and future directions / L.M. Golub, H.M. Lee // *Periodontol.* – 2020. – Vol. 82(1). – P. 186-204.

159. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in the management of institutionalised geriatric patients with chronic periodontitis / A.R. Mohammad, P.M. Preshaw, M.H. Bradshaw et al. // *Gerodontology*. – 2005. – Vol. 22(1). – P. 37-43.
160. Systematic review and meta-analysis on the adjunctive use of host immune modulators in non-surgical periodontal treatment in healthy and systemically compromised patients / S. Corbella, E. Calciolari, A. Alberti et al. // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11(1).
161. Modified-release subantimicrobial dose doxycycline enhances scaling and root planing in subjects with periodontal disease / P.M. Preshaw, M.J. Novak, J. Mellonig et al. // *J Periodontol*. – 2008. – Vol. 79(3). – P. 440-52.
162. Efficacy of subantimicrobial-dose doxycycline against nitrosative stress in chronic periodontitis / A.E. Parvu, S.F. Alb, A.Craciun, M.A. Taulescu // *Acta Pharmacol Sin*. – 2013. – Vol. 34(2). – P. 247-54.
163. Myneni, S.R. Biological strategies for the prevention of periodontal disease: Probiotics and vaccines / S.R. Myneni, K. Brocavich // *Periodontol*. – 2020. – Vol. 84(1). – P.161-175.
164. Meurman, J.H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry / J.H. Meurman // *Eur J Oral Sci*. – 2005. – Vol. 113(3). – P. 188-96.
165. Treatment challenges and delivery systems in immunomodulation and probiotic therapies for periodontitis / A. Zidar, J. Kristl, P. Kocbek, S. Zupancic // *Expert Opin Drug Deliv*. – 2021. – Vol. 18(9). – P. 1229-44.
166. Moraes, R.M. Outside the limits of bacterial viability: Postbiotics in the management of periodontitis / R.M. Moraes, U. Schlagenhauf, A.L. Anbinder // *Biochem Pharmacol*. – 2022. – Vol. 201.
167. Bacterial antagonism against periodontopathogens / M. van Essche, G. Loozen, C. Godts et al. // *J Periodontol*. – 2013. – Vol. 84(6). – P. 801-11.
168. Probiotics During the Therapeutic Management of Periodontitis / F. Furlaneto, K.H. Ishikawa, M.R. Messoria, M.P.A. Mayer // *Adv Exp Med Biol*. – 2022. – Vol. 1373. – P. 353-75.

169. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity / P. Koll-Klais, R. Mandar, E. Leibur et al. // *Oral Microbiol Immunol.* – 2005. – Vol. 20(6). – P. 354-61.

170. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health / P. Koll, R. Mandar, H. Marcotte // *Oral Microbiol Immunol.* – 2008. – Vol. 23(2). – P. 139-47.

171. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri* / P. Krasse, B. Carlsson, C. Dahl et al. // *Swed Dent J.* – 2006. – Vol. 30(2). – P. 55-60.

172. Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions / D.R. Silva, J.D.C.O. Sardi, N. de Souza Pitangui et al. // *Journal of Functional Foods.* – 2020. – Vol. 73.

173. Brandt, L.J. Fecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection / L.J. Brandt // *Gastroenterol Hepatol (N Y).* – 2012. – Vol. 8(3). – P. 191-4.

174. Metabolic Influences of Gut Microbiota Dysbiosis on Inflammatory Bowel Disease / S. Sultan, M. El-Mowafy, A. Elgaml et al. // *Front Physiol.* – 2021. – Vol. 12.

175. Nascimento, M.M. Oral microbiota transplant: a potential new therapy for oral diseases / M.M. Nascimento // *J Calif Dent Assoc.* – 2017. – Vol. 45(10). – P. 565-8.

176. Towards microbiome transplant as a therapy for periodontitis: an exploratory study of periodontitis microbial signature contrasted by oral health, caries and edentulism / A.E. Pozhitkov, B.J. Leroux, T.W. Randolph et al. // *BMC Oral Health.* – 2015. – Vol. 15. – P. 125.

177. Development and characterization of an oral microbiome transplant among Australians for the treatment of dental caries and periodontal disease: A study protocol / S. Nath, P. Zilm, L. Jamieson et al. // *PLoS ONE.* – 2021. – Vol. 16(11).

178. Сакман, Б. Регистрация одиночных каналов / Б. Сакман, Э. Нееп // «Мир». – 1987. – С. 448.

179. Tonetti, M.S. European Workshop in Periodontology group C: Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and

disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology / M.S. Tonetti, N. Claffey // *J Clin Periodontol.* – 2005. – Vol. 32 (Suppl 6). – P. 210-213.

180. Burt, B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases / B. Burt // *J Periodontol.* – 2005. – Vol. 76. – P. 1406-1419.

181. Sekino, S. The effect of systemic administration of ibuprofen in the experimental gingivitis model / S. Sekino, P. Ramberg, J. Lindhe // *J Clin Periodontol.* – 2005. – Vol. 32. – P. 182-187.

182. Effect of systemically administered naproxen sodium on clinical parameters and myeloperoxidase and elastase-like activity levels in gingival crevicular fluid / H. Aras, F. Çağlayan, G.N. Güncü et al. // *J Periodontol.* – 2007. – Vol. 78. – P. 868-873.

183. Azoubel, M.C. Adjunctive benefits of systemic etoricoxib in non-surgical treatment of aggressive periodontitis: short-term evaluation / M.C. Azoubel, V.A. Sarmiento, V. Cangussú // *J Periodontol.* – 2008. – Vol. 79. – P. 1719-1725.

184. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclooxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats / C.M. Queiroz-Junior, C.M. Pacheco, K.L. Maltos et al. // *J Periodontal Res.* – 2009. – Vol. 44. – P. 153-160.

185. Fitzgerald, G.A. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2 / G.A. Fitzgerald, C. Patrono // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol. 345. – P. 433-442.

186. Randomised, double-blind comparison of efficacy and tolerability of diclofenac mouthwash versus placebo in mucositis of oral cavity by radiotherapy / R. Kostrica, J. Rottenberg, J. Kvech et al. // *J Clin Res.* – 2002. – Vol. 5. – P. 1-15.

187. Kayal, R.A. The role of osteoimmunology in periodontal disease / R.A. Kayal // *Biomed Res Int.* – 2013. – P. 1-12.

188. Mescher, A.L. Junqueira's basic histology: text and atlas / A.L. Mesche // 14th ed. USA: McGraw-Hill. – 2015. – P. 560.

189. Lamster, I.B. Periodontal disease and the metabolic syndrome / I.B. Lamster, M. IPagan // *Int Dent J.* – 2017. – Vol. 67(2). – P. 67-77

190. In vitro экспериментальное изучение тканевой и клеточной токсичности новых лекарственных веществ / Е.А. Дагар, Я.А. Мазов, Е.В. Блинова и др. // Вестник «Биомедицина и Социология». – 2022. – Т.7, №3. – С.90-94.

191. Изучение эффективности фармакологической композиции с производным диметилацетамида при инфраорбитальной анестезии у крыс с пародонтитом / Я. А. Мазов, Е.А. Дагар, Е.В. Блинова и др. / Вестник «Биомедицина и Социология». – 2022. – Т.7, №1. – С.88-94.

192. Novel dimethylacetamide-containing formulation improves infraorbital anaesthesia efficacy in rats with periodontitis / E.V. Blinova, E.V. Shikh, A.V. Novikov et al. // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Vol. 2020. – ID 3058735.

193. Соединение n-ацетил-6-аминогексановой кислоты подавляет нервную проводимость / Я.А. Мазов, А.А. Дмитриев, А.С. Пирожков и др. // Вестник Биомедицина и социология. – 2023. – Т. 8, № 3. – С. 59-64.

194. Изучение эффективности фармакологической композиции с производным диметилацетамида при инфраорбитальной анестезии у крыс с пародонтитом / Я.А. Мазов, Е.В. Блинова, Е.В. Семелева и др. // Вестник Биомедицина и социология. – 2022. – Т. 7, № 1. – С. 88-94.

195. In vitro экспериментальное изучение тканевой и клеточной токсичности новых лекарственных веществ / Е.А. Дагар, Я.А. Мазов, Е.В. Блинова и др. // Вестник Биомедицина и социология. – 2022. – Т. 7, № 3. – С. 90-94.

196. Novel dimethylacetamide-containing formulation improves infraorbital anaesthesia efficacy in rats with periodontitis / E.V. Blinova, E.V. Shikh, A.V. Novikov et al. // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2020. Vol. 2020. P. 3058735.

197. Metal-containing taurine compounds protect rat's brain in reperfusion-induced injury / E.V. Semeleva, E.V. Blinova, A.V. Zaborovsky et al. // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Т. 6, № 4. – С. 43-50.

198. Cerium-containing n-acetyl-6-aminohexanoic acid formulation accelerates wound reparation in diabetic animals / E. Blinova, D. Shimanovsky, Y. Mazov et al. // *Biomolecules*. – 2021. – Т. 11, № 6.
199. Novel hydroxypyridine compound protects brain cells against ischemic damage in vitro and in vivo / E. Blinova, E. Turovsky, E. Eliseikina et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23, № 21. – С. 12953.
200. Химико-аналитический подход к оценке эффективности местных анестетиков / Э.В. Величко, Т.А. Лобаева, С.А. Рабинович и др. // *Российский журнал боли*. – 2023. – Т. 21, № 3 – С. 35-42