

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРИМОГО ОСТЕОКЛАСТАКТИВИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И ОСТЕОПРОТЕГЕРИНА В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ ПАЦИЕНТОВ С ПАРОДОНТИТОМ

Вавилова Т.П., Пашкова Г.С., Гринин В.М.

Московский государственный медико-стоматологический университет,

г. Москва

Информация для связи: Пашкова Г. С. врач-пародонтолог клинко-диагностического центра МГМСУ. г.Москва, ул.Долгоруковская, д.4

Резюме

Обследовано 29 пациентов с хронической формой генерализованного пародонтита. В смешанной слюне определяли количество растворимого рецептора активатора нуклеации каппа В лиганд (sRANKL) и остеопротегерина, а также активность лактатдегидрогеназ, аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, иммуноферментным методом до и после пародонтологического лечения. Установлено, что после проведенного лечения в слюне снижается содержание sRANKL и активность исследованных ферментов. Эти изменения свидетельствуют о стабилизации воспалительного процесса и снижении интенсивности деструктивного процесса в костной ткани пародонта.

Ключевые слова

Пародонтит, sRANKL, остеопротегерин, ферменты слюны.

Проявления заболеваний пародонта связаны с нарушением физиологической регенерации костной ткани альвеолярного отростка, которая на определённом этапе переходит либо на репаративный, или на патологический путь. При развитии патологического пути регенерации в пародонте возникает дисбаланс в остеокласт/остеобласт активирующей системе, которая в норме обеспечивает процесс ремоделирования костной ткани [6].

Процесс ремоделирования костной ткани включает две стадии - резорбции и восстановления. Образование межклеточного матрикса костной ткани происходит с участием клеток остеобластов, которые синтезируют коллагеновые и неколлагеновые белки [1, 11]. Остеобласты также синтезируют лиганды рецепторов активатора фактора нуклеации каппа В (RANKL), которые затем связываются с их поверхностью [10]. За разрушение костной ткани ответственны другие клетки – остеокласты, активация которых регулируется системными (паратгормоном и кальцитриолом) и локальными (фактором некроза опухоли, интерлейкинами, и простагландинами) факторами [14]. Образующиеся вначале одноядерные предшественники остеокластов имеют на своей поверхности мембранные рецепторы, называемые рецепторы активатора нуклеации каппа В (RANK). Связывание RANK-лиганда с RANK-рецептором сопровождается слиянием нескольких клеток-предшественников в один зрелый многоядерный остеокласт, который начинает разрушать костную ткань [8]. Стадия преобразования предшественников остеокластов в зрелый остеокласт может блокироваться белком остеопротегерином (OPG), который, свободно перемещаясь, связывает RANKL, предотвращая этим его связывание с RANK-рецептором. Остеопротегерин – гликопротеин, относящийся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли. Он способен подавлять мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов. В тканях ротовой полости OPG синтезируют фибробластные клетки волокон периодонта, десны, пульпы зуба, а также клетки эпителия слизистой оболочки [7, 9, 11].

Исследование показателей смешанной слюны позволяет оценивать процессы ремоделирования костной ткани и состояние мягких тканей при развитии пародонтита средней и тяжёлой степени тяжести, а также следить за эффективностью методов лечения, что является важным прогностическим тестом. Обычно исследуются такие показатели смешанной слюны, которые отражают интенсивность гликолиза, распада белков и аминокислот, повреждение мембран клеток, свободно-радикальное окисление в клетках микроорганизмов и/или мягких тканей пародонта. Повреждение костной ткани пародонта обычно оценивается только рентгенологическими методами.

Безусловно, на данном этапе клиническая стоматология нуждается в появлении новой тест-системы белкового спектра биологических жидкостей полости рта для выявления метаболических сдвигов во всех тканях пародонта.

Цель нашего исследования изучение содержания растворимого активатора фактора нуклеации каппа В лиганд, остеопротегерина и активности ряда ферментов смешанной слюны для комплексной оценки состояния тканей пародонта у пациентов с пародонтитом средней и тяжёлой степени до и после проведённого лечения.

Материалы и методы: Было проведено клиническое стоматологическое обследование 29 пациентов с воспалением пародонта по общепринятой методике до лечения, и после лечения через 1 месяц. Обследование пациентов на доклиническом этапе включало сбор анамнеза, осмотр полости рта. Для оценки гигиенического состояния полости рта и пародонтального статуса пациентов, определения эффективности проводимого лечения, помимо визуальной оценки, использовали упрощённый индекс гигиены (ОHI-S) по Грину-Вермиллиону (1964), пародонтальный индекс (PI) по Russel (1956) и степень кровоточивости десны после зондирования (SBI) по Muhlemann и Son (1971).

Лечение пациентов с пародонтитом начиналось с коррекции индивидуальной гигиены полости рта с обязательным введением в повседневный

уход стационарных ирригационных систем регулируемой мощности. Всем обследованным проводили несколько сеансов профессиональной гигиены полости рта с использованием ультразвукового аппарата «Piezon-master-600», скейлеров и кюрет Грейси, аппарата «Air-Flow», полировочных щеток, пасты «Detartrine-Z». После стихания острых воспалительных проявлений заболевания выполняли кюретаж пародонтальных карманов с применением экскаваторов, кюрет Грейси, удлиненных насадок к ультразвуковому наконечнику «Piezon». При проведении лоскутных операций проводили ликвидацию воспалительного очага без введения остеинтегрантов. Ирригация пародонтальных карманов и самостоятельные полоскания антисептическими растворами на основе 0,05% хлоргексидина биглюконата применялись на всех перечисленных этапах. Для иммобилизации зубов II и III степени подвижности проводили балочное, п-образное, вантовое шинирование.

Сбор смешанной слюны проводили натошак, без стимуляции, путём сплевывания в пробирку в течение 5 минут до и через 1 месяц после проведённого лечения. Пробирки с образцами до начала исследования хранились на холоду при $t=-30^{\circ}\text{C}$. Полученную слюну после однократного размораживания центрифугировали в течение 15 мин. при 3000 об/мин и в супернатанте слюны спектрофотометрическим методом определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) (МЕ/л), иммуноферментным методом определяли содержание растворимого рецептора активатора нуклеации каппа В лиганд (sRANKL) и остеопротегерина (OPG) (пг/мл). В качестве контроля была исследованная смешанная слюна 10 здоровых волонтеров, не имеющих воспалительных изменений в полости рта.

Все полученные в процессе обследования цифровые данные были подвергнуты статистической обработке методами вариационной статистики. Статистическая обработка данных произведена с использованием пакета

прикладных программ Statistica 6.0. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение для нормального распределения. Значимость различий в группах оценивалась по критерию Вилкоксона и Манна-Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение: Согласно проведённому клиническому обследованию и показанию пародонтальных индексов все пациенты были разделены на две группы по степени тяжести воспаления пародонта. В первую группу вошли 15 пациентов с пародонтитом средней степени (ХГПСС), а во вторую группу 14 пациентов с пародонтитом тяжёлой степени (ХГПТС).

До начала лечения у всех пациентов индивидуальная гигиена полости рта была неудовлетворительной, а значения PI и SBI были повышенными. После проведённого консервативного лечения у пациентов обеих групп было отмечено достоверное уменьшение индексов PI и SBI, а также снижение индекса гигиены. Однако если у пациентов с ХГПСС значения индексов приближались к значениям контрольной группы, то у пациентов с ХГПТС значения индексов PI и SBI уменьшались до показателей, наблюдаемых исходно у пациентов с ХГПСС.

Согласно полученным данным хронический генерализованный пародонтит характеризуется наличием в смешанной слюне маркёров ремоделирования костной ткани sRANKL и OPG (табл. 1). Нашими методами в смешанной слюне здоровых волонтеров содержание этих белков не выявлено.

Содержание sRANKL в слюне невелико и находится в прямой зависимости от степени тяжести пародонтита. Так, при ХГПТС количество этого белка почти в 3 раза превышает значения, полученные при ХГПСС, и находится в пределах от 3,00 до 3,80 пг/мл. Количество OPG в слюне пациентов с пародонтитом значительно выше содержания sRANKL, значения которого варьируют в пределах от 6,00 до 12,2 пг/мл.

Таблица 1

Содержание sRANKL и OPG (пг/мл) в смешанной слюне пациентов с пародонтитом средней и тяжёлой степени до и после проведённого лечения (M±m)

Показатели	sRANKL	OPG
ХГПСС (n=15)		
до лечения	0,86±0,22	7,89±1,53
после лечения	0,32±0,13 p=0,03	11,0±1,25 p=0,06
ХГПТС (n=14)		
до лечения	3,43±0,28 *p=0,02	10,0±1,70 *p=0,46
после лечения	1,44±0,24 p=0,02 *p=0,02	7,19±1,87 p=0,03 *p=0,11

Примечание: p – рассчитанное до и после проведённого лечения; *p – рассчитанное между группами.

После проведённого лечения в обеих группах пациентов количество sRANKL в смешанной слюне достоверно понижается, но не достигает значений контрольной группы. Наибольшее снижение количества sRANKL в 2,7 раза выявляется в группе пациентов с ХГПСС. Следует также отметить, что у 20% пациентов этой группы после лечения содержание sRANKL в смешанной слюне не определялось.

У пациентов с ХГПТС количество sRANKL в смешанной слюне уменьшалось в 2,3 раза, но превышало содержание определяемого белка у пациентов с ХГПСС как до, так и после проведённого лечения.

Содержание OPG в смешанной слюне после проведённого лечения у пациентов как с ХПСС, так и с ХГПТС имело только тенденцию к понижению, но оставалось повышенным по сравнению со значениями этого протеина в контрольной группе.

Таким образом, полученные нами данные о повышенном количестве sRANKL и OPG в смешанной слюне следует рассматривать как активацию Т-лимфоидных клеток в ответ на воспаление, которое при тяжёлой форме пародонтита не купируется полностью даже после проведённого лечения. Наши данные совпадают с результатами других исследователей, выявивших в десневой жидкости больных пародонтитом тяжёлой степени более низкое содержание OPG и большее количество sRANKL по сравнению со средней степенью поражения пародонта [9]. Считается, что на синтез sRANKL влияют клетки моноцит-макрофагальной линии, которые инициируют синтез мРНК sRANKL в остеокластах и подавляют синтез мРНК OPG в остеобластах [6]. Одновременно было показано, что активаторами синтеза sRANKL являются провоспалительные интерлейкины -1 β и 6, а также фактор некроза опухоли- α [14].

Проявление пародонтита в полости рта отражает и изменение активности ферментов смешанной слюны, что обусловлено, прежде всего, неудовлетворительной гигиены полости рта, а также интенсивным распадом тканевых белков и аминокислот [13]. Согласно полученным нами результатам, исходно в смешанной слюне пациентов с пародонтитом выявлена высокая активность всех исследованных ферментов по сравнению со значениями контрольной группы (табл.2).

Таблица 2

**Активность ферментов (МЕ/л) в смешанной слюне пациентов до и после
лечения пародонтита средней и тяжёлой степени (M±m)**

Ферменты	Группы				
	Контроль ная (n=10)	ХГПСС (n=15)		ХГПТС (n=14)	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
ЛДГ	96,1±3,31	177±35,4 Δp=0,06	99,1±23,0 Δp=0,2 *p=0,4	194±54,7 Δp=0,3	121±8,55 Δp=0,03 *p=0,03
АСТ	23,6±6,31	70,2±13,3 Δp=0,01	37,1±8,90 Δp=0,2 *p=0,08	84,0±15,8 Δp=0,01	60,1±15,0 Δp=0,03 *p=0,3
АЛТ	28,4±4,71	25,1±5,95 Δp=0,9	20,2±9,34 Δp=0,4 *p=0,2	53,0±15,2 Δp=0,2	24,5±4,80 Δp=1,0 *p=0,2
ЩФ	24,2±4,15	81,7±25,4 Δp=0,02	35,8±16,5 Δp=0,7 *p=0,07	162±80,1 Δp=0,02	37,1±6,09 Δp=0,07 *p=0,3

Примечание: Δp – по сравнению с значениями контрольной группы (критерий Манна-Уитни); *p – по сравнению с исходными данными (критерий Вилкоксона).

При развитии ХГПСС в слюне пациентов наблюдалось достоверное увеличение активности АСТ и ЩФ ($p < 0,05$), тогда как активность ЛДГ имела тенденцию к повышению, а активность АЛТ практически не отличалась от данных контрольной группы.

Пародонтит тяжёлой степени сопровождался ещё более высокой активностью в смешанной слюне ЛДГ, АСТ, АЛТ и ЩФ по сравнению со значениями пациентов с ХГПСС. Однако, в смешанной слюне пациентов с ХГПТС мы также не наблюдали статистически достоверных отличий в повышении активности ЛДГ

и АСТ от показателей контрольной группы, что было связано с индивидуальными различиями в количественных показателях исследуемых ферментов.

Выявленное нами повышение активности ЛДГ в смешанной слюне при пародонтите одни авторы объясняют тем, что данный фермент освобождается в окружающую среду анаэробной микрофлорой, являющейся обязательным участником процесса воспаления [4], а другие считают, что при воспалении ткани находятся в состоянии местной гипоксии [5].

В процессе деструкции ткани пародонта активно подвергаются протеолизу при участии различных протеиназ [2], освобождаются аминокислоты, из которых при расщеплении освобождается аммиак, обладающий цитотоксическим действием. Трансаминазы АСТ и АЛТ участвуют в процессах дезаминирования путём реакции межмолекулярного переноса аминогруппы на α -кетокислоту без промежуточного образования аммиака. Выявленная более высокая активность АСТ и АЛТ в смешанной слюне при ХГПТС свидетельствует о более интенсивном распаде освобождающихся аминокислот по сравнению со средней степенью воспаления пародонта.

Помимо трансаминаз при воспалении пародонта в смешанной слюне растёт активность ЩФ, источником которой являются полиморфноядерные лейкоциты, локализующиеся в пародонтальных карманах [3]. Они имеют большое количество специфических гранул, содержащих щелочную фосфатазу.

Через 1 месяц после проведённого лечения в смешанной слюне у пациентов обеих групп наблюдалось снижение активности ЛДГ, АСТ, АЛТ и ЩФ по сравнению с исходными данными. У пациентов с ХГПСС показатели активности всех исследованных ферментов после лечения не имели достоверных отличий от значений контрольной группы ($p > 0,1$).

После лечения пациентов с ХГПТС в смешанной слюне выявлено достоверное снижение активности ЛДГ и АСТ ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными. При этом активность ЛДГ оставалась достоверно выше

показателей контрольной группы ($p < 0,05$), что свидетельствует об сохраняющемся воздействии анаэробной микрофлоры на ткани пародонта, несмотря даже, на проведённое лечение.

Исследование содержания OPG и sRANKL в смешанной слюне является информативным показателем деструкции костной ткани, что позволяет диагностировать риск развития прогрессирующего пародонтита. Тяжёлая степень пародонтита даже после проведённого лечения характеризуется необратимыми процессами, смещёнными в сторону резорбции костной ткани альвеолярного отростка, проявляясь в усиленном синтезе sRANKL.

Литература:

1. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта, М., 2008. – С.115-121.
2. Вавилова Т.П. Ферментные системы жидкостей и тканей полости рта при пародонтите. – Дисс. ... докт. мед. наук. – Москва, 1991. – С. 187
3. Гильмиярова Ф.Н. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости. Самара. 2006. – С.67
4. Долгих В.Т., Матусов И.Е., Чесноков В.И., Солодников Н.Н., Таран Н.И., Корпачёва О.В. Клиническая патофизиология для стоматолога. Под ред. Проф. В.Т. Долгих. – М: Медицинская книга, Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2000. – С. 105-106
5. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Менщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. – М., Наука, 2001, С. 343.
6. Crotti T. Receptor activator NF KB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis // Crotti T., Smith M.D., Hirsch R. et al. / J Periodont Res. – 2003. – Vol. 38. – P.380–387.
7. Hasegawa T. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells // Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T. et al. / J Periodont Res. – 2002. - Vol.37. – P. 405–411.

8. Hofbauer L.C. Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology // Hofbauer L.C., Heufelder A.E./ J Mol Med. – 2001. - Vol.79. – P.243–253.
9. Mogi M. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patient with periodontitis // Mogi M., Otogoto J., Ota N., Togari A. / J Dent Res. – 2004. - Vol. 83. – P. 166–169.
10. Nakagawa N. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis // Nakagawa N., Kinoshita M., Yamaguchi K. et al. / Biochem Biophys Res Commun. – 1998. - Vol. 253. – P. 395–400.
11. Raisz L.G. Metabolic bone disease. // Raisz L.G., Kream B.E., Lorenzo J.A. / Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. Philadelphia, 2003. – P.1373–1383.
12. Sakata M. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells // Sakata M., Shiba H., Komatsuzawa H., et al. / J Bone Miner Res. – 1999. - Vol.14. – P.1486–1492.
13. Sreebny L.M., Yu A ., Green A ., Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus //Diabetes Care. – 1992. - Vol 15, Issue 7. – P. 900-904.
14. Tsuda E. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis // Tsuda E., Goto M., Mochizuki S. et al. / Biochem Biophys Res Commun.- 1997. - Vol. 234. – P. 137–142.