

И. Е. Сергеева

К вопросу о механизмах нарушений иммунного ответа и обмена липидов в патогенезе генерализованного пародонтита обострившегося течения

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины О. В. Коркошко)

*Доведено діагностичні критерії патогенетичних змін при загостреному перебігу ГП I–II ступеня. У комплексному обсязі розглянуто зміни співвідношення насиченості жирних кислот у біологічних діагностичних середовищах хворих, показники активації пероксидації ліпідів та субкомпенсаторні зміни антиоксидантної системи. Відмічено перевагу ферментативних процесів при загостренні запалення при недостатній індукції *serpin*, що відбувається на фоні зниження абсолютної кількості CD8 у пародонті та вираженої цитотоксичності нейтрофілів, індукції IL-2, IL-8, CD25, CD54.*

В настоящее время, несмотря на многочисленные исследования на протяжении последних лет, не всегда можно дать однозначную оценку значения инфильтрации нейтрофилами, особенно в очагах с высоким содержанием хемоаттрактанта ИЛ-8 [1–7]. В связи с тем, что нейтрофилы способны нейтрализовать микроорганизмы и клетки-мишени не только путем фагоцитоза — переваривания, но и вследствие выделения различных бактерицидных веществ, введены понятия “цитотоксичности” и “бактерицидности” нейтрофилов. Под цитотоксичностью подразумевается повреждение и деструкция клеток эукариотов, под бактерицидностью — уничтожение микроорганизмов.

При рассмотрении механизмов антителозависимой цитотоксичности нейтрофилов учитывается:

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

В патогенезе генерализованного пародонтита (ГП) при исследовании механизмов воспаления и деструкции тканей немаловажная роль отводится мембраноповреждающим процессам, связанным с избыточным действием и накоплением синглетного кислорода, радикалов, вследствие пероксидного окисления белков и липидов (ПОЛ) [8–11], дисбалансом насыщенности жирнокислотного спектра липидов. Смещение прооксидантного и оксидантного равновесия, увеличение количества активных метаболитов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК) — продукта ненасыщенных жирных кислот (ННЖК), малонового диальдегида (МДА), супероксиддисмутазы (СОД) при усилении ПОЛ в мембранах, активации фосфолипаз и угнетении ферментов антиоксидантной защиты приводит к дестабилизации структуры ДНК-клеток, в том числе и к нарушению функции иммунокомпетентных клеток, их активации и экспрессии адгезивных молекул [12–14]. В связи с этим возникает вопрос: в какой степени потенциальные стимуляторы метаболизма кислорода и определяемое изменение соотношения насыщенности жирных кислот (ЖК) и их продуктов оксигенизации влияют на миграцию нейтрофилов в очагах повреждения тканей пародонта?

Для определения значимости кислородозависимых механизмов в деструктивных процессах пародонта нами проведен сравнительный анализ степени угнетения ферментов системы антиоксидантной защиты (АОЗ), баланса насыщенности ЖК, ингибитора эластазы — SLPI, молекул адгезии и провоспалительных цитокинов в периферической крови больных ГП I–II степени обострившегося течения и тождественных показателей в содержимом полости рта.

Материалы и методы исследования. Обследовано 76 больных ГП I–II степени обострившегося течения и 24 практически здоровых человека (контрольная группа) в возрасте 20–55 лет. Диагноз поставлен в соответствии с классификацией заболеваний пародонта, предложенной Н. Ф. Данилевским (1994), и рекомендациями кафедры терапевтической стоматологии Национального медицинского университета им. А. А. Богомольца (НМУ). Проведены общепринятые клинические, индексные оценки состояния пародонта, ортопантомография, специальные иммунологические, биохимические методы, метод газожидкостной хроматографии. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась на персональном компьютере, программа Microsoft Excel, использован метод вариационной статистики, при допустимой погрешности $P < 0,05$ (метод Стьюдента).

Материал исследования: периферическая кровь обследуемых из локтевой вены, смешанная ротовая жидкость полости рта (СРЖ) — надосадочная фракция после центрифугирования, слюна, полученная из протока *gl. Parotis*, содержимое пародонтальных карманов (ПК). Все исследования проведены в Институте проблем патологии на базе НМУ, забор материала произведен во время клинического приема в Стоматологическом центре НМУ. Иммунологическое исследование методом иммуноферментного анализа включало определение SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor), тест-система — “Human SLPI. Hucult Biotechnology. Elisa testkit Holland”. Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-2 и хемоаттрактанта ИЛ-8 оценивали с помощью тест-системы “Протеиновый Контур” (Санкт-Петербург, Россия). Определяли кислородозависимый антибактериальный НСТ-тест функциональной активности нейтрофилов — восстановление нитросинего тетразоля — цитоморфологически на микроскопе Olympus.

Методом непрямой иммунофлюоресценции определяли экспрессирующие поверхностные маркеры Т-лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD25 (низкоафинный рецептор для ИЛ-2), CD54, использовали моноклональные антитела, полученные в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиологии им. Р. Е. Кавецкого (Киев). Спектрофотометрическим методом определяли биохимические показатели уровня ПОЛ и АОЗ: содержание МДА, ДК, СОД, каталазы (КТ), уровень пероксидного гемолиза эритроцитов (ПГЭ).

Результаты и их обсуждение. У 97,75% обследуемых пациентов выявлен дисбаланс показателей ПОЛ и АОЗ с избыточным накоплением МДА, ДК, ПГЭ (97,5%) и развитием субкомпенсаторного состояния АОЗ (у 86,8%), по сочетанному избыточному накоплению продуктов перекисаации и снижению количества КТ и СОД в периферической крови по сравнению с контролем (рис. 1, 2).

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

Полученные данные характеризуют процессы респираторного взрыва с участием кислородных радикалов, с потреблением кислорода, выделением O₂, OH⁻, H₂O₂, вероятно, с окислением и изменением насыщенности ЖК в клетках, что связано с функцией мембранных липидов и степенью насыщенности фосфолипидов. Это обуславливает текучесть и проницаемость мембран, что обеспечивает в конечном счете биологическую функцию

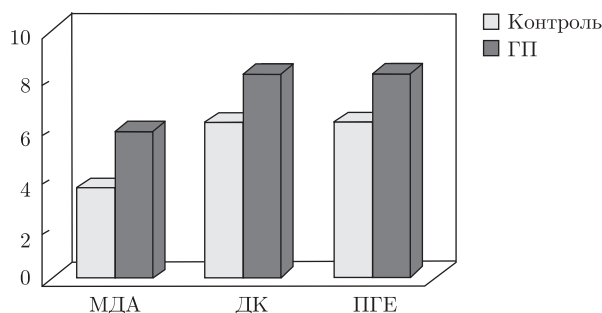


Рис. 1. Показатели МДА, ДК, ПГЭ (мкмоль/л) в периферической крови

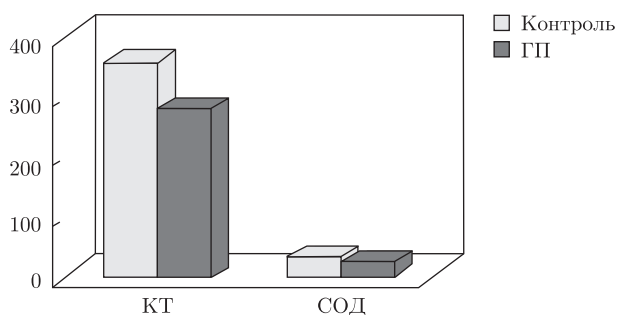


Рис. 2. Показатели КТ, СОД в периферической крови

клеток и органелл. В итоге передача сигналов происходит как в экстрацеллюлярное пространство, так и в сторону цитоплазмы, что влияет на функцию и апоптоз клеток. В связи с этим закономерно возникает вопрос: какое методологическое значение имеют полученные результаты для определения механизмов осуществления антителозависимого лизиса клеток у больных ГП I–II степени обострившегося течения? Для того чтобы ответить на этот вопрос, необходимо расширить исследования процессов цитотоксичности Т-лимфоцитов и нейтрофилов.

Так как 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, проведя сравнительный анализ тождественных показателей как в периферической крови пациентов, так и на местном уровне, в средах полости рта. Кроме того, поскольку на этапе развития неспецифического врожденного противомикробного иммунитета закладываются основы для формирования специфического ответа, мы учитывали интенсивность индукции ИЛ-2 и ИЛ-8 и функциональную активность Т-лимфоцитов по опосредованным показателям экспрессии CD25 и CD54 (ICAM-1), продукция которых обеспечивается активированными макрофагами — фагоцитирующими клетками, в формирующемся очаге воспаления, что клинически проявляется в виде местного покраснения, локального накопления жидкости (отека тканей), усиления проницаемости сосудов и возникновения болевых ощущений у больных ГП.

При выборе методологического подхода для решения поставленных задач учитывалось также то, что альтернативным субстратом для определения маркеров системной активации

может быть секрет ротовой полости (смешанная ротовая жидкость), на состоянии которого отражаются 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 трансудат проникает через пародонтальные карманы; при синтезе и экспрессии из слюнных желез, попадая в СРЖ; под влиянием адгезивных контактов с микроорганизмами происходит образование цитокинов — продукта мукозальных эпителиоцитов.

Согласно полученным данным, 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), обладающих местными и системными эффектами, что клинически проявляется в формировании 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 перфори-на [14]. Этой своей особенностью они отличаются от CD8⁺ Т-лимфоцитов, естественных киллеров и некоторых клонов CD4⁺, что является очень важным для участия в защите тогда, когда гранулоциты и естественные киллеры 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 перфори-на не является обязательным, сопровождается воспалением и связан с эффективной иммунотерапией (ИЛ-2) [7, 14]. 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 маркера CD25 и ИЛ-2, зрелых CD8⁺ тимоцитов.

Кроме того, наши данные согласуются с результатами экспериментальных исследований, свидетельствующих о том, что на этих этапах под влиянием ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-8 происходит экспрессия селектинов на эндотелиальных клетках сосудов [13], 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, нарушением микроциркуляции, ацидозом в тканях микроокружения, изменением миграционного процесса — остановкой 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 результаты (рис. 3, 4) 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 содержание ингибиторов в секрете gl. Parotis увеличивается лишь на 10–13%, а в СРЖ выражена рез-

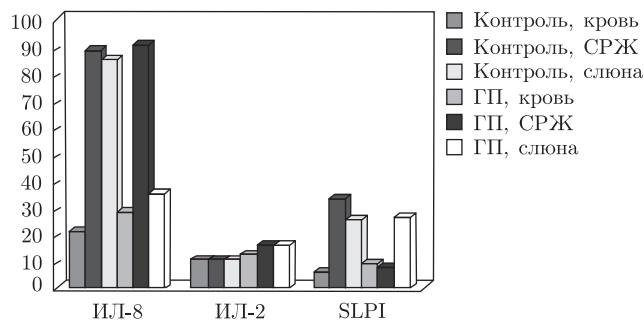


Рис. 3. Показатели ИЛ (пкг/мл), SLPI у больных ГП I-II ст. обострившегося течения

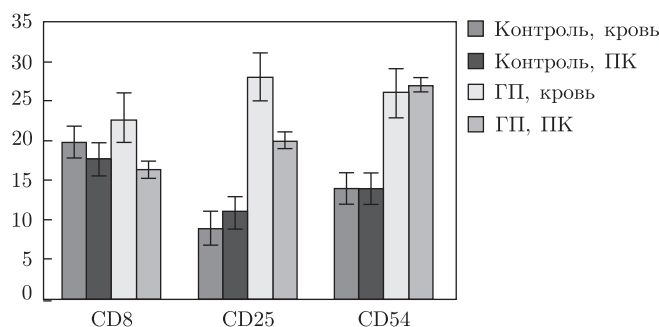


Рис. 4. Показатели CD8, CD25, CD54 у больных ГП I-II ст. обострившегося течения

кая недостаточность, ингибирование экспрессии этого показателя лейкоцитами (ПМЯЛ) на 380–400% меньше по сравнению с контролем, 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 [2].

Согласно исследованиям С. Бергстрема (1982), предшественником всех простагландинов являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), в частности арахидоновая кислота (и ряд ее производных, дигомо-Υ-линоленовая и пентадекановая (C_{15:0}) кислоты, в свою очередь образующиеся из миристиновой (C_{14:0}), линолевой (C_{18:2}), линоленовой (C_{18:3}) ЖК). Арахидоновая кислота после освобождения из фосфолипидов (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 газожидкостной хроматографии содержания насыщенных жирных кислот (НЖК) и ПНЖК при сравнительной оценке в плазме крови, эритроцитах, секрете gl. Parotis, содержанием СРЖ и ПК позволяет провести дифференцированный анализ суммы насыщенности жирнокислотного состава на разных этапах 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 имеют место однонаправленные изменения жирнокислот-

ного состава липидов, увеличивается содержание пальмитиновой ЖК ($C_{16:0}$) на 50–52% по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о накоплении лизолецитинов фосфолипидов фракции крови. В исследуемых биологических средах снижается уровень ПНЖК за счет окисления, недостаточности линолевой и линоленовой ЖК. Кроме того, в содержимом ПК статистически достоверно увеличивается уровень миристиновой ЖК ($C_{14:0}$) до 2,5 раз, в секрете *gl. Parotis* снижается уровень олеиновой ЖК ($C_{18:1}$) до 2 раз, а в эритроцитах — на 55–58%, в фильтрате содержимого ПК уменьшается количество линолевой ЖК ($C_{18:2}$) до 32% ($P < 0,05$). В эритроцитах и секрете *gl. Parotis* снижается сумма ПНЖК за счет линолевой и арахидоновой ЖК — в среднем на 28–35% по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации процессов перекисидации.

Арахидоновая кислота при остром воспалении высвобождается из фосфолипидов мембран, впоследствии активируется, окисляется под действием 5-липооксигеназы, запуская каскад окислительных, ферментативных биохимических реакций, которые приводят к производству вторичных медиаторов воспаления.

Кроме того, необходимо учитывать, что обострение ГП, стимуляция и выделение лейкотриенов, простагландинов идет под действием активных бактериальных липополисахаридов и других факторов активации альтернативного пути комплемента. Клинически это проявляется классическими признаками острого воспаления и характеризуется повышением проницаемости сосудов в пародонте, выраженной клеточной инфильтрацией — отеком, кровоточивостью тканей; хемотаксисом лейкоцитов, дегрануляцией ПМЯЛ — серозным и гнойно-геморрагическим экссудатом, некробиотическим повреждением маргинального пародонта.

Избыточный катаболизм арахидоновой кислоты ($C_{20:4}$) (увеличение содержания в плазме крови на 42%) и последующий активный ее метаболизм (снижение на 28% в содержании ПК, $P < 0,05$) при уменьшении концентрации в мембранах эритроцитов крови на 21% позволяет сделать предположение об ингибировании ее дальнейшего накопления вторичными сигнальными молекулами по принципу обратной связи. Кроме того, о ферментативной активности метаболизма арахидоновой кислоты ($C_{20:4}$) можно также судить по избыточному накоплению $C_{20:5}$ в изучаемых средах, что явилось объективным статистически достоверным ($P < 0,005$) критерием.

Очевидно арахидоновая кислота, присутствующая в мембранных фосфолипидах эритроцитов периферической крови, подвергается активному циклогеназному окислению с образованием циклического эндопероксида под действием комплекса циклооксигеназ, простагландинсинтетазы, что имеет решающее значение для адаптационно-защитных регуляторных механизмов взаимосвязи баланса функционального гомеостаза организма и преимущественно воспалительно-дистрофических поражений пародонта. Это положение подтверждают результаты исследования показателей АОЗ — снижение концентрации в крови КТ, СОД у больных ГП I–II степени обострившегося течения.

Суммируя данные исследований газовой хроматографии, необходимо констатировать, что у больных ГП I–II степени обострившегося течения имеет место изменение ЖК состава во всех биологических жидкостях. Зарегистрировано увеличение арахидоновой ЖК ($C_{20:4}$) на 40–48% в плазме крови и снижение на 28% местно, в содержимом ПК за счет активных ее окислительных метаболических превращений. Изменение соотношения суммы НЖК, ННЖК и ПНЖК в плазме крови является объективным диагностическим критерием процессов активации воспаления и требует терапевтической коррекции с назначением препаратов *per os*.

Подводя итоги проведенного исследования, можно заключить, что избыточные процессы перекисидации, внедрение молекулярного кислорода в арахидоновую кислоту с образованием гидропероксидных интермедиатов, которые спонтанно превращаются в соответствующие гидроэкозатетраеновые кислоты или ферментативно в лейкотриены и простагландины, усугубляют повреждения сосудов (CD54 — ICAM-1), и тем самым активируются ПМЯЛ (ИЛ-2, ИЛ-8). ПМЯЛ участвуют в фагоцитозе, регулируя интенсивность экспрессии сериновых антипротеаз — SLPI, недостаточность которых на местном уровне отражается на активности эластаз, в сторону увеличения активности протеаз, что приводит к повреждению белков базальной мембраны в очагах воспаления. В результате этого происходят метаболические повреждения тканей за счет реакций, протекающих чисто химическим путем, а также агрессивных биохимических, ферментативных процессов, которые сопровождаются окислительным фосфорилированием с последующим возможным развитием некроза и апоптоза клеток тканей пародонта, клеток-мишеней, клеток-микроокружения, эндотелиоцитов кровеносных сосудов. Это приводит к дальнейшей активации межклеточного взаимодействия адгезивных молекул и иммунокомпетентных клеток и продуцированию различных типов цитокинов, что отражает темпы и объем, соответствующий степени активности воспалительных процессов и повреждения тканей соединительнотканного экстрацеллюлярного матрикса, и в конечном итоге определяет степень и кинетику процесса деструкции тканей пародонта, а также, возможно, функциональные нарушения гомеостаза организма больных ГП I–II степени при обострившемся течении.

Таким образом, при проведении сравнительного анализа степени угнетения ферментов системы АОЗ, баланса насыщенности ЖК в периферической крови и содержимом полости рта больных ГП I–II степени установлено, что нейтрофилы являются гетерогенными, мультифункциональными популяциями клеток, активно фагоцитирующими, проявляющими цитотоксическое действие, индуцирующими SLPI, цитокины, и выполняют роль антигенпрезентирующих клеток.

При изучении вопросов патогенеза обострения хронического течения ГП необходимо учитывать формирование и состояние клеток и тканей микроокружения на ранних и поздних стадиях, включая активность и процессинг фагоцитоза, степень выраженности дисрегуляции системы АОЗ и активации перекисидации липидов в периферической крови и биологических средах полости рта, контроль за уровнем ингибиторов серинпротеаз, участие нейтрофилов в индукции противовоспалительной резистентности, активации цитокинов, хемоаттрактантов, маркеров адгезии клеток. 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, характеризует механизмы обострения заболевания, клинические проявления и должно учитываться при разработке методических подходов коррекции патогенетического лечения.

1. *Потапов М. П.* Цитокиновая сеть нейтрофилов при воспалении // Иммунология. – 1995. – № 4. – С. 34–40.
2. *Нестерова И. В., Колесникова Н. В.* Современные представления о роли системы нейтрофильных гранулоцитов // *Rus. J. Immunol.* – 1999. – 4, Suppl. 1. – P. 22–29.
3. *Левицкий А. П.* Адаптационно-трофические системы организма и их роль в патологии // *Вісн. стоматології.* – 2003. – № 1. – С. 91–95.
4. *Кетлинский С. А., Калинина Н. М.* Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета // Иммунология. – 1995. – № 3. – С. 30–44.

5. Чумакова Ю. Г. Роль цитокинов в регуляции воспаления тканей пародонта у больных генерализованным пародонтитом // Современ. стоматология. – 2004. – № 4. – С. 60–62.
6. Чумакова Ю. Г. Роль лейкоцитов в патогенезе генерализованного пародонтита: особенности при различных клинических формах заболевания // Вісн. стоматології. – 2007. – № 1. – С. 17–30.
7. Мащенко И. С., Самойленко А. В. Новые аспекты патогенеза и лечения генерализованного пародонтита // Там само. – 2002. – № 1. – С. 12–15.
8. Белоклицкая Г. Ф. Возможности антиоксидантной коррекции перекисного окисления липидов при заболеваниях пародонта разной тяжести // Современ. стоматология. – 2000. – № 1. – С. 38–41.
9. Борисенко А. В., Герелюк В. И. Оценка роли продуктов арахидоновой кислоты при дистрофически-воспалительном процессе в тканях пародонта на фоне применения нового препарата “Текома” // Там же. – 2000. – № 4. – С. 23–25.
10. Чумакова Ю. Г., Косенко К. М., Зубачек В. М. та ін. Мембранотропні препарати як засоби патогенетичної терапії пародонту // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, № 2 (додаток). – С. 106.
11. Мороз К. А. Роль пероксидної окисації ліпідів у розвитку патології пародонта // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2004. – № 2. – С. 87–91.
12. Clemens M. J. Interferons and apoptosis // J. Exp. Med. – 2000. – **192**, No 10. – P. 277–292.
13. Carvalho-Tavares J., Hickey M. J., Hutchison J. et al. A role for platelets and endothelial selectins in TNF- α induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature // Circ. Res. – 2000. – **87**, No 12. – P. 1141–1148.
14. Coppack S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue // Proc. Nutr. Soc. – 2001. – **60**, No 3. – P. 349–356.

Национальный медицинский университет
им. А. А. Богомольца, Киев

Поступило в редакцию 09.03.2011

I. E. Sergeeva

To the question about the mechanisms of violations of immune answer and exchange of lipids in pathogeny of generalized intensified periodontitis

We present the diagnostic criteria of nosotropic changes at intensifying the course of generalized periodontitis of I-II degrees. We give complexly the changes of correlation of the saturation of fat acids in the biological environments of patients, activation indices of the lipids peroxidation, subcompensatory state of the antioxidative system, predomination of activity of enzymatic processes at the centers of inflammation, and insufficiency of induction of serpinantielastase at the absolute decline of index CD8 in parodontal packets, but under enough expressed cytotoxicity of neutrophils and induction of IL-2, IL-8, CD25, CD54.