

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

ОЦЕНКА ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ
ГИДРОГЕЛЯ ХИТОЗАНА НА МОДЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы
Направления 06.03.01 – Биология
биологического факультета
Кауновой Дарьи Дмитриевны

Научный руководитель
доцент кафедры физиологии
человека и животных, к.б.н.

Шорина 20.06.17 Л.Н. Шорина
подпись, дата

Научный консультант
ст.н.с. ОНИ НС и БС, к.б.н.

Зудина 20.06.17 И.В. Зудина
подпись, дата

Заведующий кафедрой
профессор, д.б.н.

Семьякина-Глушкова О.В. Семьякина-Глушковская
подпись, дата

Саратов 2017

Актуальность работы. Распространенность болезней пародонта в мире составляет 98% и является основной причиной потери здоровых зубов. По данным ВОЗ пик заболеваемости приходится на 15-18 лет и 35-44 года. В последние годы наблюдается тенденция к росту числа случаев пародонтита у лиц молодого возраста. В связи с этим проблемы, связанные со стоматологическими заболеваниями, остаются по-прежнему актуальными.

Основным этиологическим фактором воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) выступает патогенная пародонтальная микробиота, обитающая в содержимом десневой борозды (в зубном налете и в десневой жидкости). Видоспецифические особенности метаболизма пародонтопатогенных микроорганизмов оказывают влияние на гомеостаз тканей пародонта и инициируют развитие воспалительного процесса. Итогом жизнедеятельности пародонтопатогенов являются резорбция альвеолярной кости, расшатывание и потеря здоровых зубов.

Часто наблюдаемая на практике низкая эффективность применяемой этиотропной терапии ВЗП связана с быстро формирующейся у бактерий резистентностью к антибактериальным препаратам. Очевидно, что решением данной проблемы может быть использование лекарственных средств, обладающих не только антибактериальной активностью, но и способностью активизировать местный иммунитет и за счет этого повысить устойчивость тканей пародонта к действию агрессивной микрофлоры. Кроме того показано, что местное использование антибиотических средств более эффективно и безопасно, чем их системное введение.

В этом плане особый интерес представляют препараты из полимера хитозана (ХТЗ), которые успешно применяются в медицине, в том числе и в стоматологии, поскольку ХТЗ обладает выраженным противовоспалительным, иммуностропным и антибактериальным действием. Показано, что гидрогели на основе соли ХТЗ и аскорбиновой кислоты (аскорбат ХТЗ) достаточно эффективны при лечении заболеваний пародонта. Они проявляют выраженное противовоспалительное действие, позволяют в более короткие сроки

приостановить деструкцию тканей, уменьшить подвижность зубов, улучшить кровоснабжение.

Анализ научной литературы показал, что вопрос о том, каким образом аскорбат ХТЗ воздействует на условно-патогенную микрофлору и эпителий полости рта при ВЗП, до настоящего времени остается открытым.

Цель данной работы состояла в выявлении взаимосвязи между клинической картиной у лиц страдающих ВЗП, видовым составом бактериальной микрофлоры и цитологической картиной содержимого десневой борозды до и после аппликаций гидрогеля аскорбата ХТЗ.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить мазки-препараты с содержимым десневой борозды и провести цитологическую оценку состояния полости рта до и после аппликаций гидрогеля аскорбата ХТЗ.
2. Выделить ДНК бактерий из содержимого десневой борозды и определить состав микрофлоры методом ПЦР до и после аппликаций гидрогеля аскорбата ХТЗ.
3. Соотнести клиническую картину до и после применения аскорбата ХТЗ с данными, полученными при анализе ПЦР и цитограмм.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материал и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из семи подразделов: пародонт в норме и при патологии, этиологические факторы ВЗП, нормальная микрофлора полости рта, нарушение состава нормальной микрофлоры, пародонтопатогенные микроорганизмы, диагностика и лечение гингивита и пародонтита, применение аскорбата хитозана в стоматологии. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает в себя восемь подразделов: клиническое

состояние тканей пародонта до начала аппликаций, индексная оценка тканей пародонта у испытуемых, бактериоскопическое исследование, выявление ДНК пародонтогенных бактерий методом ПЦР, оценка состояния пародонта после аппликаций гидрогеля аскорбата ХТЗ, индексная оценка состояния тканей пародонта, бактериоскопическое исследование, определение видового состава пародонтопатогенов в содержимом десневой борозды.

Объектом исследования служил раствор аскорбата ХТЗ - соли ХТЗ и аскорбиновой кислоты (АК). Гелеобразную форму этой соли получали путем смешения водного 9 %-ного раствора аскорбиновой кислоты $C_6H_8O_6$ с порошком водорастворимого ХТЗ со средневязкостной молекулярной массой 32 кДа и степенью деацетилирования 70 мольн.% в мольном соотношении ХТЗ : АК = 1 : 0,6.

В качестве препарата сравнения применяли стоматологический гель для десен и полости рта «Метрогил Дента».

Для исследования привлекали 150 молодых людей-добровольцев. Критерии включения волонтеров в исследование: возраст от 18 до 25 лет, отсутствие антибактериальной и противовоспалительной терапии в течение 6 месяцев перед началом исследования, информированное согласие.

Основное содержание работы. Работа выполнена на базе кафедры физиологии человека и животных, отдела высокомолекулярных соединений ОНИ НС и БС, лаборатории молекулярной биологии и лаборатории микробиологии и физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Саратовский НИГУ имени Н.Г. Чернышевского», ЦКП «Симбиоз» ФГБУН ИБФРМ РАН, консультативной поликлиники кафедры терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России.

Постановка эксперимента. Комплексное клиническое обследование 150 молодых людей-добровольцев включало в себя осмотр полости рта, рентгенологическое исследование и определение стоматологических индексов: гигиенического индекса (ГИ, индекс зубного налета), I. Muhlemann (индекс

кровооточивости) и РМА (папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс).

После установленного диагноза ВЗП все больные были разделены на две группы: в группе сравнения (n = 15) проводились аппликации стоматологического геля Метрогил Дента, в экспериментальной группе (n = 15) апплицировали гидрогель аскорбата ХТЗ. Гели наносились ежедневно в течение 10 дней.

Содержимое десневой борозды переносили на стерильное обезжиренное предметное стекло и распределяли по поверхности тонким слоем с помощью покровного стекла. После высыхания мазка на воздухе его фиксировали 96 %-ным спиртом. Фиксированные мазки окрашивали гематоксилином и эозином и проводили микроскопирование препаратов на конфокальном микроскопе Leica DM6000. При 800-кратном увеличении просматривали 100 эпителиоцитов с разной степенью микробной контаминации.

Просмотренные эпителиальные клетки распределяли на 4 группы в зависимости от числа адсорбированных на поверхности микроорганизмов:

1 группа - на поверхности эпителиоцитов адсорбировано не более 10 клеток микроорганизмов;

2 группа - на поверхности адсорбировано от 10 до 50 микробных клеток;

3 группа - адсорбировано от 50 до 100 микроорганизмов;

4 группа - адсорбировано более 100 клеток микроорганизмов.

Показатель ПЕКЭ рассчитывали по формуле.

ДНК пяти видов пародонтопатогенов (*Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*) выявляли в десневой жидкости и в содержимом пародонтального кармана методом ПЦР с помощью набора «Мультидент-5».

Из собранного биологического материала выделяли ДНК микроорганизмов в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору «Ускоренная пробоподготовка». Полученные растворы ДНК хранили при минус 25 °С. Смесь для ПЦР включала: 5 мкл выделенной ДНК, 21 мкл раствора «Супермикс» и 1 мкл фермента полимеразы (горячий старт). В

отрицательном контроле в реакционную смесь не добавляли ДНК. В положительном контроле в реакционную смесь вносили ДНК всех пяти пародонтопатогенов, предоставленную производителем набора «Мультиидент-5». Для предохранения реакционной смеси от испарения при амплификационных циклах на ее поверхность наслаивали 15 мкл минерального масла «PCR Oil».

Амплификацию фрагментов проводили на четырехканальном ДНК-амплификаторе «Терцик». После окончания ПЦР реакционную смесь охлаждали до плюс 12 °С и ПЦР-продукты (по 10 мкл каждого образца) разделяли электрофорезом в 1.2 % агарозном геле (1×ТАЕ-буфер; U=150 - 200 в). Наличие ампликонов определенного размера свидетельствует о присутствии в тестируемом материале ДНК соответствующего микроорганизма. Отсутствие ампликонов свидетельствует об отсутствии в образце ДНК пяти пародонтогенных бактерий в детектируемых количествах.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки $p \leq 0,05$. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программ «Statistica 8.0 for Windows» (StatSoft-Russia) и Microsoft Office Excel 2007.

Обсуждение результатов исследования. До начала аппликаций. На первом подготовительном этапе исследований было изучено состояние полости рта у 150 молодых людей-добровольцев, что позволило выявить лиц, страдающих легкой формой ВЗП. Была проведена индексная оценка воспалительных процессов в тканях пародонта, установлен состав пародонтопатогенной микрофлоры десневой борозды и составлено объективное представление об общей интенсивности колонизации эпителиоцитов микроорганизмами.

В результате проведенного обследования у 56 (38 %) молодых людей было выявлено наличие воспалительных заболеваний пародонта, причем, у 40 (27 %) человек диагностировался хронический генерализованный катаральный

гингивит (ХГКГ), а у 16 (11 %) – хронический генерализованный пародонтит легкой степени (ХГПл). Наблюдалась зависимость между степенью углубления патологического процесса в пародонте и уровнем гигиены: у людей с интактным пародонтом индекс ГИ составлял $0,83 \pm 0,09$ ед.; при гингивите – $1,82 \pm 0,14$ ед., а при ХГП легкой степени – $2,50 \pm 0,29$ ед., и эти различия были статистически значимы $p \leq 0,05$.

Бактериоскопическое исследование содержимого десневой борозды показало, что практически у всех обследованных в мазках содержались микроорганизмы разных морфологических форм. В препаратах здоровых людей 59,4 % эпителиоцитов имели умеренную степень колонизации – на их поверхности было адсорбировано в среднем 10 – 50 микробных тел, что свидетельствовало о функциональной активности клеток эпителия. Значительный процент (15,6 %) составляли неконтаминированные клетки и клетки с низкой степенью колонизации (до 10 микробных тел). Лишь 6,2 % эпителиоцитов имели на своей поверхности более 100 микробных тел.

В препаратах людей, страдающих ВЗП, отмечалась высокая доля эпителиоцитов с высокой плотностью контаминации, что свидетельствовало об ослаблении колонизационной резистентности и начале дестабилизационных процессов на уровне слизистых оболочек. Так, у лиц с ХГКГ число клеток, адсорбированных на своей поверхности более 100 микробных тел, было выше нормального в 2,5 раза, у лиц с ХГП легкой степени – в 6,2 раза. У лиц с интактным пародонтом и у лиц, страдающих ВЗП, ПЕКЭ статистически значимо различался. Так, в норме ПЕКЭ составил $2,1 \pm 0,1$ ед., у больных ХГКГ – $2,5 \pm 0,2$ ед., а у больных ХГПл – $2,8 \pm 0,2$ ед.

При проведении ПЦР обнаружено, что ДНК пародонтопатогенных бактерий не детектировалась в содержимом десневой борозды у 65 (69,1 %) здоровых человек. У 29 (30,9 %) молодых людей со здоровым пародонтом из содержимого десневой борозды наиболее часто выявлялась ДНК *P. gingivalis* (21,3 %) и *P. intermedia* (10,6 %). ДНК пародонтопатогенов обнаруживалась у 38 (95 %) страдающих ХГКГ и у 16 (100 %) страдающих ХГПл. Причем, у

больных ХГКГ наиболее часто выделялась ДНК *P. gingivalis* (42,5 %) и *A. actinomycetemcomitans* (27,5 %), а у больных ХГПл - *P. gingivalis* (75,5 %), *P. intermedia* (56,3 %) и *T. forsythia* (50,0 %). По мере углубления тяжести течения ВЗП возрастала доля случаев обнаружения у больных ассоциаций из 2 - 4 видов пародонтопатогенов, среди которых доминировали *P. gingivalis*, *T. forsythia* и *P. intermedia*.

После аппликаций. На втором этапе исследований лиц, страдающих ВЗП и являющихся носителями пародонтопатогенных бактерий, разделили на две группы по 15 человек. Всем пациентам врач-стоматолог в течение 10 дней проводил курс ежедневных аппликаций стоматологического геля Метрогил Дента (группа сравнения) и гидрогеля ХТЗ (экспериментальная группа).

Во всех группах испытуемых наблюдалось значительное улучшение гигиенического состояния полости рта. У больных ВЗП отмечалось существенное улучшение состояния тканей пародонта. Во всех группах испытуемых отсутствовали отек тканей и кровоточивость десен. Данные изменения сопровождалось снижением значений ГИ в среднем в 1,8 – 1,9 раза и значений основного показателя выраженности воспалительных явлений в пародонте – индекса РМА. Особенно сильно этот индекс убыл (в 5,7 раз) под влиянием аппликаций препарата Метрогил Дента. Противовоспалительный эффект (ПЭ) геля Метрогил Дента (82,4 %) оказался статистически значимо выше, чем у аскорбата ХТЗ.

Бактериоскопия препаратов содержимого десневой борозды, забранного у больных после аппликаций, также выявила положительную динамику изменения уровня обсемененности тканей пародонта. Во всех группах больных значения ПЕКЭ не имели статистически значимых отличий от показателя в норме. При детальном анализе характера распределения эпителиоцитов с разной интенсивностью бактериальной колонизации было установлено, что применение препарата Метрогил Дента привело к чрезмерному увеличению количества неконтаминированных и слабо контаминированных эпителиоцитов (группа 0 – 10 м. т.). В большинстве препаратов наблюдалось обеднение

микробного пейзажа, выявлялась, как правило, кокковая флора в виде единичных элементов, редких в поле зрения. У 2-х (13,3 %) человек отмечалось появление дрожжеподобных грибов в значительном количестве. Все это указывает на серьезное нарушение биоценоза полости рта и снижение уровня неспецифической резистентности клеток десневого эпителия в результате применения сильного антибактериального препарата. Тем не менее, противовоспалительный эффект Метрагил Дента оказался довольно высоким (ПЭ = 82,0 %), очевидно, за счет снижения микробной нагрузки в области зубодесневого соединения. У всех больных ВЗП применение гидрогеля аскорбата ХТЗ привело к положительной динамике изменения уровня естественной колонизации эпителиоцитов. Показатель ПЕКЭ ($2,2 \pm 0,5$) в группе больных, которым апплицировали гидрогель, был близок к значениям у здоровых людей ($2,1 \pm 0,1$). В препаратах преобладали эпителиоциты со средней степенью контаминации микроорганизмами (от 10 до 100 м. т.), что соответствует физиологическому уровню естественной колонизации эпителиоцитов. Количество микроорганизмов в препаратах несколько снизилось, однако состав микробной флоры характеризовался высоким разнообразием. Очевидно, что высокая противовоспалительная эффективность применения гидрогеля аскорбата ХТЗ (ПЭ = 74,1 %) обусловлена не столько снижением микробной нагрузки, сколько улучшением состояния микробиоценоза полости рта.

Анализ бактериального состава содержимого десневой борозды методом ПЦР показал, что после проведения аппликаций препарата Метрогил Дента и гидрогеля ХТЗ нагрузка ДНК пародонтопатогенов в образцах уменьшилась, о чем свидетельствовало снижение светимости или полное отсутствие отдельных полос на электрофореграммах с продуктами ПЦР. После аппликаций на десну геля Метрогил Дента практически у всех больных из группы сравнения удалось достичь снижения содержания пародонтопатогенной микрофлоры. Так, ДНК *T. denticola* отсутствовала в детектируемых количествах во всех обследованных образцах. ДНК *P. gingivalis* выявлялась только в 50 % случаев, ДНК *T. forsythia*

– в 40 %, ДНК *P. intermedia* – в 25 %, а ДНК *A. actinomycetemcomitans* – в 20 %. Менее значительные результаты были достигнуты после аппликации гидрогеля аскорбата ХТЗ. Антибактериальная активность геля Метрогил Дента статистически значительно превосходила противомикробное действие гидрогеля аскорбата ХТЗ в отношении всех 5 видов пародонтопатогенов. Тем не менее, после аппликации аскорбата ХТЗ частота выявления ДНК *P. gingivalis* в образцах снизилась на 11,1 %; ДНК *A. actinomycetemcomitans* - на 33,3 %; ДНК *T. forsythia* – на 75,0 %; ДНК *P. intermedia* - на 80,0 %; ДНК *T. denticola* - на 66,7 %. Таким образом, наибольшую чувствительность к действию гидрогеля проявили бактерии *A. actinomycetemcomitans*, а наименьшую - *P. gingivalis*.

Заключение. По результатам проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что у 38 % молодых людей в возрасте от 18 до 21 года выявляются признаки развития воспалительных заболеваний пародонта. Причем, у 27 % человек диагностируется хронический генерализованный катаральный гингивит (ХГКГ), а у 11 % - хронический генерализованный пародонтит легкой степени (ХГПл).
2. Выявлена зависимость между степенью углубления патологического процесса в пародонте и уровнем гигиены полости рта: у людей с интактным пародонтом индекс ГИ составлял 0.83 ± 0.09 ед.; при ХГКГ - 1.82 ± 0.14 ед., при ХГП легкой степени - 2.50 ± 0.29 ед.
3. У 30.9 % здоровых молодых людей выявляется ДНК пародонтопатогенных бактерий, при этом наиболее часто обнаруживается ДНК *P. gingivalis* (21.3 %) и *P. intermedia* (10.6 %). У 95 - 100 % страдающих ВЗП детектируется ДНК нескольких пародонтопатогенов, причем по мере углубления тяжести течения заболевания возрастает доля микробных ассоциаций, состоящих из 3 - 4 видов.
4. Проведение курса аппликаций геля Метрогил Дента и гидрогеля аскорбата ХТЗ приводит к существенному улучшению состояния тканей пародонта у больных ВЗП. Противовоспалительный эффект геля Метрогил

Дента превосходит таковой у аскорбата ХТЗ на 8.3 %. Аппликации геля Метрогил Дента в отдельных случаях обуславливают дисбиотический сдвиг и гипореактивность эпителия полости рта.

5. Применение аскорбата ХТЗ не нарушает нормальный видовой состав микрофлоры полости рта и повышает уровень неспецифической резистентности клеток десневого эпителия.