

УДК 616.31-085 + 615.036.8

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ
БЫСТРОПРОГРЕССИРУЮЩЕГО ПАРОДОНТИТА****¹Стабаева Г.С., ¹Мусаев А.Т., ¹Угланов Ж.Ш., ²Бугыбаева С.Ж., ¹Куаталы А.К.,
¹Колбай А.З., ¹Айтили Р.М., ¹Бегларов Д.З., ¹Магомедов Г.В., ¹Амангельдиев С.Ж.**¹*Казахский Национальный Медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы,
e-mail: musaev.dr@mail.ru;*²*Казахская Академия Спорта и Туризма РК г. Алматы*

Большинство пациентов с хроническими формами пародонтита хорошо поддаются стандартному лечению, т.е. снятию отложений и сглаживанию поверхности корня иногда с пародонтологическими операциями, а затем адекватной длительной поддерживающей терапией. Тем не менее, иногда (до 17% пациентов) такое лечение неэффективно. Молекулярно-биологическими исследованиями выявлено, что стимулирование бактериальными агентами иммунных клеток приводит к выработке провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и фактора некроза опухоли- α (ФНО α), активизирующих фибробласты к синтезу коллагеназы и остеобласты к трансформации в остеокласты. К противовоспалительным цитокинам относится Ронколейкин, представляющий собой новое поколение иммуномодуляторов. Ронколейкин обладает выраженной способностью подавлять инициацию провоспалительного цитокинового каскада интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли- α – основных причин деструкции пародонтальной связки и костной ткани пародонта.

Ключевые слова: пародонтиты, иммунология, цитокины, ронколейкин, лечение**CYTOKINE THERAPY OF RAPIDLY PROGRESSIVE PERIODONTITIS
BY USING NANOTECHNOLOGY****¹Stabayeva G.S., ¹Musaev A.T., ¹Uglanov Zh.Sh., ²Bugybaeva S.Zh., ¹Kuataly A.K.,
¹Kolbay A.Z., ¹Aiteli R.M., ¹Beglarov D.Z., ¹Magomedov G.V., ¹Amangeldiev S.Zh.**¹*Kazakh National Medical university after S.D. Asfendiarov, Almaty, e-mail: musaev.dr@mail.ru;*²*Kazakh Academy of Sports and Tourism, Almaty*

Most patients with chronic periodontal disease respond well to standard treatment, ie, removal of fat and smoothing the root surface sometimes with periodontal operations, then an adequate long-term maintenance therapy. However, occasionally (to 17% of patients), such a treatment is ineffective. Molecular biological studies found that bacterial agents stimulate immune cells to produce proinflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF - α), which activate fibroblasts to synthesis of collagenases, osteoblasts and transform it to osteoclasts. Roncoleukin refers to proinflammatory cytokines which is a new generation of immunomodulators. Roncoleukin have a denominated ability to suppress initiation proinflammation cytokine cascade: Interleukin-1 β and Factor of Necrosis Tumor- α , main reasons of destruction periodontal ligament and bone tissue of parodont.

Keywords: periodontitis, immunology, cytokines, ronkoleikin, treatment**Актуальность проблемы**

Большинство пациентов с хроническими формами пародонтита хорошо поддаются стандартному лечению, т.е. снятию отложений и сглаживанию поверхности корня иногда с пародонтологическими операциями, а затем адекватной длительной поддерживающей терапией. Тем не менее, иногда (до 17% пациентов) такое лечение неэффективно. Молекулярно-биологическими исследованиями выявлено, что стимулирование бактериальными агентами иммунных клеток приводит к выработке провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и фактора некроза опухоли- α (ФНО α), активизирующих фибробласты к синтезу коллагеназы и остеобласты к трансформации в остеокласты [1]. Сочетание этих двух факторов являются одной из основных

причин деструкции пародонтальной связки и костной ткани альвеолярного отростка при быстро прогрессирующем пародонтите (БПП). Являясь инициаторами цитокинового каскада в тканях десны, ИЛ-1 β и ФНО α , усиливают как собственную продукцию, так и синтез других провоспалительных цитокинов. При БПП локальный выброс ИЛ-1 β и ФНО α становится неуправляемым [2].

По данным [3] иммуноцитокينات ИЛ-1 β и ФНО α относятся к основным генетическим факторам, определяющим особенности иммунного ответа и могут играть причинную или модифицирующую роль в развитии агрессивных форм пародонтита. Пациенты с генетическим полиморфизмом генов, отвечающих за выработку ИЛ-1 β и ФНО α , были отнесены к генотип-положительным [4].

Иммунологические показатели больных с БПП позволяют рассматривать данную патологию как иммунодефицитное и аутоиммунное состояние, требующее иммуно-реабилитационных мероприятий [4]. Это привело к поиску новых лекарственных препаратов, способных подавлять инициацию провоспалительного цитокинового каскада. В стандарт пародонтологического лечения агрессивных форм пародонтита целесообразно ввести иммуноцитокинотерапию, способную блокировать цитокинез, ингибировать активность коллагеназы и подавлять активность остеокластов [5].

К противовоспалительным цитокинам относится Ронколейкин, представляющий собой новое поколение иммуномодуляторов. Это лекарственная форма рекомбинантного (т.е. полученного методами генной инженерии) дрожжевого интерлейкина-2 человека (рИЛ-2). Препарат разработан в биотехнологической Академии («БИОТЕХ», Санкт Петербург) в 1995 год, в Казахстане разрешен к применению Комитетом фармации МЗ с 2007 года. Многогранность биологической активности рИЛ-2 позволяет применять его в комплексной терапии и монотерапии при декомпенсированном вторичном иммунодефиците бактериальных, вирусных, грибковых инфекций, онкозаболеваний, аллергических проявлений, в педиатрии. Основанием для выбора иммуномодулятора Ронколейкина при комплексной терапии БПП послужили сведения о его широкой фармакотерапевтической активности: иммунорегулирующей, противовоспалительной и регенерирующей. Кроме того, немаловажное значение имеет модификация рИЛ-2 таких системных факторов риска генерализованного пародонтита, как генетическая предрасположенность и системный остеопороз [6].

Одной из областей интенсивного развития нанобиотехнологии в приложении к биомедицине является разработка новых методов селективной внутриклеточной и внутритканевой доставки физиологически активных веществ. В 1986 году под руководством биохимика Леонарда Рома из Калифорнийского университета в живых клетках были открыты наноконтейнеры – липосомы и фосфолипиды. Исследование наноконтейнеров натолкнуло ученых на мысль об использовании этих природных нанокапсул в нанотехнологиях, для адресной доставки лекарств, молекул ДНК и РНК. Лекарства, упакованные в липосомы (рис. 1), становятся более эффективными и безопасными, точно попадают к органам-мишеням и позволяют снизить дозу. При применении липосомальной формы лекар-

ственных препаратов эффективную дозу можно уменьшить до 10 раз, а продолжительность действия лекарства увеличивает в два-три раза.

Сотрудниками Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина под руководством академика НАН РК М.К. Гильманова впервые:

– Созданы универсальные наноконтейнеры размерами 0,3–0,5 мкм на основе липосом – мицелл. Благодаря наличию на их поверхностях отрицательного заряда, нанокапсулы, отталкиваясь друг от друга, исключают возможность агрегации и закупорки капилляров, легко проходят сквозь межклеточное пространство через слизистую оболочку, также имеющую слабо отрицательный заряд. Вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных разрушению в биологических жидкостях. Данный аспект имеет немаловажное значение для применения лекарственных препаратов в полости рта.

– Оработан метод загрузки наноконтейнеров лекарственными препаратами. Для этого использовали их свойство открываться в гидрофобной фазе, а затем захватывать лекарства и захлопываться при переводе их в водную фазу.

– Загруженные Ронколейкином наноконтейнеры смешиваются с ланолином для приготовления мазевой лекарственной формы.

– После нанесения этой мази на десневой край или введения в пародонтальный карман наноконтейнеры, в виду малых размеров легко проходят через слизистую оболочку и сквозь межклеточное пространство через 15-20 мин создают депо лекарственного препарата в очагах воспалительного-деструктивного процесса тканей пародонта. Капилляры, снабжающие кровью эти области, как правило, сильно перфорированы, поэтому липосомы легко проникают через расширенные поры и накапливаются в ткани. Это явление получило название «Пассивного нацеливания» (рис. 2). Еще одно важное преимущество наночастиц как лекарственной формы – постепенное высвобождение заключенного в них лекарственного вещества, что увеличивает время его действия.

Цель исследования

Обосновать иммуноцитокинотерапию быстро прогрессирующего пародонтита и провести сравнительный анализ 2-х способов применения Ронколейкина: инъекционного и местного в виде наноконтейнерной технологии.

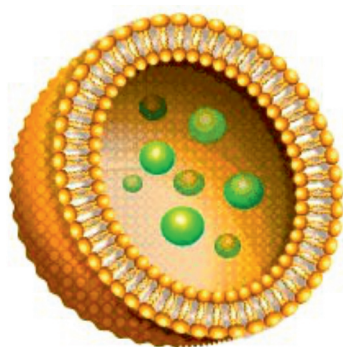


Рис. 1. Схематическое строение липосомы

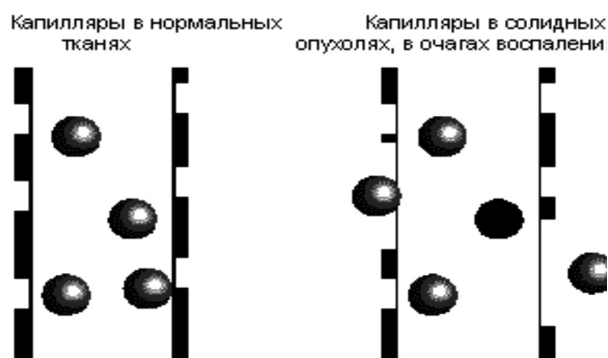


Рис. 2. Проникновение липосом через поры капилляров в область воспаления

Материалы и методы исследования

Дизайн настоящего исследования: рандомизированное клиническое контролируемое исследование с двумя основными группами лечения и одной группой сравнения. Под наблюдением находилось 70 пациентов с БПП в возрасте от 18 до 55 лет. Длительность заболевания составила от 3 до 20 лет. Пациентам кроме базового пародонтологического лечения (профессиональная гигиена полости рта; поддесневойскейлинг и детоксикация корня) назначали иммуноцитокинотерапию. В зависимости от применяемого метода иммунотерапии были выделены 3 группы пациентов с БПП: 1 подгруппа основной группы ($n = 25$) – иммунотерапия Ронколейкином в виде инъекционных введений; 2 подгруппа основной группы ($n = 25$) – иммунотерапия Ронколейкином в виде наноконтейнерной мази; 3 группа – сравнения ($n = 20$) – локальная иммунотерапия Имудоном. Для сравнительного анализа и определения значимости показателей ИЛ-1 β и ФНО- α выделили 4 группу, в которую вошли 12 здоровых добровольца без клинически определяемой патологии пародонта, сопоставимых с больными по возрасту и полу.

Методика инъекционного применения ронколейкина (манипуляция очень болезненная): сухой ампулированный Ронколейкин, содержащий 0,5 мг (500 000 МЕ) растворяли в 5 мл раствора натрия хлорида. Пациенту после интрасептальной анестезии карпульными анестетиками в основание каждого десневого сосочка вводили раствор ронколейкина по 0,3 мл. Курс лечения составил от 2 до 3 инъекций с интервалом 2-3 дня. По показаниям Ронколейкин применяли 2 – 3 раза в год.

Методика применения липосомальной формы Ронколейкина: наноконтейнерная мазь наносится на десневой край или вводится в пародонтальный карман от 3 до 5 раз с интервалом 2-3 дня. Курс лечения 3-4 раза в год.

Использовали следующие критерии оценки эффективности иммунотерапии: индексная оценка пародонтального статуса; морфологическое исследование биопсийной ткани десны. Биоптаты фиксировали в 10% растворе формалина. Гистологические срезы осуществляли на микротоме MC-2, окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали

под микроскопом фирмы «Leica» при увеличении окуляра $\times 50$. Для изучения уровня цитокинов ФНО α и ИЛ-1 β в сыворотке осуществляли забор крови из локтевой вены в количестве 5 мл. Смывы пародонтальных карманов получали после их двукратного промывания 0,9%-м раствором хлорида натрия в количестве 5 мл. Забор материала (кровь и смывы пародонтальных карманов) проводили при идентичных условиях в утренние часы натощак. Уровень провоспалительных цитокинов определяли двухфазным иммуноферментным сэндвич-методом, используя наборы реактивов фирмы «BeringerMannheim» (Германия).

Полученные данные результатов исследования были статистически обработаны с помощью t критерия Стьюдента и программного пакета «Statistica-5», при этом различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Клинический эффект иммунотерапии ронколейкином БПП заключался в быстром купировании признаков воспаления, уменьшении глубины пародонтальных карманов, сокращении сроков лечения по сравнению с группой сравнения более чем в 2 раза. Отмечалась стабилизация зубов и длительная ремиссия.

Морфологическое исследование биоптатов десны показало, что до лечения на сагитальном срезе слизистой оболочки десны при БПП выявлялся отек эпителиальных клеток, полнокровие сосудов и стаз эритроцитов. Отмечалось наличие круглоклеточной инфильтрации в строме, дезорганизация коллагеновых волокон.

На 30-е сутки после применения Ронколейкина значительно улучшалась структура и архитектура многослойного плоского эпителия. В соединительнотканной основе не обнаруживались обширные очаги воспалительной инфильтрации, а клеточ-

ный состав в основном состоял из клеток фибробластического ряда. Увеличивалось количество новообразованных сосудов, воспалительная инфильтрация менялась на макрофагально-фибробластическую. Отмечалась также высокая плотность новообразованной капиллярной сети в функционирующем состоянии, что указывает на активацию метаболических процессов.

С помощью иммуногистохимических исследований было выявлено, что до лечения отмечалось статистически достоверное повышение экспрессии в собственной пластинке слизистой оболочки десны ФНО α (39,9%; $p < 0,05$). После лечения экспрессия ФНО α значительно снижалась. Через 14 суток цитокин выявлялся у 17,3% ($p < 0,05$) а через 21 день у – 6,1% ($p < 0,05$). Спустя 30 суток этот фактор почти не выявлялся (4,1%; $p < 0,05$).

По уровню содержания ИЛ-1 β и ФНО α в смывах пародонтальных карманов эффективность лечения БПП с применением Ронколейкина оказалась выше в 2,5 (инъекционный метод введения) и 2,3 (наноконтейнеры) раза по сравнению с традиционным местным иммунокорректором Имудоном ($p < 0,05$).

Заключение

Таким образом, цитокинотерапия бы-
стро прогрессирующего пародонтита Рон-

колейкином купирует основные симптомы заболевания, активировать процессы восстановления опорно-удерживающих структур зуба, значительно сокращает сроки лечения и способствует длительной ремиссии. Создание наноконтейнерных лекарственных форм препаратов не уступающих их традиционной форме, перспективно и позволит проводить эффективное лечение в пародонтологии без использования инъекционных форм лекарств.

Список литературы

1. Decreased interleukin-2 responses to *Fusobacteriumnucleatum* and *Porphyromonasgingivalis* in generalized aggressive periodontitis. Borch T.S., Lobner M., Bendtzen K., Holmstrup P., Nielsen CH. *J Periodontol.* 2009 May;80(5):800-7.
2. Rescala B., Rosalem W.Jr, Teles R.P., Fischer R.G., Haf-fajee A.D., Socransky S.S., Gustafsson A., Figueredo C.M. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol.* 2010 Sep;81(9):1308-16.
3. Nikolopoulos G.K., Dimou N.L., Hamodrakas S.J., Bagos P.G. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J ClinPeriodontol.* 2008 Sep;35(9):754-67.
4. Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: role of the macrophage. HaticeHasturk, AlpdoganKantarci, Van-Dyke. *Front Immunol.* 2012;3:118.
5. Graves D.T., Li J., Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res.* 2011 Feb;90(2):143-53.
6. Кравченко Е.В., Кравченко Д.С. Ронколейкин в комплексном лечении заболеваний пародонта. Фундаментальные исследования. Медицинские науки. – 2012. – № 7. – С. 355-358.