

Информация об авторах: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: n.u.anisimova@gmail.com

Анисимова Наталья Юрьевна — с.н.с., к.б.н.

Громова Елена Георгиевна — заведующая, д.м.н., e-mail: e_gromova05@mail.ru

Кузнецова Людмила Сергеевна — врач, Плужникова Наталья Андреевна — аспирант,

Андрейчиков Антон Александрович — стажер, Андрейчиков Александр Владимирович — профессор, д.м.н.,

Киселевский Михаил Валентинович — заведующий лабораторией, д.м.н., профессор, e-mail: kisele@inbox.ru.

© ДОМАНОВА Е.Т., ЦЫБИКОВ Н.Н., ЗОБНИН В.В. — 2011
УДК 616.31 — 002: 612.017.1

ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ α -ДЕФЕНЗИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА

Елена Товьевна Доманова, Намжил Нанзатович Цыбиков, Валерий Валерьевич Зобнин

(Читинская государственная медицинская академия, ректор д.м.н., проф. А.В. Говорин, кафедра патологической физиологии, зав. — д.м.н., проф. Н.Н. Цыбиков, кафедра стоматологии ФПК и ППС, зав. — к.м.н. В.В. Зобнин)

Резюме. Изучали фибринолитическую активность α -дефензинов у лиц со здоровым пародонтом, хроническим гингивитом, хроническим генерализованным пародонтитом. В ходе опытов установлены корреляционные взаимосвязи между уровнем α -дефензинов в смывах десневой борозды, кармана и фибринолизом. При воспалительных заболеваниях пародонта дефензины способны ингибировать фибринолиз, что помогает избежать микробной инвазии, однако при длительном процессе подавляется репарация тканей, развивается хроническое течение заболевания.

Ключевые слова: заболевания пародонта, α -дефензины, фибринолиз.

FIBRINE ACTIVITY OF α — DEFENSINES IN CHRONIC PERIODONTAL DISEASES

E.T. Domanova, N.N. Tsybikov, V.V. Zobnin
(Chita State Medical Academy)

Summary. Fibrine activity of α -Defensines in patients with healthy teeth, with chronic gingivitis, with chronic generalized periodontitis was studied. In the experimental course the correlation interactions between the α -Defensine level in the washing of the gum line, of the pocket and fibrinolysis have been revealed. In case of inflammatory periodontal diseases defensines, can inhibit fibrinolysis, which assists in prevention of microbe invasion, however, tissue restoration is suppressed in the long-lasting process, the chronic course of the disease is developed.

Key words: the periodontal diseases, α -Defensins, fibrinolysis.

Дефензины — катионные пептиды молекулярной массой 3-4 кДа, представляющие собой генетически различные α и β подсемейства и циклические Q-формы. Молекула дефензина состоит из 29-35 аминокислот и содержит 3 внутримолекулярные дисульфидные связи. У человека α -дефензины (human neutrophil peptides, HNP- α), составляют около 30-50% общего клеточного белка и локализованы в азурофильных гранулах нейтрофилов [4, 7]. В норме концентрация HNP- α в плазме менее 15 нМ, но может увеличиваться до 50 мкМ в ответ на инфекционные и воспалительные стимулы [8]. При нарушении эпителиального барьера, микроорганизмы, проникающие в организм хозяина, стимулируют высвобождение нейтрофилами HNP- α , что ведет к активации врожденного иммунитета [6]. Эти пептиды способны комплексоваться с белками и сохраняться в жидкостях организма [9]. В исследованиях Abd Al-Roof Higazi и Tomas Ganz (1996г) сообщалось, что последовательность аминокислот HNP- α напоминает Lys-связывающий участок в Крингл-доменах плазминогена. Дальнейшее изучение этих пептидов выявило двухфазное дозозависимое влияние на плазминоген-опосредованный фибринолиз. Ингибирующий эффект объясняется тем, что плазминоген, связанный с фибрином, в присутствии HNP- α менее восприимчив к активации тканевым активатором плазминогена (ТАП), а стимуляция фибринолиза — конкурентными отношениями между молекулами ТАП и HNP- α , за один сайт связывания [7]. В

физиологических условиях процессы фибринообразования и фибринолиза взаимоуравновешены, в том числе и в полости рта. В ходе изучения фибринолиза при воспалительных заболеваниях пародонта (ВЗП) П.П. Беликов отметил, что добавление смешанной слюны до осаждения эуглобулиновой фракции плазмы увеличивает скорость растворения фибринового сгустка, противоположный эффект проявляется если внести секрет после выпадения эуглобулинов в осадок [3]. Было выдвинуто предположение, что в роли ингибиторов фибринолиза могут выступать вещества находящиеся в клетках. Возможно это дефензины, содержащиеся в нейтрофилах десневой жидкости (ДЖ). Изучению этого вопроса посвящено исследование.

Цель исследования — проанализировать влияние дефензинов на фибринолитическую систему в здоровом пародонте и при воспалительных заболеваниях: хронический гингивит и хронический генерализованный пародонтит.

Таблица 1

Уровень дефензина и ИЛ-8, в смывах десневой борозды у лиц со здоровым пародонтом, пациентов с хроническим гингивитом, и в смывах пародонтального кармана при пародонтите

	Н — норма смывы из десневой борозды здоровых	Г — смывы из десневой борозды больных хроническим гингивитом	П — смывы из пародонтального кармана больных пародонтитом
Дефензины (пг/мл) Me $\pm$ SD (процентили 25-75)	946,3 $\pm$ 16,74 (940,4 — 963,6)	900,6 $\pm$ 69,66 (823,8 — 917,8) Z = 3,55*	709,1 $\pm$ 229,46 (619,2 — 769,5) Z = 4,11*, Z = 3,34**
ИЛ-8 пг/мл	18,56 $\pm$ 8,89 (15,41 — 32,09)	434,80 $\pm$ 27,68 (420,30 — 466,10) Z = 4,67*	106,0 $\pm$ 25,24 (104,40 — 110,40) Z = 4,63*, Z = 4,63**

Примечание: Z — коэффициент Манна-Уитни ($p < 0,05$), * — уровень значимых отличий между нормой, хроническим гингивитом и пародонтитом; ** — между хроническим гингивитом и пародонтитом.

Показатели фибринолиза, при внесении в пробирку смывов десневой борозды и пародонтального кармана

	ЭуФ (мин) Эуглобулиновый фибринолиз	ХгФ (мин) Хагеманзависимый фибринолиз
К — контроль, NaCl (0,9%) 0,2 мл	220,0 ± 25,12 (200,0 — 225,0)	12,30 ± 1,57 (10,30 — 13,30)
Н — норма смывы из десневой борозды здоровых	150,0 ± 18,84 (140,0 — 165,0) Z = 4,62*	6,0 ± 1,18 (5,3 — 7,6) Z = 4,63*
Г — смывы из десневой борозды больных хроническим гингивитом	280,0 ± 20,41 (260,0 — 290,0) Z = 4,24*, Z = 4,68**	19,3 ± 1,98 (18,3 — 21,0) Z = 4,63*, Z = 4,67**
П — смывы из пародонтального кармана больных пародонтитом	340,0 ± 20,46 (320,0 — 350,0) Z = 4,63*, Z = 4,64**, Z = 4,45***	27,6 ± 3,03 (25,6 — 30,6) Z = 4,63*, Z = 4,63**, Z = 4,67***

Примечание: Z — коэффициент Манна-Уитни ($p < 0,05$), * — уровень значимых отличий по сравнению с контролем; ** — уровень значимых отличий между нормой, хроническим гингивитом и пародонтитом; *** — между хроническим гингивитом и пародонтитом.

Материалы и методы

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (1964, 2000 ред.). В исследовании принимали участие 60 человек в возрасте от 25 до 40 лет. Исследуемая группа состояла из 45 человек: 15 — с интактным пародонтом, 15 пациентов с диагнозом хронический гингивит (ХГ) средней степени тяжести, 15 — с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) средней степени тяжести. Группа доноров крови — 15 человек без ВЗП. Материалом для исследования служили: смывы десневой борозды (СДБ) и пародонтального кармана (СПК), полученные от исследуемой группы путем аспирации с помощью стерильного шприц-тюбика [2, 5]. Кровь, получали от группы доноров пункционным методом из локтевой вены с помощью широкой иглы в пластиковые пробирки, из которой готовили тест-плазму, стабилизированную цитратом натрия. Тест-плазму доноров использовали для проведения коагуляционных тестов для оценки гемостаза: эуглобулиновый фибринолиз (ЭуФ) (Н. Kowarzyk и L. Buluk, 1954), хагеманзависимый (каолиновый) фибринолиз (ХгФ) (К.Н. Веремеенко, 1978) [цит. по 1]. Применительно к нашим опытам определения фибринолитической активности СДБ и СПК, проводилась модификация реакции фибринолиза, предложенная П.П. Беликовым в 1970 г. Смысл в том, что содержащиеся в слюне ингибиторы и активаторы фибринолиза при осаждении эуглобулинов диссоциируют, в осадке остаются активаторы, а ингибиторы удаляются вместе с надосадочной жидкостью [3]. В данном случае оцениваются активаторы фибринолиза, а ингибиторы нет. При внесении секрета после осаждения эуглобулиновой фракции плазмы ингибиторы остаются в пробирке и участвуют в реакции фибринолиза. В этом случае представляется возможным оценить наличие или отсутствие ингибиторов в секрете. Для проведения опытов мы использовали четыре пластиковые пробирки. Первые три пробирки заполнены тест-плазмой доноров и маркированы: «Н» — норма, «Г» — гингивит, «П» — пародонтит. После осаждения эуглобулиновой фракции тест-плазмы доноров в эти пробирки мы вносили 0,1мл СДБ или СПК (соответственно диагнозу и маркировке). В четвертую пробирку «К» — контроль вводили NaCl 0,9% 0,1мл. По скорости растворения фибринового сгустка судили о наличии или отсутствии ингибиторов фибринолиза в смывах десневой борозды и пародонтального кармана. Концентрацию дефензина определяли в СДБ и СПК методом ИФА (реактивы фирмы «Nucult Biotech»). Концентрацию цитокина ИЛ-8

определяли в СДБ и СПК методом ИФА (реактивы фирмы «Вектор-Бест», Новосибирск).

Статистический анализ проведен с использованием пакета программ STATISTICA версии 6.0, StatSoft Inc. (USA). Учитывая ненормальное распределение данных (распределение вариант проверялось критерием Шапиро-Уилка), при сравнении групп использовался U — критерий Манна — Уитни для независимых выборок, различия считали значимыми при $p < 0,05$. Результаты исследования представлены как $Me \pm SD$ и процентиля 25, 75, где Me — медиана, SD — среднее квадратичное отклонение. При анализе взаимосвязей параметров применялся непараметрический корреляционный метод Спирмена. При оценке силы корреляций считали: если $|r| \leq 0,25$ — слабая корреляция; $0,25 < |r| < 0,75$ — умеренная; $|r| \geq 0,75$ — сильная. Критический уровень значимости при проверке гипотез $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами обнаружено, у лиц со здоровым пародонтом в СДБ наблюдалась высокая концентрация HNP-α (табл. 1), что отражает достаточную готовность иммунитета поддерживать гомеостаз полости рта. При ХГ содержание пептида в СДБ несколько снижается, но остается значительным, что подтверждается высоким уровнем основного хемоаттрактанта нейтрофилов — ИЛ-8 (434,8 пг/мл). Концентрация дефензина при ХГП в СПК падает до — 709,1 пг/мл, возможно, вследствие потребления пептида в ходе воспалительной реакции или по причине снижения уровня ИЛ-8 (106 пг/мл) по сравнению с нормой и ХГ ($p < 0,05$). Уровень HNP-α наглядно отражает иммунный потенциал полости рта при ВЗП.

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между уровнем дефензинов в смывах десневой борозды у лиц со здоровым пародонтом, пациентов с хроническим гингивитом, в смывах пародонтального кармана при пародонтите с показателями фибринолиза. Значимые корреляции Спирмена на уровне $p < 0,05$

	Дефензины		
	Здоровый пародонт (n=15)	ХГ-хронический гингивит (n=15)	ХГП — хронический генерализованный пародонтит (n=15)
ЭуФ - Эуглобулиновый фибринолиз	$r=0,7$ $p=0,0009$	$r=0,5$ $p=0,035$	$r=0,8$ $p=0,0003$
ХгФ - Хагеманзависимый фибринолиз	$r=0,6$ $p=0,006$	$r=0,4$ $p=0,106$	$r=0,7$ $p=0,0006$

Скорость ЭуФ у пациентов с диагнозом ХГ и ХГП значительно снижается (табл. 2) по сравнению с контролем «К» — 220,0 мин ($p < 0,05$). В тесте ХгФ наблюдается подобное торможение активности фибринолиза. Полученные данные показывают: при внесении СДБ или СПК снижается активность фибринолиза, что указывает на присутствие ингибиторов, возможно содержащийся в клетках ДЖ.

Для определения патогенетических взаимосвязей между уровнем HNP-α и показателями фибринолиза больных ВЗП и здоровых, нами проведен корреляционный анализ (табл. 3). Так, у пациентов с диагнозом ХГП выявлены сильные корреляционные взаимосвязи, показывающие зависимость скорости фибринолиза от концентрации HNP-α в СПК. Очевидно, изменение в процессах гемостаза также связано с уменьшением в крови у этих больных ИЛ-8, основного хемоаттрактанта для нейтрофилов, в гранулах которых находятся HNP-α. Потенциал дефензинов ингибировать фибринолиз имеет положительный эффект помогая избежать микробной инвазии. Однако длительное влияние приводит к подавлению процессов репарации и может, по нашему мнению, служить

основой для прогрессирования патологического процесса и развитию порочного круга в патогенезе заболевания.

Таким образом, определение концентрации дефензинов при воспалительных заболеваниях пародонта дают

возможность контролировать патологический процесс, предупредить возможное развитие хронического течения заболевания и может служить, по нашему мнению, одним из объяснений прогрессирования гингивита в пародонтит.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольберг Е.Д. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. — Томск, 1980. — 233 с.
2. Барер Г.М., Кочержинский В.В., Халитова Э.С. Десневая жидкость: состав и свойства // Стоматология. — 1986. — № 4. — С. 86-90.
3. Беликов П.П. Нарушение гемокоагуляции и фибринолиза и их коррекция при заболеваниях пародонта: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1990. — 36 с.
4. Будихина А.С., Пинегин Б.В. α -Дефезины — антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции // Иммунология. — 2008. — №5. — С. 317-320.
5. Робустова Т.Г., Лебедев К.А., Максимовский Ю.М. Иммунный статус в полости рта. — М., 1990. — 30 с.
6. De Yang, et al. Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins and Eosinophil-derived in Host Defense // Annual Review Immunology. — 2004. — Vol 22. — P.181-215.
7. Higazi A.A.R., et al. Defensin Modulates Tissue-type Plasminogen Activator and Plasminogen Binding to Fibrin and Endothelial Cells // Journal of Biological Chemistry. — 1996. — Vol. 271. — P. 17650-17655.
8. Lehrer I.R., Ganz T. Antimicrobial Peptides in Mammalian and Insect Host Defence // Current Opinion Immunology. — 1999. — Vol.11. — P.23-27.
9. Panyutich A.V., et al. Plasma Defensin Concentrations Are Elevated in Patients with Septicemia or Bacterial Meningitis // Journal Laboratory Clinical Medicine. — 1993. — Vol. 122. — P. 202-207.

Информация об авторах: 672090, Забайкальский край, г. Чита, ул. Горького, д. 39а, тел.: (3022) 315981

Доманова Елена Товьевна — старший лаборант, e-mail: l.domanova@yandex.ru;

Цыбиков Намжил Нанзатович — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, e-mail: Thybikov@mail.ru;

Зобнин Валерий Валерьевич — к.м.н., заведующий кафедрой, e-mail: v.zobninstom@mail.ru

© САЯПИНА И.Ю., ЦЕЛУЙКО С.С. — 2011

УДК 591.463.05:616-001.18/19

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЕ НА ЭТАПАХ АДАПТАЦИИ ОРГАНИЗМА К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Ирина Юрьевна Саяпина, Сергей Семёнович Целуйко

(Амурская государственная медицинская академия, Благовещенск, ректор — д.м.н., проф. В.А. Доровских, кафедра гистологии, зав. — д.м.н., проф. С.С. Целуйко)

Резюме. Изучена структурно-функциональная организация простаты крыс при окислительном стрессе (ОС), вызванном адаптацией организма к низким сезонным температурам. Установлено, что структурные и биохимические проявления ОС имеют место уже на 1-й неделе адаптации, достигают максимального развития к концу 4-й недели адаптации и сохраняются через 8 недель после завершения адаптации. Адаптация к холоду сопровождается повышением секреторной и пролиферативной активности glanduloцитов, что приводит к развитию гипертрофии и очаговой гиперплазии железистого эпителия. Через 8 недель после адаптации в железистом эпителии преобладают дегенеративные изменения с массовой гибелью эпителиоцитов, пролиферативный потенциал эпителия угнетается.

Ключевые слова: простата, окислительный стресс, адаптация.

OXIDATIVE STRESS IN PROSTATE AT THE STAGES OF ADAPTATION OF AN ORGANISM TO LOW TEMPERATURES

I.Y. Sayapina, S.S. Tseluyko

(Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk)

Summary. The structural and functional organization of the prostate of rats under oxidative stress (OS), caused by adaptation to low seasonal temperatures has been researched. It has been found that the severity of the OS in the prostate is correlated with the duration of the period of adaptation. Structural and biochemical manifestations of the OS occur during the 1st week of adaptation, the maximum development reach to the end of 4th week of adaptation and persist in the prostate 8 weeks after the end of adaptation. The cold adaptation causes the increase in the secretory and proliferative activity of glandular cells, that in the future lead to the hypertrophy and focal hyperplasia of the glandular epithelium. In the late periods after adaptation in the glandular epithelium the degenerative changes are observed due to the massive loss of epithelial cells, proliferative potential of the epithelium depressed.

Key words: prostate, oxidative stress, adaptation.

Распространённость заболеваний предстательной железы определяет повышенный интерес исследователей к изучению структурно-функциональных изменений в простате при воздействии на организм неблагоприятных факторов среды. В последние годы особое внимание уделяется ОС в предстательной железе [4, 5, 7, 10, 13]. Установлено, что ОС нарушает в простате естественный баланс между процессами пролиферации, дифференцировки и гибели клеток железистого

эпителия, являясь фактором, стимулирующим её гиперплазию и канцерогенез [5, 6, 13]. Развитие ОС в простате могут инициировать различные средовые факторы: описан ОС простаты, вызванный диетой с повышенным содержанием холестерина [7], влиянием на организм промышленных токсикантов [4] и лекарственных препаратов [10]. ОС является стереотипной реакцией организма при адаптации к низким сезонным температурам, однако структурно-функциональная организа-