

Сергеева И.Е.,
Борисенко А.В.,
Яременко Л.М.,
Брюзгина Т.С.

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО ОТВЕТА И ОБМЕНА ЛИПИДОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА, ОБОСТРИВШЕГОСЯ ТЕЧЕНИЯ

Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца

Резюме. Авторами приведены диагностические критерии патогенетических изменений при обострении течения ГП I-II степени. Комплексно представлены изменения соотношения насыщенности жирных кислот в биологических средах пациентов, показатели активации пероксидации липидов и субкомпенсаторное состояние антиоксидантной системы, превалирование активности ферментативных процессов в очагах воспаления и недостаточности индукции *serpin* – антиэластазы, при тенденции к абсолютному снижению показателя CD8 в тканях пародонта, но достаточно выраженной цитотоксичности нейтрофилов, индукции ИЛ-2, ИЛ-8, CD25, CD54.

Ключевые слова: генерализованный пародонтит, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, жирные кислоты, цитокины.

На основании анализа работ последних лет, касающихся патофизиологических аспектов развития генерализованного пародонтита, сложно однозначно оценить значение инфильтрации нейтрофилами (Н), особенно в очагах с высоким содержанием хемоаттрактанта ИЛ-8 [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. В связи с тем, что Н способны нейтрализовать микроорганизмы и клетки-мишени путем фагоцитоза, но и вследствие выделения различных бактерицидных веществ, введены понятия «цитотоксичности» и «бактерицидности» Н. При рассмотрении механизмов антителозависимой (АТЗ) цитотоксичности нейтрофилов авторами учитываются:

- респираторный взрыв с участием кислородных радикалов;
- активация ферментов, миелопероксидазы (МПО) и взаимодействие с H_2O_2 ;
- активация системы перфорин-гранзимы;
- кислороднезависимый лизис – выделение ферментов из гранул, а также неферментных дефензинов.

В патогенезе генерализованного пародонтита (ГП), в частности, при исследовании механизмов воспаления и деструкции тканей, немаловажная роль отводится мембрано-повреждающим процессам, связанным с избыточным действием и накоплением синглетного кислорода, радикалов вследствие перекисного окисления белков и липидов (ПОЛ) [8, 9, 10, 11, 12].

Смещение прооксидантного и оксидантного равновесия, увеличение количества активных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) – продукта ненасыщенных жирных

кислот, малонового диальдегида (МДА), супероксиддисмутазы (СОД) при усилении ПОЛ в мембранах, активации фосфолипаз и угнетения ферментов антиоксидантной защиты приводит к дестабилизации структуры ДНК-клеток, в том числе, и к нарушению функции иммунокомпетентных клеток, их активации и экспрессии адгезивных молекул [12, 13, 14].

В связи с этим, возникает вопрос: в какой степени потенциальные стимуляторы метаболизма кислорода и изменения соотношения насыщенности жирных кислот и их продуктов оксигенизации влияют на миграцию нейтрофилов в очагах повреждения тканей пародонта?

Цель исследования: провести сравнительный анализ степени угнетения ферментов системы антиоксидантной защиты (АОЗ), баланса насыщенности жирных кислот, ингибитора эластазы (SLPI), молекул адгезии и провоспалительных цитокинов в периферической крови пациентов ГП I-II степени, обострившегося течения и тождественных показателей, содержимого полости рта, для определения значимости кислородозависимых механизмов в деструктивных процессах пародонта.

Материалы и методы исследования

Обследовано 96 пациентов ГП I-II степени, обострившегося течения и 24 человека контрольной группы в возрасте 20-55 лет. Диагноз поставлен в соответствии с классификацией заболеваний пародонта Н.Ф.Данилевского (1994) и рекомендаций кафедры терапевтической стоматологии НМУ имени А.А.Богомольца. Проведены обще-

принятые клинические, индексные оценки состояния пародонта, ортопантомография, специальные иммунологические, биохимические методы, метод газовой хроматографии. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась на персональном компьютере, программа Microsoft Excel, использован метод вариационной статистики, при допустимой погрешности $P < 0,05$ (Стьюдента).

Материал исследования

Периферическая кровь обследуемых из локтевой вены, смешанная ротовая жидкость полости рта (СРЖ) – надосадочная фракция после центрифугирования, слюна (С) – полученная из протока околоушной слюнной железы, содержимое пародонтальных карманов (п/к). Все исследования проведены в Институте проблем патологии при НМУ, забор материала произведен на базе Стоматологического медицинского центра НМУ имени А.А.Богомольца.

Иммунологическое исследование методом иммуноферментного анализа включало определение SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor), тест система – «Human SLPI. Nucult Biotechnology. Elisa testkit Holland». Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-2 и хемоаттрактанта ИЛ-8 – тест-системой «Протеиновый Контур» – СПб, Россия. Определен кислородозависимый антибактериальный НСТ-тест функциональной активности нейтрофилов – восстановление нитросинего тетразола - микроскопически.

Определены экспрессирующие поверхностные маркеры Т-лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD25 (низкоафинный рецептор для ИЛ-2), CD54, использованы моноклональные антитела, полученные в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины – методом непрямой иммунофлуоресценции. Спектрофотометрическим методом определены биохимические показатели уровня ПОЛ и АОЗ: малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК), супероксиддисмутаза (СОД), кеталаза (КТ), перекисный гемолиз эритроцитов (ПГЕ).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что у 97,75% обследуемых пациентов выявлены колебания ПОЛ и АОЗ, с избыточным накоплением МДА, ДК, ПГЕ (97,5%) и развитием субкомпенсированного состояния АОЗ (у 86,8%), по сочетанному избыточному накоплению продуктов пероксидации и снижению количества КТ, СОД и Ф в

периферической крови, по сравнению с контролем. Данные собственных исследований схематично представлены на Рис.1 и Рис.2.

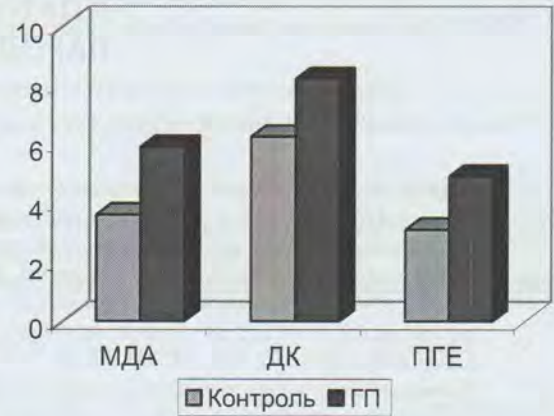


Рис.1. Показатели МДА, ДК, ПГЕ (мкмоль/л) в периферической крови

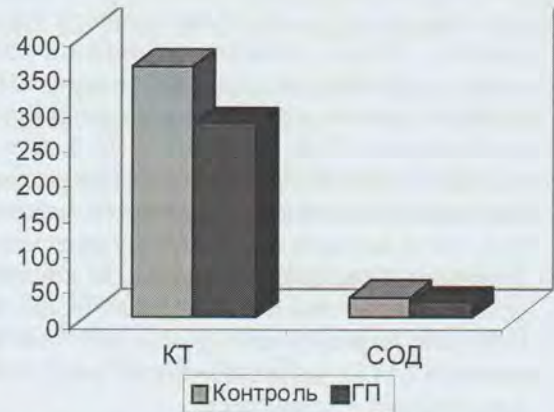


Рис.2. Показатели КТ, СОД в периферической крови

Антибактериальный кислородозависимый НСТ-тест нейтрофилов у больных ГП I-II степени, обострившегося течения имеет тенденцию к снижению. Показатель в периферической крови пациентов достигает лишь нижней границы контроля, определяясь в пределах 8-10%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют и характеризуют процессы респираторного взрыва, с участием кислородных радикалов, с потреблением кислорода, выделением O_2 , OH^- , H_2O_2 , вероятно с окислением и изменением насыщенности жирных кислот в клетках, связанных с функцией мембранных липидов, степенью насыщенности липидов, которая влияет на текучесть и проницаемость мембраны, что обеспечивает, в конечном счете, биологическую функцию клеток и органелл, участвуя в передаче сигнала

лов, как в экстрацеллюлярное пространство, так и в сторону цитоплазмы, влияя на апоптоз клеток. Для выяснения роли полученных результатов исследования в разрешении механизмов антителозависимого лизиса клеток у больных ГП I-II степени, обострившегося течения, мы расширили исследования для изучения процессов цитотоксичности Т-лимфоцитов и нейтрофилов.

В связи с тем, что при ГП I-II степени, обострившегося течения происходит избыточное накопление основного провоспалительного цитокина ИЛ-2, что вызывает лейкоцитарный хемотаксис, накопление хемоаттрактанта ИЛ-8 в очагах воспаления и в дальнейшем агрегацию лейкоцитов с участием в передаче сигналов эйкозаноидами (C_{20} – жирными окисленными кислотами), нами была поставлена задача: исследовать и объективно аргументировать это положение, проводя сравнительный анализ тождественных показателей, как в периферической крови пациентов, так и на местном уровне.

Кроме того, исходя из того, что на этапе развития неспецифического противоинфекционного иммунитета закладываются основы для формирования специфического ответа, мы учитывали интенсивность продукции ИЛ-2 и ИЛ-8 и функциональную активность Т-лимфоцитов по показателям экспрессии CD25 и CD54 (ICAM-1), продукция которых обеспечена активированными макрофагами, фагоцитирующими клетками. Как известно, основное предназначение последних состоит в формировании очага воспаления и реализации его клинических симптомов – местного покраснения, локального накопления жидкости (отек тканей), усиления проницаемости сосудов и возникновения болевых ощущений у пациентов.

Отметим, что для решения поставленных задач по определению маркеров системной активации нами избран альтернативный субстрат – ротовая жидкость, качественные изменения которой отражают не только местные, но и общие нарушения гомеостаза. Это связано с тем, что источником «саливарных» цитокинов могут быть лимфоциты и вспомогательные клетки иммунной системы в эпителии слизистых оболочек. Их активность усиливается при:

- стимуляции флогогенными раздражителями, которые в избытке поступают в ротовую полость и верхние дыхательные пути;
- воспалении тканей пародонта, когда сывороточный транссудат проникает через

пародонтальные карманы;

- при синтезе и экспрессии из слюнных желез, попадая в СРЖ;

- под влиянием адгезивных контактов с микроорганизмами происходит образование цитокинов как продукта мукозальных эпителиоцитов.

Таким образом, при активации местного воспалительного процесса в тканях пародонта можно выделить несколько периодов, которые характеризуются:

1. Активностью макрофагов и интенсивной продукцией цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-8), обладающие местными и системными эффектами, что подтверждается полученными нашими данными исследования, и клинически проявляется формированием местных очагов воспаления в пародонте.

2. Экспрессией адгезивных молекул на эндотелиальных клетках, при этом усиливается приток фагоцитов в очаг воспаления (CD54 – ICAM-1, хемокина ИЛ-8). Представляет особый интерес и тот факт, что обладая способностью к перфоринзависимому лизису клеток-мишеней, сами нейтрофилы характеризуются устойчивостью к действию перфорина [18]. Этой своей особенностью они отличаются от CD8⁺ Т-лимфоцитов, естественных киллеров (ЕК), и некоторых клонов CD4⁺, что является очень важным для участия в защите тогда, когда гранулоциты и ЕК появляются в одних и тех же участках воспаления. Кроме того, экспериментально установлено, что существует Fas/FasL – зависимый апоптоз клеток, индуцированный нейтрофилами, который не связан с респираторным взрывом и продукцией кислородных радикалов, может происходить в отсутствие Т-лимфоцитов – эффекторов, участие перфорина не является обязательными, сопровождается воспалением и связан с эффективной иммунотерапией (ИЛ-2) [7, 15]. Это положение еще раз подтверждает практическую значимость и актуальность проводимых нами исследований.

3. Активацией медиаторов воспаления, пролиферацией эффекторных клеток – дифференцировка и изменение соотношения CD4-CD8 субпопуляции Т-клеток в очагах воспаления, выраженная экспрессия низкоаффинного – CD25 и ИЛ-2, зрелых CD8⁺ тимоцитов.

Кроме того, наши данные согласуются с экспериментальными исследованиями, что на этих этапах под влиянием ФНО- α , ИЛ-1,

ИЛ-2, ИЛ-8 происходит экспрессия селективных на эпителиальных клетках сосудов [17], которые способны распознавать углеводные радикалы на гликопротеиновых рецепторах, циркулирующих в кровеносном русле лейкоцитах (получены данные содержания CD25 - ИЛ-2), что сопровождается сокращением гладкой мускулатуры сосудов, венозным застоем, изменением микроциркуляции, ацидозом в тканях микроокружения, изменением миграционного процесса – остановка движения фагоцитов по кровеносному руслу, что и характеризует механизмы повреждения клеток и тканей на последующем этапе, с вовлечением и активацией ферментативных процессов и пероксидации клеток.

Полученные данные исследования представлены в рис. 3 и 4.

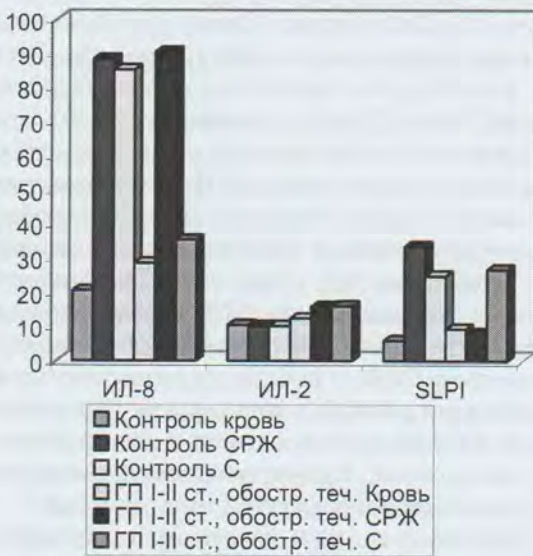


Рис.3. Показатели ИЛ (пкг/мл), SLPI у больных ГП I-II ст., обострившегося течения

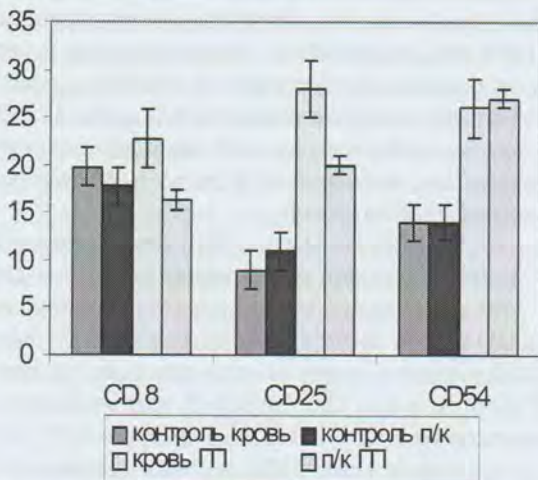


Рис.4. Показатели CD8, CD25, CD54 у больных ГП I-II ст., обострившегося течения

Полученные результаты объективно ($P < 0,05$) отражают активность ферментативных процессов и способность организма на разных уровнях коррелировать цитотоксичность эластазы, продуцируя SLPI. Так, при обострившемся течении, уровень SLPI в периферической крови больных компенсаторно возрастает в 1,8-2 раза, при этом содержания ингибиторов в С gl.Parotis увеличивается лишь на 10-13%, а в СРЖ выражена резкая недостаточность, ингибирование экспрессии этого показателя лейкоцитами (ПМЯЛ) на 380-400% меньше, по сравнению с данными контроля, что свидетельствует о необходимости местного введения ингибиторов протеолиза.

Столь же объективна и роль микроокружения, когда цитотоксическая индукция нейтрофилов увеличивается в присутствии гиалуроновой кислоты и эластазы [16].

Согласно исследованиям С.Бергстрема (1982), предшественником всех простагландинов являются полиненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая кислота (и ряд ее производных, дигомо-У-линоленовая и пентадекановая С 15:0 кислоты, в свою очередь образующиеся из миристиновой С 14:0, линолевой С 18:2, линоленовой С 18:3 ЖК). Арахидоновая кислота после освобождения из фосфоглицеридов (фосфолипидов) биомембран, в зависимости от ферментативного пути превращения дает начало простагландинам и лейкотриенам, при включении в химический процесс молекулярного кислорода, специфических оксигеназ, что сопровождается усилением воспалительных процессов.

Таким образом, определение методом газовой хроматографии содержание насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) при сравнительной оценке в плазме крови, эритроцитах, секрете gl.Parotis, и, в содержимом СРЖ и пародонтальных карманах (п/к) позволяет провести дифференцированный анализ суммы насыщенности жирнокислотного состава на разных уровнях исследования, и определить градиент максимальных изменений.

Достоверно ($P < 0,05$) зарегистрировано увеличение насыщенности липидного комплекса крови и снижение уровня ПНЖК, которое обусловлено липидной пероксидацией. Установлено, что в плазме и эритроцитах периферической венозной крови у больных ГП I-II степени, обострившегося течения имеет место однонаправленные изменения жирнокислотного состава липидов, увеличе-

ние пальмитиновой (С 16:0 ЖК) на 50-52% (по сравнению с контролем), что может свидетельствовать о деструкции лецитиновой фракции фосфолипидов крови. Установлено снижение уровня ПНЖК за счет линоленовой ЖК во всех исследуемых биологических средах. Кроме того, определено статистическое увеличение миристиновой (С 14:0 ЖК) в содержимом п/к до 50%, снижение олеиновой ЖК до 2 раз. В секрете gl.Parotis, в эритроцитах - на 58%, а в фильтрате содержимого п/к - линолевой ЖК - до 32% (P<0,05). Снижение суммы ПНЖК за счет линолевой, линоленовой и арахидоновой ЖК в среднем - на 50%, по сравнению с данными контроля, в эритроцитах и С gl.Parotis, что свидетельствуют об активации процессов пероксидации.

Суммируя данные исследований газовой хроматографии, необходимо констатировать, что у больных ГП I-II степени, обострившегося течения имеет место изменение ЖК состава во всех биологических исследуемых жидкостях. Зарегистрировано увеличение С 20:4 арахидоновой ЖК до 2 раз, изменение соотношения суммы насыщенных и ненасыщенных ЖК, что является объективным диагностическим критерием процессов активации воспаления, и требует терапевтической коррекции.

Подводя итоги проведенного исследования, можно заключить, что избыточные процессы пероксидации, внедрение молекулярного кислорода в арахидоновую кислоту с образованием гидроперекисных интермедиатов, которые спонтанно превращаются в соответствующие гидроэкозатетраеновые кислоты или ферментативно в лейкотриены и простогландины, ингибируя повреждения сосудов (CD54 - ICAM-1), активируя ПМЯЛ (ИЛ-2, ИЛ-8) и выделяя активные метаболиты кислорода (НСТ-тест); ПМЯЛ, регулируя интенсивность экспрессии сериновых антипротеаз - эластазы (SLPI), в результате чего

происходит повреждение - лизис и апоптоз тканей пародонта, клеток-мишеней, клеток микроокружения, эндотелиоцитов кровеносных сосудов, что приводит к дальнейшей активации адгезивных молекул и иммуокомпетентных клеток, и продуцированию различных типов цитокинов, отражая темпы и объем, соответствующий степени воспаления и повреждения тканей, и функционального нарушения гомеостаза организма пациентов ГП I-II степени, обострившегося течения.

Выводы

1. Нейтрофилы являются геторегенными, мультифункциональными популяциями клеток, активно фагоцитирующие, проявляющие цитотоксическое действие и индуцирующие SLPI, цитокины, представляя антигены антигенпрезентирующим клеткам.

2. При изучении вопросов патогенеза обострения хронического течения генерализованного пародонтита необходимо учитывать формирование и состояние клеток и тканей микроокружения на ранних и поздних стадиях, включая активность и процессинг фагоцитоза, дисрегуляцию системы антиоксидантной защиты и активацию пероксидации липидов в периферической крови и биологических средах полости рта, контроль за уровнем ингибиторов серин-протеаз, участие нейтрофилов в индукции противовоспалительной резистентности, активации цитокинов, хемоаттрактантов, маркеров адгезии клеток.

3. Представленный потенциал критериев функциональных изменений, которые регистрируются, как на системном уровне организма больных ГП I-II степени, обострившегося течения, так и местно - в тканях и средах полости рта, имеет дифференциально-диагностическое значение, характеризуя механизмы обострения заболевания, клинические проявления и является основой для разработки подходов к коррекции лечения.

ДО ПИТАННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕНЬ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ТА ОБМІНУ ЛІПІДІВ В ПАТОГЕНЕЗІ ГЕНЕРАЛИЗОВАНОГО ПАРОДОНТИТА, ЗАГОСТРЕНОГО ПЕРЕБІГУ

Сергєєва І.Є., Борисенко А.В., Яременко Л.М., Брюзгина Т.С.

Резюме. Авторами приведені діагностичні критерії патогенетичних змін при загостренні перебігу ГП I-II ступеню. Комплексно представлені зміни співвідношення насиченості жирних кислот, показники активації пероксидатії ліпідів і субкомпенсаторний стан антиоксидантної системи, переважання активності ферментативних процесів у вогнищах запалення і недостатності індукції *serpin* - антиеластази, при тенденції до абсолютного зниження показника CD8 - місцево у тканинах пародонту, але при цьому досить вираженої цитотоксичності нейтрофілів, індукції ІЛ-2, ІЛ-8, CD25, CD54.

Ключові слова: генералізований пародонтит, перекисне окислення ліпідів, антиоксидантний захист, жирні кислоти, цитокини.

TO THE QUESTION ABOUT THE MECHANISMS OF VIOLATIONS OF IMMUNE ANSWER AND EXCHANGE OF LIPID'S IN PATHOGENY OF GENERALIZED PERIODONTITIS, INTENSIFIED FLOW

Sergeeva I.E., Borisenko A.V., Yaremenko L.M., Bryuzgina T.S.

Summary. Authors are result the diagnostic criteria of nosotropic changes at intensifying of flow of GP I-II degrees. The changes of correlation the saturation of fat acids are complex presented in the biological environments of patients, indexes of activating lipid's peroxidation and subscray state of the antioxidative system, predominating of activity of enzymatic processes in the hearths of inflammation and insufficiency of induction of serpin is antielastases, at the absolute decline of index of CD8 in parodontal packets, but there is enough expressed cytotokcik of neutrophils, induction of IL-2, IL-8, CD25, CD54.

Keywords: generalized periodontitis, lipid peroxidation, an antioxidative defence, fat acids, cytotokines.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Потапнев М.П. Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении / М.П.Потапнев // Иммунология. -1995. -№ 4. -С. 34-40.
2. Нестерова И.В. Современные представления о роли системы нейтрофильных гранулоцитов / И.В.Нестерова, Н.В.Колесникова // Rus. J. Immunol. – 1999. – Vol. 4, Suppl. 1. – P. 22-29.
3. Машенко И.С. Обмен цитокинов у больных генерализованным пародонтитом / И.С.Машенко // Современная стоматология. – 2004. – № 1 (25). – С. 73-75.
4. Кетлинский С.А. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета / С.А.Кетлинский, Н.М.Калинина // Иммунология. - 1995. - №3. – С.30-44.
5. Чумакова Ю.Г. Роль цитокинов в регуляции воспаления тканей пародонта у больных генерализованным пародонтитом/ Ю.Г.Чумакова // Современная стоматология. – 2004. – № 4. – С. 60-62.
6. Чумакова Ю.Г. Роль лейкоцитов в патогенезе генерализованного пародонтита: особенности при различных клинических формах заболевания / Ю.Г Чумакова. // Вісник стоматології. – 2007. - № 1. -С. 17-30.
7. Самойленко А.В. Сучасні аспекти етіології, патогенезу та лікування різних клінічних варіантів генерализованого пародонтиту: автореф. дис... д-ра мед. наук: 14.01.22 /Ін-т стомат. АМН України. – Одеса, 2003. – 34 с.
8. Белоключкая Г.Ф. Клинико-патогенетическое обоснование дифференцированной фармакотерапии генерализованного пародонтита: автореф. дис... д-ра мед. наук: 14.01.21 /Нац. мед. ун-т им. А.А.Богомольца. – К., 1996. – 32 с.
9. Борисенко А.В. Оценка роли продуктов арахидоновой кислоты при дистрофически-воспалительном процессе в тканях пародонта на фоне применения нового препарата «Текома» / А.В.Борисенко, В.И.Герелюк // Современная стоматология. – 2000. – № 4. – С. 23-25.
10. Бобырев В.Н. Биохимическая фармакодинамика и молекулярные механизмы действия антиоксидантов как средств профилактики и лечения свободнорадикальной патологии: автореф. дис... д-ра мед. наук. - М., 1990. – 36 с.
11. Зубачик В.М. Мембранні механізми патогенезу та терапії запальних процесів пародонту: автореф. дис ... д-ра мед. наук: 14.01.22 /Львів, нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького. – Львів, 2005. – 34 с.
12. Мороз К.А. Роль пероксидної оксидації ліпідів у розвитку патології пародонта / К.А.Мороз // Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія. - 2004. - № 2. - С. 87-91.
13. Герелюк В.І. Роль ліпідних медіаторів у перебігу генерализованого пародонтиту та ефективність їх корекції в комплексному лікуванні: автореф. дис... д-ра мед. наук: 14.01.22 / Ів.-Фр. держ. мед. акад.- Івано-Франківськ, 2001. – 36 с.
14. Владимиров Ю.А. Роль нарушенных свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов / Ю.А.Владимиров // Патолог, физиол. и эксперим. терапия. – 1989. – №4. – С. 7-19.
15. Чумакова Ю.Г. Показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных генерализованным пародонтитом в зависимости от степени развития заболевания / Ю.Г.Чумакова // Вісник стоматології. - 2004. -№1.- С. 43-46.
16. Clemens M.J. Interferons and apoptosis / M.J.Clemens // J. Exp. Med. – 2000. – 192, №10. – P.277-292.
17. Carvalho-Tavares J. A role for platelets and endothelial selectin in TNF- α induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature / J.Carvalho-Tavares, M.J.Hickey, J.Hutchison et al. // Circ. Res. – 2000. – 87. – № 12. – P.1141-1148.
18. Coppack S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue / S.W.Coppack // Proc.Nutr. Sos. – 2001. – 60, №3. – P.349-356.