

**ВЛИЯНИЕ ГЕЛЯ С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА СОСТОЯНИЕ ДЕСНЫ
КРЫС С ПРОТАМИНОВЫМ ГИНГИВИТОМ****ГУ «Харьковский национальный медицинский университет» (г. Харьков)*****ГУ «Институт стоматологии НАМН» (г. Одесса)**

Данная работа является фрагментом НИР «Удосконалення та розробка нових індивідуалізованих методів діагностики та лікування стоматологічних захворювань у дітей та дорослих», № гос. реєстрації 0112U002382.

Вступлення. В ранее проведенных исследованиях нами было показано, что аппликации на слизистую полости рта (СОПР) крыс геля, содержащего протамин, вызывают в десне развитие дисбиоза и воспаления, аналогично тому, что можно наблюдать при экспериментальном гингивите [3].

Как известно, протамин (полиаргинин) является антидотом при передозировке гепарина [5], а при длительном (2-3 недели) парентеральном введении вызывает сахарный диабет 2 типа (СД2) [7].

Изучение состояния пародонта у крыс с СД2 показано наличие в десне дисбиоза и воспаления, развитие которых связывают с гипергликемией [9]. Однако наши исследования действия аппликаций геля с протамином показывают, что развитие протаминового гингивита может иметь иной, не гипергликемический патогенез. В частности, нами показано снижение в тканях десны содержания гиалуроновой кислоты, являющейся межклеточным «цементом» и обеспечивающей резистентность к развитию воспаления и транслокации микробов [4].

Целью настоящего исследования стало изучение влияния на состояние десны крыс, получавших аппликации протамин, препарата гиалуроновой кислоты.

Объект и методы исследования. В работе использовали протамин сульфат производства ЗАО «Индар», Украина в виде 1%-ного раствора (1000 м. е. /мл) (регистрационное свидетельство Минздрава Украины № UA/9616/01/01 от 13.05.09 г. № 331). Гель, содержащий протамин сульфат, готовили на 2,5%-ном растворе карбоксиметилцеллюлозе натриевой соли с конечной концентрацией протамин сульфата 0,1 мг/мл.

В качестве препарата гиалуроновой кислоты использовали гель для десен «Генгигель», производства фирмы «Riceforma s. r. l.» (Италия) (гигиеническое заключение Минздрава Украины № 05. 03. 02-03/72694 от 13.11.2009 г.), разведенный 2,5%-ным раствором КМЦ до конечной концентрации гиалуроновой кислоты 0,2 мг/мл.

Опыты были произведены на 22 белых крысах линии Вистар (самцы, 13 месяцев, средняя масса 280 ± 15 г), распределенных в 3 группы: 1-ая (8 крыс) – норма, 2-ая (7 крыс) - протаминовый гингивит, который вызывали путем нанесения на СОПР 0,5 мл геля с протамин сульфатом один раз в день в течение 2 дней и 3-я группа (7 крыс) - протаминовый гингивит + гель с гиалуроновой кислотой, который наносили ежедневно по 0,5 мл в течение 7 дней.

Умерщвление животных осуществляли на 8-й день под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. Иссекали десну и получали сыворотку крови, которые хранили до исследования при -30°C .

В гомогенате десны и в сыворотке крови определяли активность эластазы [2], уреазы [8], лизоцима [8], каталазы [2] и содержание малонового диальдегида (МДА) [6]. Кроме того, в гомогенате десны определяли содержание гиалуроновой кислоты нефелометрическим методом по Клементу [1]. По соотношению активности каталазы и концентрации МДА рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс АПИ [2], а по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима степень дисбиоза по методу Левицкого [6].

Результаты исследований и их обсуждение. В табл. 1 представлены результаты определения биохимических показателей десны крыс с протаминовым гингивитом, получавших аппликации геля с гиалуроновой кислотой. Из этих данных видно, что оба маркера воспаления (эластаза и МДА) повышают свой уровень после аппликаций протамин сульфата, однако достоверно лишь эластаза. Аппликации геля с гиалуроновой кислотой снижают уровень обоих маркеров воспаления, причем достоверно лишь активность эластазы ($p < 0,05$).

У крыс с протаминовым гингивитом достоверно ($p < 0,01$) возрастает активность уреазы, которая коррелирует со степенью микробной обсемененности. Аппликации геля с гиалуроновой кислотой полностью нормализуют этот показатель, что свидетельствует о снижении уровня микробной обсемененности, обусловленной уменьшением транслокации бактерий.

Возможной причиной этого может быть, в определенной степени, значительное снижение в десне

Таблиця 1

Влияние геля с гиалуроновой кислотой на биохимические показатели десны крыс с протаминовым гингивитом

№ п/п	Показатели	1-ая группа, норма (n=8)	2-ая группа, гингивит (n=7)	3-ая группа, гингивит + гиалуроновая кислота (n=7)
1	Эластаза, мк-кат/кг	48±3	69±5 p<0,05	56±4 p>0,05 p ₁ <0,05
2	МДА, ммоль/кг	11,6±1,1	13,6±1,2 p>0,2	11,0±1,1 p>0,5 p ₁ >0,05
3	Уреаза, мк-кат/кг	1,21±0,10	1,64±0,11 p<0,01	1,16±0,10 p>0,5 p ₁ <0,01
4	Лизоцим, ед/кг	360±28	198±12 p<0,001	308±26 p>0,05 p ₁ <0,01
5	Каталаза, мкат/кг	4,93±0,15	4,12±0,09 p<0,001	4,35±0,37 p>0,05 p ₁ >0,2
6	Гиалуроновая кислота, мг/кг	655,2±109,4	413,7±16,4 p<0,05	606,9±83,8 p>0,5 p ₁ <0,05
7	Индекс АПИ, ед.	4,25±0,31	3,03±0,25 p<0,05	3,95±0,26 p>0,3 p ₁ <0,05
8	Степень дисбиоза, ед.	1,00±0,10	2,47±0,25 p<0,001	1,13±0,11 p>0,3 p ₁ <0,001

Примечание: p – показатель достоверности отличий в сравнении с группой № 1; p₁ – показатель достоверности отличий в сравнении с группой № 2.

Таблиця 2

Влияние геля с гиалуроновой кислотой на биохимические показатели сыворотки крови крыс с протаминовым гингивитом

№ п/п	Показатели	1-ая группа, норма (n=8)	2-ая группа, гингивит (n=7)	3-ая группа, гингивит + гиалуроновая кислота (n=7)
1	Эластаза, мк-кат/л	205,7±12,0	286,0±15,0 p<0,01	208,3±8,0 p>0,5 p ₁ <0,01
2	МДА, ммоль/л	0,81±0,03	0,79±0,03 p>0,3	0,75±0,03 p>0,1 p ₁ >0,3
3	Уреаза, мк-кат/л	0,22±0,01	0,23±0,01 p>0,3	0,22±0,01 p=1,0 p ₁ >0,3
4	Лизоцим, ед/л	79±5	61±3 p<0,05	67±4 p>0,05 p ₁ >0,1
5	Каталаза, мкат/л	0,17±0,01	0,15±0,01 p>0,05	0,15±0,01 p>0,05 p ₁ =1,0
6	Индекс АПИ, ед.	2,10±0,18	1,90±0,18 p>0,3	2,00±0,19 p>0,4 p ₁ >0,4
7	Степень дисбиоза, ед.	1,00±0,10	1,36±0,25 p>0,05	1,18±0,11 p>0,3 p ₁ >0,3

Примечание: p – показатель достоверности отличий с группой № 1; p₁ – показатель достоверности отличий с группой № 2.

крыс, получавших протамин, активности лизоцима - показателя неспецифического иммунитета. Аппликации геля с гиалуроновой кислотой существенно повышают активность лизоцима в десне.

Активность антиоксидантного фермента каталазы и уровень индекса АПИ достоверно снижаются у крыс, получавших протамин. Аппликации геля с гиалуроновой кислотой повышают активность каталазы и индекс АПИ.

Аппликации геля с протамин сульфатом достоверно снижают содержание в десне гиалуроновой кислоты, что может приводить к существенному повышению тканевой проницаемости и, как следствие, к увеличению транслокации бактерий и повышению риска развития воспаления. Аппликации

геля с гиалуроновой кислотой снижают патогенное действие протамин и восстанавливают содержание в десне гиалуроновой кислоты.

Надо полагать, что изменение содержания гиалуроновой кислоты в десне крыс предопределяет изменение степени дисбиоза этой ткани, т. е. резкое (почти в 2,5 раза) повышение степени дисбиоза при снижении содержания гиалуроновой кислоты и, наоборот, снижение степени дисбиоза до нормы при нормализации содержания в десне гиалуроновой кислоты.

В табл. 2 представлены результаты определения биохимических показателей сыворотки крови крыс, получавших протамин. Из всех изучаемых показателей достоверными являются лишь два: повышение активности маркера воспаления эластазы (p<0,01) и снижение активности лизоцима. Аппликации геля с гиалуроновой кислотой нормализуют активность эластазы и существенно повышает активность лизоцима.

Выводы. Таким образом, развитие гингивита при локальном нанесении протамин устраняется аппликациями геля, содержащего гиалуроновую кислоту. Механизм такого лечебного эффекта гиалуроновой кислоты можно объяснить ее способностью проникать в десну и снижать проницаемость тканей пародонта в отношении бактерий и лейкоцитов - главных участников воспалительной реакции [10].

Перспективы дальнейших исследований. Полученные данные дают веские основания рекомендовать препараты гиалуроновой кислоты в качестве лечебно-профилактического средства при гингивите, а, возможно, и при пародонтите. Дальнейшие исследования покажут, насколько эффективно использование ГК при лечении воспалительно-дистрофических заболеваний пародонта с вовлечением в процесс костной ткани.

Литература

1. Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии / В. С. Асатиани. – М.: Наука, 1965. – 298 с.
2. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: Метод. рекомендации. / [А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко и др.]. – Одесса, 2010. – 16 с.
3. Влияние аппликаций геля с протамином на биохимические показатели воспаления и дисбиоза в десне крыс / А. П. Левицкий, Н. Л. Хлыстун, Е. П. Ступак [и др.] // Вісник стоматології. - 2012 - № 7, спецвип. - С. 33-36.
4. Лечение-профилактическое действие аппликаций геля с гиалуроновой кислотой на состояние десны крыс с экспериментальным гингивитом / Н. Л. Хлыстун, И. И. Соколова, Л. Н. Хромагина, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. - 2012. - № 3. - С. 8-10.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 8-е изд. / М. Д. Машковский. - М.: Медицина, 1978. - Т. 1. – 529 с.
6. Пат. 43140 Україна, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А. П., Деньга О. В., Селіванська І. О. [та ін.]. – № u200815092. – заявл. 26. 12. 08; опубл. 10. 08. 09, Бюл. № 15.
7. Ульянов А. М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.
8. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / [А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская и др.]. – Киев, ГФЦ, 2007. – 22 с.
9. Цісельський Ю. В. Дисбіотичні аспекти патогенезу, профілактики і лікування діабетичної ретинопатії : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук : спец. 14. 03. 04 «Патологічна фізіологія» / Ю. В. Цісельський. – Одеса, 2011. - 30 с.
10. Чайковська І. В. Роль мікроорганізмів у виникненні в розвитку хвороб пародонта / І. В. Чайковська // Український стоматологічний альманах. - 2005. - № 5. - С. 14-17.

УДК 517. 112:612. 8+615. 462. 03

ВЛИЯНИЕ ГЕЛЯ С ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА СОСТОЯНИЕ ДЕСНЫ КРЫС С ПРОТАМИНОВЫМ ГИНГИВИТОМ

Хлыстун Н. Л., Соколова И. И., Левицкий А. П.

Резюме. Протаминовый гингивит у крыс вызывали путем аппликаций геля с протамином (0,1 мг/мл) в дозе 0,18 мг/кг. Аппликации на десну геля с гиалуроновой кислотой (0,2 мг/мл) в дозе 0,36 мг/кг осуществляли в течение 7 дней. Установлена способность гиалуроновой кислоты повышать содержание последней в ткани десны и устранить дисбиотические и воспалительные процессы в пародонте, о чем судили по характеру изменения уровня биохимических маркеров.

Ключевые слова: десна, протамин, гиалуроновая кислота, воспаление, дисбиоз, ферменты.

УДК 517. 112:612. 8+615. 462. 03

ВПЛИВ ГЕЛЯ З ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ НА СТАН ЯСЕН ЩУРІВ З ПРОТАМІНОВИМ ГІНГІВІТОМ

Хлыстун Н. Л., Соколова И. И., Левицкий А. П.

Резюме. Протаминовый гингивит у щурів викликали шляхом аппликацій гелю з протаміном (0,1 мг/мл) в дозі 0,18 мг/кг. Аплікації на ясна гелю з гіалуроновою кислотою (0,2 мг/мл) в дозі 0,36 мг/кг здійснювали протягом 7 днів. Встановлена здатність гіалуронової кислоти підвищувати вміст останньої в тканині ясен і усувати дисбіотичні та загальні процеси в пародонті, які оцінювали за характером змін рівня біохімічних маркерів.

Ключові слова: ясна, протамін, гіалуронова кислота, запалення, дисбіоз, ферменти.

UDC 517. 112:612. 8+615. 462. 03

The Influence of Gel with Acidi Hyaluronici to Condition State of Rats Gum with Protamini Gingivitis

Khlistun N. L., Sokolova I. I., Levitskij A. P.

Abstract. Hyaluronic acid is glycosamineglycane and composes the basis of intracellular substance of conjunctive tissue along with collagen. Its optimal contents in tissues provides with the required level of penetrability and resistance of tissue to the development of inflammation. As at gingivites the intensification of the processes of hydrolysis of hyaluronic acid at the expense of the activation of bacterial and lysosomal of hyaluronidases, the development of pathologic processes in the conjunctive tissue aggravates. The therapeutical effect of the preparations of hyaluronic acid upon the state of oral cavity as the simulations of gingivitis in rats was studied.

At the simulation of diabetes mellitus of type II (with protamine) the development of inflammatory and dystrophic processes in periodontium, conditioned by dysbiosis, was shown.

The protamini gingivitis in he – rats caused from the gel applications with protamin (CC «Indar», Ukraine) (0,1 mg/ml) in dose 0,18 mg/kg (of wich the growth of elastase activity speaks and disbiosis – displayed by the increase in urease activity and degree of disbyosis). In gum research level of inflammation – activity of elastase, catalase, MDA, urease, lysozyme, antioksidant – prooksidant index API, degree of disbiosis and quantity of acidi hyaluronici.

The application of protamine have reduced activity of lysozyme, catalase and antioksidant – prooksidant index API. As supposed, the noticed effect of protamine is the result of its anti-heparin activity that increases the activity of hyaluronidase, reduces the content of hyaluronic acid and favors the development of inflammation.

The growth in the activity of hyaluronidase in gingival and saliva in rats with periodontitis was determined. The inhibitors of hyaluronidase (bioflavonoids, sulphated polysahaccharides) reduce the inflammatory reaction and decrease the microbe semination of periodontium.

The treatment was carried out with the preparation «Gengigel» (0,2% hyaluronic acid, Riserfarma, Italy) dosed at 0,36 mg/kg of rat's weight during 7 days. Established ability of acidi hyaluronici increase percentage acidi hyaluronici in tissues of gingiva and remove dysbiotics and inflammation processes in periodontis. The applications of the gel «Gengigel» reduce the level of markers of inflammation. The held investignations have shown the applications of gel with hyaluronic acid to be of anti-inflammatory effect upon the gingival at the influence of pathogenic factors. It is also possible, that the therapeutic and preventive effect of the investigated preparation of hyaluronic acid can be intensified by increase of its dose.

Acidi hyaluronici is the main composition of connective tissue, it is determine manifestation of many function. After study the property, acidi hyaluronici wide use in medicine. The possibility of application in stomatology is a very interesting and perspective.

Key words: gum, protamin, acidi hyaluronici, inflammation, dysbiosis, fermentes.

Рецензент – проф. Скрипников П. М.

Стаття надійшла 11. 12. 2013 р.