

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

УДК 577.15 (088.8)

И. П. Девулит, к. м. н.

Львовский национальный медицинский университет им.
Данилы Галицкого

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МУКОЗО-АДГЕЗИВНЫХ ПЛЕНОК С ЛИЗОЦИМОМ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ СТОМАТИТЕ

Апликация на слизистую полости рта липополисахарида вызывает развитие воспаления, дисбиоза и снижение уровня антиоксидантной защиты. Наложение пленок, содержащих лизоцим, снижает степень дисбиоза и воспаления.

Ключевые слова: ЛПС, стоматит, мукозо-адгезивные пленки, лизоцим, ферменты.

I. P. Dvulit

Львівський національний медичний університет ім. Даніли
Галицького

ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНА ДІЯ МУКОЗО-АДГЕЗИВНИХ ПЛІВОК З ЛІЗОЦИМОМ ПРИ ТОКСИЧНОМУ СТОМАТИТІ

Апликація на слизову порожнини рота ліпополісахарида викликає розвиток запалення, дисбіоза та зниження рівня антиоксидантного захисту. Накладення плівок, що містять лізоцим, знижує ступінь дисбіозу і запалення.

Ключові слова: ЛПС, стоматит, мукозо-адгезивні плівки, лізоцим, ферменти.

I. P. Dvulit

Lviv national medical university

THERAPEUTIC-PROPHYLACTIC ACTION OF MUCOADHESIVE FILMS WITH LYSOZYME ON TOXIC STOMATITIS

ABSTRACT

Introduction. *Mucoadhesive films (MAF), containing some biologically active substance, have some advantaged over the other dosage forms, because they provides long-term local action of medicinal means with usage of minimal quantity of acting substance. Formerly we had shown the effectiveness of MAF with immobilized lysozyme usage, possessing the anti-inflammatory and antibacterial effect on the rats oral cavity mucous membrane (OCMM) after application of bee venom.*

Materials and methods. *Experiments were conducted on Wister strain rats. In the homogenates of OCMM the elastase activity, malonic dialdehyde, urease, lysozyme and catalase activity were measured; the disbiosis degree and antioxidative were determined.*

Results and conclusions. *The medocobiologic properties of MAF based on polyvinyl alcohol cryogel with immobilized lysozyme and preservatives, of complex action, were investigated. It was shown, the application of lipopolysaccharide on oral cavity mucous membranes of Wister strain rats induced inflammation development disbiosis, decreasing of antioxidant defence. It was established, that MAF with entrapped lysozyme, chlorhexidine bigluconate and ethylenediamine letraacetate, promotes 50 % decrease of urease level-marker of microbial dissemination of rats cheek mucous membrane. Application on rats oral cavity*

mucous membranes of lysozyme-containing films, decreases both disbiosis and inflammation degree.

Key words: LPS, stomatite, mucoadhesive films, lysozyme, enzymes.

Мукозо-адгезивные пленки (МАП), содержащие биологически активные вещества, имеют ряд преимуществ перед другими лекарственными формами, поскольку обеспечивают длительное локальное воздействие лечебного средства с использованием минимального количества действующего вещества [1, 2].

Известно использование МАП, содержащих лизоцим, для воздействия на слизистую полости рта после аппликаций пчелиного яда [3].

Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение лечебно-профилактического действия МАП на основе поливинилового спирта с включением лизоцима, и МАП, содержащих антисептик (хлоргексидин бигуанидин), хелатор (ЭДТА) или их комбинацию, при токсическом стоматите, вызываемом липополисахаридом (ЛПС)

Выбор ЛПС был обусловлен тем обстоятельством, что в патогенезе патологических процессов в тканях полости рта решающую роль играет микробный фактор, реализующий свое патогенное действие за счет токсинов, среди которых наиболее эффективным является ЛПС [4, 5].

Материалы и методы исследования. Пленки на основе поливинилового спирта (ПВС) содержали 10 мг/г лизоцима (яичный лизоцим Lysozyme afilact instant IQXO, 5K, производитель «Chr. Hansen», Дания). Для сравнения были изготовлены МАП, содержащие хелатор ЭДТА, МАП, содержащие антисептик хлоргексидин бигуанидин (ХГБГ) и МАП, содержащие лизоцим вместе с ЭДТА и ХГБГ.

Опыты были проведены на 30 крысах линии Вистар (самцы, возраст 12 месяцев, средняя живая масса 387±12 г), разделенных на 6 равных групп: 1-ая – норма (интактная), 3-6-ые группы – крысы, которым наносили на слизистую оболочку полости рта (СОПР) пленки, содержащие исследуемые вещества: 3-я – лизоцим, 4-ая – ЭДТА, 5-ая – ХГБГ и 6-ая – комбинацию всех трех соединений. 2-ая группа служила контролем (без лечения).

Предварительно у всех крыс 2-6 групп воспроизводили токсический стоматит. Для этого крысы получали на СОПР аппликации 0,2 мл геля, содержащего ЛПС в концентрации 38,5 мкг/мл, что соответствует дозе ≈ 30 мкг/кг. Через 30 минут после нанесения геля с ЛПС осуществляли аппликацию МАП на СОПР.

Умерщвление животных осуществляли через 24 часа под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца, иссекали слизистую десны и щеки в местах наложения МАП.

В гомогенатах СОПР (20 мг/мл 0,05 М трис HCl буфера pH 7,5) определяли уровень маркеров воспаления [6]: активность эластазы и содержание малонового диальдегида (МДА), показатель микробного об-

семенения – активность микробного фермента уреазы [7], показатель неспецифического иммунитета – активность лизоцима [7] и активность антиоксидантного фермента – каталазы [6].

По соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима рассчитывали степень дисбиоза по Левинскому [7], а по соотношению активности каталазы и содержания МДА – антиоксидантно-прооксидантный индекс АПИ [6].

Результаты исследований были подвергнуты статистической обработке в соответствии с общепринятыми методами [8].

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены результаты определения в слизистой полости рта активности эластазы. Из этих данных видно, что и в десне, и в щеке активность эластазы при действии ЛПС достоверно возрастает. Наложение МАП на десну мало влияет на этот показатель, независимо от вида действующего в составе пленки агента. Наложение МАП на слизистую щеки достоверно снижает активность эластазы, причем существенной разницы между отдельными действующими агентами не выявлено.

В табл. 2 представлены результаты определения в СОПР крыс после аппликации ЛПС и МАП содержания МДА, также являющегося биохимическим маркером воспаления. Как видно из этих данных, ЛПС повышает уровень МДА, особенно в щеке, однако на-

ложение пленок проявляет лишь тенденцию к снижению этого показателя.

В табл. 3 представлены результаты определения активности уреазы, которая является маркером микробной обсемененности. Как видно из этих данных, уровень уреазы при действии ЛПС возрастает более чем в 2 раза, а под влиянием МАП несколько ($p > 0,3$) снижается в десне и достоверно – в слизистой щеки, но лишь при действии МАП с ХГБГ и, особенно, при сочетании лизоцима с ХГБГ и ЭДТА.

В табл. 4 представлены результаты определения активности лизоцима, отражающие уровень неспецифического иммунитета. Как видно из этих данных, ЛПС снижает этот показатель в 2,4 раза в десне и в 3,6 раза в щеке. Наложение МАП во всех случаях достоверно повышает этот показатель в десне, но мало влияет на сниженную активность лизоцима в слизистой щеки. Существенной разницы в действии различных агентов не выявлено.

В табл. 5 показана активность каталазы в СОПР крыс после аппликации ЛПС и воздействия МАП. Как видно из этих данных, ЛПС проявляет лишь тенденцию к снижению активности каталазы, и она мало изменяется под влиянием использованных МАП, хотя при воздействии МАП, содержащих лизоцим, активность каталазы в десне повышается в большей степени (однако, $p > 0,05$).

Таблица 1

Влияние МАП на активность эластазы в слизистой полости рта крыс после аппликаций геля с ЛПС (нкат/кг)

№ п/п	Группа	Десна	Щека
1	Норма	32±2	31±2
2	ЛПС (контроль)	43±3 $p < 0,05$	40±1 $p < 0,01$
3	ЛПС + МАП с лизоцимом	40±2 $p < 0,05; p_1 > 0,3$	34±1 $p > 0,05; p_1 < 0,01$
4	ЛПС + МАП с ЭДТА	41±4 $p < 0,05; p_1 > 0,3$	35±3 $p > 0,05; p_1 < 0,05$
5	ЛПС + МАП с ХГБГ	37±3 $p > 0,05; p_1 > 0,05$	35±1 $p > 0,05; p_1 < 0,05$
6	ЛПС + МАП с лизоцимом + ХГБГ + ЭДТА	38±2 $p > 0,05; p_1 > 0,05$	34±2 $p > 0,05; p_1 < 0,05$

Примечание: p – в сравнении с гр. № 1; p_1 – в сравнении с гр. № 2.

Таблица 2

Влияние МАП на содержание МДА в слизистой полости рта крыс после аппликаций геля с ЛПС (мкмоль/кг)

№ п/п	Группа	Десна	Щека
1	Норма	11,28±1,33	11,06±1,70
2	ЛПС (контроль)	14,87±1,24 $p > 0,05$	15,51±1,35 $p < 0,05$
3	ЛПС + МАП с лизоцимом	12,56±1,15 $p > 0,3; p_1 > 0,1$	14,87±1,12 $p > 0,05; p_1 > 0,3$
4	ЛПС + МАП с ЭДТА	12,50±1,13 $p > 0,3; p_1 > 0,1$	12,18±1,25 $p > 0,3; p_1 > 0,05$
5	ЛПС + МАП с ХГБГ	13,30±1,00 $p > 0,1; p_1 > 0,3$	12,82±1,10 $p > 0,3; p_1 > 0,1$
6	ЛПС + МАП с лизоцимом + ХГБГ + ЭДТА	13,85±1,12 $p > 0,1; p_1 > 0,3$	13,07±1,12 $p > 0,3; p_1 > 0,2$

Примечание: см. табл. 1.

Таблица 3

**Влияние МАП на активность уреазы в слизистой полости рта крыс
после аппликаций геля с ЛПС (мк-кат/кг)**

№ п/п	Группа	Десна	Щека
1	Норма	0,34±0,09	0,82±0,09
2	ЛПС (контроль)	0,81±0,10 p<0,01	1,87±0,10 p<0,001
3	ЛПС + МАП с лизоцимом	0,73±0,09 p<0,05; p ₁ >0,3	1,60±0,11 p<0,001; p ₁ >0,05
4	ЛПС + МАП с ЭДТА	0,66±0,10 p<0,05; p ₁ >0,3	1,58±0,14 p<0,001; p ₁ >0,05
5	ЛПС + МАП с ХГБГ	0,78±0,09 p<0,05; p ₁ >0,6	1,53±0,13 p<0,01; p ₁ <0,05
6	ЛПС + МАП с лизоцимом + ХГБГ + ЭДТА	0,70±0,11 p<0,05; p ₁ >0,3	1,32±0,10 p<0,01; p ₁ <0,01

Примечание: см. табл. 1.

Таблица 4

**Влияние МАП на активность лизоцима в слизистой полости рта крыс
после аппликаций геля с ЛПС (ед/кг)**

№ п/п	Группа	Десна	Щека
1	Норма	322±26	302±26
2	ЛПС (контроль)	134±17 p<0,001	83±9 p<0,001
3	ЛПС + МАП с лизоцимом	227±21 p<0,05; p ₁ <0,05	105±8 p<0,001; p ₁ >0,05
4	ЛПС + МАП с ЭДТА	248±20 p<0,01; p ₁ <0,01	105±10 p<0,001; p ₁ >0,05
5	ЛПС + МАП с ХГБГ	279±17 p>0,05; p ₁ <0,01	112±9 p<0,001; p ₁ <0,05
6	ЛПС + МАП с лизоцимом + ХГБГ + ЭДТА	217±24 p<0,05; p ₁ <0,05	112±12 p<0,001; p ₁ >0,05

Примечание: см. табл. 1.

Таблица 5

**Влияние МАП на активность каталазы в слизистой полости рта крыс
после аппликаций геля с ЛПС (мкат/кг)**

№ п/п	Группа	Десна	Щека
1	Норма	7,64±0,55	8,13±0,73
2	ЛПС (контроль)	6,92±0,58 p>0,3	7,12±0,47 p>0,1
3	ЛПС + МАП с лизоцимом	7,70±0,28 p>0,7; p ₁ >0,05	7,95±0,74 p>0,5; p ₁ >0,1
4	ЛПС + МАП с ЭДТА	7,17±0,48 p>0,3; p ₁ >0,5	7,90±0,66 p>0,5; p ₁ >0,2
5	ЛПС + МАП с ХГБГ	6,89±0,54 p>0,3; p ₁ >0,7	7,73±0,58 p>0,3; p ₁ >0,3
6	ЛПС + МАП с лизоцимом + ХГБГ + ЭДТА	7,68±0,42 p>0,8; p ₁ >0,2	7,67±0,70 p>0,5; p ₁ >0,3

Примечание: см. табл. 1.

На рис. 1 показаны изменения степени дисбиоза в СОПР крыс, получавших аппликации ЛПС и после наложения МАП. Видно, что при действии ЛПС степень дисбиоза в десне возрастает более чем в 5,6 раза, а в щеке – в 8,4 раза. Наложение МАП на слизистые

во всех случаях достоверно снижает степень дисбиоза, хотя и не возвращает этот показатель к норме. В наибольшей степени этот показатель снижается в слизистой щеки при действии МАП, содержащей все три исследованных агента.

Напротив, при действии ЛПС индекс АПИ достоверно снижается (в среднем в 1,5 раза), а при наложении МАП повышается, причем в большинстве случаев достоверно (рис. 2).

Таким образом, можно констатировать, что ЛПС действительно является мощным патогенным факто-

ром в полости рта, что подтверждает имеющиеся данные литературы [4, 5]. МАП с лизоцимом оказывает противовоспалительное и антидисбиотическое действие на СОПР после воздействия ЛПС.

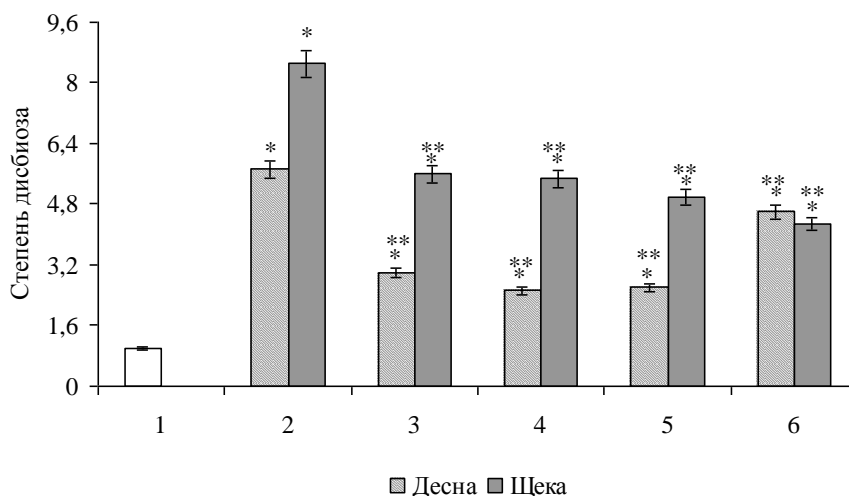


Рис. 1. Влияние МАП на степень дисбиоза в слизистой полости рта после аппликаций геля с ЛПС (2) (1 – норма).

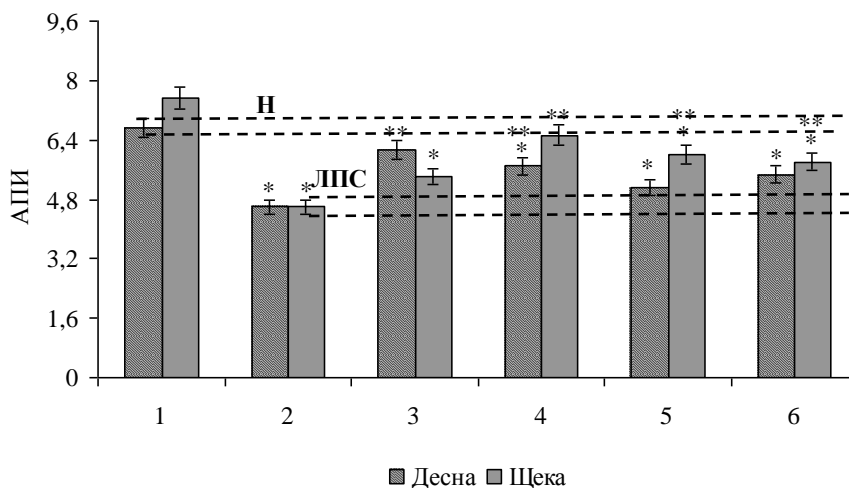


Рис. 2. Влияние МАП на индекс АПИ в слизистой полости рта после аппликаций геля с ЛПС (2)

Надо также отметить, что положительное (т.е. лечебно-профилактическое) действие оказывают даже МАП, не содержащие лизоцим, по-видимому, за счет механической защиты СОПР от повреждающих факторов ротовой полости.

Выводы. 1. Аппликации ЛПС на СОПР вызывают развитие в ней дисбиотических и провоспалительных явлений (стоматит).

2. Аппликации на СОПР МАП, содержащих лизоцим, оказывают антидисбиотическое и противовоспалительное действие при стоматите.

3. Определенную положительную роль в действии МАП играет их механическая защитная функция.

Список литературы

1. Харенко Е. А. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор) / Е. А. Харенко, Н. И. Ларионова, Н. Б. Демина // Химико-фармацевтический журнал – 2009. – т. 43, № 4. – С. 21-29.
2. Punitha S. Polymers in mucoadhesive buccal drag delivery system – a review / S. Punitha, Y. Girish // Int. J. Res. Pharm. Sci. – 2010. – v. 1, № 2. – P. 170-186.
3. Протизапальная дія мукоадгезивних плівок з імобілізованим лизоцимом на слизову оболонку щоки щурів / С. С. Декіна, А. П. Левицький, І. І. Романовська [та ін.] // Одеський медичний журнал – 2011. – № 4 (126). – С. 7-9.
4. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prerotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas gingivalis*) induce interleukine-8 gene expression in human gingival fibroblast culture / V. Tamura, M. Tocado, S. Nagaoka [et al.] // Infect. Immunol. – 1992. – v. 60, № 11. – P. 4932-4937.
5. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its Lipopolysaccharide, or its FimA protein / Q. Zhou, T.

Desta, M. Fenton [et al.] // Infection and Immunity. – 2005. – v. 73, № 2. – P. 935-943.

6. **Биохимические** маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации / А. П. Левицкий, О. В. Денга, О. А. Макаренко [и др.]. – Одесса: КП ОГТ, 2010. – 16 с.

7. **Ферментативный** метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / Левицкий А. П., Макаренко О. А., Селиванская И. А. [и др.]. – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 23 с.

8. **Лапач С. Н.** Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 320 с.

REFERENCES

1. **Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B.** Mucoadhesive drug formulations (review). *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2009; 43(4): 21-29.

2. **Punitha S., Girish Y.** Polymers in mucoadhesive buccal drug delivery system – a review. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2010; 1(2): 170-186.

3. **Dekina S. S., Levitsky A. P., Romanovska I. I. [i dr.]** Anti-inflammatory action of mucoadhesive films with immobilized lysozyme on the cheek mucosa of rats. *Odes'kyj medychnyj zhurnal*. 2011; 4(126): 7-9.

4. **Tamura V., Tocuda M., Nagaoka S. [et al.]** Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prerotella intermedia*) and *Bacteroides Porphyromonas gingivalis* induce interleukine-8 gene expression in human gingival fibroblast culture. *Infect. Immunol.* 1992; 60(11): 4932-4937.

5. **Zhou Q., Desta T., Fenton M. [et al.]** Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its Lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infection and Immunity*. 2005; 73(2): 935-943.

6. **Levitsky A. P., Denga O. V., Makarenko O. A. [i dr.]** *Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii* [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. Odessa, KP OGT, 2010: 16.

7. **Levitsky A. P., Makarenko O. A., Selivanskaya I. A. [i dr.]** *Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skrininga pro- i prebiotikov: metodicheskie rekomendatsii* [Enzymatic methods for determination of oral dysbiosis for screening pro- and prebiotics: method guidelines]. Kiev, GFC, 2007: 22.

8. **Lapach S. N., Chubenko A. V., Babich P. N.** *Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel* [Statistical methods in medical and biological research by using Excel]. Kiev, Morion, 2000: 320.

Проступила 23.04.15



УДК 616.361+576.8+615.24

А. І. Фурдичко, к. мед. н.

Львівський національний медичний університет
ім. Данила Галицького

ВПЛИВ ІНУЛІНУ НА СТАН ПАРОДОНТА ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕПАТИТОМ

Експериментальний гепатит (гідразиновий) на тлі дисбіозу (лінккоміциновий) викликає у щурів в яснах розвиток дисбіозу і запалення, а в кістковій тканині пародонту зниження мінералізуючого індексу і збільшення протеолізу. Вживання пребіотика інуліну нормалізує стан пародонту.

Ключові слова: пародонт, гепато-оральний синдром, гепатит, дисбіоз, пребіотики.

А. И. Фурдычко

Львовский национальный медицинский университет
им. Данилы Галицкого

ВЛИЯНИЕ ИНУЛИНА НА СОСТОЯНИЕ ПАРОДОНТА КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГЕПАТИТОМ

Экспериментальный гепатит (гидразиновый) на фоне дисбиоза (линкомициновый) вызывает у крыс в десне развитие дисбиоза и воспаления, а в костной ткани пародонта снижение минерализующего индекса и усиление протеолиза. Употребление пребиотика инулина нормализует состояние пародонта.

Ключевые слова: пародонт, гепато-оральный синдром, инулин, гепатит, дисбиоз, пребиотики.

A. I. Furdychko

Lviv National Medical University named after Danylo Galyskij

THE INFLUENCE OF INULIN UPON THE STATE OF PERIODONTIUM OF RATS WITH EXPERIMENTAL HEPATITIS

ABSTRACT

The dysbiotic processes and the reduction of antimicrobial function of liver lie in the basis of hepato-oral syndrome. This fact determines the reasonability of the application of antidybiotic and hepatoprotective preparations for the prevention of stomatological complications. The aim is to reveal the periodontoprotective effect of inulin at hepatitis.

The materials and the methods. *The toxic hepatitis was caused with hydrazine simultaneous to enteric dysbiosis, restored with lincomycin. Some rats with hepatitis simultaneous to dysbiosis took prebiotic inulin per os dosed at 200 mg/kg during 20 days. The state of periodontium was estimated according to the level of biochemical markers in gum and osseous tissue of periodontium. The content of malonic dialdehyde (MDA), caseinolytic activity (CLA), activity of urease, lysozyme and catalase was determined in gum. The activity of alkaline and acid phosphatases, activity of elastase and CLA were estimated in osseous tissue.*

The findings: *In rats with hepatitis simultaneous to dysbiosis the activity of urease, CLA, content of MDA grow and the activity of lysozyme and catalase reduce. These data speak of the development of dysbiosis and inflammation in periodontium. In osseous tissue of periodontium the activity of alkaline phosphatase decreases and the activity of acid phosphatase and protease increases. The introduction of inulin normalizes these indices.*

The conclusion: *Dysbiosis and inflammation, which can be prevented with prebiotic inulin, develop in periodontium at hepato-oral syndrome. This fact speaks of the role of dysbiotic phenomena in pathogenesis of hepato-oral syndrome.*

Key words: periodontium, hepato-oral syndrome, inulin, hepatitis, dysbiosis, prebiotics.

Залежність стану тканин ротової порожнини від гепато-біліарної патології підтверджена в ряді досліджень [1-4], що дало підстави для визначення нової нозологічної форми гепато-орального синдрому [5]. Автори, які запропонували цей термін (проф. А. П. Левицький і д. мед. н. С. О. Дем'яненко), вважають, що в основі патогенезу цього синдрому лежить порушення антимікробної функції печінки [6]. Остання полягає в тому, що на шляху кишкових бактерій і