Харьковский национальный медицинский университет

доцент кафедры стоматологии, к.мед.н. Худякова Марина Борисовна; проф., д.мед.н., зав. каф. терапевтической стоматологии Рябоконь Евгений Николаевич; проф., д.мед.н., зав. каф. стоматологии Соколова Ирина Ивановна

**Коррекция цитокинового дисбаланса у больных генерализованным пародонтитом хронического течения І-ІІ степени тяжести при местном использовании геля из гранул кверцетина и липосомального кверцетин-лецитинового комплекса**

Міжнародна науково-практична конференцiя «Нове у медицині сучасного світу» м. Львів, 28-29 листопада 2014 р. С. 105-110

Разработка и применение высокоэффективных и безопасных средств фармакотерапии генерализованного пародонтита (ГП) в последние годы по праву считается одним из приоритетных направлений отечественных и зарубежных исследователей. Противовоспалительные свойства «Липофлавона» (ЗАО „Биолек”, г. Харьков), в состав которого входят лецитиновые липосомы и кверцетин, обусловлены его выраженной антилейкотриеновой активностью за счет ингибирования 5-липоксигеназы. Высокая терапевтическая эффективность предложенного ЛКЛК у больных с ГП І-ІІ степени тяжести обусловлена иммуномодулирующим, противовоспалительным и пародонтопротекторным действиями.

**Ключевые слова:** цитокины, генерализованный пародонтит, патогенез, кверцетин, липосомальный кверцетин-лецитиновый комплекс

**Khudiakova M.B.**, **Socolova I.I., Ryabokon E.N.**

The thesis proves pathogenetic role of misbalance of cytokine profile in the oral fluids in their connection with clinical change in development of chronic generalized periodontitis of I-II degrees of severity. The scheme of complex treatment of periodontitis by means of local application of lipoflavon (liposomal quercetin-lecithin complex) using individual periodontal polyvinylchloride delivery tray contributing to inflammation elimination and long-term remission has been developed. The research in question demonstrates lipoflavon capability to normalize misbalance of cytokine profile, promote stabilization of membrane structures, thus retarding process of inflammation and destruction of tissues and improving reparation of periodontal structures. High therapeutic efficiency of the liposomal quercetin-lecithin complex for patients with chronic generalized periodontitis, especially that of I-II degrees of severity was shown to be determined by antioxidant, membranotropic, antiinflammatory effects. This allows to recommend lipoflavon for local application as pathogenetically substantiated drug in treatment of generalized periodontitis.

**Key words**: cytokines, generalized periodontitis, pathogenesis, liposomes, quercetin, lipoflavon.

**КОРРЕКЦИЯ ЦИТОКИНОВОГО ДИСБАЛАНСА У БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ ХРОНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ І-ІІ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ПРИ МЕСТНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕЛЯ ИЗ ГРАНУЛ КВЕРЦЕТИНА И ЛИПОСОМАЛЬНОГО КВЕРЦЕТИН-ЛЕЦИТИНОВОГО КОМПЛЕКСА**

Эффективность местного введения лекарственных препаратов в ткани пародонта зависит от экспозиции вещества в пародонтальном кармане (ПК), выбора лекарственного вещества, способа его применения, контакта со слизистой оболочкой десен и сохранения данной концентрации. Поэтому преимущество следует отдавать формам и путям введения лекарственных средств с контролируемым и продолжительным действием [5, 6]. Разработка и применение высокоэффективных и безопасных средств фармакотерапии генерализованного пародонтита (ГП) в последние годы по праву считается одним из приоритетных направлений отечественных и зарубежных исследователей. Необходимо отметить, что в комплексном лечении ГП наиболее популярным и распространенным методом является фармакотерапия. Это объясняется тем, что терапевтический эффект большинства лекарственных средств как следствие системного или недостаточного локального действия под воздействием ряда факторов (вымывание, недостаточная фиксация и др.) наблюдается не только на пародонте, а и в организме в целом [1, 2, 3]. Медикаментозная местная терапия является неотъемлемой частью комплексного лечения ГП [4].

Хроническое течение ГП приводит к угнетению иммунного ответа, что приводит к усилению процессов воспаления в тканях пародонта. Иммунные изменения в свою очередь приводят к повреждению клеточных мембран. Значительная роль в комплексном лечении больных ГП принадлежит местному лечению с применением медикаментозных средств патогенетического действия, направленного на устранение воспалительных и дистрофических изменений в тканях пародонта, в частности на коррекцию цитокинового дисбаланса [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19]. С целью определения роли и значения цитокинов в развитии ГП, были проведены исследования провоспалительных IL-8, ІL-1β, ФНО-α и противовоспалительного ІL-4 цитокинов.

Противовоспалительные свойства «Липофлавона» (ЗАО „Биолек”, г. Харьков), в состав которого входят лецитиновые липосомы и кверцетин, обусловлены его выраженной антилейкотриеновой активностью за счет ингибирования 5-липоксигеназы - ключевого фермента биотрансформации арахидоновой кислоты по липоксигеназному пути метаболизма. Результат преобразования арахидоновой кислоты - это формирование лейкотриенов, основной биологической функцией которых считают индукцию хемотаксиса ихемокинезаполиморфноядерных лейкоцитов [7, 8]. Известно иммунномодулирующее действие кверцетина. Кверцетин дифференцированно регулирует експрессию генов Th-1 (IFNγ) и Th-2 (IL-4) цитокинов нормальными моноядерными клетками периферической крови. Кверцетин способствует повышению фенотипической экспрессии IFNγ моноядерных клеток периферической крови и супрессирует (IL-4) – позитивные моноядерные клетки периферической крови, что сопоставляется с результатами определения мРНК/белка [20]. За счет эстрогеноподобного свойства и ингибирования ІL-1β, ФНО-α, стимулирующих остеокласты, кверцетин может влиять на процессы ремоделирования костной ткани [21].

Поэтому представляет значительный теоретический и практический интерес сравнительное изучение изменений провоспалительных IL-8, ІL-1β, ФНО-α и противовоспалительного ІL-4 цитокинов у больных ГП хронического течения І-ІІ степени тяжести при местном использовании геля из гранул кверцетина (ГК) и липосомального кверцетин-лецитинового комплекса (ЛКЛК).

**Целью исследования** было повышение эффективности комплексного лечения больных ГП хронического течения І-ІІ степени тяжести при местном использовании геля из ГК и ЛКЛК за счет коррекции уровня цитокинов.

**Материалы и методы.** Проведено комплексное лечение 38 больных ГП хронического течения І-ІІ степени тяжести (из них 20 больных основной группы и 18 - группы сравнения) с местным применением геля из ГК и ЛКЛК с использованием индивидуальных пародонтальных капп.

Больным основной группы проводили базисную терапию с местным назначением ЛКЛК (инъекционная форма препарата «Липофлавон») в виде суспензии, приготовленной ex tempore, содержащая 137,5 мг лецитина и 3,75 мг кверцетина. Суспензия готовилась при замешивании 1/4 части содержимого флакона с 5 мл изотонического 0,9% раствора хлорида натрия, подогретого до 38ºС. Больным группы сравнения проводили базисную терапию с местным применением геля из ГК с помощью индивидуальных пародонтальных капп с экспозицией 40 минут 2 раза в день в течении 12 дней. Пол пакета (1 грам) «Гранул кверцетина» растворяли в 10 мл воды до получения геля, содержащего 40 мг кверцетина. Дополнительно больным обоих групп назначали 1 г «Гранул кверцетина» 2 раза в сутки внутрь в течении 1 месяца.

У пациентов в утреннее время натощак до лечения и через 1, 6 и 12 месяцев после лечения проводили забор ротовой жидкости (РЖ) для иммунологических исследований, которые проводилив ЦНИЛ ХНМУ. Потом РЖ центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин. и надосадочную жидкость (супернатант) отбирали в чистые эпиндорфы. Пробы сохраняли в замороженном виде при -20°С. Для расчета полученной концентрации цитокина строилась калибровочная кривая на основе оптической плотности стандартов. Саливаторную концентрацию IL-8,ІL-1β, ФНО-α и ІL-4 определяли иммуноферментным методом на анализаторе «Labline-90» (Австрия) с использованием коммерческих тест-систем для определения цитокинов ТОВ «Укрмед Дон» (Украина г. Донецк) и выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл).

Регистрация показателей проводилась до лечения, после курса лечениячерез 1, 6 и 12 месяцев. Через 6 месяцев больных осматривали, обследовали состояние тканей пародонта и проводили поддерживающую терапию, которая включала профессиональную гигиену полости рта и медикаментозное лечение с использованием пародонтальных капп с гелем из ГК и ЛКЛК в течении 12 дней по 40 минут 2 раза в день, а также прием внутрь в течении 1 месяца по 1 г «Гранул кверцетина» 2 раза в день.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Анализ содержания провоспалительных цитокинов в РЖ пациентов с интактным пародонтом показал, что у здоровых людей содержание ІL-1β - 64,44 ± 6,2 пг/мл, ІL-8 - 61,62 ± 7,69 пг/мл, ФНО-α - 21,71 ± 2,95 пг/мл, а противовоспалительного ІL-4 - 243,5 ± 17,48 пг/мл. Динамическое изучение состояния уровня цитокинов позволяет определить не только концентрацию медиаторов воспаления в РЖ, а и характер течения патологического процесса в целом.

ІL-1β - один из ключевых медиаторов иммунного ответа, запускающий комплекс местных защитных реакций с участием всех клеток-эффекторов воспаления в элиминации патогена и обновления целостности поврежденной ткани. Известно, что ІL-8 и ФНО-α имеют выраженные хемотаксические свойства, которые повышают приток активных нейтрофилов в ткани пародонтального комплекса с высвобождением цитотоксических посредников, в частности свободных радикалов, эластазы, β-глюкоронидазы, миелопероксидазы, катепрессина В и других. В свою очередь ІL-1β повышает активность клеток в очаге воспаления - синтез макрофагами простагландинов и цитокинов, увеличивает метаболизмнейтрофилови освобождение из них ферментов. Ферменты из гранул нейтрофилов способны расщеплять компоненты комплемента и инициировать кининовый каскад. Таким образом, нейтрофилы потенцируют еще один путь активирования систем образованиямедиаторов воспаления.

Противовоспалительные цитокины представляют альтернативу провоспалительным, их эффект носит антагонистический характер, они угнетают выработку последних. Среди противовоспалительных цитокинов в патогенезе ГП хронического течения важное место занимает ІL-4, который секретируется Тh-2-лимфоцитами, учавствует в регуляции гуморального иммунного ответа, имеет выраженную противовоспалительную активность.

По результатам иммунологического исследования у больных с ГП І-ІІ степени тяжести до лечения наблюдается повышение уровня ІL-1β - 168,9 ± 6,04 пг/мл в основной группе и 169,4 ± 8,88 пг/мл (P < 0,001) – в группе сравнения, что на 162 % и 163 % превышало показатель контроля. Этот показатель в 2,5 раза выше, чем у людей с интактным пародонтом. До лечения наблюдается повышение уровня ФНО-α - 69,78 ± 3,6 пг/мл в основной группе и 71,14 ± 2,3 – в группе сравнения, что на 221 % и 228 % превышало показатель контроля. ГП І-ІІ степени характеризуется болем високим уровнем ІL-8, составляя 105,4 ± 2,92 пг/мл и 106,4 ± 3,28 пг/мл (P < 0,001 в сравнении с нормой), что на 71 % и 73 % превышало показатель у людей с интактным пародонтом. Уровень ІL-4 до лечения соответствовал показателям - 213,4 ± 8,34 пг/мл в основной группе и 212,1 ± 7,89 пг/мл - в группе сравнения, что на 12 % и 13 % было ниже контроля.

Динамика изменений уровня ФНО-α свидетельствует про достаточное купирование воспалительного процесса в тканях пародонта у пациентов обоих групп. Через 1 месяц уровень ФНО-α при І-ІІ степени снизился до 30,05 ± 2,9 пг/мл и 27,31 ± 1,21 пг/мл, что вероятно не отличалось от нормы (Р > 0,05). Через 6 месяцев уровень ФНО-α составил 32,54 ± 3,94 пг/мл и 35,36 ± 2,54 пг/мл, увеличение на 16 % и 18 %, Р > 0,05). Это увеличение вероятно отличалось от контрольной группы (Р < 0,05), как при использовании ЛКЛК (на 50 % выше нормы), так и геля из ГК (на 63 % выше нормы). Через 1 год уровень ФНО-α составил 25,12 ± 2 пг/мл и 33,37 ± 2,81 пг/мл, что на 77 % и на 54 % ниже, чем в срок через 6 месяцев.

Через 1 месяц уровень ІL-1β при І-ІІ степени снизился до 71,98 ± 4,21 пг/мл и 81,69 ± 5,37пг/мл, что вероятно не отличалось от нормы (Р> 0,05). Через 6 месяцев уровень ІL-1β составил 79,75 ± 7,3 пг/мл и 98,34 ± 5,25 пг/мл, увеличение на 11 % и 20 %, Р > 0,05). Это увеличение вероятно отличалось от контрольной группы (Р < 0,05), как при использовании ЛКЛК (на 24 % выше нормы), так и геля из ГК (на 53 % выше нормы). Через 1 год уровень ІL-1β составил 72,3 ± 4,81 пг/мл и 93,72 ± 4,4 пг/мл, что на 9 % и на 5 % ниже, чем в срок через 6 месяцев.

Динамика изменений уровня ІL-8 свидетельствует про достаточное купирование воспалительного процесса в тканях пародонта у пациентов обоих групп. Через 1 месяц уровень IL-8 при І-ІІ степени снизился до 72,88 ± 1,62пг/мл и 81,35 ± 2,51 пг/мл, что вероятно не отличалось от нормы (Р> 0,05). Через 6 месяцев уровень ІL-8 составил 75,38 ± 5,04 пг/мл и 85,26 ± 5,46пг/мл, увеличение на 11 % и 17 %, Р > 0,05). Это увеличение вероятно отличалось от контрольной группы (Р < 0,05), как при использовании ЛКЛК (на 22 % выше нормы), так и геля из ГК (на 38 % выше нормы). Через 1 год уровень ІL-8 составил 70,18 ± 3,15 пг/мл и 82,22 ± 4,87 пг/мл, что на 7 % и на 4 % ниже, чем в срок через 6 месяцев.

Через 1 месяц уровень IL-4 повысился до 328 ± 13,96 пг/мл и 280,2 ± 13,31 пг/мл, что на 35 % и на 28 % превышает норму (Р< 0,001). Через 6 месяцев уровень ІL-4 составил 292,8 ± 10,2 и 300,1 ± 16,51, снижение на 19 % и 17 %, Р > 0,05). Через 1 год уровень ІL-4 составил 300,1 ± 16,51 пг/мл и 266,4 ± 20,11 пг/мл, что на 2 % и на 23 % выше, чем в срок через 6 месяцев.

Таким образом, после повторного местного использования ЛКЛК, с разницей между медикаментозным лечением в 6 месяцев позволило повысить показатели уровня ІЛ-4 в РЖ с 213,4 ± 8,34 пг/мл (до лечения) до 300,1 ± 16,51 пг/мл, что превышало норму на 23 %. При применении ЛКЛК у больных ГП хронического течения І-ІІ степени лечебный эффект в отдаленные сроки наблюдения (через 1 год) сохраняется. При применении геля из ГК уровень ІЛ-4 в РЖ через 1 год недостоверно был повышенным на 9 % в сравнении с нормой (Р > 0,05). То есть лечебное действие ГК на уровень противовоспалительного ІЛ-4 в РЖ через 1 год тоже сохраняется. Динамика снижения уровня ІL-1β, ФНО-α, ІL-8 и повышение уровня ІL-4 в РЖ больных ГП при лечении разными формами кверцетина показала, что помещение его в липосомы имеет болем выраженный эффект в отдаленные сроки наблюдения.

**Выводы.** Результаты иммунологического исследования у больных с ГП хронического течения І-ІІ степени тяжести при местном использовании ЛКЛК и гранул кверцетина 2 раза в год свидетельствуют о том, что изменения показателей уровня IL-8, ІL-1β, ФНО-α и ІL-4 через 12 месяцев являються стойкими. Положительная динамика изменений показателей уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на протяжении 1 года свидетельствует о продолжительной фармакологической эффективности Липофлавона при местном лечении больных ГП хронического течения І-ІІ степени тяжести по сравнению с гранулами кверцетина. Высокая терапевтическая эффективность предложенного ЛКЛК у больных с ГП хронического течения І-ІІ степени тяжести обусловлена противовоспалительным, иммуномодулирующим, и пародонтопротекторным действиями. Это позволяет рекомендовать препарат «Липофлавон» для местного применения в качестве патогенетическиобусловленного средства лечения ГП.

**ЛИТЕРАТУРА.**

1. Мельничук Г.М. Гінгівіт, пародонтит, пародонтоз: особливості лікування. Навч. пос. / Г.М. Мельничук, М.М. Рожко, Л.В. Завербна. – Івано-Франківськ. – 2011. – 328 с.
2. Данилевский Н.Ф. Заболевания пародонта / Н.Ф. Данилевский, А.В. Борисенко. – К.: Здоров’я, 2000. - 462 с.
3. Мащенко И.С. Болезни пародонта / И.С. Мащенко. − Дрогобич: Коло, 2003. − 272 с.
4. Грудянов А.И. Лекарственные средства, применяемые при заболеваниях пародонта / А.И. Грудянов, А.И. Стариков // Пародонтология. − 1998. − № 2. − С. 6−17.
5. Терапевтическая стоматология: учебник: в 3 ч.: Ч.2. Болезни пародонта / под ред. Г.М. Барера. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2008. – 224с.
6. Барер Г.М. Системы локальной доставки лекарств в лечении пародонтита: обзор литературы / Г.М. Барер, О.В. Соловьёва, О.О. Янушевич // Пародонтология. − 2002. − № 3 (24). – С. 23−28.
7. Герелюк В.І. Вплив ліпосом на ектерициді, тетрацикліну та їх поєднання на вміст ліпідних медіаторів у ясенній і ротовій рідини у разі загострення хронічного генералізованого пародонтиту / В.І. Герелюк: матеріали I (VIII) з’їзду Асоціації стоматологів України. – К., 1999. – С. 186−187.
8. Encapsulation of naturally flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines / M. Goniotaki, S.Hatziantoniou, K.Dimaset all. // J. Pharm. Pharmacol.-2004.- Vol. 56, № 10.-Р.1217 – 1224.
9. Мащенко И.С. Обмен цитокинов у больных генерализованным пародонтитом / И.С. Мащенко // Современная стоматология. – 2004. − № 1 (25). – С. 73−75.
10. Мащенко И.С. Цитокиновый статус больных генерализованным пародонтитом и его связь с состоянием процессов метаболизма костной ткани / И.С. Мащенко, А. А. Гударьян // Укр. стоматологічний альманах. – 2005. − № 2. – С. 5−8.
11. Мельничук Г.М. Генералізований пародонтит і пародонтоз: маркери спадкової схильності, патогенетичні механізми метаболічних порушень та їх комплексна корекція: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня доктора мед.наук: спец. 14.01.21 „Стоматологія”/ Г.М. Мельничук; Державнаустанова „Інститутстоматології АМН України”. − Одеса, 2007. – 35 с.
12. Самойленко А.В. Дисбаланс в системе цитокинов больных генерализованным пародонтитом и его коррекция цитокинотерапией / А.В. Самойленко, И.С. Мащенко, А.Ю. Макаревич // Современная стоматология. – К., 2001. − № 1. – С. 41−43.
13. Чумакова Ю.Г. Патогенетическое обоснование методов комплексного лечения генерализованного пародонтита (клинико-экспериментальное исследование) / Ю.Г. Чумакова: автореф. дис. на соискание ученой степени доктора мед.наук: спец. „Стоматологія” 14.01.22 ; ГУ „Институт стоматологии АМН Украины”. – Одеса, 2007. – 420 с.
14. ChenLi-Li. Porphyromonasgingivalis lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE / Li-Li Chen, Jie Yan // ActaPharmacol. Sin. – 2001. – Vol. 22, № 7. – С. 614−618.
15. Delaleu N. Interleukin-1β and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation / N. Delaleu, M. Bickel // Periodontology 2000. – 2004. – Vol. 35. – P. 42−52.
16. Okada H. Cytokine expression in periodontal health and disease / H. Okada, H. Murakami // Crit. Rev. Oral Biol. Med. – 1998. – Vol. 9, № 3. – P. 248−266.
17. Page R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease / R. C. Page // J. Periodont. Res. – 1991. – Vol. 26, № 3. – P. 230−242.
18. Seymour G. J. Cytokines in periodontal disease: where to from here? / G. J. Seymour, E. Gemmell // ActaOdontol. Scand. – 2001. – Vol. 59. – P. 167−173.
19. The relationship between concentration of proinflammatory cytokines with in gingiva and the adjacent sulcular depth / S. M. McGree, M. A. Tucci, T. P. Edmundson [et al.] // J. Periodont. – 1998. – Vol. 69, № 8. – P. 865−871.
20. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells / P. N. Nair Madhavan, C. Kandaswami, S. Mahajan [et al.] // Biochim. etbiophys. acta. Mol. Cell Res. – 2002. – Vol. 1593, № 1. – Р. 29–36.
21. Поворознюк В.В. Костная система и заболевания пародонта / В.В. Поворознюк, И.П. Мазур. – К., 2004. – 446 с. (С.302).