

УДК 616.31 - 002 : 612.017.1

Игнатов М.Ю., Доманова Е.Т., Масло Е.Ю.,
Цыбиков Н.Н.

АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ, ИНКУБИРУЕМЫХ С РОТОВОЙ И ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТЯМИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Росздрава (ректор – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В.Говорин)

ГУЧ "321 Окружной госпиталь СибВо" Минобороны РФ (начальник - полковник медицинской службы, к.м.н. В.С. Лим)

Известно, что резистентность ротовой полости обеспечивается как специфическими, так и врожденными реакциями иммунитета. Среди последних определенная роль отводится фагоцитирующими клеткам, в том числе нейтрофилам, которые морфобиохимически специализированы на фагоцитозе микроорганизмов с последующей инактивацией патогенов различными механизмами (лизосомальные катионные белки, генерация супероксида и т.д.). Основным источником поступления нейтрофилов в полость рта является зубодесневая борозда, где и происходит контакт с десневой жидкостью, а затем и со смешанной слюной. Не исключено, что эти процессы сопровождаются модификацией фагоцитарной и переваривающей способности нейтрофилов. Особый интерес представляют изменения функциональной активности нейтрофилов, инкутируемых с десневой жидкостью и смешанной слюной при воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области (ЧЛО). Однако до настоящего времени этот вопрос в достаточной степени не изучался, что и составило предмет нашего исследования.

Материалы и методы. Исследования проведены на базе стоматологической клиники Читинской государственной медицинской академии и стоматологического отделения 321 Окружного госпиталя СибВо. Всего было исследовано 105 человек в возрасте от 19 до 21 года. Больные (90 человек) были разделены на группы: 1 группа - 30 больных острым катаральным гингивитом; 2 группа - 30 больных хроническим пародонтитом; 3 группа - 15 пациентов с абсцессами ЧЛО; 4 группа - 15 пациентов с флегмонами мягких тканей ЧЛО. Контрольную группу составили 15 человек, не имеющих воспалительных заболеваний ЧЛО.

У здоровых людей и больных производили одномоментный забор ротовой (смешанной слюны) и зубодесневой жидкости в день поступле-

ния в стационар или при первичном обращении в поликлинику. Слюну и зубодесневую жидкость помещали в эпандорфы, хранили при температуре -20°C в рефрижераторе до момента исследования. Нейтрофилы выделяли из донорской крови на градиенте плотности (1,097 г/мл) фикол-урографин, трижды отмывали физиологическим раствором, вносили в пробирки в объеме 200 мкл (100000 клеток в каждой аликвоте) и дополнительно вводили по 100 мкл смешанной слюны или 100 мкл зубодесневой жидкости. В контрольные пробирки вместо слюны и зубодесневой жидкости вводили 200 мл забуферированного физиологического раствора. Через 30 минут инкубации при 37°C готовили мазки, которые фиксировали метанолом. Для выявления лизосомальных катионных белков (ЛКБ) мазки окрашивали спиртовым раствором прочного зеленого. Нейтрофилы, имеющие в цитоплазме гранулы формазана (НСТ-тест), выявляли при использовании метиленового синего [2]. Для определения фагоцитарного числа (ФЧ) и фагоцитарного индекса (ФИ) в пробирки дополнительно вводили по 50 мкл суспензии латекса ($d = 1,4 \text{ мкм}$) и после 30-минутной инкубации готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому-Гимза. Полученные данные подвергли статистической обработке и анализу с помощью программы Statistica for Windows Version 6,0. Оценку достоверности различий средних величин для независимых переменных осуществляли по критерию Стьюдента. Различия между сравниваемыми вариационными рядами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Предварительная инкубация интактных нейтрофилов с ротовой и зубодесневой жидкостью привела к резким изменениям ФЧ и ФИ (таблица 1). Следует сразу указать, что смешанная слюна здоровых людей приводит к значительному увеличению ФЧ и ФИ. В меньшей степени данный эффект регистрируется при инкубации с десневой жидкостью. Этот факт свидетельствует в пользу того, что в слюне и зубодесневой жидкости присутствуют вещества, способные активировать фагоцитоз нейтрофилов. Ранее было показано, что так называемые "оральные" лейкоциты, обладают большей фагоцитарной активностью, нежели нейтрофилы периферической крови одного и того же индивидуума [8]. Не исключено, что на роль активаторов фагоцитоза могут претендовать антигены микробов - сапрофитов полости рта, некоторые цитокины, компоненты комплемента, протеазы слюны и зубодесневой жидкости. Очевидно, что

Таблица 1

ФЧ и ФИ нейтрофилов, инкубуемых с ротовой и зубодесневой жидкостями ($M \pm SD$)

Исследуемые показатели	Контроль (физ.р-р)	Доноры		Группа 1		Группа 2		Группа 3		Группа 4	
		Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть
ФЧ, %	2,5±0,1	50,1±0,4 p<0,05	4,4±0,2 p<0,05	55,5±0,3 p<0,05 p ₁ <0,05	7,1±0,3 p<0,05 p ₁ <0,05	14,2±0,4 p<0,05 p ₁ <0,05	2,8±0,2 p>0,05 p ₁ <0,05	10,2±0,4 p<0,05 p ₁ <0,05	2,5±0,1 p>0,05 p ₁ <0,05	5,1±0,3 p<0,05 p ₁ <0,05	1,5±0,1 p<0,05 p ₁ <0,05
ФИ, %	30,3±4,5	90,5±2,6 p<0,05	70,1±2,5 p<0,05	95,0±2,5 p<0,05 p ₁ >0,05	81,0±1,3 p<0,05 p ₁ <0,05	70,3±1,9 p<0,05 p ₁ <0,05	38,4±2,7 p<0,05 p ₁ <0,05	15,1±1,7 p<0,05 p ₁ <0,05	25,1±1,5 p<0,05 p ₁ <0,05	10,2±1,6 p<0,05 p ₁ <0,05	20,2±1,7 p<0,05 p ₁ <0,05

Примечание: $p<0,05$ - уровень значимости достоверных отличий между контролем, донорами и больными; $p_1<0,05$ - уровень значимости достоверных отличий между донорами и больными.

высокая активность нейтрофилов, мигрирующих из системного кровотока, обеспечивает значительный резистивный потенциал полости рта. При катаральном гингивите еще в большей степени возрастает ФЧ и ФИ. Так, контакт интактных лейкоцитов со смешанной слюной больных приводил к более чем 20-ти кратному повышению ФЧ. Выявленный сдвиг, вероятно, указывает на дополнительную активацию "покоящихся" нейтрофилов ротовой полости местным воспалительным процессом: увеличением микробной обсемененности слизистой полости рта, появлением биологически активных веществ, медиаторами воспаления, изменением спектра цитомединов и т.д. По крайней мере, на такую возможность указывают Ашкинази В.И. и соавторы [3]. Однако при пародонтите, а особенно при наличии абсцесса или флегмоны ЧЛО, активирующая способность слюны и зубодесневой жидкости теряется. Имеется указание на то, что ареактивность оральных лейкоцитов при гнойно-септической патологии полости рта может быть изначальной, до манифестации заболевания, вплоть до выключения этого звена врожденного иммунитета [4]. Такое обстоятельство не может не создавать условия для развития гнойно-септической патологии ЧЛО. Очевидно, что при развитии гнойного воспаления

продуцируются вещества, угнетающие как фагоцитарную, так и переваривающую активность нейтрофилов. Последнее находит свое отражение в уровне ЛКБ и НСТ-тесте при флегмонах челюстно-лицевой области (таблица 2). Известно, что примерно 30 - 50% от общих ЛКБ составляют \square -дефензины, обладающие выраженной бактерицидной активностью [1]. В наших исследованиях показано, что после инкубации нейтрофилов с ротовой или зубодесневой жидкостью значительно возрастает как уровень ЛКБ, так и формазан-позитивных клеток (таблица 2). Не исключено, что этот сдвиг обусловлен наличием в слюне и зубодесневой жидкости достаточно высокой концентрации индукторов синтеза дефензинов ИЛ-1, ИЛ-17, ФНО- \square , ИФ- \square [1]. При развитии патологического процесса содержание ЛКБ и частота НСТ-положительного теста возрастают, что, вероятно, обусловлено увеличением концентрации провоспалительных цитокинов, микробных антигенов и других биологически активных веществ. Однако при развитии флегмоны ЧЛО зарегистрировано относительное уменьшение ЛКБ-позитивных клеток по сравнению с донорами и больными 1, 2 и 3-й групп больных. Параллельно у этих же больных уменьшалось количество формазан-позитивных клеток. Этот факт может сви-

Таблица 2

ЛКБ и НСТ-тест нейтрофилов, инкубуемых с ротовой и зубодесневой жидкостями ($M \pm SD$)

Исследуемые показатели	Контроль (физ. р-р)	Доноры		Группа 1		Группа 2		Группа 3		Группа 4	
		Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть	Ротовая жидк-ть	З/десневая жидк-ть
ЛКБ, %	1,6±0,1	10,2±0,3 p<0,05	3,5±0,2 p<0,05	14,5±0,5 p<0,05 p ₁ <0,05	5,6±0,4 p<0,05 p ₁ >0,05	12,1±0,4 p<0,05 p ₁ <0,05	3,0±0,3 p<0,05 p ₁ >0,05	16,3±0,5 p<0,05 p ₁ <0,05	5,7±0,3 p<0,05 p ₁ <0,05	4,2±0,4 p<0,05 p ₁ <0,05	2,1±0,6 p>0,05 p ₁ >0,05
НСТ, %	7,1±1,2	11,5±1,3 p<0,05	9,2±1,1 p>0,05	15,2±1,4 p<0,05 p ₁ <0,05	10,1±1,3 p<0,05 p ₁ >0,05	9,1±1,0 p>0,05 p ₁ >0,05	4,1±0,9 p>0,05 p ₁ >0,05	20,6±2,4 p<0,05 p ₁ <0,05	11,2±1,5 p<0,05 p ₁ <0,05	6,1±1,2 p>0,05 p ₁ <0,05	3,3±1,0 p<0,05 p ₁ <0,05

Примечание: $p<0,05$ - уровень значимости достоверных отличий между контролем, донорами и больными; $p_1<0,05$ - уровень значимости достоверных отличий между донорами и больными.

действовать как в пользу депрессии фагоцитарной активности нейтрофилов (таблица 1), так и снижения бактерицидной активности лейкоцитов ротовой полости. Предположительно причинами ингибирования эфферентной фазы фагоцитоза могут явиться сериновые антипротеазы: \square_1 -антитрипсин, \square_2 -антихимотрипсин, \square_2 -макроглобулин, связывающие дефензины [6].

При катаральном гингивите, пародонтите и абсцессе количество ЛКБ и НСТ-позитивных клеток возрастало (таблица 2), что отражает достаточно высокие возможности нейтрофилов в эфферентной фазе фагоцитоза. ЛКБ, в том числе и дефензины, повышают резистентность ротовой полости по нескольким механизмам. В частности, они способствуют формированию "фибринового блока" за счет ингибирования фибринолиза, препятствуя диссеминации инфекции [7]. Помимо бактерицидного действия дефензины рекрутируют Т-лимфоциты и нейтрофилы к очагу воспаления [9], стимулируют синтез провоспалительных цитокинов, активируют макрофаги [5]. Последняя реакция не может не сопровождаться секрецией тканевого фактора, усиливающего местную коагуляцию, а, следовательно, способствовать формированию "фибринового блока".

Таким образом, ротовая и зубодесневая жидкости здоровых людей значительно активируют нейтрофилы периферической крови доноров, что проявляется в росте ФЧ, ФИ, ЛКБ- и НСТ-позитивных клеток. При катаральном гингивите, пародонтите и абсцессе увеличивается количество ЛКБ- и НСТ- положительных клеток, а при флегмоне выявляются признаки депрессии как погло-

тительной, так и переваривающей способности нейтрофилов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будихина А.С. Дефензины - мультифункциональные катионные пептиды человека / А.С. Будихина, Б.В. Пинегин // Иммунология, аллергология, инфектология. - 2008. - № 2. - С. 31 - 40.
2. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / В.В. Меньшиков. - М. : Медицина, 1987. - 368 с.
3. Функциональная активность нейтрофилов ротовой полости при некоторых заболеваниях у детей / В.И. Ашкинази [и др.] // Российский педиатрический журнал. - 1999. - № 6. - С. 17 - 20.
4. Шулаков В.В. Ультразвуковая аэрозольная обработка ран в комплексной профилактике и лечении осложненного течения раневого процесса челюстно-лицевой области : автореф. дисс. канд. мед. наук / В.В. Шулаков. - Москва, 1995. - 21 с.
5. Differential effects of alfa- and beta defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial / N. Sakamoto [et al.] // Am. J. Physiol Lung Cell Mol Physiol. - 2005. - v. 288. № 3. - P. 508 - 13.
6. Panyutich A.V. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other / A.V. Panyutich, P.S. Hiemstra van S. Wetering and T. Ganz / Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. - 1995. - v. 12. - № 3. - P. 351 - 357.
7. Plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cell / A.A Higari. [et al.] // J. biol. chem. - 1996. - v. 271. - № 30. - P. 17650 - 17655.
8. Yamamoto M. Isolation of human salivary polymorphonuclear leucocytes and their stimulation / K. Saeki, K. Utsumi // Archiv Biochemistry Biophysics . - 1991. - v. 289. - № 2. - P. 76 - 82.
9. Yang D. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal / D. Yang, A. Biragyn, L. Kwak // Trend Immunol. - 2002. - v. 23. - P. 291 - 296.