

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук
Кафедра біології

Кваліфікаційна робота
освітній ступінь – бакалавр

на тему «**РІВЕНЬ HSP60 У ТКАНИНАХ ПАРОДОНТУ ЩУРІВ: ВПЛИВ
ІН'ЄКЦІЙ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ**»

Виконала: студентка 4-го року навчання
спеціальність 091 — біологія
Кривуля Анастасія Олегівна

Керівники:
Яковенко Л.Ф.,
кандидат біологічних наук, науковий
співробітник Інституту молекулярної
біології та генетики НАН України
Шпильчин В.В.,
кандидат біологічних наук, старший
викладач кафедри біології НаУКМА

Рецензент:
О. В. Ромащенко,
доктор медичних наук, професор,
головний науковий співробітник відділу
урології та новітніх технологій ДУ
«Інститут урології НАМН України»

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пасічник Т.В.
« » червня 2020 року

Київ - 2020

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1.ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Захворювання пародонту	7
1.1.1. Етіологія та патогенез пародонтозу	8
1.1.2. Зв'язок між пародонтитом та системними захворюваннями	9
1.1.3. Пародонт щурів як експериментальна модель для вивчення запальних процесів	10
1.2. Загальна характеристика стресового білка Hsp60	11
1.2.1. Будова та функціональний цикл Hsp60.	12
1.2.2. Локалізація та функції Hsp60.....	14
1.2.3. Hsp60 у геномі людини та асоційовані з ним захворювання.....	16
1.2.4. Рівень Hsp60 при захворюваннях пародонтиту, зв'язок із системними захворюваннями	16
1.3. Застосування гіалуронової кислоти для лікування пародонтиту	17
1.3.1. Особливості будови та метаболізму гіалуронової кислоти.	17
1.3.2. Біологічні функції та властивості гіалурону.	18
1.3.3. Ефект гіалуронової кислоти при лікуванні пародонтиту.	21
РОЗДІЛ 2.ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	23
2.1. Об'єкт дослідження.....	23
2.2. Реактиви, матеріали та обладнання.....	23
2.2.1. Реактиви та витратні матеріали	23
2.2.2. Розчини.....	24
2.2.3. Обладнання	25
2.3. Методи дослідження	25
2.3.1. Отримання сумарного лізату зразків тканин пародонту щурів.	25

2.3.2. Електрофоретичне розділення білків у ПААГ за денатуруючих умов .	26
2.3.3. Вестерн-блотинг	26
2.3.4. Статистичний аналіз отриманих результатів	27
РОЗДІЛ 3.РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	28
3.1. Дослідження рівнів Hsp60 у тканинах пародонту інтактних щурів та щурів з пародонтитом до та після ін'єкційного введення препарату гіалуронової кислоти	28
3.2. Виявлення статистичної різниці рівнів Hsp60 між досліджуваними підгрупами	30
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	33
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГК	— гіалуронова кислота
МІС	— мітохондріальний імпортований сигнал
ПААГ	— поліакриламідний гель
ECL	— підвищена хемілюмінесценція (E nhanced c hemi i luminescence, ECL)
GAPDH	— гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (G lycer a ldehyde 3- p hosphate d ehydrogenase, GAPDH)
HAS	— гіалурон синтази (H yaluronic a cid s ynthase, HAS)
Hsp	— білки теплового шоку (H eat s hock p roteins, Hsp)
PBS	— натрій-фосфатний буфер(P hosphate b uffered s aline, PBS)
sHsp	— малі білки теплового шоку (S mall h eat s hock p roteins, Hsp)
RIPA - буфер	радіоімуноосаджувальний буфер (R adio i mmuno p recipitation a ssay buffer, RIPA - буфер)
TRiC	— Т-комплекс білкового кільцевого комплексу (T -complex protein R ing C omplex, TRiC)
UDP-GlcA	— уридин дифосфат глюкуронова кислота (U rid i ne d iphosphate g lucuronic a cid, UDP-GlcA)
UDP-GlcNAc	— уридин дифосфат N-ацетилглюкозамін (U rid i ne d iphosphate N -acetyl g luc o samine, UDP-GlcNAc)

ВСТУП

Пародонтит – це прогресивний деструктивний стан, що порушує цілісність ясен, альвеолярної кістки та пародонтальної зв'язки [1]. Епідеміологічні дослідження демонструють, що тяжкість перебігу захворювання та кількість уражених людей має тенденцію до підвищення. Особливо уразливими до пародонтиту є люди старшого віку. Однак, останнім часом спостерігається тенденція до «омолодження» захворювання, часто хворіють люди до 40 років [2]. Пародонтит – системне захворювання, тому його розвиток може сприяти виникненню інших проблем: діабету, серцево-судинних, печінкових хвороб і т.д. При хронічних ураженнях пародонту без вчасного, коректного лікування виникають візуальні дефекти та недоліки (випадіння зубів, порушення прикусу), що веде до погіршення життя людини. Отже, пародонтит негативно впливає на якість життя, що пов'язано з обмеженим функціонуванням та естетикою ротової порожнини [3].

Лікування пародонтиту передбачає хірургічні втручання. Для поліпшення результатів нехірургічної пародонтальної терапії застосовують протимікробні препарати та біоматеріали. Позитивний вплив на відновлення пародонту дає місцеве застосування препаратів з високомолекулярною гіалуроновою кислотою. Проте, молекулярних механізм дії препаратів гіалуронової кислоти при пародонтиті остаточно не встановлено [4].

Запальні процеси пародонту супроводжуються підвищенням стресового білка Hsp60 у тканинах. Hsp60 вважається основним аутоантигеном, який залучений у патогенез захворювань пародонту [5]. На даний час літературні дані щодо впливу препаратів гіалуронової кислоти на вміст Hsp60 у тканинах пародонту відсутні. Тому проведення таких досліджень є актуальними. Отримані результати можуть розширити знання щодо механізмів дії препаратів гіалуронової кислоти, які на сьогодні використовуються не тільки у стоматологічній практиці, а й у ортопедії, косметології.

Метою роботи було дослідження впливу ін'єкцій препарату гіалуронової кислоти на рівні стресового білка Hsp60 у тканинах пародонту інтактних щурів та щурів з пародонтитом.

Для виконання мети було поставлено наступні завдання:

- 1) Одержати сумарний лізат зразків тканин пародонту щурів контрольної (інтактні щури) та експериментальної (щури з пародонтитом) груп;
- 2) Визначити рівень Hsp60 у сумарних лізатах методом Вестерн-блотингу;
- 3) Провести кількісну денситометрію рівнів Hsp60 із урахуванням нормалізації для підтвердження ефективності лікування пародонтиту гіалуроновою кислотою.

Експериментальна частина роботи виконана у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Захворювання пародонту

Пародонт – це комплекс тканин з судинами, нервами та волокнами, що забезпечують живлення, підтримку та чутливість зуба. Пародонтит - складна хвороба багатofакторного характеру, викликана взаємодією субгінгівіальної мікрофлори та імунними, запальними реакціями організму хазяїна та модифікованими факторами навколишнього середовища [6-7]. Сучасна класифікація захворювань тканин пародонту та періімплантних тканин розроблена під час світової робочої конференції з пародонтології 2017-го року (табл. 1.1) [8].

Таблиця 1.1

Захворювання та стани тканин пародонту [8]

Група	Прояв
Здоровий пародонт, захворювання та стани ясен	Здоровий пародонт та здорові ясна
	Гінгівіт: спричинений зубною біоплівкою
	Гінгівіт: не спричинений зубною біоплівкою
Пародонтит	Некротизуючі захворювання пародонту
	Пародонтит
	Пародонтит як прояв системних захворювань
Інші стани, що уражують пародонт	Системні захворювання та стани, що уражують тканини пародонту
	Пародонтальні абсцеси та ендо-періо ураження
	Мукогінгівальна деформація та стани
	Травматичні околюзійні сили
	Фактори, що пов'язані з зубами чи протезними конструкціями

У межах нової класифікації запроваджено систему стадій та ступенів пародонтиту. Стадія пародонтиту (від 1 до 4) визначається важкістю захворювання та складністю його лікування, а ступінь пародонтиту (три рівні) забезпечує додаткову інформацію відносно біологічних особливостей захворювання [8].

1.1.1. Етіологія та патогенез пародонтозу. Пародонтоз може виникати в результаті механічного пошкодження ділянок пародонту або неправильного медикаментозного лікування. Найпоширенішою причиною розвитку захворювання є інфекції. Мікробіота ротової порожнини представлена близько 500-700 різними видами, серед яких грамнегативні бактерії родів *Treponema*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinobacillus* та *Eikenella* та грампозитивні - *Actinomyces*, *Streptococcus*. У патологічних станах пародонту домінуючими є види *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*. Зазначені види мають комплекс факторів вірулентності, які зумовлюють запальну та імунологічну відповідь з боку організму хазяїна [9-10].

Патогенез захворювань пародонту відбувається в декілька послідовних стадій: ініціація, рання, основна та запущені етапи ураження. Ініціація відбувається протягом 2-4 діб після накопичення зубного нальоту. Рання стадія ураження розвивається протягом 4-10 діб, характеризується підвищенням утворення Т-лімфоцитів та моноклеонарних клітин, паталогічною зміною фібробластів. Основна стадія триває протягом 2-3 тижнів. Протягом стадії переважає кількість В-лімфоцитів, відбуваються процеси ураження сполучної тканини ясен. На етапі запущених уражень продовжують переважати В-клітини, спостерігаються порушення в структурі тканин ясен, альвеолярної кістки та періодонтальної зв'язки [11-13].

Імунітет у відповідь на запальні процеси запускається шляхом взаємодії резидентних клітин з бактеріальною плівкою, прикріпленої до поверхні зуба. Мікроорганізми здатні переміщуватись через сполучний епітелій у середину

тканини ясен. В яснах відбувається стимуляція патологічних змін епітеліальних клітин та фібробластів, що зумовлює запальні реакції. Розпізнавання резидентних клітин мікроорганізмами здійснюється за рахунок факторів вірулентності, зокрема, ліпополісахаридів, які зв'язуються з Toll-подібними рецепторами. Зв'язування з рецепторами активує протеїнкінази, що викликає підвищену експресію прозапальних факторів транскрипції (NF κ B та AP-1). У результаті підвищується синтез цитокінів (IL-1, IL-6, IL-8 та TNF- α), які сигналізують фібробластам про необхідність продукування простагландинів та матриксних металопротеаз. Простагландини зумовлюють пошкодження альвеолярної кістки, а металопротеази – сполучної тканини ясен [11-13].

1.1.2. Зв'язок між пародонтитом та системними захворюваннями.

Уявлення про кореляцію між захворюваннями ротової порожнини та системними (рис. 1.1) існує досить давно, існують два механізми виникнення взаємозв'язку між ними[14]:

- **прямий механізм** – прогресування пародонтиту викликає порушення цілісності ясен, що стає місцем переходу бактеріальної інфекції у кровоток. Циркулюючі бактерії безпосередньо впливають на певні органи чи тканини;
- **опосередкований механізм** – запальні процеси, викликані пародонтитом, та імунна відповідь з боку організму на них, є фактором виникнення системних захворювань [14].

Вважається, що існує зв'язок в першу чергу між захворюваннями серцево-судинної системи (атеросклероз, інфекційні хвороби міокарду) та пародонтитом. Підвищення концентрації прозапальних цитокінів та їх циркуляція кровотоком є чинником агрегації та інвазії тромбоцитів, що викликає порушення ендотелію. У відповідь на бактеріальні фактори вірулентності (наприклад, ліпополісахариди) можуть вироблятися антитіла, які зумовлюють специфічну імунну відповідь [15-16].

Із пародонтозом часто асоційовані такі захворювання як ожиріння та діабет 2 типу, порушення органів шлунково-кишкового тракту. Проникнення та циркуляція патогенної мікрофлори пародонту викликає підвищення імуннозапальних молекул. У наслідок відбувається порушення процесів метаболізму клітин, що зумовлює виникнення побічних захворювань [15-16].



Рис. 1.1. Схема взаємозв'язку пародонтиту та системних захворювань. Адаптовано з [14,15].

1.1.3. Пародонт щурів як експериментальна модель для вивчення запальних процесів. Тварин, як модельних організмів, використовують для встановлення етіологічних факторів, механізмів патогенезу захворювань пародонту та для розробки нових підходів для лікування. В якості модельних тварин для досліджування захворювань пародонту найчастіше використовуються гризуни, зокрема, щури [17-18].

Щури як модельні організми зручні, оскільки, мають невеликі розміри, встановлений вік та генетичний фон, можливий контроль над мікрофлорою, відомі основні механізми запальних та імунологічних процесів. Даних тварин відносно дешево та легко утримувати в лабораторних умовах. Однак,

анатомічні структури тканин пародонту та перебіг запальних процесів у щурів та людини мають відмінності. Епітелій борозни ясен щурів здатний до зроговіння, на відміно від людського. Зокрема, для пародонту щурів притаманна підвищена регенеративна здатність. У відповідь на запалення пародонту щурів активуються лише нейтрофіли. У людини цей процес пов'язаний з активацією складних імунних систем: лімфоцити, плазматичні клітини, макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини [17-19].

Специфіка виникнення пародонтиту щурів за природніх умов може носити різний характер. Щури через особливості харчування та гігієни більш сприятливі до виникнення спонтанного пародонтиту в результаті травмування. Мікрофлора, задіяна у патогенезі захворювання людини та тварин також мають свої відмінності. Хоча вона представлена спільними з людьми патогенами: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* – їх співвідношення відрізняється за патологічних умов [17].

Зазначені особливості пародонту щурів можуть ускладнювати інтерпретацію результатів досліджень та адаптування їх під особливості людини [17].

1.2. Загальна характеристика стресового білка Hsp60

Білки теплового шоку, або стресові білки – це велика родина молекулярних шаперонів, для яких характерна висока консервативність. До основних функції стресових білків належать: фолдинг, стабілізація, транслокація протеїнів та вплив на їх адгезію (перешкоджання злипанню) [20].

Стресові білки класифікуються відповідно до їх молекулярної маси на великі АТФ-залежні (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40) та не-АТФ-залежні малі (sHsp). Молекулярна маса великих стресових білків становить від 40 до 110 кДа, для малих - від 8 до 28 кДа [21].

Білки теплового шоку необхідні для диференціювання клітин, підтримки гомеостазу тканин та ремоделюванні органів у більшості анатомічно важливих

структурах. Більшість стресових білків експресуються у місцях запалення та задіяні у регенерації тканин[20-22]. В залежності від функцій виділяють дві групи:

- Конститутивні Hsp - локалізовані в середині клітини за нормальних умов, діють як молекулярні шаперони для забезпечення гомеостазу білків (фолдинг та транслокація);
- Індуковані Hsp - експресуються в стресових умовах та необхідні для стабілізації білків, запобігання їх денатурації та адгезії [22].

Класичним консервативним молекулярним шапероном, який належить до великих АТФ-залежних білків теплового шоку, є Hsp60.

Hsp60 належить до групи білків - шапероніни, молекулярна маса яких знаходиться в діапазоні 55-64 кДа. Для даної групи білків властиве утворення великих макромолекулярних комплексів (1 МДа), які необхідні для фолдингу білка[22-23].

Шапероніни поділяються на дві групи. Група I ідентифікована у прокаріот та в еукаріотичних органелах симбіотичного походження. У людей це мітохондріальний білок Hsp60. Шапероніни групи II притаманні для еукаріотичних клітин та архей. У клітинах людини ця група представлена білками TRiC [22-23].

1.2.1. Будова та функціональний цикл Hsp60. Hsp60 у прокаріотичних клітинах називається GroEL. GroEL та Hsp60 виконують подібну функцію – фолдинг білків. Прокаріотичний GroEL для виконання цієї функції повинен утворити макрокомплекс між двома гептодимерними кільцями цього протеїна із ко-шапероном Hsp10. Hsp60 може функціонувати як самотійно у вигляді одного гептодимерного кільця (навіть при відсутності АТФ), так і у макрокомплексі з ко-шапероном Hsp10. Hsp60 має меншу спорідненість до Hsp10, ніж прокаріотичний гомолог GroEL [20, 24].

Гептомерне кільце Hsp60 складається з 7 однакових субодиниць (рис 1.2,Б). Кожна субодиниця містить: апікальний, проміжний та екваторіальний

домени (рис.1.2,В). Апікальний домен відповідає за зв'язування та вивільнення субстратного білка та ко-шаперону Hsp10. Екваторіальний домен містить сайти зв'язування АТФ та гептодимерних кілець між собою [20,25].

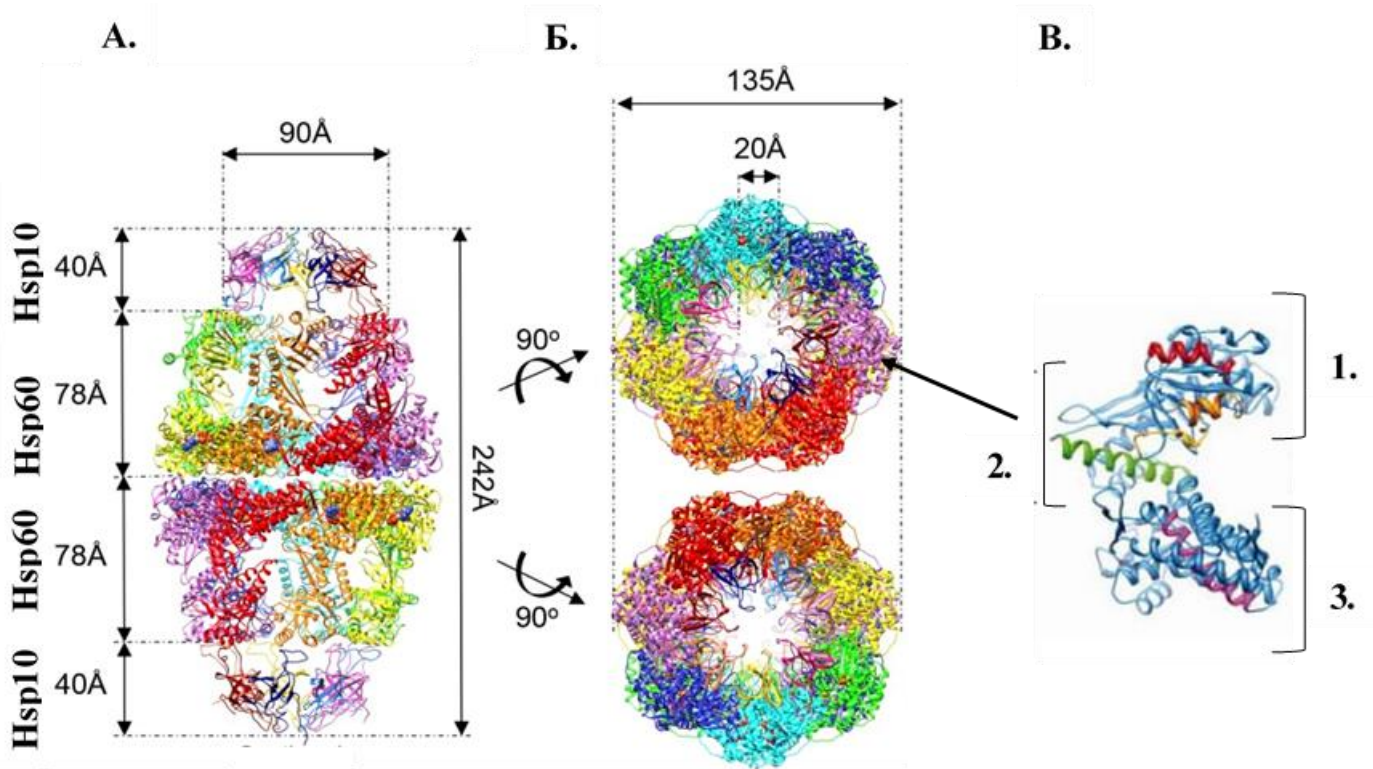


Рис. 1.2. Структурна будова стресового білка Hsp60 та його комплексу з Hsp10. А. – загальний вигляд «футбольного» комплексу Hsp60 – Hsp10; Б. – гептомерне кільце Hsp60; В. – структурна будова субодиниці: 1.- апікальний, 2. – проміжний, 3. – екваторіальний домени. Адаптовано [26].

Комплекс Hsp60 – Hsp10 має різну конформацію: у вигляді «футбольного м'яча» (рис.1.2,А) або бочкоподібний (пулеподібний). «Футбольний м'яч» (симетричний) - складається з двох кілець та двох ко-шаперонів Hsp10, які розміщені на північному та південному полюсах комплексу. Пулеподібний – має один чи два гептамерних кільця Hsp60 та один ко-шаперон Hsp10, цей комплекс має асиметричну будову [20,25-26].

Цикл роботи комплексу Hsp60 – Hsp10 починається з апо-форми білка Hsp60 (одне гептодимерне кільце). Апо-форма здатна приєднувати розгорнутий субстратний білок та АТФ, що призводить до активації сайтів

зв'язування з ко-шапероном та другим кільцем. У результаті утворюється «футбольний» комплекс. Гідроліз АТФ відбувається незалежно в обох кільцях, після чого вивільняються ко-шаперони, АДФ та згорнута форма субстратного білка, а Hsp60 повертається до початкової апо-форми. Цикл може відбуватися з проміжною асиметричною стадією у вигляді пулеподібного комплексу. Чергування конформаційних форм притаманне для прокаріотичного гомолога GroEL. Для еукаріотів більш вигідним є симетричний комплекс навіть за відсутності субстратного білка [25-26].

1.2.2. Локалізація та функції Hsp60. Білок Hsp60 може мати внутрішньоклітинне, позаклітинне та мембранасоційоване розміщення.

За нормальних умов внутрішньоклітинно існують дві популяції Hsp60: цитозольна та мітохондріальна. З клітини Hsp60 вивільняється за рахунок активного транспорту за участю екзосом чи ліпідних рафтів, або через ЕПР/АГ секреторний шлях. Позаклітинний Hsp60 проникає у систему кровообігу та ідентифікується у плазмі здорових людей. За своєю природою циркулюючий Hsp60 є інтактним (без MIC), тобто походить з мітохондрій [27].

Внутрішньоклітинний Hsp60 виконує функцію підтримки гомеостазу клітини. У мітохондріях білок регулює їх проникність та сприяє фолдингу ферментів мітохондріального матриксу. Задіяний у білкових системах окисного стресу, які підвищують рівень активних форм кисню у клітині. Цитозольний Hsp60 задіяний у внутрішньоклітинному переносі білка у пептидо-гормональному та проапоптичному шляхах. Активує сигнальні шляхи в залежності від інших клітинних факторів, тому може сприяти як механізмам руйнування, так і виживання [27-29].

Позаклітинний та мембранасоційований Hsp60 діють як стимулятори та координатори імунних відповідей (рис. 1.3). Молекули Hsp60 є сигналами для активації Toll-подібних рецепторів (TLR4 та TLR2) макрофагів та дендритних клітин. У відповідь на активацію моноцити дозрівають та продукують прозапальні молекул та факторів (TNF- α , IL-12, IL-15, IL-6, IL-1 β). Для Т- та В-клітин Hsp60 (власний та чужорідний) є антигеном. Підвищення

концентрації Hsp60 у позаклітинному матриксі активує специфічні В-клітини для синтезу аутоантитіл проти Hsp60. Підвищена експресія Hsp60 на поверхні клітин стимулює індукцію опосередкованих Т-клітинами протипухлинних імунних відповідей. При вивільненні Hsp60 у позаклітинне середовище підвищується рівень клітин регуляторних Т-лімфоцитів та пригнічуються цитотоксичні Т-лімфоцити, стимулюється синтез цитокінів. Позаклітинний Hsp60 зв'язується з мембранними рецепторами та викликають імунну відповідь. Патологічні стани (автоімунні та запальні захворювання) супроводжуються збільшення кількості Hsp60 [27-29].

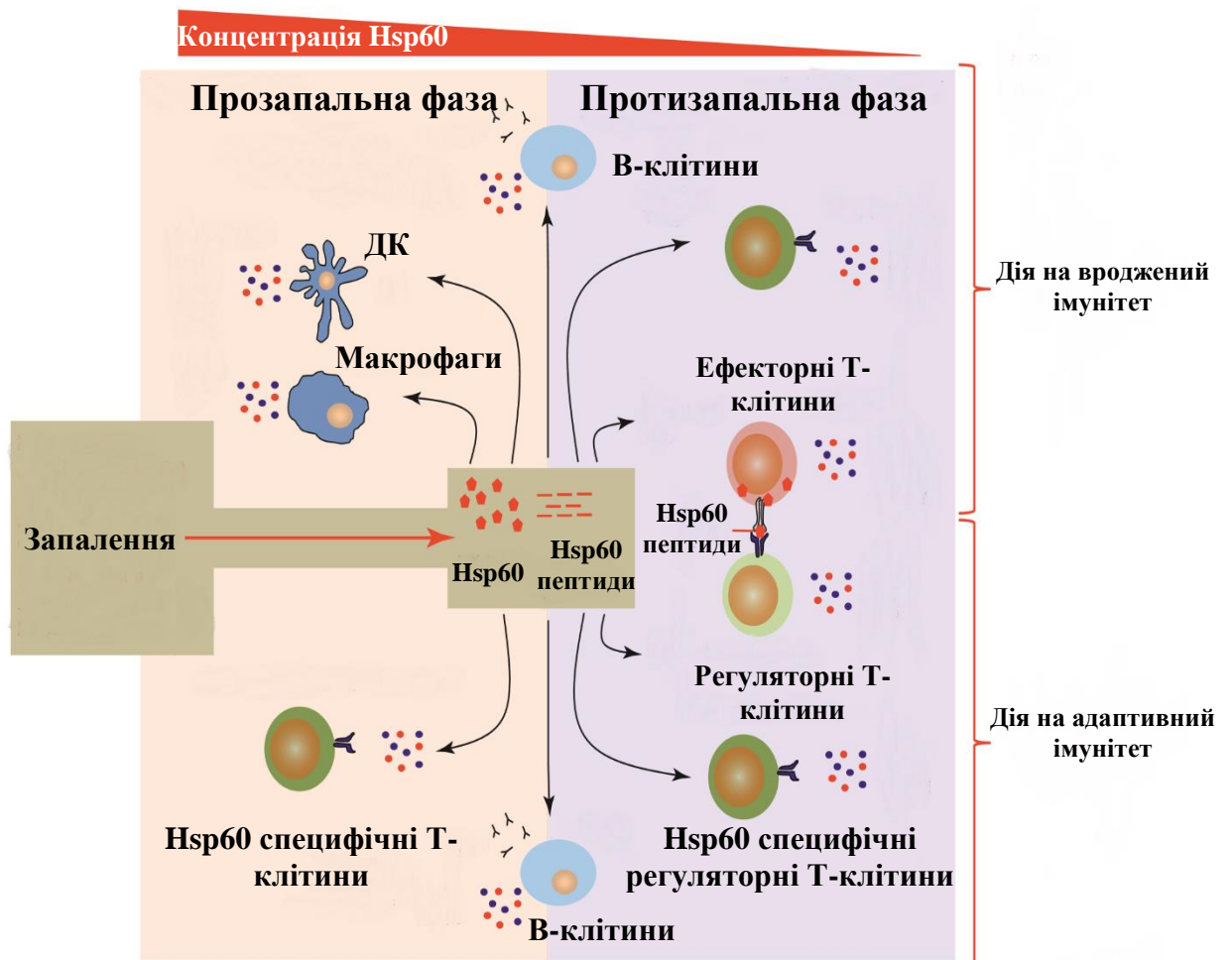


Рис. 1.3. Вплив підвищеної концентрації Hsp60 на імунну систему людини. Адаптовано з [29].

1.2.3. Hsp60 у геномі людини та асоційовані з ним захворювання.

Мітохондріальний шаперон Hsp60 людини кодується геном *HSPD1*, що локалізований на довгому плечі 2 хромосоми (у щурів – на 1) поруч з геном ко-шаперону Hsp10 (*HSPE1*). Гени мають один спільний двонаправлений промотор. У геномі людини є лише один ген *HSPD1* та 22 псевдогени [30-31].

Транскрибований у цитозоль Hsp60 містить розширений N-термінальний кінець – α -спіральні сегменти із сумарним позитивним зарядом, який називається «мітохондріальним імпортом сигналом» (MIS). MIS полегшує розпізнавання Hsp60 мітохондрій та проникнення в них. При проникненні в мітохондрії MIS відщеплюється. Hsp60 з MIS є протиапоптичним (чи протизапальним), а без MIS – проапоптичним (чи прозапальним) [30,32].

Патологічні стани (шиперонопатії), за яких Hsp60 відіграє роль патогенну, можуть бути генетичними або набутими. Мутації *HSPD1* викликають дестабілізацію олігомерного комплексу, що супроводжується нейродегенеративними розладами або спадковими спастичними паралепією. Набуті шиперонопатії охоплюють численні хронічні запальні процеси, автоімунні стани та канцерогенез. Hsp60 задіяний в патогенез запальних процесів та автоімунних захворювань як аутоген або індуктор виробництва запальних цитокінів. У канцерогенезі Hsp60 в залежності від типу пухлин та клітинних факторів може як сприяти цьому процесу, так і протидіяти [33].

1.2.4. Рівень Hsp60 при захворюваннях пародонтиту, зв'язок із системними захворюваннями. Білки теплового шоку є найбільш дослідженими аутоантигенами задіяними в захворюваннях пародонту. Hsp60 є потенційним біомаркером захворювань пародонтиту, оскільки його рівні значно підвищуються не лише в тканині, а й у слині та крові. Під час запалення спостерігається підвищена експресія Hsp60 у тканинах пародонту. Підвищена концентрація Hsp60 викликає відповідь з боку імунної активація макрофагів, що індукуює синтез прозапальних цитокінів, та Т-, В-клітини (рис.1.3). У результаті виникають запальні процеси тканин пародонту [34-35].

Між прокаріотичним та людським Hsp60 спостерігається висока ступінь гомології (більш ніж 50 %). Відповідно, інфекційні хвороби ротової порожнини можуть бути задіяні в патогенезі автоімунних захворювань та системних. Концепція молекулярної мімікрії передбачає, що організм людини не розпізнає різниці між своїм та чужорідним Hsp60, тому реагує на його підвищену концентрацію активацією імунних відповідей. Таким чином, прокаріотичний Hsp60 залучений в автоімунні захворювання. Підвищена концентрація циркулюючого Hsp60 здатна викликати активацію E-селектину, експресії молекул адгезії судинних клітин, IL-6 в ендотеліальних клітинах, що сприяє дисфункції ендотелію та розвитку атеросклерозу. Таким чином, Hsp60 задіяний не лише в патогенезі захворювань пародонту, а є одним із факторів виникнення системних захворювань [34-36].

1.3. Застосування гіалуронової кислоти для лікування пародонтиту

1.3.1. Особливості будови та метаболізму гіалуронової кислоти.

Гіалуронова кислота (ГК) – це природний лінійний полісахарид з високою молекулярною масою (від 10 до 1000 кДа). За хімічною структурою молекула ГК – полімер, що складається із залишків D-глюкоренової кислоти та D-N-ацетилглюкозаміну (рис.1.4). Первинна структура полісахариду представлена нерозгалуженим лінійним ланцюгом, мономерів якого поєднані між собою β 1,3- та β 1,4 – глікозидними зв'язками. За рахунок гідрофобних зв'язків утворюється вторинна структура, що сприяє молекулярній агрегації та утворенню третинної β -структури. Третинна структура стабілізується за рахунок міжмолекулярних водних зв'язків. Гідрофобні та водні зв'язки разом з протидіючим електростатичним відштовхуванням сприяють агрегації молекул та утворенню молекулярних сіток [37-39].

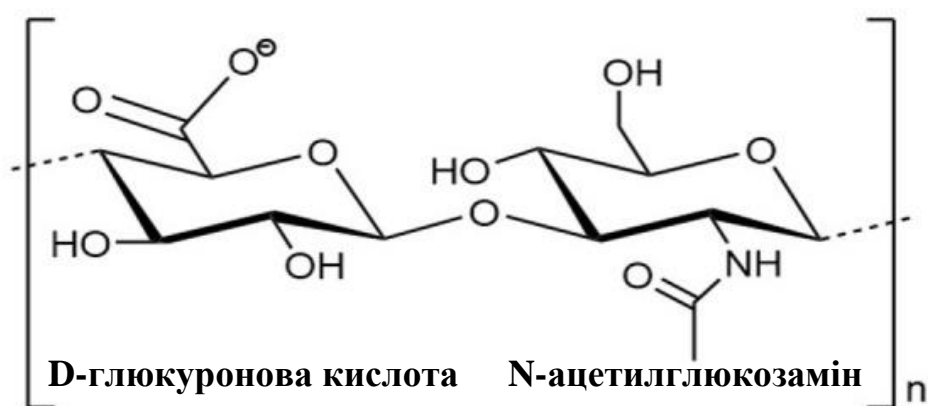


Рис. 1.4. Структурна формула гіалурону. Адаптовано з [40].

Для підтримки необхідної концентрації ГК у тканинах відбувається регулювання процесів синтезу та деградації. Синтез ГК відбувається локально в тканині, а деградація – у різних місцях [39,40].

Синтез гіалурону відбувається мембранними білками – гіалуронсинтазами (HAS). У людей відомо три ізоформи гіалуронсинтаз: HAS1, HAS2, HAS3, що відрізняються між собою довжиною полісахаридних ланцюгів, які синтезують, та функцією в міжклітинному матриксі [38-40].

Гіалуронсинтази містять ядро із чотирьох трансмембранних спіралей, що зв'язані цитоплазматичною петлею. Цитоплазматична петля має два каталітичних сайти, необхідних для переносу субстрату: UDP-GlcNAc та UDP-GlcA [37-39].

Катаболізм гіалурону регулюється гіалуронидазами, які належать до ендо- β -N-ацетилглюкозамінадаз. Основними тканинними гіалуронидазами, що контролюють процес деградації ГК, є HYAL-1 (розміщений в лізосомах) та HYAL-2 (GPI-закріплений рецептор). HYAL-2 розщеплює високомолекулярний гіалурон до фрагментів із молекулярною масою до 20 кДа, а HYAL-1 – до 800 Да. При патологічних станах активність гіалуронидаз підвищується [40].

1.3.2. Біологічні функції та властивості гіалурону. Гіалуронова кислота ідентифікована в більшості тканинах та органах хребетних. У людини

найбільша концентрація ГК у міжклітинному матриксі м'яких сполучних тканин (пуповина, синовіальна рідина, шкіра), а найнижча – у сироватці крові. У прокаріотичних організмів ГК може бути компонентом капсули (наприклад, у *Streptococcus*) та виступати в якості фактору вірулентності [37].

Гіалурон – незамінний компонент інтактного (здорового) пародонту. Найвища концентрація ГК зафіксована у немінералізованих тканинах (ясна та періодонт) [37,40].

Біологічна активність гіалуронової кислоти варіюється в залежності від молекулярної маси (табл. 1.2). Високомолекулярний гіалурон (< 1000 кДа) володіє протизапальною дією, сприяє підтримці клітинного та тканинного гомеостазу, відіграє захисну роль при онтогенезі [40-41]. Низькомолекулярний та олігомерний гіалурон (< 250 кДа) характеризується проліферативною та ангіогенною дією, має підвищену прозапальну активність, однак, може бути як активатором, так і репресором онкогенних процесів. За фізіологічно нормальних умов найбільш поширеним є високомолекулярний гіалурон. При патологічних станах (канцерогенез, запалення та поранення) підвищується рівень ГК з меншою молекулярною масою [42].

Для перетворення сигналів у клітинну функцію ГК повинен провзаємодіяти з гіалурон-зв'язувальними білками (гіаладгеринами). Гіаладгерини можуть бути частиною міжклітинного матриксу (агрекан та версикан) або рецепторами (CD44, RHAMM, Live-1 та HARE) [41].

Молекулярна маса ГК впливає на кількість рецепторів, з якими взаємодіє молекула, та тип клітинної відповіді, що активізується. Молекули гіалурону різної довжини проявляють антагоністичну взаємодію до рецепторів. Тип клітинної відповіді залежить від концентрації певної молекулярної групи (табл. 1.2) у клітинному оточенні [39,41].

Таблиця 1.2

Молекулярно-масові групи гіалурону у людини [41]

Назва групи	Молекулярна маса, кДа	Функції
Гіалурон з високою молекулярною масою	> 1000	<ul style="list-style-type: none"> – підтримка клітинного гомеостазу; – протизапальна; – антипроліферативна; – антиангіогенна; – захисна роль при онкогенезі.
Гіалурон з середньою молекулярною масою	250 - 1000	<ul style="list-style-type: none"> – бактеріостатична дія; – протизапальна; – антипроліферативна; – антиангіогенна; – захисна роль при онкогенезі.
Гіалурон з низькою молекулярною масою	10-250	<ul style="list-style-type: none"> – бактеріостатична дія; – ангіогенна; – прозапальна.
Олігомерний гіалурон	< 10	<ul style="list-style-type: none"> - прозапальна дія; - проліферативна; - ангіогенна; - промотер утворення пухлин або супресор (активація апоптозу).

Гіалуронова кислота характеризується унікальними фізико-хімічними та біологічними властивостями [43-44]:

- Гігроскопічні властивості. ГК здатна зв'язувати значну кількість води за рахунок утворення у водних розчинах водневих зв'язків між карбоксильними та N-ацетильними групами. Дана властивість обумовлює амортизації рухів.

- В'язкоеластичність – сприяє регенерації, підвищує бар'єрну функцію тканин (зменшує проникнення вірусів та бактерій).

- Бактеріостатична дія – зменшується вплив прокаріотичних організмів у місцях запалення. При пародонтиті висока концентрація ГК середньої та

низької молекулярної маси сприяє бактеріостатичній дії проти штамів *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella oris* та *Staphylococcus aureus*.

- Неімуногенна природа – не викликають специфічної імунної відповіді.
- Протизапальні властивості – екзогенний гіалурон активує шляхи утилізації простагландинів, металпротеїназ та інших біологічно активних молекул, які задіяні в процесах запалення .
- Антиоксидантна дія – регуляція запальних процесів шляхом знешкодження активних форм кисню.
- Остеокондуктивний потенціал – підвищення регенерації кісток за рахунок хемотаксису, проліферації та диференціації мезенхімальних клітин.

Вплив на ангиогенез – гіалурон із низькою молекулярною масою задіяний у процесах утворення судин у пошкоджених ділянках [37,41,43-44].

1.3.3. Ефект гіалуронової кислоти при лікуванні пародонтиту. Для поліпшення результатів нехірургічної пародонтальної терапії застосовують протимікробні препарати та біоматеріали. В якості супроводжувачого лікування розглядають місцеве застосування гіалуронової кислоти [37,45].

Гіалурон задіяний у низці процесів, що супроводжують загоєння пародонтального пошкодження: запалення, утворення грануляційної тканини та епітелію, ремоделювання тканини. На початкових стадіях запалення ГК за рахунок взаємодії з фібриновим згустком забезпечує структурний каркас. Гіалурон активує запальні клітини – поліморфноядерні лейкоцити та макрофаги. За рахунок дії ГК запальні клітини мігрують до пошкодженої ділянки, де виникає їх адгезія, фагоцитоз та знешкодження патогенної мікрофлори. Тобто відбувається протидія колонізації та проліферації анаеробних патогенних бактерій у тканинах пародонту. Гіалурон індукує утворення прозапальних цитокінів фібробластами, кератиноцитами, цементобластами та остеобластами, що стимулюють запальний процес та синтез ГК ендотеліальними клітинами судин [37].

Під час фази грануляції ГК сприяє проліферації та міграції клітин матриксу в середину пошкодженої ділянки, що сприяє утворенню

грануляційної тканини. У результаті подій даної фази відбувається повторне прикріплення базального шару епітелію ясен до базальної пластинки, дозрівання мінералізованих тканин. На пізніх етапах фази грануляції припиняється синтез гіалурона, а залишки деградують під дією гіалуронидаз до молекул з низькою молекулярною масою. ГК із низькою молекулярною масою задіяні у процесах ангіогенезу в пошкоджених ділянках пародонту [46].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Для дослідження використовували зразки тканин пародонту нижньощелепних різців дорослих самців щурів лінії Wistar. Щурів у віці 10-12 місяців, вагою 200-220 г було надано віварієм Національного медичного університету імені Богомольця. Тварин утримували у клітках у приміщенні з контрольованою температурою (18 °C) та вологістю (60,5 %). Протокол дослідження було затверджено комітетом з етики Національного медичного університету імені Богомольця.

Щурів було розподілено на дві групи: контрольну групу та експериментальну групу. Критерієм відбору тварин до експериментальної був прояв гіперемії ясен. У контрольній групі було виокремлено дві підгрупи: інтактні щури (І); інтактні щури, яким вводили препарат гіалуронової кислоти (І+ГК). Дві підгрупи виокремлено й у експериментальній групі: щури з пародонтитом (П); щури з пародонтитом, яким вводили препарат ГК (П+ГК). У кожній підгрупі було по три тварини. Щурам вводили по 0,05 мл препарату гіалуронової кислоти (BioScience GmbH, Germany) у ділянку центральних різців альвеолярного відростку один раз на тиждень, три рази. Рівні Hsp60 визначали у сумарних лізатах зразків тканин пародонту методом Вестерн-блотингу до та після закінчення лікування (через один місяць після останньої ін'єкції).

2.2. Реактиви, матеріали та обладнання

2.2.1. Реактиви та витратні матеріали. У роботі було використано реактиви: NaCl, EDTA, NP40, дезоксихолат Na, SDS, інгібітори протеаз (Sigma, США), PMSF (Sigma, США), ДСН, гліцерин, 2-меркаптоетанол, бром

фенолового синього, гліцин, поліакриламід, TEMED, персульфату амонію, маркер молекулярної маси, метанол, знежирене молоко, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2HPO_4 , полісорбат 20, люмінол, кумарова кислота, H_2O_2 .

Для проведення вестерн-блотингу використовували нітроцелюлозу мембрану (Nitrocell Paper, Bio-Rad, Cat. No 1620115). В якості первинних антитіл використовували кролячі поліклональні анти-Hsp60 антитіла та щурячі поліклональні анти-GAPDH антитіла. Як вторинні антитіла застосовували кон'юговані пероксидазою хрона вторинні анти-кролячі (для Hsp60) та анти-щурячі (для GAPDH) антитіла. Для роботи використовувались антитіла напрацьовані в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України.

2.2.2. Розчини. Для виконання роботи використовували наступні розчини:

- RIPA – буфер: 20 mM трис-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат Na; 0,1% додецилсульфат натрію; 0,1 % розчин суміші інгібіторів протеаз; 0,1 % PMSF.
- Буфер для зразків (4x): 200mM трис-HCl (pH 6,8); 4 % ДСН; 40 % гліцерин; 400 mM 2-меркаптоетанол; 0,01 % бром фенолового синього.
- Розділяючий гель: 30 % поліакриламід; 1,5M трис-HCl, pH 8,8; 10 % SDS; 10 % ПСА; TEMED.
- Концентруючий гель: 30 % поліакриламід; 1M трис-HCl, pH 6,8; 10 % SDS; 10 % ПСА; TEMED
- Трис-гліциновий буфер: 192 mM гліцин; 25 Мм трис-HCl; 0,1 % SDS.
- Буфер для електропереносу: 200 mM гліцин; 25 mM трис-HCl; 10 % метанол.
- Натрій-фосфатний буфер (PBS): NaCl; KCl; Na_2HPO_4 ; KH_2HPO_4 .
- PBS з твін 20 (PBS-T): NaCl; KCl; Na_2HPO_4 , KH_2HPO_4 ; полісорбат 20.

- Розчин 5 % знежиреного молока у PBS з твін 20.
- Розчин ECL: 1,25 мМ люмінол; 0,45 мМ кумарова кислота; 0,015 % H_2O_2 ; 100 мМ трис–HCl, pH 8,8.

2.2.3. Обладнання. Під час виконання роботи використовували: сэмплери, центрифуга, спектрофотометр (NanoDrop 2000), установка для проведення гелъ-електрофорезу, прилад для вологого переносу білків (BioRad), транслюмінатор (ChemiDoc).

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Отримання сумарного лізату зразків тканин пародонту щурів.

Для отримання тотального лізату тканин пародонту щурів використовували охолоджений лізуючий RIPA – буфер. Зразки тканин пародонту щурів гомогенізували за допомогою ступки з пестиком та кварцевого піску. Для гомогенізації зразку тканини пародонту наважкою ≈ 20 мкг використовували 1 мл охолодженого за $+4^\circ\text{C}$ RIPA - буферу. Зразки одержаного сумарного лізату тканин витримували за $+4^\circ\text{C}$ протягом 30 хв, потім центрифугували за 10 000 об/хв протягом 20 хв. Надосад відбирали у мікроцентрифужні пробірки та визначали концентрацію білка в зразку за допомогою спектрофотометрії на NanoDrop 2000.

Для підготовки зразків до електрофорезу використовували буфер для зразків (4х). Зразки змішували з буфером у пропорції 3:1, прогрівали протягом 5 хв за температури $+95^\circ\text{C}$. Отримані зразки зберігали за температури -20°C до дня проведення електрофоретичного розділення білків та електропереносу на нітроцелюлозну мембрану.

Таким чином, сумарно було підготовлено 12 зразків для подальших досліджень: 3 зразки тотального лізату тканин пародонту щурів інтактної групи (І) ; 3 зразки - тканин пародонту щурів інтактної групи, яким вводили препарат гіалуронової кислоти (І+ГК); 3 зразки - тканин пародонту щурів

групи пародонтиту (П); 3 зразки - тканин пародонту щурів групи пародонтиту, яким вводили препарат гіалуронової кислоти (П+ГК).

2.3.2. Електрофоретичне розділення білків у ПААГ за денатуруючих умов. Електрофорез отриманих білкових препаратів проводили у 12 % ПААГ в денатуруючих умовах за Леммлі.

Розділяючий гель містив 100 мМ Трис-НСІ (рН 8,7) відповідний відсоток суміші акриламід/ метилен-біс-акриламід в пропорції 30:1, 10 % SDS. Концентруючий гель містив Трис-НСІ (рН 6,8) відповідно. Гелі полімеризували додаванням безпосередньо перед заливанням 1 мкл/мл ТЕМЕД та 10мкл/мл 10 % свіжоприготовленого персульфату амонію. У кожен лунку вносили по 100 мкг підготовленого завчасно зразку, в одну з лунок вносили маркер молекулярної маси.

Електрофоретичне розділення білків проводили в трис-гліциновому буфері з використанням приладу для електрофоретичного розділення білків за кімнатної температури, сила струму 10 мА (концентруючий гель) та 20 мА (розділяючий гель).

2.3.3. Вестерн блотинг. Після електрофоретичного розділення білки переносили на нітроцелюлозну мембрану протягом 45 хв за напруги 90 В на приладі для вологого переносу з використанням буферу для електропереносу. Після електропереносу мембрану блокували 5 % розчином знежиреного молока у PBS з твін-20 (PBS-T) протягом 1 години за кімнатної температури.

Мембрану розрізали на дві частини по маркеру молекулярної маси (близько 55 кДа) для подальшого одночасного визначення рівнів Hsp60 та GAPDH у сумарних лізатах тканин пародонту. Частини мембрани інкубували окремо з використанням поліклональних анти-Hsp60 антитіл (розведення 1:100) та поліклональних анти-GAPDH антитіл (розведення 1:2000) у PBS-T протягом 18 год за +4 °С. Надлишок антитіл відмивали PBS-T три рази по 5 хв. Частини мембрани інкубували протягом 1 год за

кімнатної температури з вторинними антитілами у розведенні згідно рекомендацій виробника. Надлишок антитіл відмивали PBS-T.

Після відмивання надлишку вторинних антитіл мембрани інкубували протягом 5 хв в ECL розчині та проявляли за допомогою транслюмінатору ChemiDoc.

Всі зразки сумарних лізатів тканин пародонту щурів було досліджено на вміст Hsp60 та GAPDH у 6 відтворюваних повторях.

2.3.4. Статистичний аналіз отриманих результатів. Для порівняння вибірок досліджуваних груп використовували критерій Крускала—Уолліса. Значення $p < 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. При виявленні різниці між групами застосовували множинне порівняння за допомогою критерія Ньюмана-Кейлса для встановлення відмінностей між групами.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження рівнів Hsp60 у тканинах пародонту інтактних щурів та щурів з пародонтитом до та після ін'єкційного введення препарату гіалуронової кислоти

Одержані сумарні лізати зразків тканин пародонту щурів контрольної та експериментальної груп використовували для дослідження вмісту Hsp60 методом Вестерн-блотингу (рис.3.1). Візуально помітно, що інтенсивність сигналів вища для інтактної групи та з ознаками пародонтити (рис. 3.1, А, Б). Однак, отримані таким чином результати є якісними, що ускладнює їх об'єктивний аналіз.

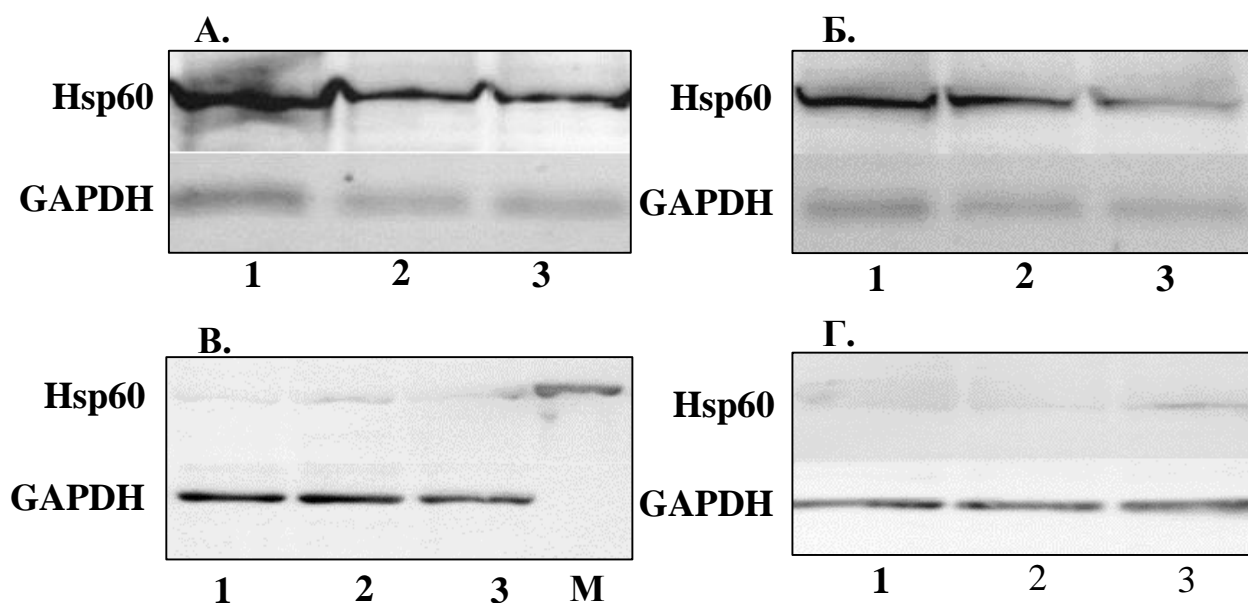


Рис. 3.1. Рівні Hsp60 у тотальних лізатах зразків тканин пародонту щурів за допомогою Вестерн-блотингу. А. – інтактна група; Б. – група пародонтиту; В. – інтактні щури, яким вводили препарат ГК; Г.- щури з пародонтитом, яким вводили препарат ГК.

Для об'єктивного аналізу результатів за допомогою програмного забезпечення Image Studio інтенсивність сигналу на блотограмі переводили у

числовий вираз. Для кожної групи визначалось співвідношення числового виразу Hsp60/GAPDH та його середня значення (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Числовий вираз результатів Вестерн-блотингу за допомогою
програмного забезпечення Image Studio

Назва групи	Номер зразка	Інтенсивність сигналу		Співвідношення інтенсивності сигналів Hsp60/GAPDH	Середнє значення співвідношення Hsp60/ GAPDH
		Hsp60	GAPDH		
Інтактні щури	1	12980940	5851776	2,218	2,153
	2	7262068	3249224	2,235	
	3	6434600	3205960	2,007	
Інтактні щури + Гіалуронова кислота	1	1215600	4575840	0,266	0,142
	2	775840	7155640	0,108	
	3	366640	6870520	0,053	
Щури з пародонтитом	1	10040457	4349020	2,309	2,143
	2	7126292	2832216	2,516	
	3	4674186	2913809	1,604	
Щури з пародонтитом + Гіалуронова кислота	1	1528350	6480950	0,236	0,199
	2	836400	5685080	0,147	
	3	1493704	6935266	0,215	

За результатами кількісної денситометрії рівнів Hsp60 та GAPDH у сумарних лізатах зразків тканин пародонту щурів контрольної та експериментальної груп побудовано діаграму (рис. 3.2). Результати демонструють, що статистично достовірної різниці між рівнями Hsp60 у тотальних лізатах тканин пародонту інтактних щурів та щурів з пародонтитом до лікування не виявлено ($p > 0,05$). У інтактних щурів та щурів з

пародонтитом через місяць після останнього введення препарату гіалуронової кислоти спостерігалось зниження рівнів Hsp60 у сумарних лізатах тканин пародонту порівняно з рівнями Hsp60 до початку лікування (у 15,2 та 10,8 разів відповідно, $p < 0,001$). Тобто, спостерігається позитивний ефект застосування ін'єкцій гіалуронової кислоти для лікування захворювань пародонтиту, що канонічно літературним даним [47-50]. При цьому існує кореляція між дією гіалурону та рівнем стресового білку Hsp60.

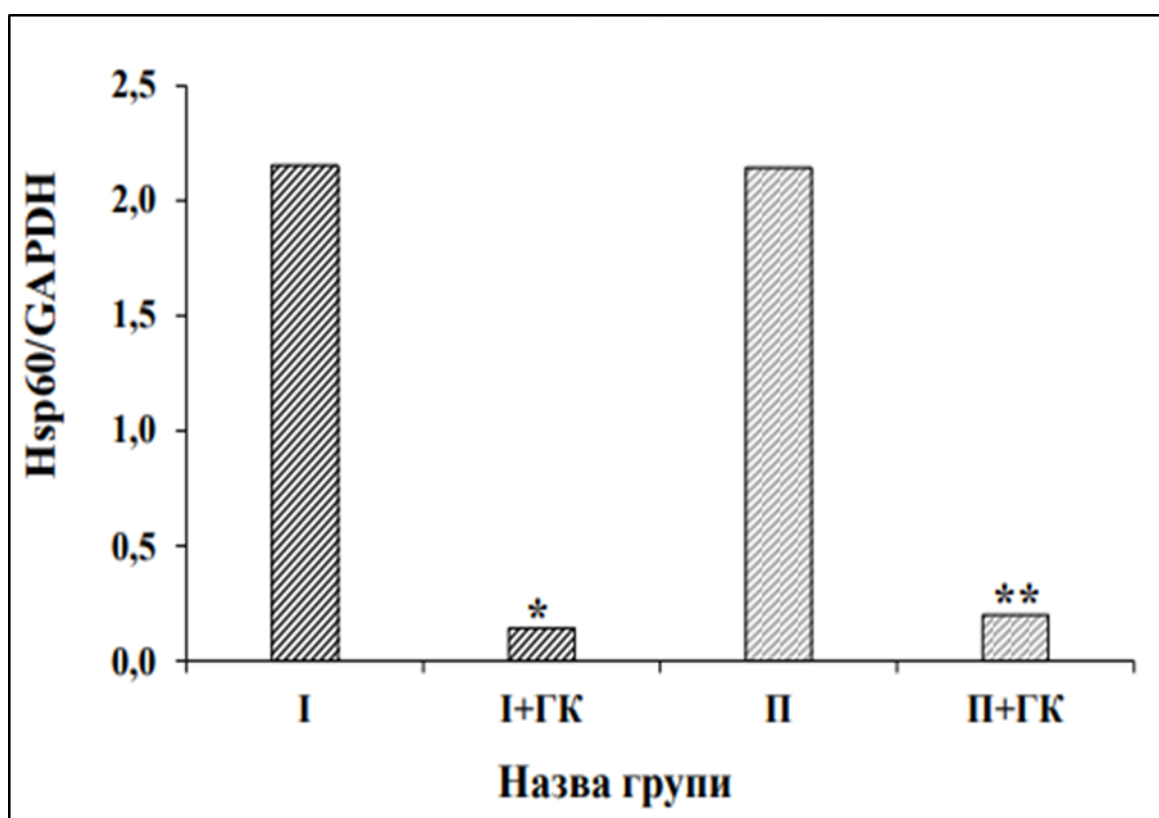


Рис. 3.2. Кількісна денситометрія рівнів Hsp60 та GAPDH. * $P < 0,001$ порівняно з інтактною групою; ** $P < 0,001$ порівняно з групою пародонтиту.

3.2. Виявлення статистичної різниці рівнів Hsp60 між досліджуваними підгрупами

Статистична оцінка різниці між рівнями Hsp60 у досліджуваних груп відбувалась із застосуванням непараметричного однофакторного дисперсійного аналізу – критерій Крускала—Уолліса (табл. 3.2). Отримані результати порівнювались із табличним значенням [51].

Отримані результати порівняння чотирьох досліджуваних підгруп демонструють, що між ними існує різниця у рівнях Hsp60, так як емпіричне значення 44,52 більше за теоретичне - 7,82 (для ступеня свободи 3 та рівня значущості 0,05).

Таблиця 3.2

Порівняння груп за допомогою критерія Крускала—Уолліса

Назва групи	Сума рангів, R	Середній ранг, R _{ср.}	Емпіричне значення критерія Крускала—Уолліса, H	Теоретичне значення (хі-квадрат), χ^2
Інтактні щури + Гіалуринова кислота	9	3	44,52	7,82
Щури з пародонтитом + Гіалуринова кислота	12	4		
Щури з пародонтитом	28	9,33		
Інтактні щури	27	9		

Множинне порівняння інтактних щурів та щурів з пародонтитом (табл. 3.3) продемонструвало, що отримані результати статистично не відрізняються ($q_{\text{ф}} 0,817 < q_{\text{т}} 3,314$). Рівень Hsp60 у тканинах обох груп фактично є однаковим. За літературними даними очікуваний результат має протилежний характер, тобто для інтактної групи кількість Hsp60 має бути набагато меншим [52]. Причина виникнення подібних результатів може полягати у використанні тотального лізату тканини для досліджень. Hsp60 – це високонсервативний білок, характерний для більшості живих організмів [47-50]. Тканина пародонту перед отриманням лізату не оброблювалась для знешкодження

мікрофлори, тому є вірогідність, що у зразках, окрім щурячого, наявний прокаріотичний Hsp60. Однак, для встановлення точної природи виникнення даного явища необхідні додаткові дослідження.

При порівнянні результатів групи з пародонтитом та з пародонтитом, яку лікували ін'єкціями гіалуронової кислоти (див. табл. 3.3) виявилось, що результати статистично відрізняються ($q_{\phi} 9,238 > q_{\tau} 2,772$). Рівень Hsp60 вище у групи з пародонтитом, що підтверджується й іншими дослідженнями лікування пародонтиту із використанням гіалуронової кислоти [47-50]. Подібний результат продемонструвало порівняння інтактної групи, що має підвищений рівень Hsp60, як при пародонтиті, та інтактної, яку лікували ін'єкціями гіалуронової кислоти (див. табл. 3.3). Виявилось, що результати статистично відрізняються ($q_{\phi} 10,392 > q_{\tau} 3,314$). При цьому інтактна група демонструє підвищений рівень Hsp60, на відміну від групи, яку лікували гіалуроном.

Таблиця 3.3

Множинне порівняння між групами за допомогою критерію Ньюмана-Кейлса

Назва групи	Емпіричне значення	Теоретичне значення
П та І	0,817	2,772
П та П + ГК	9,238	3,314
І + ГК	10,392	3,314

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті проведених досліджень було проаналізовано рівень Hsp60 у сумарних лізатах зразків тканин пародонту щурів контрольної та експериментальної груп. Виявлено, що у інтактних щурів та щурів з ознаками пародонтиту не має суттєвих відмінностей у рівнях Hsp60. Згідно літературним даним, за нормальних умов рівень стресового білку має бути нижчим, ніж при запальних процесах [52]. Така невідповідність літературним даним може бути пов'язана з особливістю тканин пародонту щурів, яким притаманна висока регенераційна здатність на відміну від тканин пародонту людини. Даний факт потребує додаткового детального дослідження.

Введення препарату гіалуронової кислоти супроводжувалось зниженням вмісту Hsp60 у тканинах пародонту інтактних щурів та щурів з пародонтитом. Для досліджень використовували сумарний лізат зразків тканин пародонту, який крім Hsp60 щура може містити прокаріотичний Hsp60. Оскільки однією з найпоширеніших причин пародонтиту є інфекційні захворювання ротової порожнини [9,52]. Необхідним є аналіз та співставлення отриманих результатів з результатами мікробіологічних досліджень.

Згідно з результатами, які представлено у науковій літературі, ефективність лікування препаратами гіалуронової кислоти залежить від способу та курсу застосування [47]. Найбільш ефективним є місцеве застосування препаратів протягом тривалого часу, що частково було відтворено для тварин, тканини пародонту яких було досліджено [36].

Вперше отримані результати впливу ін'єкцій гіалуронової кислоти на вміст Hsp60 у тканинах пародонту є важливими та свідчать про необхідність подальших досліджень з огляду на те, що його різке зниження може мати неоднозначний ефект.

ВИСНОВКИ

- 1) Не виявлено статистично достовірної різниці між рівнями Hsp60 у сумарних лізатах зразків тканин пародонту інтактних щурів та щурів з парадонтитом до лікування.
- 2) Введення препарату гіалуронової кислоти супроводжувалося зниженням рівнів Hsp60 у тканинах пародонту інтактних щурів та щурів з парадонтитом.
- 3) Ін'єкції гіалуронової кислоти призводять до зменшення запальних процесів, що корелює з рівнями стресових білків Hsp60.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cerajewska T, Davies M, West N. Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. *BDJ Team*. 2016;3(4).
2. Малий Д.Ю., Антоненко М.Ю. Епідеміологія захворювань пародонта: віковий аспект. *Клінічні Медицина*. 2013; 41-3.
3. Ferreira M, Dias-Pereira A, Branco-de-Almeida L, Martins C, Paiva S. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *Journal of Periodontal Research*. 2017;52(4):651-65.
4. Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B et al. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2016;29(4):572-82.
5. Baron B. Role of the Post-translational Modifications of HSP60 in Disease. *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. 2019;;69-94.
6. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology 2000*. 2017;75(1):7-23.
7. Lang N, Bartold P. Periodontal health. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45:S9-16.
8. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple I, Jepsen S, Kornman K et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45:S1-8.
9. Bui F, Almeida-da-Silva C, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical Journal*. 2019;42(1):27-35.
10. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontology 2000*. 2017;76(1):85-96.
11. Luis Muñoz-Carrillo J, Elizabeth Hernández-Reyes V, Eduardo García-Huerta O, Chávez-Ruvalcaba F, Isabel Chávez-Ruvalcaba M, Mariana

- Chávez-Ruvalcaba K et al. Pathogenesis of Periodontal Disease. Periodontal Disease - Diagnostic and Adjunctive Non-Surgical Considerations. 2020.
12. Van Dyke T. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017; 58:21-36.
 13. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R. Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*. 2015;23(3):329-55.
 14. Winning L, Linden G. Periodontitis and systemic disease. *BDJ Team*. 2015;2(10).
 15. Nagpal R, Yamashiro Y, Izumi Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators of Inflammation*. 2015; 1-9.
 16. Arigbede A, Babatope B, Bamidele M. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2012;16(4):487.
 17. Жулев Е.Н., Кочубейник А.В., Лапшин Р.Д. Экспериментальное моделирование воспалительных заболеваний пародонта. *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1 (часть 4) – С. 744-7.
 18. Dannan A., Alkattan F. Animal Models in Periodontal Research: A Mini-Review of the Literature. *The Internet Journal of Veterinary Medicine*. 2008;5(1).
 19. Oz H, Puleo D. Animal Models for Periodontal Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 1-8.
 20. Rowland S, Robb F. Structure, Function and Evolution of the Hsp60 Chaperonins. *Prokaryotic Chaperonins*. 2017;3-20.
 21. . Macario AJL, Conway de Macario E, Cappello F (2013) The Chaperonopathies. Diseases with defective molecular chaperones, Springer briefs in biochemistry and molecular biology. Springer, Dordrecht

22. . Cappello F, Mazzola M, Jurjus A, Zeenny M, Jurjus R, Carini F. Hsp60 as a Novel Target in IBD Management: A Prospect. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10.
23. . Cappello F, Conway de Macario E, Macario A. HSP60: A Story as Long as Life on the Earth. *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. 2019;3-14.
24. Meng Q, Li B, Xiao X. Toward Developing Chemical Modulators of Hsp60 as Potential Therapeutics. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018;5.
25. Clare,D.K. Saibil,H.R. ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers* 201399, 846-59.
26. Nisemlat S, Yaniv O, Parnas A, Frolow F, Azem A. Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(19):6044-6049.
27. Caruso Bavisotto C, Scalia F, Pitruzzella A, Górska-Ponikowska M, Marino C, Taglialatela G. Hsp60 in Modifications of Nervous System Homeostasis and Neurodegeneration. *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. 2019;:241-66.
28. Jakic B, Wick G, Cappellano G. Hsp60 in Atherosclerosis: Past, Present and Future. *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. 2019;181-208.
29. Quintana F, Cohen I. The HSP60 immune system network. *Trends in Immunology*. 2011;32(2):89-95.
30. Cappello F. Hsp60 and human aging: Les liaisons dangereuses. *Frontiers in Bioscience*. 2013;18(2):626.
31. Vilasi S, Bulone D, Caruso Bavisotto C, Campanella C, Marino Gammazza A, San Biagio P. Chaperonin of Group I: Oligomeric Spectrum and Biochemical and Biological Implications. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018;4.

32. Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(2):274-85.
33. Macario AJL, Conway de Macario E (2019) Chaperone proteins and chaperonopathies. In: Fink (ed) *Stress physiology, biochemistry, and pathology*. Handbook of stress. Elsevier, Amsterdam
34. Nethravathy R R, Alamelu S, Arun K V, Kumar T. Evaluation of circulatory and salivary levels of heat shock protein 60 in periodontal health and disease. *Indian J Dent Res* 2014; 25:300-4
35. Indumathy P, Arun K. V., Sai Prashanth P. Heat shock protein (hsp60) in periodontal disease: a review. *Int J Cur Res Rev*. 2014; 23(6): 18-21.
36. Seymour G, Ford P, Cullinan M, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007; 13:3-10.
37. Dahiya P, Kamal R. Hyaluronic acid: A boon in periodontal therapy. *North American Journal of Medical Sciences*. 2013;5(5):309.
38. Савоськин О. В., Семенова Е. Ф., Рашевская Е. Ю., Полякова А. А., Грибкова Е. А., Агабалаева К. О. Характеристика различных методов получения гиалуроновой кислоты. *Научное обозрение. Биологические науки*. – 2017. – № 2 – С. 125-35
39. Ahmadian E, Eftekhari A, Dizaj S, Sharifi S, Mokhtarpour M, Nasibova A et al. The effect of hyaluronic acid hydrogels on dental pulp stem cells behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019; 140:245-54.
40. Iijima J, Konno K, Itano N. Inflammatory Alterations of the Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment. *Cancers*. 2011;3(3):3189-205.
41. Bohaumilitzky L, Huber A, Stork E, Wengert S, Woelfl F, Boehm H. A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix. *Frontiers in Oncology*. 2017;7.

42. Gao Y, Sun Y, Yang H, Qiu P, Cong Z, Zou Y et al. A Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Derivative Accelerates Excisional Wound Healing by Modulating Pro-Inflammation, Promoting Epithelialization and Neovascularization, and Remodeling Collagen. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15):3722.
43. Brice Nativel, Cynthia Planesse, Philippe Gasque, Christine Robert da Silva, Olivier Meihac, Wildriss Viranapcken. *Biology of Extracellular HSP60*, Chapter 3. 2019;57-80
44. Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res* 2010; 21:575-8
45. Casale M, Vella P, Moffa A, Oliveto G, Sabatino L, Grimaldi V. Hyaluronic acid and upper airway inflammation in pediatric population: A systematic review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2016; 85:22-6.
46. Gontiya G, Galgali S. Effect of hyaluronan on periodontitis: A clinical and histological study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2012;16(2):184.
47. Lobato JC, Santos Vilhena MA, Izidoro C, Alves RC, Proença L. Single application of 0.8% hyaluronic acid as a coadjuvant of nonsurgical treatment in nonsmoking patients with periodontitis: A split-mouth, randomized, controlled pilot clinical trial. *J Indian Soc Periodontol* 2019; 23:545-8
48. Mahmood AA, Abdul-Wahab GA, Al-Karawi SI. Effect of hyaluronan and metronidazole gels in management of chronic periodontitis. *J Int Oral Health* 2019; 11:158-63
49. Rajan P. Hyaluronic Acid as an Adjunct to Scaling and Root Planing in Chronic Periodontitis. A Randomized Clinical Trail. *Journal of clinical and diagnostic research*. 2014.
50. Shah SA, Vijayakar HN, Rodrigues SV, Mehta CJ, Mitra DK, Shah RA. To compare the effect of the local delivery of hyaluronan as an adjunct to

scaling and root planing versus scaling and root planing alone in the treatment of chronic periodontitis. J Indian Soc Periodontol 2016; 20:549-56

51. С. Гланц. Медико-биологическая статистика. McGraw-Hill, 1994; М.: Практика, 1998. — 459 с.

52. Henderson B, Donos N, Nibali L, Kaiser F. Secreted and Circulating Cell Stress Proteins in the Periodontal Diseases. Heat Shock Proteins. 2015:77-91.