

УДК 616.314.18-002.4:577.15

**Оценка цитокинового профиля и активности ферментов десневой жидкости у жителей г. Волгограда с интактным пародонтом и при пародонтите легкой степени тяжести**

Патрушева М. С., Михальченко В. Ф., Яковлев А. Т.

Включение биохимических и иммунологических исследований десневой жидкости в комплексное обследование больных пародонтитом позволяет повысить эффективность диагностики и лечения данной патологии. Показано, что уже на ранних стадиях пародонтит сопровождается значительными нарушениями метаболизма и местного иммунного ответа, предшествующими клиническим проявлениям.

Ключевые слова: *пародонтит легкой степени тяжести, десневая жидкость, ферменты, цитокиновый профиль, местный иммунитет,  $\alpha$ -амилаза, фосфолипаза A2, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа.*

**The assesment of the cytokine profile and the enzymatic activity of gingival crevicular fluid at the residents of Volgograd with intact periodontium and in patients with mild periodontitis**

Patrusheva M. S., Mikhalchenko V. F., Yakovlev A. T.

The inclusion of biochemical and immunological analysis of gingival crevicular fluid in the complex examination of patients with periodontitis allows to increase the efficiency of the diagnosis and treatment of this disease. It is shown, that already in the early stages, periodontal disease are accompanied by considerable disorders of metabolism and local immune response, preceding clinical implications.

Keywords: *mild periodontitis, gingival crevicular fluid, enzymes, cytokine profile,  $\alpha$ -amylase, phospholipase A2, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase.*

Из-за физиологического строения и многообразия функций, полость рта тесно связана с внутренней средой организма и одной из первых реагирует

на внешние воздействия, в связи с чем изучение особенностей формирования и клинического течения заболеваний пародонта с учетом различных биотопов является актуальным направлением [2, 5] Кроме того, максимальная индивидуализация лечебных и диагностических мероприятий и их фокус на пациенте являются основными принципами современной врачебной практики [5,10].

В связи с иммунными реакциями, развивающимися в ответ на микробную инвазию, клинические проявления воспалительной инфильтрации до определенного момента отсутствуют, а ткани десны при визуальном обследовании соответствуют норме [3,14].

Таким образом, адекватная оценка состояния больного пародонтитом в современных условиях предполагает комплексное обследование, включающее в себя помимо традиционных клинических методов также биохимические и иммунологические исследования, которые позволяют объективизировать состояние больного пародонтитом, прогнозировать течение болезни и анализировать эффективность лечебных мероприятий [9,12].

Цель исследования: изучить активность ферментов и цитокиновый профиль десневой жидкости у жителей г. Волгограда и определить возможность использования данных показателей в целях ранней диагностики и контроля эффективности лечения начальных форм пародонтита.

### **Материалы и методы исследования**

Было проведено обследование 106 человек, жителей г. Волгограда, в возрасте 21—35 лет (ранний зрелый возраст по систематизации ВОЗ) с хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести без выраженной соматической патологии и давностью заболевания до 5 лет.

Выбор данной возрастной группы обоснован закономерностями функционирования иммунной системы: в 18—45 лет связанность между компонентами иммунной системы достигает стабильного уровня. Контрольную группу составили 22 добровольца в возрасте 20—25 лет с интактным пародонтом.

Для выявления субклинических локальных изменений в тканях пародонта, дополнения клинической картины проводилось лабораторное исследование десневой жидкости, включавшее в себя измерение активности ферментов и оценку цитокинового профиля. Забор десневой жидкости

производили по методике Чукаевой Н. А., 1990 [1] при помощи разработанного нами оригинального приспособления, представляющего собой градуированный шприц с мягкой неметаллической насадкой-канюлей.

Оценку цитокинового профиля десневой жидкости: интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ); интерлейкина-4 (ИЛ-4); фактора некроза опухолей —  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя соответствующие наборы фирмы «Цитокин» (г. Санкт-Петербург) и «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). При исследовании ферментов определялась активность щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ),  $\alpha$ -амилазы (с помощью наборов реактивов фирмы «Olvex» (г. Санкт-Петербург) на фотометре «Микролаб-200» (Германия) и фосфолипазы А2 (ФЛА) (с использованием модифицированной методики Ханана [6]). При статистической обработке клинических и лабораторных данных для каждого параметра рассчитывались следующие величины: средние арифметические величины (М), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ), ошибки репрезентативности (m). Достоверность различий между группами (p) оценивали по критерию Стьюдента (t). Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ ;  $t \geq 2$ .

## Результаты исследования

У лиц с интактным пародонтом в исследуемых образцах определялось наличие как про-так и противовоспалительных цитокинов. Присутствие провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  биологически оправдано и является защитной реакцией организма против микробной инвазии т. к. в зубодесневой борозде постоянно находятся скопления микроорганизмов. Противовоспалительный ИЛ-4 выполняет регуляторную функцию, сдерживая продукцию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , поддерживая баланс в системе цитокинов и обеспечивая таким образом адекватный локальный иммунный ответ и направляя его развитие по Th2-типу (стимуляция поликлональной активации В-лимфоцитов). Активация гуморального звена иммунитета, сопровождающаяся усилением антителообразования, обеспечивает защиту преимущественно от внеклеточных патогенов — бактерий и их токсинов, каковыми и являются пародонтопатогены, в то время как клеточное звено (Т-цитотоксические лимфоциты) ориентировано преимущественно на борьбу с внутриклеточными агентами — вирусами, грибковой микрофлорой, некоторыми бактериями и простейшими.

Низкое значение соотношения ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-4 (8,44 $\pm$ 0,12) свидетельствует о том, что система цитокинов находится в равновесии (таблица 1).

*Таблица 1 — Цитокиновый профиль десневой жидкости у лиц с интактным пародонтом и у больных пародонтитом легкой степени тяжести (M $\pm$ m)*

Группа обследования	Показатели			
	ИЛ-1 $\beta$ (пг/мл)	ИЛ-4 (пг/мл)	ИЛ-1/ИЛ-4	ФНО $\alpha$ (пг/мл)
Интактный пародонт	95,22 $\pm$ 1,84	11,30 $\pm$ 0,22	8,44 $\pm$ 0,12	48,05 $\pm$ 0,30
Пародонтит легкой степени	304,79 $\pm$ 1,27*	3,56 $\pm$ 0,02*	85,82 $\pm$ 0,24*	813,3 $\pm$ 3,03*

\* достоверность различий между группами  $p < 0,05$

ИЛ-1 $\beta$  — интерлейкин 1-бета

ИЛ-4 — интерлейкин-4

ФНО $\alpha$  — фактор некроза опухолей — альфа.

По мнению ряда авторов [13] на содержание цитокинов может оказывать влияние ряд факторов, таких как генетические особенности, возраст, социальная среда, экологические условия и т. д., поэтому считаем целесообразным сравнить полученные нами данные с результатами исследований, проведенных в других регионах.

Анализ данных литературы показал, что содержание цитокинов в десневой жидкости подвержено значительным колебаниям в различных регионах, т. е. являются фенотипически обусловленными, что следует учитывать при проведении научных исследований и диагностических процедур (таблица 2).

*Таблица 2 — Цитокиновый профиль десневой жидкости у лиц с интактным пародонтом в различных регионах ( $M \pm m$ )*

	<b>Возраст</b>	<b>ИЛ-1<math>\beta</math></b>	<b>ФНО<math>\alpha</math></b>	<b>ИЛ-4</b>
Результаты собственного исследования	20—25	95,22 $\pm$ 1,84	48,05 $\pm$ 0,3	11,3 $\pm$ 0,22
Т. П. Иванюшко с соавт., 2000 (Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова) [4]	19—48	84,0 $\pm$ 52,0	128,0 $\pm$ 7,0	360,0 $\pm$ 91,0
Д. В. Шмидт, 2009 (Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург) [11]	20—53	402,6	6,3	—
Л. В. Лукина, 2007 (Саратовский государственный медицинский университет) [7]	18—30	117,23 $\pm$ 25,56	70,54 $\pm$ 11,56	13,51 $\pm$ 1,21
S. Offenbacher et al., 2010 (США) [15]	—	283,0 $\pm$ 11,0	47,0 $\pm$ 0,8	72,0 $\pm$ 13,0
A. Rawlinson et al, 2003 (Великобритания) [16]	—	393,8	—	—

Присутствие ферментов в жидкости зубодесневой борозды у лиц со здоровым пародонтом объясняется жизнедеятельностью микроорганизмов, локальными защитными реакциями макроорганизма, такими как фагоцитоз, а также метаболическими процессами, в норме протекающими в тканях пародонта (таблица 3).

*Таблица 3 — Активность ферментов десневой жидкости у лиц с интактным пародонтом и у больных пародонтитом легкой степени тяжести ( $M \pm m$ )*

<b>Группа обследования</b>	<b>Показатели</b>			
	<b>ШФ</b> (мкмоль/л)	<b>ЛДГ</b> (мкмоль/л)	<b><math>\alpha</math>-амилаза</b> (мкмоль/л)	<b>ФЛА</b> (мкмоль/л)

Интактный пародонт	4,49±0,16	172,32±1,2	4,71±0,18	1,23±0,01
Пародонтит легкой степени	8,58±0,07*	471,68±1,43*	2,29±0,03*	5,7±0,05*

\* достоверность различий между группами  $p < 0,05$

ЩФ — щелочная фосфатаза

ЛДГ — лактатдегидрогеназа

ФЛА — фосфолипаза А2

Провести сравнение полученных данных об активности ферментов десневой жидкости с результатами исследований других авторов не представилось возможным из-за слишком больших различий в методиках исследований и единицах измерений (данные не сопоставимы).

У больных хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести отмечались выраженные изменения цитокинового профиля и ферментного состава десневой жидкости.

Концентрация ИЛ-1 $\beta$  возросла в 3,2 раза, содержание ФНО $\alpha$  возросло в 16,9 раза по сравнению с контрольной группой. Такое увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в десневой жидкости у больных пародонтитом связано с изменениями качественного и количественного состава микрофлоры за счет формирования пародонтального кармана, являющегося благоприятной средой для размножения микроорганизмов и обилием зубных отложений вследствие неудовлетворительной гигиены. Именно микробный фактор является иницирующим в запуске каскада цитокиновых реакций, причем ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  играют ключевую роль в этом процессе, первыми появляясь в очаге поражения и регулируя выработку других цитокинов [8]. Высокие концентрации ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в десневой жидкости косвенным образом свидетельствуют о скоплении макрофагов и тучных клеток в очаге поражения, т. к. именно они являются основными продуцентами указанных цитокинов. Эти клетки в условиях дискоординации иммунного ответа, вызывают деструкцию тканей пародонта за счет

высвобождения агрессивных биологических веществ и активации процессов перекисного окисления липидов.

Уровень ИЛ-4, ингибирующего секрецию макрофагами провоспалительных цитокинов, напротив, в 3,2 раза ниже, чем в контрольной группе.

Таким образом, при пародонтите легкой степени тяжести происходит достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение содержания основных провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  на фоне снижения выработки противовоспалительного ИЛ-4, что приводит к смещению соотношения ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-4 в сторону ИЛ-1 $\beta$  и увеличению значений этого показателя в 10,2 раза. Этот дисбаланс в системе цитокинов имеет патогенетическое значение в развитии заболеваний пародонта.

Ферментный состав десневой жидкости при пародонтите легкой степени также значительно отличается от такового при интактном пародонте.

Активность ЩФ в 2 раза превышает показатели в контрольной группе. Высокая активность ЩФ при пародонтите связана с деструктивными процессами в тканях пародонта, усилением метаболизма костной ткани, скоплением большого количества нейтрофилов в очаге поражения, в лизосомах которых содержится высокие концентрации этого фермента, а также обилием продуцирующих ЩФ микроорганизмов.

Активность ЛДГ при пародонтите легкой степени в 2,7 раза выше, чем в контрольной группе. Такое локальное повышение активности ЛДГ свидетельствует о распаде клеточных элементов десны и процессах анаэробного гликолиза, приводящего к защелачиванию среды, снижению фагоцитарной активности лейкоцитов и развитию процессов перекисного окисления липидов.

ФЛА является маркером острой фазы заболевания и свидетельствует о нарушении целостности клеточных мембран, а также участвует в синтезе эйкозаноидов. Ее активность при пародонтите легкой степени в 4,6 раза выше, чем в контрольной группе.

Активность  $\alpha$ -амилазы, напротив, достоверно ниже показателей контрольной. Снижение активности данного фермента в 2 раза по сравнению с его уровнем при интактном пародонте свидетельствует о снижении функциональной активности клеточных элементов слюнных желез и тканей пародонта вследствие их интоксикации продуктами распада тканей и жизнедеятельности микроорганизмов, а также о наличии ацидоза.

Следует также отметить, что у больных пародонтитом легкой степени тяжести со слабо выраженной клинической симптоматикой активность ферментов и концентрация цитокинов десневой жидкости достоверно не отличались от таковых у пациентов с явными воспалительными явлениями в тканях пародонта, хотя рентгенологическая картина у них была идентичной и соответствовала поставленному диагнозу. На основании этого наблюдения можно сделать вывод о том, что иммунологические и биохимические сдвиги предшествуют клиническим проявлениям заболевания, т. е. лабораторный анализ десневой жидкости является методом доклинической диагностики.

### **Заключение**

Таким образом, полученные результаты позволяют глубже понять патогенез начальных форм пародонтита. Сочетанное определение концентрации цитокинов и активности ферментов в десневой жидкости позволяют всесторонне оценить как патологические изменения при наличии заболевания, так и положительные сдвиги в процессе лечения. Если дисбаланс в системе цитокинов является индикатором начала воспалительного процесса, особенно это касается ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , уровень которых первым повышается при воспалении, то повышенная активность ферментов, таких как ЛДГ, ЩФ, ФЛА, говорит об уже идущей деструкции тканей пародонта или остаточных деструктивных явлениях, т. е. по этим критериям можно дать характеристику как «причине» — неадекватному локальному иммунному ответу на микробную инвазию, так и «следствиям» — разрушению тканей и структур пародонта, которое в более поздние сроки приведет к характерным клиническим проявлениям. Полученные данные могут быть использованы в качестве контроля как для дальнейших исследований так и в практическом здравоохранении в целях диагностики и контроля эффективности лечения.

### **Список литературы**

1. Антипова О. А. Транскраниальная электростимуляция в комплексном лечении больных пародонтитом: клинико-иммунологические аспекты: дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.21.- Волгоград, 2005.- 121 с.



2. Галикеева А. Ш. Экологические аспекты дисэлементозов у лиц с заболеваниями пародонта // Тезисы докладов международной конференции «Социальная ответственность работодателя за здоровье работника».- М.-25-26 июня.-2003.- С.25.
3. Григорьян А. С., Фролова О. А. Морфофункциональные основы клинической симптоматики воспалительных заболеваний пародонта // Стоматология.- 2006.- №3.- С.11—17.
4. Иванюшко Т. П., Ганковская Л. В., Ковальчук Л. В. [и др.] Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите // Стоматология.- 2000.-№4.- С.13—16.
5. Леонтьев В. К., Колпаков В. В., Брагин А. В. Концепция типовой вариабельности физиологической индивидуальности — фундаментальная основа системной профилактики и комплексной терапии в стоматологии // Стоматология.- 2005.-№5.-С.4—8.
6. Липолитические ферменты. Пер с англ./ Брокерхоф Х., Джексон Р.; под ред. Л. Б. Браунштейна, Е. В. Горячевой.-М.: Мир, 1978.- 396 с.
7. Лукина Л. В. Клинико-иммунологическое исследование эффективности применения иммуномодулятора гепона в комплексной терапии больных пародонтитом: автореф. дис. ...канд. мед. наук / Л. В. Лукина: Волгоград, 2007.-26 с.
8. Пародонтология. Пер. с нем. / Г. Ф. Вольф [и др.]; под ред. Г. М. Барера.- М.: МЕДпресс-информ, 2008.-548 с.
9. Патрушева М. С., Михальченко В. Ф., Яковлев А. Т. Роль сочетанного определения цитокинового профиля и активности ферментов десневой жидкости в диагностике пародонтита лёгкой степени тяжести // Вестник новых медицинских технологий, Тула.-2012.- Т.ХІХ, №3.-С. 124—125.
- 10.Петров В. И., Недогода С. В. Медицина, основанная на доказательствах : учебное пособие // М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 144 с.
- 11.Шмидт Д. В. Цитокины десневой жидкости; их роль в патогенезе и контроле лечения хронического пародонтита: автореф. дис. ...канд. мед. наук / Д.В. Шмидт.- Пермь.- 2009.- 21 с.

12. Armitage G. C. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis // *Periodontology* 2000.- 2004.- № 34.- P. 109—119.
13. Fitzsimmons T. R. Biomarkers of periodontal inflammation in the Australian adult population // *Aust. Dent. J.*- 2009.- Vol.54.- № 2.- P.115—122.
14. Hetz G. Пародонтология сегодня. Часть 2. Профессиональные методы диагностики и лечения // *Новое в стоматологии.*- 2001.- № 8.- С.39—48.
15. Offenbacher H. S. Changes in Gingival Crevicular Fluid Inflammatory Mediator Levels during the Induction and Resolution of Experimental Gingivitis in humans // *J. Clin. Periodontol.* -2010.- Vol. 3.- №74.- P. 324—333.
16. Rawlinson A., Grummit J. M., Walsh T. F. Interleukin 1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus non-smokers // *J. Clin. Periodontol.*- 2003.- №1.- P. 42—48.