

# Изучение содержания дефензинов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области

Д.м.н. Т.П. ИВАНЮШКО\*, д.м.н., проф. Л.В. ГАНКОВСКАЯ, к.м.н. С.В. ШАМАНАЕВ, д.м.н. О.А. СВИТИЧ, к.м.н. Д.Д. КАРТАШОВ, к.м.н. В.В. ГРЕЧЕНКО, Р.А. БАЛЫКИН

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; Российский национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

## Defensines level in patients with inflammatory diseases of maxillofacial area

T.P. IVANYUSHKO, L.V. GANKOVSKAYA, S.V. SHAMANAIEV, O.A. SVITICH, D.D. KARTASHOV, V.V. GRECHENKO, R.A. BALYKIN

Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Молекулярное исследование врожденных факторов иммунитета было проведено на 45 пациентах с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО). Изучена группа катионных низкомолекулярных пептидов —  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензинов, обладающих прямой антибактериальной активностью и участвующих в регуляции иммунных процессов. У больных ГВЗ ЧЛО экспрессия дефензинов в слизистой оболочке полости рта была в 20 раз выше по сравнению с контрольной группой (12 здоровых лиц). Изучение факторов врожденного иммунитета выявило их важную роль в развитии ГВЗ ЧЛО. Для повышения эффективности лечения больных с ГВЗ ЧЛО рекомендована цитокиноterapia.

*Ключевые слова:* гнойно-воспалительные заболевания, челюстно-лицевая область, острый одонтогенный остеомиелит, врожденный иммунитет, катионные пептиды, дефензины, цитокиноterapia, суперлимф.

Molecular study of congenital immune factors was conducted in 45 patients with inflammatory diseases of maxillofacial area. The study focused on expression of cationic low-molecular peptides  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins in oral mucosa. These peptides are involved in antibacterial activity and regulation of immune reactions. The results showed 20-fold increase in defensins expression in oral mucosa of patients with inflammatory diseases of maxillofacial area when compared to control group (12 healthy individuals) thus proving an important role they play in the development of the disease. Therapy with cytokines may be indicated in these cases.

*Key words:* inflammatory diseases, maxillofacial area, acute odontogenous osteomyelitis, congenital immunity, cationic low-molecular peptides, defensins, cytokinotherapy, superlimf.

Гнойно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО), представляющие угрозу для здоровья и жизни больных, являются одной из актуальных проблем стоматологии.

В этиологии ГВЗ ЧЛО решающую роль играют 2 основных фактора: активность резидентной микрофлоры полости рта и состояние врожденного иммунитета слизистой [1, 2, 11–13, 16].

В настоящее время активно изучаются механизмы врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек. Важнейшими эффекторными молекулами, обеспечивающими противомикробную защиту, являются низкомолекулярные пептиды — дефензины [5, 7, 9, 10, 15, 17].

Дефензины обладают широким спектром антимикробной активности, вызывая гибель микроорганизмов вследствие нарушения целостности их мембран. Дефензины называют эндогенными антибиотиками. Помимо прямого микробицидного действия, отмечено их опосредованное влияние на гуморальный и клеточный иммунный ответ [7, 8].

Известно, что провоспалительные цитокины индуцируют выработку дефензинов [14].

В работах ряда авторов показано, что эпителиальными клетками слизистой оболочки полости рта вырабатываются  $\beta$ -дефензины, осуществляющие защиту полости рта (СОПР) от бактериальной инвазии и препятствующие колонизации патогенными микроорганизмами слизистой оболочки. Некоторые  $\beta$ -дефензины секретируются эпителием конститутивно (HBD-1), другие являются индуцибельными (HBD-2, 3) и вырабатываются при стимуляции микробными компонентами рецепторов врожденного иммунитета.

При попадании микробов в кровяное русло происходит экспрессия нейтрофилами противомикробных пептидов  $\alpha$ -дефензинов, которые локализованы в гранулах нейтрофилов. Механизм их действия аналогичен таковому у перфоринов, они участвуют в лизисе микробов и вирусов.

Определение уровня  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензинов у больных с ГВЗ ЧЛО позволяет оценить уровень противомикробной защиты и имеет значение для прогноза течения заболевания, определения эффективности лечения, показаний к назначению иммунотерапии.

Цель нашей работы — изучение роли противомикробных пептидов —  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензинов у больных с ГВЗ ЧЛО и обоснование иммунотерапии как патогенетического лечения.

#### Задачами исследования было:

- определить уровень экспрессии гена  $\beta$ -дефензина (*HBD-3*) эпителиальными клетками полости рта у здоровых людей и больных ГВЗ ЧЛО;
- оценить уровень  $\alpha$ -дефензинов (HNP-3) в плазме крови у здоровых людей и больных ГВЗ ЧЛО;
- сопоставить уровни противомикробных пептидов с клиническими проявлениями заболевания;
- проанализировать изменение уровня дефензинов в процессе лечения больных ГВЗ ЧЛО;
- оценить эффективность цитокинотерапии препаратом суперлимф в комплексном лечении больных ГВЗ ЧЛО.

## Материал и методы

Больным одонтогенными флегмонами (ОФ) ( $n=45$ ) применялось традиционное лечение: оперативное вмешательство, противовоспалительная и десенсибилизирующая терапия, общеукрепляющая и детоксикационная терапия.

Оперативное вмешательство включало в себя широкое вскрытие гнойного очага, создание хорошего оттока отделяемого, дренирование раны, удаление причинного зуба. Хирургическое лечение выполняли под общим или комбинированным обезболиванием, а также под местной анестезией. После вскрытия гнойную полость обрабатывали антисептическими растворами. Антибактериальная терапия предусматривала применение антибиотиков широкого спектра действия и препаратов метронидазола. Длительность антибактериальной терапии составляла 7–10 дней. Детоксикационная терапия проводилась в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Общее состояние больных с ОФ оценивали по степени выраженности системной воспалительной реакции [4].

В зависимости от выраженности синдрома системной воспалительной реакции выделяли легкую, среднюю и высокую степени тяжести заболевания.

Больных с ОФ условно подразделяли на группы сравнения ( $n=35$ ) и основную ( $n=10$ ). В группе сравнения применяли традиционную терапию; в основной, помимо традиционной терапии — цитокинотерапию препаратом суперлимф. Суперлимф представляет собой комплекс цитокинов и противомикробных пептидов, оказывающих противовоспалительное, иммуностимулирующее и ранозаживляющее действие [6].

Суперлимф применяли в виде суппозитория (25 ед. активности) ежедневно 1 раз в течение 10 дней.

Из лабораторных методов использовали определение: общий анализ крови, СОЭ, биохимических и других показателей, а также определение дефензинов.

Экспрессию гена  $\beta$ -дефензина в соскобах клеток эпителия СОПР оценивали у 25 больных ОФ и 12 здоровых доноров методом полимеразной цепной реакции в режи-

ме реального времени. Реакцию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя (Институт Аналитического Приборостроения РАН, РФ) в амплификаторе АНК-32. Учет результатов вели с помощью программного обеспечения, прилагающегося к детектирующему амплификатору АНК-32 [3].

Уровень противомикробных пептидов HNP-3 ( $\alpha$ -дефензинов нейтрофилов) определяли у 20 больных ОФ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), концентрацию HNP-3 в плазме периферической крови — с помощью коммерческих наборов для ИФА наборов (НВТ, Нидерланды), предназначенных для ИФА, основанного на принципе сэндвича. Оптическую плотность измеряли на анализаторе иммуноферментных реакций («Пикон», РФ).

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования уровня экспрессии гена  $\beta$ -дефензина (*HBD-3*) в эпителиальных клетках СОПР представлено на рис. 1.

У больных с ОФ в общей группе ( $n=25$ ) уровень экспрессии гена  $\beta$ -дефензина в клетках СОПР был в среднем в 20 раз выше, чем у здоровых лиц (1-я группа). Однако данная группа не была однородной. У 20 (80%) больных с легкой и средней степенями тяжести заболевания (2-я группа) уровень экспрессии гена  $\beta$ -дефензина был повышен в 3 раза, чем у здоровых и составил  $3124,4 \pm 812,9$  копии кДНК гена *HBD-3*, а у 5 (20%) больных с высокой степенью тяжести заболевания (3-я группа) в 42 раза —  $40245,6 \pm 9565,6$  копии кДНК. У здоровых лиц данный показатель был равен  $961,0 \pm 91,6$  копии кДНК гена *HBD-3*.

В дальнейшем было рассмотрено изменение уровня экспрессии гена *HBD-3* при общепринятом традиционном лечении (рис. 2). У этих больных (1-я группа, группа сравнения) исходно данный показатель был равен  $2791,9 \pm 663,6$  копии кДНК, на 7-е сутки отмечалось его повышение в 4 раза, что соответствовало  $11259,5 \pm 2641,6$  копии кДНК гена *HBD-3*, а на 14-е сутки показатель нормализовался ( $993,8 \pm 98,6$  копии кДНК гена *HBD-3*).

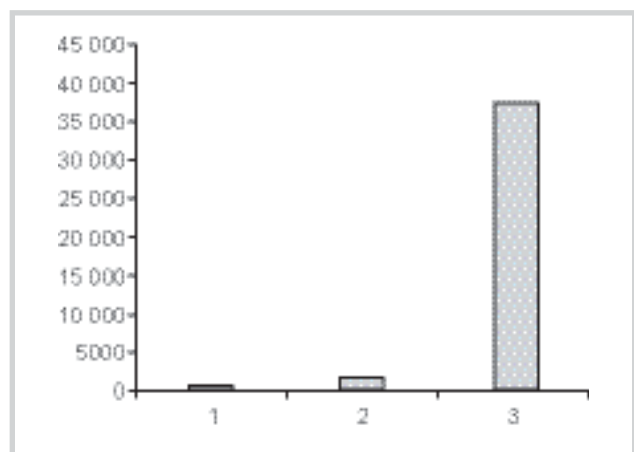


Рис. 1. Уровень экспрессии гена  $\beta$ -дефензина-3 (*HBD-3*) у больных с ГВЗ ЧЛО.

По оси абсцисс — группы: 1-я — здоровые доноры ( $n=12$ ); 2-я ( $n=20$ ) — больные ОФ с легкой и средней степенями тяжести; 3-я ( $n=5$ ) — больные ОФ с высокой степенью тяжести заболевания; по оси ординат — количество копий кДНК гена *HBD-3* относительно  $10^6$  кДНК гена актина. Здесь и на рис. 2: различия с контролем достоверны при  $p < 0,05$ .

Включение в комплексное лечение 10 больным 2-й группы (основная) цитокилотерапии (препарат суперлимф) стимулировало экспрессию гена *HBD-3* на 7-е сутки в 14 раз ( $48150,8 \pm 7665,0$  копии кДНК гена *HBD-3*), по сравнению с исходным уровнем —  $3512,3 \pm 1539,0$  копии кДНК, что в 3,5 раза превосходило уровень экспрессии на 7-е сутки в группе сравнения. К 14-м суткам показатель снижался до нормальных значений —  $817,0 \pm 105,1$  копии кДНК гена *HBD-3* (см. рис. 2). Таким образом, включение суперлимфа в лечение больных ОФ способствовало выра-

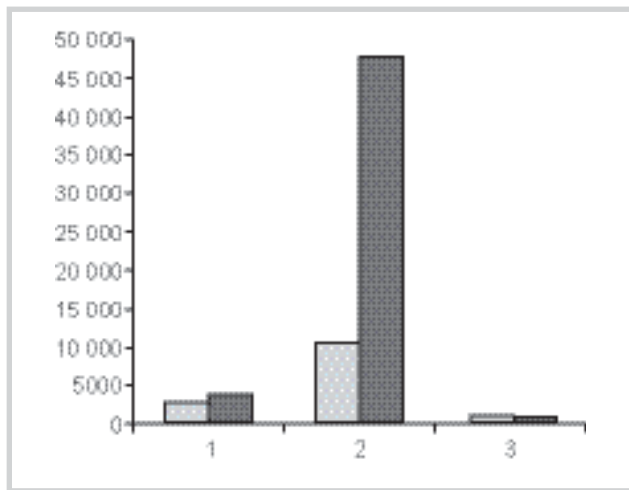


Рис. 2. Динамика экспрессии гена  $\beta$ -дефензина (*HBD-3*) у больных с ОФ.

По оси абсцисс — сутки после начала лечения: 1 — исходное количество копий кДНК в группе сравнения и основной группе; 2 — показатели на 7-е сутки; 3 — показатели на 14-е сутки; по оси ординат — количество копий кДНК гена *HBD-3* относительно  $10^6$  кДНК гена актина.

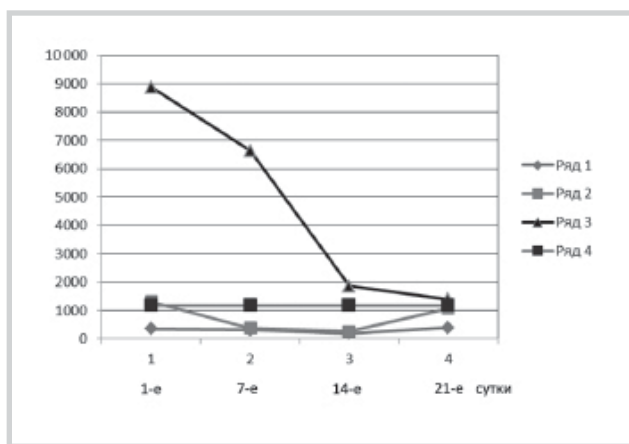


Рис. 3. Концентрация  $\alpha$ -дефензинов (HNP-3) в плазме крови у больных с ОФ в динамике.

1 — 1-я подгруппа; 2 — 2-я подгруппа; 3 — 3-я подгруппа; 4 — здоровые лица; по оси абсцисс — сроки исследования (сут.); по оси ординат — концентрация HNP-3 (нг/мл).

#### Содержание $\alpha$ -дефензинов (HNP1-3) в плазме периферической крови у больных с ОФ ( $M \pm m$ )

Показатели	Здоровые лица (n=8)	Больные с ОФ		
		1-я подгруппа (n=10)	2-я подгруппа (n=3)	3-я подгруппа (n=7)
Содержание HNP-3, нг/мл	$1172,4 \pm 114,3$	$369,3 \pm 67,4^*$	$1305,6 \pm 99,6$	$8871,3 \pm 1998,8^*$

Примечание. \* — достоверность различий со здоровыми лицами ( $p < 0,05$ ).

женной активации противомикробной защиты СОПР, что сопровождалось улучшением клинической картины.

У больных основной группы, в отличие от группы сравнения, отмечалось значительное улучшение самочувствия уже со 2—3-го дня, уменьшались отек и инфильтрат, в ране происходило активное отторжение некротических тканей, на стенке раны налет фибрина быстрее очищался, наблюдалось активное развитие первых грануляций.

В группе сравнения на 1—2 дня позже уменьшались отек и инфильтрат, рана была обильно покрыта фибриновым налетом, первые грануляции появлялись позже на 2—3 суток.

Использование суперлимфа в комплексном лечении больных с ОФ положительно влияло на субъективное самочувствие больных — боли в очаге воспаления исчезали на 1—2-е сутки раньше, температура тела снижалась в среднем на 2 суток раньше, чем в группе сравнения.

В таблице представлены данные об уровне  $\alpha$ -дефензинов периферической крови у больных с ОФ (n=20). Эти больные были подразделены на 3 подгруппы в зависимости от уровня исходных показателей. У 10 (1-я подгруппа, 50% обследованных) больных уровень  $\alpha$ -дефензинов был ниже в 3 раза, чем у здоровых лиц, у 3 (2-я подгруппа, 15%) — в пределах нормы, у 7 (3-я подгруппа, 35%) — в 7 раз выше, чем у здоровых.

На рис. 3 представлено содержание  $\alpha$ -дефензинов у больных с ОФ в динамике на 7-е, 14-е и 21-е сутки на фоне традиционного комплексного лечения.

Как видно из приведенных данных, концентрация  $\alpha$ -дефензинов в 1-й и 2-й подгруппах на 7-е и 14-е сутки была ниже таковой у здоровых лиц и нормализовалась к 21-м суткам. Изначально повышенные показатели в 3-й подгруппе снижались постепенно в указанные сроки и нормализовались к 21-м суткам.

Полученные данные свидетельствуют о том, что больным с ОФ необходима коррекция измененных факторов противомикробной защиты с 1-х суток заболевания.

Исследование факторов противомикробной защиты у больных с ГВЗ ЧЛО показало их важную роль в патогенезе данной патологии. Современные методы исследования на молекулярном уровне позволяют изучать новые механизмы врожденного иммунитета. Разработанный подход к оценке противомикробных пептидов на локальном и системном уровнях может использоваться для мониторинга системы врожденного иммунитета у больных с ГВЗ ЧЛО, повышения эффективности лечения, а также поиска новых методов стимуляции защитных механизмов врожденного иммунитета.

При ОФ имеют место активная экспрессия и продукция противомикробных пептидов — дефензинов — как локально (на уровне слизистой), так и на системном уровне.

На уровне СОПР у больных с ОФ выявляется повышенная в среднем в 20 раз по сравнению со здоровыми лицами экспрессия противомикробного пептида —  $\beta$ -дефензина (*HBD-3*). Включение в комплексное лечение препарата суперлимф повышало экспрессию гена  $\beta$ -дефензина в 7,5 раза.

Эффективность препарата суперлимф в суппозиториях заключалась в активации воспалительного процесса, характеризующегося активным очищением раны от некротических тканей. Под воздействием препарата суперлимф наблюдалось более благоприятное течение раневого процесса, чем у больных в группе сравнения.

Уровень  $\alpha$ -дефензинов (HNP-3) на системном уровне коррелировал со степенью тяжести заболевания. При тяжелом течении заболевания отмечался повышенный в 7 раз уровень  $\alpha$ -дефензинов, а при легкой и средней степенях тяжести данный показатель снижался в 3 раза, что свидетельствовало о необходимости проводить коррекцию измененных факторов противомикробной защиты.

Вышеизложенное позволяет заключить, что:

— у больных с ОФ повышена экспрессия противомикробного пептида  $\beta$ -дефензина (HBD-3) эпителиальными

клетками СОПР в среднем в 20 раз; при легкой и средней степенях тяжести заболевания — в 3 раза, а при его тяжелом течении — в 42 раза;

— концентрация нейтрофильных  $\alpha$ -дефензинов в периферической крови у больных с ОФ коррелирует со степенью тяжести заболевания: при легкой и средней степенях тяжести она снижена в 3 раза у 50% больных, а при тяжелой повышена в 7 раз;

— уровни экспрессии и продукции дефензинов могут служить иммунологическими маркерами тяжести заболевания и эффективности лечения;

— больным с ОФ при снижении уровня противомикробной защиты показана иммунотерапия, в том числе цитокинотерапии для нормализации функций системы врожденного иммунитета.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бажанов Н.Н., Тер-Асатуров Г.П., Иванюшко Т.П. Некоторые иммунологические аспекты одонтогенного воспаления. Российский медицинский форум. Пилотный номер 2006; 26–29.
2. Воробьев А.А., Мионов А.Ю., Пашков Е.П., Быков А.С., Кочеровец В.И., Дратвин С.А., Буданова Е.В., Иноземцева Л.О. Состояние проблемы инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробными бактериями. Вестн рос акад мед наук 1996; 2: 3–7.
3. Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В., Ганковская О.А., Макаров О.В., Лавров В.Ф., Карташов Д.Д., Кузнецов П.А. Экспрессия противомикробных пептидов клетками слизистой оболочки цервикального канала и нейтрофилами периферической крови у беременных с урогенитальной инфекцией. Вестник Российского государственного медицинского университета 2008; 5: 26–29.
4. Гостищев В.К. Общая хирургия. М 2001; 607.
5. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мороз А.Ф., Аведова Т.А., Москвина С.Н. Противомикробные пептиды иммунной системы: клинические аспекты. Аллергология и иммунология 2003; 4: 2: 20–26.
6. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Чадаев А.П., Алиханов Х.А., Иванюшко Т.П., Долгина Е.Н., Ярыгин Н.В. Суперлимф в комплексной терапии осложненного раневого процесса. Биопрепараты 2004; 21–24.
7. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб: Наука 2006; 261.
8. Ламонт Р.Дж., Берне Р.А., Лантц М.С., Лебланк Д.Дж. Микробиология и иммунология для стоматологов. Пер. с англ. Под ред. В.К. Лентьева. М 2010; 502.
9. Литвицкий П.Ф., Синельникова Т.Г. Врожденный иммунитет: механизмы реализации и типовые патологические синдромы. М 2008; 83.
10. Макаров О.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Ганковская О.А. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет. М 2007; 173.
11. Тер-Асатуров Г.П. Некоторые вопросы патогенеза одонтогенных флегмон. Стоматология 2005; 1: 20–27.
12. Тер-Асатуров Г.П., Иванюшко Т.П. Суперлимф — средство патогенетического лечения больных с одонтогенными флегмонами. Нижегородский мед журн 2008; 2: 292–295.
13. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии. М 2004; 143.
14. Bissell J. et al. Expression of  $\beta$ -defensins in gingival health and in periodontal disease. J Oral Patol Med 2004; 33: 278–285.
15. Janeway Jr. C.A., Medzhdov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20: 197–216.
16. Offenbacher S., Katz V., Fertik G. et al. Periodontal infectiol as a possible risk factor for preterm low birth weight. J Periodontol 1996; 67: 1103.
17. Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Ann Rheum Dis 2003; 62: 17–21.