

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ С ПОЛНЫМ ОТСУТСТВИЕМ ЗУБОВ

Садыков М.И., Шумский А.В., Нестеров А.М., Нестеров Г.М.

*ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Минздрава России» Самара, Россия, e-mail: stoma2001@rambler.ru*

Проведена сравнительная оценка состояния местного иммунитета полости рта у пациентов с полным отсутствием зубов. Пациенты контрольной группы получали традиционное лечение. Пациентам основной группы проводили предпротезическую подготовку беззубого протезного ложа с применением аутоплазмотерапии. Исследовались следующие показатели: содержание лизоцима, секреторного IgA, альфа-дефензина, концентрация цитокинов человека IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ . Изучение местного иммунитета полости рта у пациентов контрольной и основной групп по лечению показало наличие хронического воспаления полости рта, диссонанс интерлейкинового статуса. Полученные показатели значительно не менялись у пациентов контрольной группы на всем протяжении исследования. Применение аутоплазмотерапии у пациентов основной группы приводило к активации неспецифической иммунной защиты полости рта, к снижению провоспалительных и повышению противовоспалительных интерлейкинов.

Ключевые слова: аутоплазмотерапия, местный иммунитет, полное отсутствие зубов.

## EVALUATION OF LOCAL IMMUNITY ORAL CAVITY IN PATIENTS WITH COMPLETE ABSENCE OF TEETH

Sadykov M.I., Shumsky A.V., Nesterov A.M., Nesterov G.M.

*Medical University «Samara State Medical University, Ministry of Health of Russia» Samara, Russia, e-mail: stoma2001@rambler.ru*

A comparative assessment of the state of local immunity of the oral cavity in patients with a complete lack of teeth. Patients in the control group received standard treatment. Patients of the main group carried predproteticheskuyu to othless preparing prosthetic bed with autoplazmoterapii. The following parameters were studied: the content of lysozyme, secretory IgA, alpha-defensin concentration of human cytokines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ . The study of local immunity of the oral cavity in patients and control groups for the primary treatment showed the presence of chronic inflammation of the mouth, dissonance interleukin status. These figures have not changed significantly in the control group throughout the study. Application autoplazmoterapii patients basic groups leads to the activation of nonspecific immune defense mouth to reduce and increase anti-inflammatory interleukins.

Keywords: autoplazmoterapiya, local immunity, a complete lack of teeth.

Ортопедическое лечение больных с полным отсутствием зубов, и в особенности на нижней челюсти, представляет собой одну из основных проблем ортопедической стоматологии. Прогрессирование атрофических процессов после удаления зубов приводит к тяжелым клиническим условиям полости рта, при которых традиционно используемые клинико-лабораторные этапы изготовления полных съемных пластиночных протезов не всегда оказываются эффективными [1,2,4].

Применяемые съемные протезы вызывают патологические изменения слизистой оболочки протезного ложа. Она значительно отличается по морфологическим и иммунологическим критериям от слизистой оболочки при наличии зубов. Отсутствие зубов нарушает рефлекторную взаимосвязь с органами полости рта: изменяется состав и свойства ротовой жидкости. При клиническом осмотре полости рта больных с частичным или полным

отсутствием зубов можно заметить атрофические изменения, участки десквамации и уменьшение конфигурации слизистой оболочки. У ряда пациентов можно выявить атрофию мелких слизистых желез. Все это инициирует хроническое воспаление, дисбиотические расстройства и, как следствие, иммунные нарушения в полости рта [3,5].

**Цель исследования:** оценить состояние местного иммунитета полости рта у пациентов с полным отсутствием зубов до ортопедического лечения и после проведения аутоплазмотерапии.

**Материалы и методы исследования.** Для нормализации функции слизистой оболочки полости рта, восстановления рельефа, увеличения ее податливости, устранения атрофии эпителия нами успешно апробирована плазмотерапия (Plazmolifting).

Суть метода состояла в следующем. У пациентов производили забор небольшого количества крови из вены (в среднем от 9 до 36 мл), а затем с помощью центрифугирования в специальной для этого биотехнологической пробирке получали плазму, обогащенную тромбоцитами и факторами роста.

Полученную после центрифугирования плазму вводили локально под слизистую оболочку беззубого протезного ложа при помощи инсулинового шприца (по 0,2-0,3 мл на 1 см<sup>2</sup>) по вершине альвеолярного гребня на верхней и нижней челюстях, а на верхней челюсти еще и в области шва твердого неба. Далее в течение 5–6 минут проводили пальцевой массаж слизистой оболочки малоподатливых зон. При 1 степени податливости слизистой оболочки по Суппле проводили 1 курс. При 2 степени податливости проводили 2 курса с интервалом через 8–10 дней. При этом происходила стимуляция образования фибробластов. Фибробласты производят коллаген, гиалуроновую кислоту и эластин, что в свою очередь приводило к образованию молодой соединительной ткани и росту капилляров. Кроме этого, факторы роста блокируют остеокласты и стимулируют пролиферацию остеобластов, что сдерживает дальнейшую убыль костной ткани и способствует ее восстановлению.

Для исследования были привлечены 60 пациентов с малым количеством зубов на одной из челюстей и их полным отсутствием на противоположной. Все пациенты имели неудовлетворительные условия для стабилизации полного съемного протеза, слизистая оболочка протезного ложа соответствовала 2 классу по Суппле. Пациенты случайным образом были разделены на контрольную и основную группы. Больным контрольной группы (30 человек) проводилось ортопедическое лечение по традиционным технологиям, а пациентам основной группы (30 человек) перед протезированием проводили подготовку протезного ложа при помощи предложенного нами метода с применением аутоплазмотерапии.

Для изучения состояния местного иммунитета полости рта исследовали ротовую жидкость у пациентов контрольной и основной группы. Материалом служила не стимулированная смешанная слюна. Перед взятием материала пациенту предлагали прополоскать рот кипяченой водой комнатной температуры.

Для забора материала в каждом случае использовали стерильные флаконы. Слюну подвергали центрифугированию при 3000 об/мин в течение 15 мин, после чего замораживали при температуре минус 70°.

Для оценки состояния местного иммунитета полости рта: определяли содержание лизоцима, секреторного IgA, альфа-дефензина, исследовали концентрацию цитокинов человека IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ .

Для определения содержания лизоцима из 24-часовой культуры *Micrococcus Lysodecticus* (штамм № 2665, полученный из ГИСК им. Тарасевича) готовили суспензию тест культуры в физиологическом растворе по оптическому стандарту мутности 0,5 по Макфарланду. Далее суспензию в количестве 1 мл рассеивали на поверхность питательного агара с формированием микробного газона.

Ротовой жидкостью пропитывали стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм. Пропитанные жидкостью диски, укладывали на поверхность приготовленного микробного газона, и инкубировали в термостате 24 часа. Учет результатов проводили по диаметру зоны задержки роста вокруг диска и отображали в мм.

Для определения количественного секреторного IgA использовали набор «IgA секреторный ИФА-БЕСТ» методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Концентрацию  $\alpha$ -дефензина определяли, используя набор HBTNHP 1-3 ELISA, предназначенный для количественного определения дефензинов нейтрофилов в смешанной слюне.

Определение содержания цитокинов проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) по интенсивности флуоресценции исследуемых образцов.

Данные показатели исследовали в динамике у пациентов контрольной и основной групп до протезирования и через 30 суток после проведения плазмолифтинга пациентам основной группы.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программ Microsoft Excel, Statistica 10.0 и SPSS 16.0.

**Результаты и обсуждения.** Дефензины обеспечивают реализацию защитных и приспособительных реакций организма при инфицировании и стрессорном воздействии. Антимикробные пептиды представляют собой небольшие катионные пептиды, которые воздействуют на микроорганизмы путем нарушения проницаемости мембран, образуя

ионные каналы, при этом вызывая мембранную деполяризацию и лизис. Результат защитного действия этих факторов оказывается очень мощным. Дефензины принимают участие и в адаптивном иммунном ответе. Полученные результаты уровня содержания альфа-дефензина в смешанной слюне у пациентов контрольной группы и пациентов основной группы, которым проводилась подготовка протезного ложа с использованием плазмолифтинга, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Уровень содержания  $\alpha$ -дефензина в смешанной слюне у пациентов контрольной и основной групп

До лечения у пациентов контрольной и основной групп (нг/мл)	Через 15 дней после проведения плазмолифтинга (нг/мл)	Через 30 дней после проведения плазмолифтинга (нг/мл)
268,4±27,3	504,8±78	181,4±17,9

Примечание:  $p < 0,05$ .

Из полученных результатов видно, что до ортопедического лечения у пациентов контрольной и основной групп уровень содержания  $\alpha$ -дефензина в смешанной слюне соответствовал 268,4±27,3 (нг/мл). Данный показатель у пациентов контрольной группы значительно не изменялся на всем протяжении исследования, что указывает на хронический вялотекущий процесс. У пациентов же основной группы произошли значительные изменения на 15 сутки после проведения плазмолифтинга. Уровень содержания  $\alpha$ -дефензина в смешанной слюне увеличился в 1,9 раза по сравнению с показателями, полученными до лечения у пациентов контрольной и основной групп, и составил 504,8±78 (нг/мл). Увеличение данного показателя указывает на активацию неспецифической иммунной защиты полости рта у пациентов основной группы. На 30-е сутки уровень содержания  $\alpha$ -дефензина у наблюдаемых пациентов основной группы снизился, что указывает на купирование воспаления. Повышение дефензима свидетельствует об ответной реакции на патогенные микроорганизмы которые отмечаются у больных с частичным и полным отсутствием зубов. Содержание дефензима четко отражает степень дисбиотических нарушений в полости рта.

На сегодняшний день достоверным показателем иммунологических изменений являются показатели цитокинов. Учитывая тот факт, что иммунокомпетентные клетки могут экспрессировать различные рецепторы, то более достоверным критерием функциональной способности иммунной системы являются показатели цитокинов. Интерлейкины четко указывают фазность иммунного ответа.

Результаты динамики содержания цитокинов в слюне у пациентов контрольной и основной групп представлены в таблице 2.

## Динамика содержания цитокинов слюны

Цитокины	До лечения у пациентов контрольной и основной групп	У больных основной группы на 30-е сутки после плазмолифтинга	Контрольная группа на 30-е сутки после лечения
IL-1 $\beta$	201,3 $\pm$ 32,2	561,4 $\pm$ 22	286,6 $\pm$ 24,1
IL-2	214,9 $\pm$ 4,2	112,5 $\pm$ 13,1	208,8 $\pm$ 11,2
IL-4	98,9 $\pm$ 8,0	59,8 $\pm$ 7,1	128,0 $\pm$ 14,7
IL-5	24,0 $\pm$ 2,7	11,2 $\pm$ 4,0	38,6 $\pm$ 4,8
IL-8	66,9 $\pm$ 7,4	94,1 $\pm$ 7,2	61,7 $\pm$ 4,9
IL-10	16,9 $\pm$ 4,4	19,3 $\pm$ 3,1	47,2 $\pm$ 3,3
TNF $\alpha$	4,4 $\pm$ 1,2	16,5 $\pm$ 2,0	8,1 $\pm$ 2,1

Из полученных результатов следует, что на 30-е сутки после плазмотерапии у пациентов основной группы произошло снижение IL-2, что свидетельствует о завершении воспалительного процесса, элиминации микроорганизмов.

Исследование содержания цитокинов в слюне подтвердило положительную динамику цитокиновой противовоспалительной реакции.

Согласно полученным нами данным на 30-е сутки терапии аутоплазмой содержание интерлейкинов IL-8, IL-10 повысилось, а содержание IL-2 снизилось, что свидетельствует о повышении противовоспалительного потенциала.

Обращают на себя внимание содержание цитокинов IL-4, IL-5 и TNF $\alpha$ , динамика которых имела различное направление в сравниваемых группах. У пациентов, получавших плазмолифтинг, уровень интерлейкинов IL-4 и IL-5 в результате лечения статистически значимо снизился ( $p < 0,01$ ), а TNF $\alpha$  – незначительно повысился ( $p > 0,05$ ). У пациентов контрольной группы уровень IL-4 и IL-5 после применения стандартного лечения повысился ( $p < 0,05$ ), а содержание TNF $\alpha$  статистически значимо снизилось ( $p < 0,01$ ).

Ответная реакция на плазмолифтинг проявляется достоверным повышением содержания IL-1, что может свидетельствовать о «запуске» воспалительного процесса, инициированного микробным и грибковым антигенным раздражителями.

Динамика интерлейкинового ответа убеждает в том, что плазмотерапия повышает противовоспалительный ответ, в довольно быстрые сроки купирует хроническое состояние в полости рта, вызванные дисбиотическими сдвигами.

В результате исследований было установлено, что плазмотерапия при атрофии слизистой оболочки полости рта устраняет диссонанс интерлейкинового статуса, координирует содержание провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Лизоцим (мурамидаза) является одним из ключевых показателей резистентности полости рта. Мурамидаза направлена на разрушение грамположительной микрофлоры.

Данный фермент запускает многие иммунные реакции, инициирует активность гуморального местного иммунитета. Содержание лизоцима в слюне у пациентов контрольной и основной групп до лечения и на 30 сутки после проведения плазмолифтинга представлено в таблице 3.

Таблица 3

Уровень содержания лизоцима в смешанной слюне у пациентов контрольной и основной групп

До лечения у пациентов контрольной и основной групп (мкг/мг)	Контрольная группа на 30-е сутки после лечения(мкг/мг)	У больных основной группы на 30-е сутки после плазмолифтинга(мкг/мг)
12,1±2,9	10,8±3,2	28,1±3,3

Примечание:  $p < 0,05$ .

Содержание лизоцима в ротовой жидкости у наблюдаемых пациентов контрольной и основной групп до лечения составило 12,1±2,9 мкг/мг.

Изучая показатели лизоцима в слюне через 1 мес, нельзя не отметить наглядную тенденцию к положительной динамике данного показателя у пациентов, получавших плазмотерапию.

Содержание лизоцима у больных, которым проводилась плазмотерапия, увеличилось на 16 мкг/мг (28,1±3,3 мкг/мг при  $p < 0,05$ ), что свидетельствует об активации гуморального звена неспецифической системы местного иммунитета. Важно отметить, что при использовании зубных протезов у больных контрольной группы содержание лизоцима в слюне менялось незначительно, и данное через 1 месяц значение показателя оставалось таким же (10,8±3,2 мкг/мг при  $p < 0,05$ ).

О состоянии мукозального иммунитета можно судить по такому важному фактору, как sIgA.

Секреторный IgA относится к маркерам местного иммунитета. Сборка секреторного иммуноглобулина происходит на базальной мембране лимфоидных и эпителиальных клеток из предшественника секреторного компонента сывороточного IgA. Изменение количества sIgA в смешанной слюне позволяет определить состояние местного иммунитета полости рта, также контролировать динамику лечения.

Динамика показателей sIgA в слюне у пациентов контрольной и основной групп до лечения и на 30-е сутки после проведения плазмолифтинга представлено в таблице 4.

Таблица 4

Уровень содержания sIgA в смешанной слюне у пациентов контрольной и основной групп

До лечения у пациентов контрольной и основной	Контрольная группа на 30-е сутки после лечения (мг/мл)	У больных основной группы на 30-е сутки после

групп (мг/мл)		плазмолифтинга(мг/мл)
79±9,2	153±12,1	289±17,3

Примечание:  $p < 0,05$ .

Нельзя не отметить положительное влияние плазмолифтинга на синтез sIgA в ротовой жидкости.

После применения плазмолифтинга к концу 4 недели отмечалось повышение содержания sIgA до 289 мг/мл. Хотелось бы указать тот факт, что у пациентов после отмечалась выраженная тенденция к снижению содержания sIgA. Очевидно, это объясняется механизмом влияния зубного протеза на гуморальный ответ местного иммунитета.

**Заключение.** Таким образом, оценивая результаты по изучению местного иммунитета полости рта, можно сделать заключение, что у пациентов основной и контрольной групп до ортопедического лечения имелось хроническое воспаление полости рта. Это подтверждается содержанием  $\alpha$ -дефензина в смешанной слюне на уровне  $268 \pm 27,3$  (нг/мл). Изучение профиля цитокинов ротовой жидкости также подтверждает хроническое воспаление полости рта у пациентов с сочетанием частичного и полного отсутствия зубов. Кроме этого, о низкой неспецифической иммунной защиты полости рта до ортопедического лечения указывают низкие показатели секреторного IgA ( $79 \pm 9,2$  мг/мл) и лизоцима ( $12,1 \pm 2,9$ ). Полученные показатели значительно не изменились у пациентов контрольной группы на всем протяжении исследования, что указывает на хронический вялотекущий процесс, диссонанс интерлейкинового статуса и дисбиотическое нарушение.

Применение аутоплазмотерапии у пациентов основной группы приводило к активации неспецифической иммунной защиты полости рта. Исследование основных цитокинов в ротовой жидкости показало достоверное снижение провоспалительных и повышение противовоспалительных интерлейкинов под действием плазмотерапии. Устраняется диссонанс интерлейкинового статуса. Активируется неспецифическая иммунная защита полости рта, что подтверждается увеличением содержания  $\alpha$ -дефензина и секреторного IgA в слюне пациентов, которым проводилась аутоплазмотерапия.

### Список литературы

1. Саввиди К.Г. Результаты ортопедического лечения пациентов пожилого и старческого возраста с полной потерей зубов при применении оптимизированных собственных методик [Текст] / К.Г. Саввиди, Г.Л. Саввиди, А.В. Белова // Верхневолжский медицинский журнал. – 2014. – Т.12. – С.31-34.

2. Садыков М.И. Успехи и неудачи при реабилитации больных с полным отсутствием зубов [Текст] : монография / М.И. Садыков. – Самара : Офорт; СамГМУ, 2004. – 168 с.
3. Олесова В.Н. Динамика микроциркуляции в слизистой оболочке протезного ложа у пациентов в период приспособления к полным съемным протезам [Текст] / В.Н. Олесова, В.Р. Шашмурина, Е.В. Силаев, А.В. Кузнецов и др. // Российский стоматологический журнал. – 2008. – № 3. – С.34-36.
4. Critchlow, S.B. Prognostic indicators for conventional complete denture therapy: A review of the literature [Text] / S.B. Critchlow, J.S. Ellis // J. Dent. – 2010. – Vol. 38, № 1. – P.2-9.
5. Lu, Ya-lin. Stress area of the mandibular alveolar mucosa under complete denture with linear occlusion at lateral excursion [Text] / Ya-lin Lu, Hang-di Lou, Qi-guoRong et al. // J. Chin. Med. – 2010. – Vol.123, № 7. – P.917-921.

**Рецензенты:**

Байриков И.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и стоматологии ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара;

Степанов Г.В., д.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.