

О. А. Янова<sup>1</sup>, Д. С. Медведев<sup>1</sup>, Н. С. Линькова<sup>1, 2</sup>, Н. И. Трифонов<sup>1</sup>, М. М. Дьяконов<sup>1</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ КРАЙНЕВЫСОКОЧАСТОТНОЙ И ИНФРАКРАСНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: linkova@gerontology.ru; <sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

В работе изучено сочетанное влияние электромагнитного излучения крайневысокочастотного (КВЧ) и инфракрасного (ИК) диапазонов на экспрессию маркеров клеточного обновления (*Ki67*, *p53*) и провоспалительного цитокина *TNF-α* в буккальном эпителии у людей разного возраста с хроническим пародонтитом. После курса КВЧ- и ИК-терапии наблюдается повышение экспрессии пролиферотропного протеина *Ki67*, снижение синтеза проапоптозного белка *p53* и провоспалительного цитокина *TNF-α* у людей молодого, зрелого и пожилого возраста, страдающих хроническим пародонтитом. Полученные данные свидетельствуют о возможности влияния метода КВЧ- и ИК-терапии на патогенетические механизмы хронического пародонтита у людей разного возраста.

**Ключевые слова:** пародонтит, КВЧ-терапия, ИК-терапия, сигнальные молекулы, возраст

Высокая распространённость, склонность к прогрессированию и многогранное воздействие на зубочелюстную систему и организм в целом позволяют отнести заболевания пародонта к числу актуальных проблем современной медицины [15]. Распространённость воспалительных заболеваний пародонта у людей пожилого возраста составляет более 90 % [15]. Воспаление пародонта у лиц старше 60 лет усугубляется сопутствующими соматическими заболеваниями. Арсенал применяемых в пародонтологии лекарственных препаратов постоянно расширяется. Медикаментозная терапия является важнейшей составляющей комплексного лечения, однако многостороннее воздействие, оказываемое на организм, не всегда приводит к желаемому результату [10].

Одним из перспективных направлений в профилактике и комплексном лечении пародонтита у пациентов пожилого и старческого возраста является применение лечебных физических факторов. В ряде исследований показана эффективность

применения КВЧ-терапии в комплексном лечении пациентов с пародонтитом [12, 16]. Поскольку одним из основных механизмов КВЧ-терапии является повышение неспецифической резистентности организма, мобилизация иммунных и регуляторных функций [9], назначение этого метода пациентам с пародонтитом патогенетически оправдано. Вместе с тем, известно, что инфракрасное излучение может проникать на глубину 5–6 см, влиять на микроциркуляцию и проницаемость сосудов и, тем самым, способствовать удалению из тканей продуктов воспаления [7, 18]. Учитывая патогенез развития пародонтита, перспективным является изучение сочетанного влияния электромагнитного крайневысокочастотного (КВЧ) и инфракрасного излучения (ИК) в комплексном лечении пациентов старших возрастных групп, страдающих пародонтитом. В связи с этим, целью работы явилось изучение молекулярных механизмов сочетанного действия КВЧ- и ИК-терапии у людей разного возраста с пародонтитом.

### Материалы и методы

Для исследования влияния КВЧ- и ИК-излучения на течение хронического пародонтита были использованы образцы буккального эпителия (БЭ), взятые у 55 человек 45–89 лет с помощью цитощетки со слизистой оболочки щеки. БЭ был выбран нами в качестве объекта исследования в связи с тем, что его можно рассматривать как пограничную зону между внешней и внутренней средой организма [3]. Изменения функциональной активности клеток БЭ во многом отражают состояние локального и системного гомеостаза организма при патологических состояниях и старении организма [1, 4]. Цитологические мазки готовили

методом жидкостной цитологии с использованием автоматизированной системы «Novoprep NRS» (Франция).

Все пациенты были разделены на три возрастные группы в соответствии с классификацией ВОЗ: 1-я (45–59 лет,  $n=25$ ) — лица зрелого возраста; 2-я (60–74 года,  $n=20$ ) — люди пожилого возраста, 3-я — лица старческого возраста (75–89 лет,  $n=20$ ). Все группы были однородными по полу.

Облучение ротовой полости пациентов проводили с помощью аппарата КВЧ–ИК-терапии «Триомед» (ООО «Триомед», Санкт-Петербург), который представляет собой источник низкоинтенсивного излучения (менее 10 мкВт/см<sup>2</sup>) электромагнитных волн крайневисокочастотного и инфракрасного диапазонов для неинвазивного воздействия на участки кожного покрова человека (Рег. удост. ФСР № 2009/06554 от 17 августа 2012 г.). В работе использовали излучатели «Противовоспалительный» и «Инфракрасный» (программы модуляции № 26 и № 5 по единому реестру программ производителя). В течение одной процедуры с помощью КВЧ-излучателя и ИК-излучателя проводили поочередное воздействие на правую и левую стороны верхней челюсти, правую и левую стороны нижней челюсти, по 5 мин на каждую зону. Таким образом, общее время одного сеанса составило 20 мин. Процедуру проводили ежедневного в утренние часы в течение 10 дней. Забор БЭ осуществляли за 1 сут до начала первого сеанса облучения и на следующий день после проведения последнего сеанса.

Полученный материал БЭ подвергали иммуноцитохимическому исследованию. Для этого использовали первичные моноклональные антитела к маркерам *Ki67* (1:50, Novocastra), *p53* (1:75, Novocastra) и *TNF-α* (1:75, Dako) и вторичные антитела — биотинилированные антимышинные иммуноглобулины (все реагенты от «Novocastra»). Пермеабиллизацию проводили с применением 0,1% тритона X100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидина («EnVision Detection System», Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse).

Оценку результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическим методом на микроскопе «Nikon Eclipse E400» с помощью цифровой камеры «Nikon DXM1200» и программного обеспечения Videotest Morphology 5.2. В каждом случае анализировали 10 полей зрения при ув. 200. Площадь экспрессии рассчитывали

как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Выбор исследуемых сигнальных молекул был обусловлен их участием в процессах клеточного обновления (пролиферотропный протеин *Ki67* и проапоптозный белок *p53*) и развитии воспалительной реакции — цитокин *TNF-α*.

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли в программе Statistica 7.0. Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, который является наиболее точным методом для сравнения выборок, включающих около 20–30 элементов. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

После проведения курса КВЧ- и ИК-терапии все пациенты отмечали улучшение состояния. Пациенты отмечали снижение выраженности основных симптомов пародонтита — уменьшение кровоточивости десен, исчезновение неприятного запаха изо рта и отсутствие гнойных выделений из зубов. Экспрессия изученных сигнальных молекул *Ki67*, *p53* и *TNF-α* была выявлена во всех изученных образцах БЭ пациентов с пародонтитом. Однако уровень экспрессии различался в зависимости от возраста пациента и терапии.

Площадь экспрессии проапоптозного белка *p53* в БЭ пациентов до лечения была несколько выше у лиц пожилого возраста по сравнению с молодыми людьми и лицами зрелого возраста (рис. 1). После проведения курса КВЧ–ИК-терапии во всех исследуемых возрастных группах наблюдали снижение выраженности апоптоза в БЭ: у людей молодого возраста — в 4,03 раза, у лиц зрелого возраста — в 2,33 раза и у людей пожилого возраста — в 3,11 раза.

Площадь экспрессии пролиферотропного протеина *Ki67* в БЭ пациентов до лечения имела выраженную возрастную зависимость (рис. 2). Так, при переходе от молодого к зрелому возрасту и переходе от зрелого возраста к пожилому, площадь экспрессии *Ki67* снижалась примерно в 2 раза. Выявленное возрастное снижение способности клеток БЭ к пролиферации характерно практически для всех тканей организма и отражает системные процессы возрастной инволюции. После курса КВЧ- и ИК-терапии у лиц молодого возраста пролиферативная способность клеток не изменялась, а

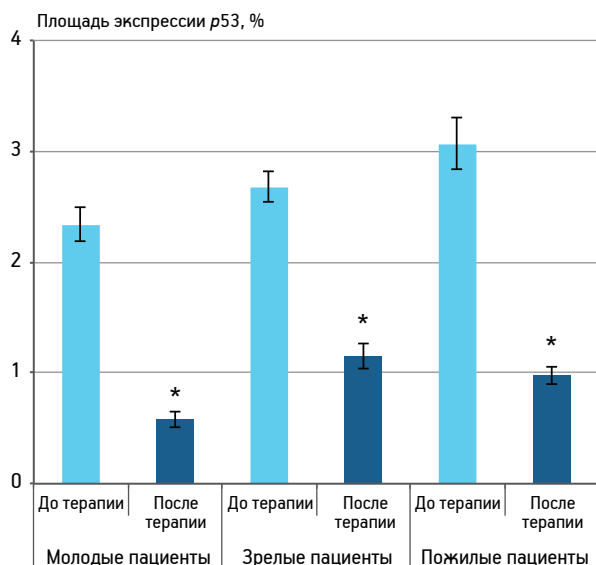


Рис. 1. Влияние KBЧ–ИК-излучения на экспрессию проапоптозного протеина p53 в буккальном эпителии пациентов разного возраста с пародонтитом.

Здесь и на рис. 2, 3: \*  $p < 0,05$  по сравнению с соответствующим показателем до применения KBЧ–ИК-терапии

у лиц старше 45 лет наблюдали повышение способности БЭ к пролиферации. Так, площадь экспрессии Ki67 возрастала у лиц зрелого возраста в 2,62 раза, у людей пожилого возраста — в 3,16 раза.

Площадь экспрессии провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  в БЭ пациентов всех исследуемых возрастных групп до лечения находилась на достаточно высоком уровне, что свидетельствует о наличии хронического воспалительного процесса (рис. 3). После курса KBЧ- и ИК-терапии во всех исследуемых возрастных группах наблюдали сильное снижение экспрессии TNF- $\alpha$  в БЭ: у людей молодого возраста — в 7,47 раза, у лиц зрелого возраста — в 6,08 раза, у людей пожилого возраста — в 6,25 раза.

Ранее было установлено, что при воспалении пародонта наблюдается повышение уровня экспрессии белка p53, что коррелирует со степенью повреждения ДНК [8, 14]. Эти результаты хорошо согласуются с полученными нами данными до лечения пациентов и указывают на способность KBЧ- и ИК-терапии нивелировать повреждения ДНК и гибель клеток при пародонтите у пациентов разного возраста.

В другом исследовании авторы указывают на тесную связь между активацией апоптоза клеток при хроническом пародонтите и снижением их пролиферативной способности, что также согласуется с нашими данными. Так, у 60 больных с хроническим пародонтитом на фоне рефрактерной

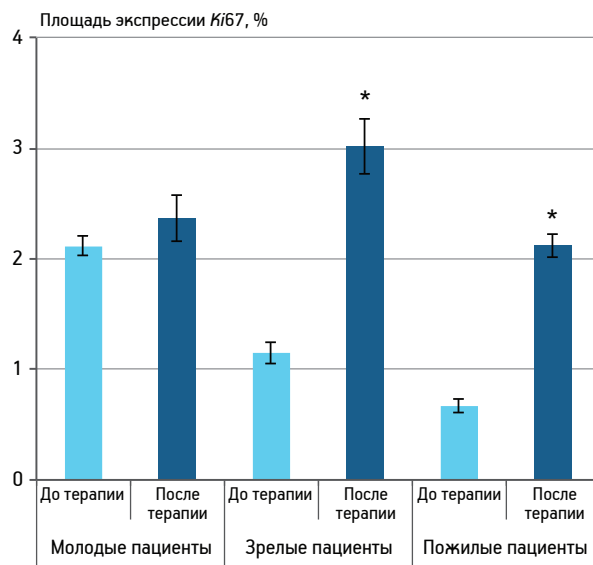


Рис. 2. Влияние KBЧ–ИК-излучения на экспрессию пролиферотропного протеина Ki67 в буккальном эпителии пациентов разного возраста с пародонтитом

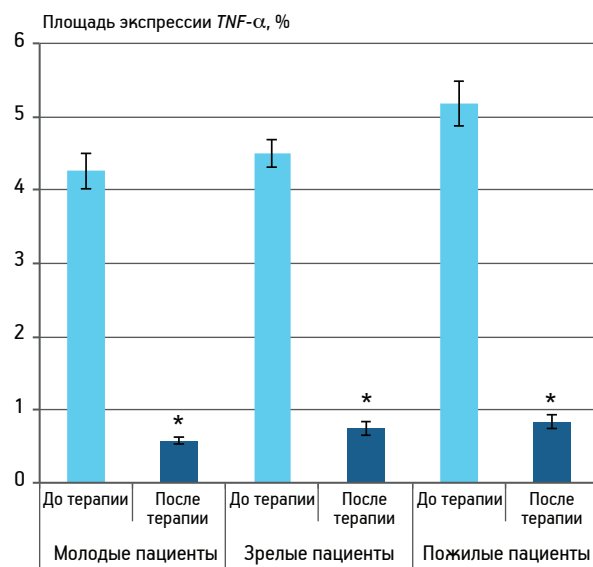


Рис. 3. Влияние KBЧ–ИК-излучения на экспрессию провоспалительного цитокина TNF  $\alpha$  в буккальном эпителии пациентов разного возраста с пародонтитом

формы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни «клеточная пролиферация характеризуется прогрессирующим отставанием от апоптозной активности эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта» [2]. При этом нами установлено, что KBЧ–ИК-излучение стимулирует смещение баланса процессов клеточного обновления в сторону преобладания процессов пролиферации над апоптозом.

Известно, что при хроническом пародонтите значительно повышается экспрессия провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$

[13, 17]. Эффективность противовоспалительного действия некоторых лекарственных средств, например 5% линимента циклоферона, основана на нормализации цитокинового баланса в десневой жидкости [17]. Увеличение выработки *TNF-α* вызывает повышение секреции *IL-1* и *IL-6*, которые способствуют снижению костной массы [13]. *TNF-α* подавляет функцию остеобластов: угнетает их способность вырабатывать матрикс, участвующий в минерализации, блокирует дифференциацию предшественников остеобластов, вызывает устойчивость остеобластов к кальцитриолу. *TNF-α* стимулирует экспрессию генов, способствующих костной резорбции (гены *IL-6*, *RANKL* и др.), и подавляет экспрессию генов, ингибирующих костеобразование (гены *VDR*, остеокальцина и др.) [5, 6].

Таким образом, повышение экспрессии *TNF-α* играет определяющую роль в патогенезе пародонтита. После курса лечения циклофероном у пациентов с пародонтитом снижается уровень провоспалительных цитокинов, *TNF-α* и *IFN-γ* и повышается уровень противовоспалительных цитокинов *IL-4* и *IL-10* [11]. Полученные нами данные свидетельствуют, что КВЧ–ИК-излучение имеет сходный механизм действия, в 6–7 раз снижая экспрессию провоспалительного цитокина *TNF-α* у пациентов с хроническим пародонтитом.

### Заключение

Таким образом, было установлено, что сочетанное применение КВЧ- и ИК-терапии способствует повышению экспрессии пролиферотропного протеина *Ki67*, снижению синтеза проапоптозного белка *p53* и провоспалительного цитокина *TNF-α* у людей молодого, зрелого и пожилого возраста с хроническим пародонтитом. Поскольку в основе патогенеза хронического пародонтита лежит нарушение экспрессии указанных сигнальных молекул, сочетанное применение КВЧ- и ИК-терапии можно отнести к патогенетическому методу лечения данного заболевания у людей разного возраста.

### Литература

1. Кветная Т.В., Линькова Н.С., Седов Е.В. и др. Экспрессия факторов дифференциации и ремоделирования межклеточного матрикса в буккальном эпителии человека при старении // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 3. С. 432–436.
2. Осадчук М.А., Булкина Н.В. Пролиферативная активность эпителиоцитов десны в патогенезе хронического генерализованного пародонтита у больных рефрактерной формой гастроэзофагиальной рефлюксной болезни // Бюл. мед. интернет-конф. 2013. Т. 3. № 3. С. 134–139.
3. Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О. и др. Сигнальные молекулы в буккальном эпителии: оптимизация диагностики социально значимых заболеваний // Молекул. мед. 2012. № 4. С. 18–23.
4. Седов Е.В., Линькова Н.С., Козлов К.Л. и др. Буккальный эпителий как объект оценки биологического возраста и темпа старения организма // Успехи геронтол. 2013. Т. 26. № 4. С. 610–613.
5. Boughman J.A. Problems of genetic model testing in early onset periodontitis // J. Periodontol. 1998. Vol. 59. № 5. P. 332–337.
6. Checchi L. Test genetico e microbiologico nella malattia parodontale // Miherva stomatol. 2004. Vol. 53. № 6. P. 345–353.
7. Drobyshev V.A., Filippova G.N., Loseva M.I. The use of low-frequency magnetotherapy and EHF puncture in the combined treatment of arterial hypertension in vibration-induced disease // Vopr. Kurortol. Fizioter Lech. Fiz. Kult. 2000. Vol. 3. P. 9–11.
8. Gamonal J., Bascones A., Acevedo A., Blanco E., Silva A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry // J. Periodontol. 2001. Vol. 72. № 4. P. 517–525.
9. Gapeev A.B., Romanova N.A., Chemeris N.K. Changes in the chromatin structure of lymphoid cells under the influence of low-intensity extremely high-frequency electromagnetic radiation against the background of inflammatory process // Biofizika. 2011. Vol. 56. № 4. P. 688–695.
10. Iordanishvili A.K., Soldatov S.V., Moskalev A.V. et al. Methodical approaches to treatment of the chronic generalized periodontitis in elderly and senile patients // Adv. Geront. 2011. Vol. 24. № 3. P. 515–520.
11. Javed F., Ahmed H.B., Mikami T. et al. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with chronic periodontitis // J. Investig. Clin. Dent. 2014. Vol. 5. № 1. P. 1–8.
12. Kazarina L.N., Okulova Iu. V. Influence of HFF-range radiation therapy upon dynamics of biochemical indices in patients with chronic generalized periodontitis // Stomatologija. 2007. Vol. 86. № 4. P. 22–24.
13. Kotake S., Nanke Y. Effect of *TNFα* on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1840. № 3. P. 1209–1213.
14. Kuzenko E.V., Romaniuk A.N., Politun A.M., Moskalenko R.A. Pathogenesis of periodontal cell DNA damage during periodontitis // Georg. Med. News. 2013. Vol. 217. P. 57–61.
15. Plessas A. Nonsurgical periodontal treatment: review of the evidence // Oral Hlth Dent. Manag. 2014. Vol. 13. № 1. P. 71–80.
16. Samoïlovich V.A. The immunological assessment of exposure to millimeter electromagnetic waves in periodontosis // Lik Sprava. 1996. Vol. 7–9. P. 151–154.
17. Soboleva L.A., Siakin R.R., Blinnikova E.N. et al. Parodontitis immunotropic therapy in patients with chronic viral and bacterial infections // Stomatologija. 2010. Vol. 89. № 3. P. 20–22.
18. Tsimmerman I.S., Teliaper I.I. Effectiveness of ulcer treatment with electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF therapy) and some mechanism of its therapeutic action // Klin. Med. (Mosk). 2002. Vol. 80. № 5. P. 13–18.

*O. A. Yanova<sup>1</sup>, D. S. Medvedev<sup>1</sup>, N. S. Linkova<sup>1,2</sup>, N. I. Trifonov<sup>1</sup>, M. M. Dyakonov<sup>1</sup>*

**MOLECULAR MECHANISMS OF COMBINED EXTREMELY RADIOFREQUENCY AND INFRARED THERAPY  
IN VARIOUS AGE PATIENTS WITH CHRONIC PARODONTITIS**

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3, pr. Dinamo, St. Petersburg 197110;  
e-mail: linkova@gerontology.ru; <sup>2</sup> Saint-Petersburg State Polytechnic University, 29 ul. Polytekhnicheskaya,  
St. Petersburg 195251

The influence of extreme radiofrequency millimeter microwave (EHF) and infrared (IR) electromagnetic emanation on the molecular markers of cell renovation (*Ki67*, *p53*) and proinflammatory cytokine *TNF- $\alpha$*  expression in the buccal cells of various age patients with chronic parodontitis was investigated. The results show that EHF- and IR-electromagnetic emanation increased *Ki67* proliferative marker expression and decreased expression of proapoptosis protein *p53* and proinflammatory cytokine *TNF- $\alpha$*  in the buccal epithelium of young, middle-aged and elderly people with chronic parodontitis. The data obtained open the new ability for patogenetic treatment of various age patients with chronic parodontitis using the EHF- and IR-electromagnetic emanation method.

**Key words:** *parodontitis, EHF-emission, EHF-emission, signal molecules, age*