

## ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ АСКОРБАТА ХИТОЗАНА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

Иванов П.В.<sup>2</sup>, Зудина И.В.<sup>1</sup>, Булкина Н.В.<sup>3</sup>, Ведяева А.П.<sup>3</sup>, Иванова Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия (410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83).

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза, Россия (440026, г. Пенза, ул. Красная, 40), e-mail: [sto-kafedra@yandex.ru](mailto:sto-kafedra@yandex.ru)

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, ГСП ул. Большая Казачья, 112), e-mail: [stomat@sgmu.ru](mailto:stomat@sgmu.ru)

Изучалась динамика изменения содержания цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8 и ИЛ-1ra) в жидкости зубодесневых карманов у пациентов с воспалительными заболеваниями тканей пародонта на фоне обработки десны гелеподобной формой аскорбата хитозана. Установлено, что аскорбат хитозана проявляет ярко выраженную противовоспалительную активность в очаге воспаления. Выявленные нами в настоящей работе закономерности позволяют предположить, что лечебный эффект гелеобразного 8%-ного аскорбата ХТЗ обусловлен не только пролонгированной санацией зубо-десневых карманов благодаря выраженной антибактериальной активности ХТЗ, но и его иммуотропному действию на эффекторы врожденного иммунитета. Механизм воздействия этого поликатионного гетерополисахарида на живые клетки, по всей видимости, тот же, что и у поликатионных антимикробных белков (прежде всего, дефензинов  $\beta$ ).

Ключевые слова: гингивит, пародонтит, аскорбат хитозана, цитокины.

## ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF ASCORBATE CHITOSAN IN THE PERIODONTAL DISEASE TREATMENT

Ivanov P.V.<sup>2</sup>, Zudina I.V.<sup>1</sup>, Bulkina N.V.<sup>3</sup>, Vedyayeva A.P.<sup>3</sup>, Ivanova E.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saratov State University n.a. N.G. Chernyshevsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, Street Astrakhanskaya, 83), e-mail: [ivzudina@mail.ru](mailto:ivzudina@mail.ru)

<sup>2</sup>Penza State University, Penza, Russia (440026, Penza, Krasnaya St., 40), e-mail: [sto-kafedra@yandex.ru](mailto:sto-kafedra@yandex.ru)

<sup>3</sup>Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, Street B.Kazachya, 112), e-mail: [stomat@sgmu.ru](mailto:stomat@sgmu.ru)

The article studies the effect of the gum treatment with the gel-like form of the ascorbate chitosan on the dynamics of the changes in the level of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-1ra) in the periodontal pockets liquid from patients who have the generalized type of the inflammation in the periodontal tissues. It was found that chitosan ascorbate exhibits a pronounced anti-inflammatory activity, probably, due to the regulation of the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokine levels in the inflammatory focus. We have identified in this paper patterns suggest that the therapeutic effect of the gel 8% ascorbate HTZ not only due to prolonged readjustment of teeth-gums due to a pronounced antibacterial activity HTZ, but its effect on the immuno-effectors of innate immunity. The mechanism of action of polycationic heteropolysaccharide on living cells, apparently the same as that of the polycationic antimicrobial proteins (primarily defensins  $\beta$ ).

Key words: gingivitis, periodontitis, chitosan ascorbate, cytokines.

### Введение

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнений многофакторность природы воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП), однако ведущая роль по-прежнему отводится патогенному воздействию супра- и субгингивальной пародонтальной микрофлоры [3]. Часто наблюдаемая на практике низкая эффективность применяемой этиотропной терапии ВЗП связана, как полагают, с высокой скоростью адаптации микрофлоры полости рта к используемым антибактериальным препаратам. Очевидно, что решением данной проблемы

может быть использование препаратов, обладающих не только антибактериальной активностью, но и иммунокорректирующими свойствами, позволяющими активизировать местный иммунитет и за счет этого повысить устойчивость тканей пародонта к действию агрессивной микрофлоры.

В последние годы в стоматологическую практику все чаще внедряются различные композиции, включающие в свой состав соли аскорбиновой кислоты и хитозана - аскорбаты хитозана - в различных концентрациях [1; 3; 10]. Хитозан (2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкан, ХТЗ) – это полимер, получаемый из компонента экзоскелета членистоногих хитина путем частичного или полного деацетилирования. Этот полисахарид обладает выраженным иммуностимулирующим действием, а также антибактериальной, антиоксидантной, детоксикационной и ранозаживляющей способностью [2; 11]. Однако на данный момент крайне мало известно о механизме модуляции иммунного ответа этими биологически активными веществами.

Одним из объективных критериев контроля эффективности проводимого лечения может служить мониторинг колебаний уровня про- и противовоспалительных цитокинов. Как известно, ИЛ-1β и ФНО-α являются цитокинами первой линии реагирования и в ответ на агрессию пародонтопатогенных микробов способны инициировать высвобождение медиаторов острой воспалительной реакции, в том числе хемокина ИЛ-8. Высокая концентрация ИЛ-8 в очаге воспаления способствует прилипанию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам, благодаря чему обеспечивается диапедез этих лейкоцитов сквозь эндотелий посткапиллярных венул и их миграция к месту проникновения патогенов [8].

У больных ВЗП наблюдается повышенная плотность нейтрофильных гранулоцитов в зоне поражения, однако их функциональная активность относительно невысока. Для полноценной активации зрелых нейтрофилов требуются высокие концентрации ИЛ-1β, являющегося их праймирующим фактором. Способность нейтрофилов отвечать только на высокие концентрации ИЛ-1β обусловлена низкой экспрессией на их поверхности функционально активных рецепторов к ИЛ-1β I типа (IL-1RI), связывание с которыми вызывает быстрое включение МКК3/p38 MAPK каскада, высвобождение супероксидного аниона и экспрессию поверхностных молекул CD11b/CD18 и CD15 [9]. Однако избыточное количество провоспалительных цитокинов ФНО-α и ИЛ-1β в тканях пародонта вызывает гиперактивацию остеокластов, что в свою очередь приводит к дегенеративно-деструктивным поражениям кости альвеолярного отростка [5].

Существует ряд естественных механизмов контроля воспалительной реакции и предотвращения повреждения тканей, вызванного избыточным высвобождением

цитотоксичных продуктов в результате массовой дегрануляции фагоцитов. В частности, активированные нейтрофилы под действием провоспалительных стимулов начинают продуцировать цитокин ИЛ-1 $\alpha$  – специфичный антагонист интерлейкина 1 $\beta$ , способный связывать его рецепторы и тем самым полностью предотвращать стимулирующее и праймирующее действие ИЛ-1 $\beta$  на нейтрофилы [6].

Цель исследования: изучить механизмы воздействия гелеобразного препарата 8%-ного аскорбата ХТЗ на состояние местного иммунитета при воспалении пародонта.

### **Материал и методы**

В качестве объекта исследования была использована десневая жидкость 20 здоровых доноров-добровольцев, жидкость десневых карманов, полученная от 20 пациентов с хроническим катаральным гингивитом, и жидкость пародонтальных карманов 50 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени (по 25 человек, соответственно). Клиническое состояние тканей пародонта оценивали с помощью индексов: гигиенического (ГИ), пародонтального (ПИ), папиллярно-маргинально-альвеолярного (РМА), кровоточивости десневого края (I. Muhlemann, 1971). Состояние костной ткани межзубных перегородок оценивали по данным внутриротовой рентгенографии. Всем пациентам проводили традиционную комплексную терапию с ежедневными аппликациями противовоспалительного препарата 8%-ного аскорбата хитозана на область сосочков и краевой десны с захватом 1-2 см слизистой оболочки альвеолярного отростка у больных с гингивитом и, дополнительно, инстилляцией в пародонтальные карманы у больных пародонтитом. Продолжительность ежедневных обработок составляла 15 минут в течение 8 дней. Контроль за динамикой изменения концентрации цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\alpha$ ) в жидкости карманов (ЖК) осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Результаты учитывали на анализаторе StatFax 4200 («Awareness Technology», США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica v.6.0.

### **Результаты и обсуждение**

Оценка состояния местного иммунитета у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта после проведенного лечения позволила выявить ряд закономерностей. Прежде всего следует отметить, что до начала и в первые дни лечения средние концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8 в ЖК пациентов с воспалением пародонта статистически достоверно превышали норму (табл. 1). Однако к моменту клинического выздоровления уровни этих цитокинов в ЖК изменялись разнонаправленно. В частности, значения концентраций ФНО- $\alpha$  у всех групп больных

оказались существенно ниже уровня контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Средние концентрации ИЛ-1 $\beta$  во всех трех группах также достоверно снизились, тем не менее, они оставались выше по сравнению с таковыми в группе контроля. Концентрация ИЛ-8 в ЖК пациентов с хроническим гингивитом после проведенной терапии снизилась в 0,9 раз ( $p < 0,05$ ), в ЖК пациентов с ХГП легкой степени возросла в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) и практически не изменилась в группе пациентов с ХГП средней степени ( $p > 0,05$ ). При этом отсутствовало статистически достоверное различие между установившимися после лечения значениями концентраций ИЛ-8, а их уровень в 1,8-2 раза превышал норму ( $p < 0,05$ ). Важно отметить, что повышенная концентрация хемокина ИЛ-8 в ЖК пациентов всех трех групп сохранялась в процессе лечения на фоне чрезвычайно низкого уровня ФНО- $\alpha$  и высоких значений ИЛ-1 $\beta$ . Этот факт свидетельствует в пользу того, что мы наблюдали вторую (позднюю) фазу инициации продукции ИЛ-8 в ответ на стимуляцию нейтрофилов высокими концентрациями не ФНО- $\alpha$ , а ИЛ-1 $\beta$ .

Концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-1 $\alpha$  в ЖК пациентов всех групп до начала лечения были в 1,3-2 раза ниже нормы ( $p < 0,05$ ), в то время как по окончании курса лечения они возросли до нормальных значений ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

Изучение динамики колебания концентрации цитокина ФНО- $\alpha$  в ЖК выявило ее корреляцию с изменениями состояния тканей пародонта у больных в ходе проводимого лечения. Так, из рисунка 1 видно, что в первые сутки лечения концентрация ФНО- $\alpha$  у пациентов с ХГ и ХГП в 2-5 раз превышала норму ( $p < 0,05$ ). Индексные показатели состояния пародонта соответствовали разгару клинических проявлений воспалительных процессов в тканях (табл. 2). Однако уже на третьи сутки лечения уровень этого цитокина в ЖК больных всех трех групп снизился практически до нормальных значений ( $p > 0,05$ ). Этот процесс сопровождался прекращением болевых ощущений и кровоточивости десен на 1-3-и сутки лечения и исчезновением отека и гиперемии тканей на 3-5-е сутки, что подтверждалось положительной динамикой индексных показателей. Из данных таблицы 2 видно, что у больных ХГ после курса лечения с использованием 8%-ного аскорбата ХТЗ индекс РМА снизился в 24,5 раза: с  $29,40 \pm 3,50$  до  $1,20 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ); у больных ХГП легкой степени – в 17 раз:  $38,30 \pm 4,90$  до  $2,25 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ); у пациентов с ХГП средней степени - в 14,7 раза: с  $49,70 \pm 5,42$  до  $3,37 \pm 0,64$  ( $p < 0,05$ ). Эффект противовоспалительного воздействия составил 95,9, 94,1 и 89,1% соответственно.

Также было установлено, что на фоне проведения традиционной терапии в сочетании с аппликациями препарата 8%-ного аскорбата хитозана у больных ХГП средней степени в 1-5-е сутки отмечался значительный рост уровня ИЛ-1 $\beta$  (в 2,5 раза), а на 8-10-е сутки наступал глубокий спад примерно в 4 раза относительно максимального значения (рис. 2).

Аналогичная динамика наблюдалась и у больных ХГ и ХГП легкой степени с единственной разницей, что всплеск уровня ИЛ-1 $\beta$  в начале лечения был несколько слабее, а падение средних значений концентраций этого цитокина происходило в среднем на 2-3 суток раньше.

Как известно, ИЛ-1 $\beta$  в высоких концентрациях является праймирующим фактором для нейтрофилов и повышает их жизнеспособность, замедляя апоптоз, а ФНО- $\alpha$  в низкой концентрации также задерживает апоптоз нейтрофилов, а в высокой, наоборот, активирует его [10]. Таким образом, наблюдаемые нами на рисунках 1 и 2 изменения уровней цитокинов ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в ЖК в процессе лечения, по всей видимости, являются отражением процессов массового рекрутирования, праймирования и продления срока жизни нейтрофилов, осуществляющих основную защиту от пиогенных бактерий и способных существовать в анаэробных условиях пародонтального кармана [7].

**Таблица 1**

**Содержание цитокинов в ЖК у больных с воспалением тканей пародонта до и после лечения с использованием гелеподобной формы аскорбата ХТЗ (M $\pm$ m)**

Цитокин	ХГП				ХГ		Норма (n=20)
	легкой степени		средней степени		до лечения	после лечения	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения			
ФНО- $\alpha$ (пг/мл)	34,42 $\pm$ 1,56*	1,75 $\pm$ 0,04***	47,40 $\pm$ 1,73*	1,61 $\pm$ 0,09***	17,60 $\pm$ 1,91	0,60 $\pm$ 0,04***	9,74 $\pm$ 0,14
ИЛ-1 $\beta$ (пг/мл)	1830,7 $\pm$ 250,81*	1273,5 $\pm$ 174,73***	2421,7 $\pm$ 295,18*	1197,3 $\pm$ 99,91***	1715,4 $\pm$ 281,34*	711,5 $\pm$ 81,89**	706,8 $\pm$ 64,91
ИЛ-8 (нг/мл)	15,44 $\pm$ 1,39*	18,04 $\pm$ 0,77***	21,19 $\pm$ 0,35*	20,73 $\pm$ 0,34*	19,67 $\pm$ 0,42*	17,70 $\pm$ 0,65***	9,67 $\pm$ 0,53
ИЛ-1 $\alpha$ (нг/мл)	74,25 $\pm$ 4,84*	107,04 $\pm$ 5,30	61,75 $\pm$ 6,40*	105,41 $\pm$ 6,62**	44,58 $\pm$ 6,75*	95,61 $\pm$ 10,86**	95,31 $\pm$ 6,68

Примечание: (\*) – обозначены статистически значимые различия по сравнению с нормой (p<0,05); (\*\*\*) – по сравнению с данными до лечения (p<0,05).

**Таблица 2**

**Индексная оценка состояния пародонта у пациентов, леченных традиционным способом в сочетании с аппликациями препарата 8%-ного аскорбата хитозана в динамике лечения (M $\pm$ m)**

Группа	Показатель							
	РМА (%)				I. Muhlemann (y.e.)			
	до лечения	3-и сут.	5-е сут.	8-е сут.	до лечения	3-и сут.	5-е сут.	8-е сут.
ХГПл (n=25)	38,30 $\pm$ 4,90	21,30 $\pm$ 3,00*	2,75 $\pm$ 0,09*	1,25 $\pm$ 0,03*	2,10 $\pm$ 0,30	0,60 $\pm$ 0,09*	0,50 $\pm$ 0,07*	0,40 $\pm$ 0,07*
ХГПс (n=25)	49,70 $\pm$ 5,42	26,70 $\pm$ 2,02*	4,50 $\pm$ 0,15*	3,37 $\pm$ 0,64*	2,40 $\pm$ 0,70	0,80 $\pm$ 0,10	0,60 $\pm$ 0,06*	0,40 $\pm$ 0,06*
ХГ (n=20)	29,40 $\pm$ 3,50	8,40 $\pm$ 1,50*	1,30 $\pm$ 0,07*	1,20 $\pm$ 0,05*	1,90 $\pm$ 0,30	0,50 $\pm$ 0,06*	0,30 $\pm$ 0,05*	0,20 $\pm$ 0,05*

Примечание: (\*) - обозначены статистически значимые различия по сравнению с соответствующим

показателем до лечения ( $p < 0,05$ ).

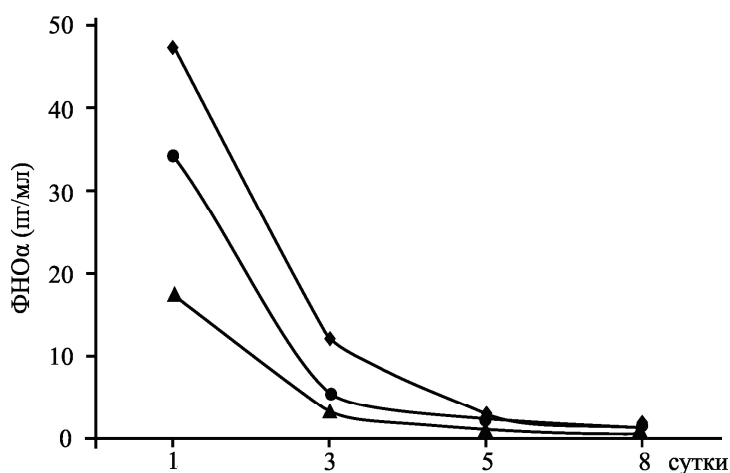


Рис. 1. Динамика изменения концентрации цитокина ФНО $\alpha$  в жидкости десневых карманов у больных с ХГ (▲-) и ХГП легкой (◆-) и средней (●-) степени

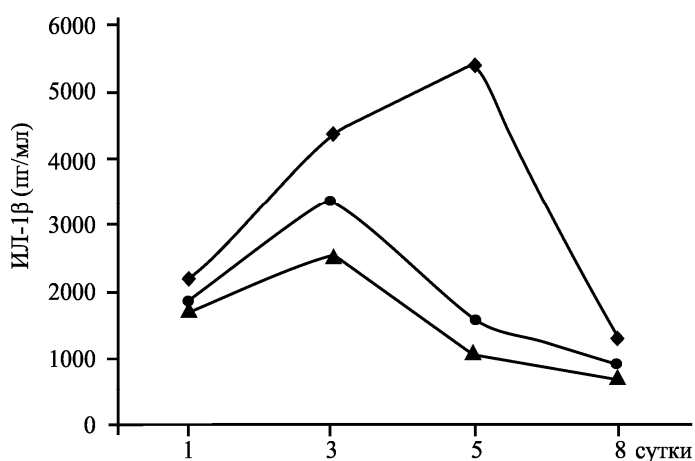


Рис. 2. Динамика изменения концентрации цитокина ИЛ-1 $\beta$  в жидкости десневых карманов у больных с ХГ (▲-) и ХГП легкой (◆-) и средней (●-) степени

### Список литературы

1. Большаков И.Н., Солнцев А.С., Майгуров А.А. и др. Способ лечения хронического пародонтита : патент РФ № 2301064. 2005.
2. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н., Егоров В.Н. Хитозан в медицине и рациональном питании. Серия: Медицина XXI века. – СПб., 2000. – С. 24.
3. Солнцев А.С., Большаков И.Н., Старостенко Т.Д. и др. Способ лечения хронического катарального гингивита : патент РФ № 2240770. 2004.

4. Царев В.Н., Ушаков Р.В., Давыдова М.Н. Микробная флора полости рта при развитии патологических процессов // Микробиология, вирусология, иммунология. – М., 2009. – С. 483-502.
5. Davanian H., Båge T., Lindberg J. et al. Signaling pathways involved in the regulation of TNF $\alpha$ -induced toll-like receptor 2 expression in human gingival fibroblasts // Cytokine. - 2012; 3: 406-416.
6. Ishihara Y., Nishihara T., Kuroyanagi T. et al. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites // J. Periodontal Res. - 1997; 6: 524-529.
7. Liu R.K., Cao C.F., Meng H.X., Gao Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis // J. Periodontol. - 2001. - V. 72. - № 11. - P. 1545-1553.
8. Roberts F.A., Darveau R.P. Beneficial bacteria of the periodontium // Periodontology - 2000. - 2002; 30: 40-50.
9. Suzuki K., Hino M., Kutsuna H. et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 $\beta$  // J Immunol. - 2001; 10: 5940-5947.
10. Van den Berg J.M., Weyer S., Weening J.J. et al. Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils // J. Leukoc Biol. - 2001; 3: 467-473.
11. Wang X., Jia H.C., Feng Y.M., Hong L.H. Chitosan-ascorbate for periodontal tissue healing and regeneration in rat periodontitis model // J. Clin. Rehabilitative Tissue Eng Res. - 2010; 12: 2268-2272.

**Рецензенты:**

Скуридин П.И., д.м.н., главный врач ГАУЗ ПО «Городская стоматологическая поликлиника», г. Пенза.

Еремина Н.В., д.м.н., зав. кафедрой стоматологии общей практики и стоматологии терапевтической ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, г. Пенза.