На правах рукописи

ИВАНЮШКО ТАТЬЯНА ПЕТРОВНА

РОЛЬ ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПАРОДОНТИТА И ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДОВ ЛОКАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

14.00.21 – стоматология

14.00.36 – аллергология и иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва - 2002

Работа выполнена на кафедре стоматологии Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова

Научные консультанты:
академик РАМН,
доктор медицинских наук, профессор **Н.Н.Бажанов**
доктор медицинских наук, профессор **Л.В.Ганковская**

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук, профессор **А.И.Грудянов**
доктор медицинских наук, профессор **В.С.Иванов**
доктор медицинских наук, профессор **М.А.Стенина**

Ведущая организация:
Московский государственный медико-стоматологический университет

Защита состоится «17» октября 2002г. в 10.00 часов на заседании Диссертационного совета (Д.208.111.01) в Центральном научно-исследовательском институте стоматологии МЗ РФ по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, ул. Тимура Фрунзе, д.16 (конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Центрального научно-исследовательского института стоматологии МЗ РФ (119992, Москва, ГСП-2, ул. Тимура Фрунзе, д.16).

Автореферат разослан «_____»_____2002 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор медицинских наук **Е.К.Кречина**

2004-4
9672

685162

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Воспалительные заболевания пародонта до настоящего времени представляют медицинскую и социальную проблему, в связи с их широкой распространенностью среди населения, низкой эффективностью лечения, обусловленной нерешенными вопросами этиологии и патогенеза пародонтита [Иванов В.С., 1981, 1998; Логинова Н К. и др.,1993.; Барер Г М.; Лемецкая Т.И., 1996; Грудянов А.И , 1998; Воложин А.И. и др., 1999].

Многочисленными исследованиями была подтверждена важная роль микробного фактора в этиологии пародонтита, однако перспективы изучения этиологии и патогенеза данного заболевания связывают, в первую очередь, с изменениями в иммунной системе организма [Рыбаков А.И., 1990; Шаповалов В.Д., 1995, 2001; Орехова Л.Ю., 1997; Канканян А.П. и др., 1997, Дмитриева Л.А., 2002; Page R., 1994;Wilson M., 1995; Gemmel E et al., 1995; Haffajee A D. et al , 1995; Cole M.F. et al., 1995; Buchman R , 2000].

Снижение факторов общей и местной защиты приводит к дисбактериозу полости рта и, как следствие этого, к микробной агрессии и развитию воспаления в тканях пародонта [Усатова Г Н , 1989; Gregory R.L et al , 1992; Sigusch B et al., 1992; Whitney C. et al., 1997, Contreras A et al., 1999].

Традиционная терапия пародонтита, включающая механическое удаление зубного налета, как этиологического фактора, применение антибактериальных препаратов, является эффективной помощью, но не учитывает измененное состояние иммунитета слизистой оболочки полости рта и возможности иммунотерапии, что приводит к нестойкой ремиссии [Барер Г.М., Лемецкая Т.И., 1996; Philstrom B.L., 1997].

Особую актуальность приобретает возможность применения различных иммунокорригирующих препаратов в лечении пародонтита [Шматко В И , 1985; Дерейко Л.В , 1987, Шаповалов В.Д., 1995, 2001; Wilton

РОССИЙСКАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
200 4 РК

I M , 1983, Neumann C et al , 1996] При этом важно разработать клинико-лабораторные критерии их назначения, оценки эффективности Механизмы действия иммунотропных препаратов в лечении данного заболевания изучены недостаточно, не обоснованы и не разработаны конкретные схемы включения иммуномодуляторов в терапию пародонтита

Исследования последних лет сконцентрированы на изучении участия в патологии пародонта цитокинов, медиаторов, управляющих биологической активностью в очаге воспаления. Повреждающее действие провоспалительных цитокинов приводит к развитию самоподдерживающегося воспалительного процесса в пародонте, многие механизмы которого до конца не раскрыты и требуют дальнейшего исследования [Katz J et al , 1989; Schapiza L et al., 1992; Wilson M.,1995, 1996].

Локальный, на уровне поврежденного органа, дисбаланс продукции цитокинов обуславливает показания к проведению адекватной иммунотерапии препаратами, корригирующими цитокиновый статус В связи с этим перспективным является применение эндогенных биорегуляторов - цитокинов в качестве фармакологических средств [Ковальчук Л В , Ганковская Л В , 1987, 1995, 1999]

Учитывая, что цитокины являются маложивущими и короткодистантными веществами, требуется создание их высокой концентрации в очаге воспаления, поэтому, вероятным методом лечения представляется локальный способ их применения. Локальная цитокинотерапия позволяет избежать осложнений, имеющих место при системном применении цитокинов [Ковальчук Л.В., Ганковская Л В , 1995]

Таким образом, актуальность проблемы определяется неясными вопросами этиологии и патогенеза пародонтита, необходимостью изучения роли локальных и системных иммунных механизмов в развитии данного заболевания Не определены объективные тесты для назначения иммунотерапии и подбора иммуномодулирующих препаратов Практически

не изучены вопросы локальной иммунотерапии и, в частности, применения цитокинов в лечении пародонтита.

Изучение роли системы цитокинов в патогенезе пародонтита и оценка клинической эффективности локальной цитокинотерапии в лечении пародонтита определило новое направление данного исследования

Цель исследования изучить активность локальных и системных иммунных механизмов при пародонтите и разработать подходы к повышению эффективности лечения путем применения локальной иммунотерапии

Задачи:

1 Определить роль микрофлоры полости рта в этиологии и патогенезе пародонтита с помощью микробиологических исследований слюны, десневой жидкости и зубной бляшки.

2 Изучить состояние локального иммунитета слизистой оболочки полости рта с использованием цитологических и иммунологических исследований слюны и десневой жидкости.

3 Изучить функциональное состояние тимуса по уровню сывороточного тимического фактора и разработать методы исследования этого фактора в слюне при пародонтите.

4 Определить состояние системного иммунитета при пародонтите и провести корреляцию его показателей с клиническими проявлениями заболевания для оценки тяжести, подбора иммунотерапии, оценки ее эффективности.

5 Разработать подходы к проведению иммунотерапии тактивином и критерии оценки ее эффективности

6 Провести клинико-лабораторное обоснование локального применения цитокинов в лечении пародонтита

Научная новизна Впервые проведено комплексное исследование цитокинового состава десневой жидкости в норме и при пародонтите. При пародонтите установлен дисбаланс в системе провоспалительных (ИЛ-1,

ФНОα, ИЛ-8) и противовоспалительных (ИЛ-4, ТФРβ, ИЛ-1Ra, ИНФγ) цитокинов в динамике развития заболевания. Показано увеличение уровня провоспалительных цитокинов и снижение противовоспалительного цитокина - ИЛ-4, что является прогностическим признаком неблагоприятного течения заболевания.

Впервые показано иммуномодулирующее действие ауто- и гетерологичных комплексов цитокинов (препарат «Суперлимф») на функциональную активность нейтрофилов и фибробластов пародонта в норме и при пародонтите. Установлено, что комплекс цитокинов восстанавливает сниженный при пародонтите фагоцитоз нейтрофилов, усиливает пролиферацию и синтез коллагена фибробластами.

Впервые разработан, обоснован и внедрен в клиническую практику новый способ иммунотерапии пародонтита, заключающийся в местном применении аутологичного (аутоцитокинотерапия) и гетерологичного (препарат «Суперлимф») комплекса цитокинов. Получен патент на изобретение № 1514377 Установлено, что цитокинотерапия восстанавливает дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, оказывает противовоспалительное действие и стимулирует репаративные процессы в тканях пародонта после хирургического лечения

Впервые проведено определение тимического фактора в слюне Изучены корреляционные связи между сывороточным тимическим фактором и тимикоподобным фактором слюны Показана слабая корреляционная зависимость между ними (r=0,33).

Впервые показано, что существенно меняется содержание сывороточного тимического фактора, популяций и субпопуляций лимфоцитов в крови при прогрессировании пародонтита Установлены низкие уровни сывороточной тимической активности, основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови при тяжелом течении пародонтита Обосновано применение иммунокорректоров Т-системы иммунитета при данном заболевании

Впервые в комплексном лечении пародонтита использовано локальное применение тактивина, проведена оценка клинической эффективности Установлено, что тактивин действует как иммуномодулятор, повышает сниженную тимическую активность в сыворотке и слюне и уровни Т-лимфоцитов и Т-хелперов в крови

Впервые проведена сравнительная оценка клинической эффективности иммунотропных препаратов тактивина, суперлимфа, имудона при лечении пародонтита Установлено, что наиболее приемлемой локальной иммунотерапией является цитокинотерапия (препарат «Суперлимф»). При ее использовании отсутствуют осложнения, возможно применение при хирургическом лечении пародонтита.

Практическая значимость работы Предложен оптимальный набор чувствительных и доступных лабораторных тестов: определение уровня цитокинов, содержания эпителиальных клеток, лейкоцитов в десневой жидкости и слюне, сиалометрия Они позволяют оценить тяжесть течения пародонтита, а также способствуют подбору иммунотерапии, контролю эффективности проведенного лечения, прогнозу течения заболевания.

Разработаны неинвазивные методы оценки иммунного статуса у больных пародонтитом - определение тимического фактора в слюне Проведено одновременное исследование фактора тимуса в сыворотке и слюне при пародонтите.

Разработаны методы парентерального и локального использования тактивина в комплексном лечении пародонтита

Предложен новый метод аутоцитокинотерапии, позволяющий устранить воспаление в пародонте и ускорить репаративные процессы

Естественный комплекс цитокинов (препарат “Суперлимф”) рекомендован в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта как метод локальной цитокинотерапии

Научные положения, выносимые на защиту.

1 При пародонтите угнетены иммунные механизмы на уровне слизистой оболочки полости рта - снижен фагоцитоз нейтрофилов, имеется дисбаланс в системе цитокинов в десневой жидкости, повышена выработка провоспалительных цитокинов – ИЛ-1, ФНОα, ИЛ-8 и снижен уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-4.

2 Нарушение иммунных механизмов на уровне слизистой оболочки полости рта сопровождается сменой микробного состава, снижением в слюне и зубном налете количества представителей нормальной микрофлоры (бифидо- и лактобактерий) и преобладанием в изучаемых суббиотопах (слюне, зубном налете, десневой жидкости) патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, что расценивается как нарушение колонизационной резистентности и позволяет определить ведущую роль факторов локальной защиты в патогенезе пародонтита

3. Изменение показателей системного иммунитета: уровня Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов, естественных киллеров, снижение сывороточной тимической активности, является обоснованием возможности применения препаратов тимического ряда (тактивин)

4 Действие аутологичных и гетерологичных комплексов цитокинов (препарат «Суперлимф») на фагоцитоз нейтрофилов, функциональную активность фибробластов пародонта, уровень про- и противовоспалительных цитокинов позволяет включить в комплексное лечение пародонтита локальную цитокинотерапию для быстрого снятия симптомов воспаления, стимуляции репаративных процессов, нормализации измененных факторов защиты на уровне слизистой оболочки полости рта.

Апробация работы Основные материалы диссертации были доложены на хирургическом обществе стоматологов на кафедре стоматологии ММА им И М Сеченова (май 1995); на научных конференциях кафедры стоматологии ММА им И М Сеченова (1995-1998), на научных конференциях кафедры иммунологии РГМУ (1987-2000), на симпозиуме

Российской Ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (М., 1998); на 5-ом Международном конгрессе по иммунореабилитации (Тенериф, май 1999); на 2-ом Съезде иммунологов России (Сочи, сентябрь 1999); на VI Всероссийской научно-практической конференции "Стоматология XXI века" (М , 11-13 сентября 2000).

Апробация диссертационной работы проведена на совместном заседании сотрудников кафедры стоматологии Московской медицинской академии им И М.Сеченова и Центрального научно-исследовательского института стоматологии 25 апреля 2002 года.

Внедрение результатов исследования в практику Результаты работы внедрены на кафедре стоматологии ММА им И М Сеченова при лечении воспалительных заболеваний пародонта Материалы диссертации включены в лекционный курс и практические занятия студентов кафедры иммунологии Российского государственного медицинского университетого

Публикации По теме диссертации опубликованы 32 научные работы, в том числе получен 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 217 страницах машинописного текста Состоит из введения, обзора литературы, главы материал и методы исследования, 3 глав результатов исследований, обсуждения полученных данных и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 292 источника, из них 146 отечественных и 146 зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 18 рисунками и 29 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования.

Проведено клинико-иммунологическое обследование 344 человек, из них - 260 больных пародонтитом и 84 человека со здоровым пародонтом без соматической патологии (контрольная группа). Больных пародонтитом с легкой степенью тяжести было 60 человек (23,1% обследованных), средней степенью тяжести – 85 человек (32,7% обследованных), с тяжелым течением – 115 человек (44,2% обследованных), из них 175 женщин и 85 мужчин, возраст пациентов от 20 до 55 лет.

При постановке диагноза использована классификация, в основу которой положена клиническая форма заболевания, с определением характера тяжести течения, принятая на 16-ом Пленуме Всесоюзного общества стоматологов в г.Ереване (1983г).

Клинические методы исследования больных пародонтитом включали сбор анамнеза заболевания: жалобы, давность заболевания, перенесенные и сопутствующие заболевания, характер ранее проводимого лечения и его эффективность, характер гигиены полости рта Затем проводили общепринятое обследование полости рта для оценки состояния тканей пародонта с определением клинических индексов, а также рентгенологическое исследование кости альвеолярного отростка [Грудянов А И , 1998].

Нами использованы следующие клинические индексы: гигиенический индекс (Green, Vermillon, 1964), пародонтальный индекс (Russel, 1956) и индекс кровоточивости (Muhlemann, 1971).

Лабораторные методы исследования включали иммунологические, микробиологические, цитологические

Изучение иммунитета на уровне слизистой оболочки полости рта включало определение: фагоцитоза нейтрофилов, полученных из крови пародонта; уровня цитокинов в десневой жидкости и слюне; количества

лейкоцитов и эпителиальных клеток в слюне и десневой жидкости; уровня фактора тимуса в слюне; уровня колонизационной резистентности (соотношение нормальной и условно-патогенной микрофлоры в слюне, десневой жидкости, зубной бляшке), уровня саливации.

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали в микротесте на покровном стекле (поглощение частиц латекса). Учет фагоцитарной активности проводили, определяя фагоцитарное число (ФЧ) - процент нейтрофилов (из 100 клеток), поглотивших частицы латекса и фагоцитарный индекс (ФИ) - количество поглощенных частиц, приходящихся на один нейтрофил [Ганковская Л.В., Цховребова А.З и др., 1986]

Исследование спектра цитокинов в десневой жидкости и слюне включало определение уровня интерлейкина – 1 (ИЛ-1), фактора некроза опухоли - α (ФНОα), интерлейкина – 8 (ИЛ-8), интерферона γ (ИНФγ), интерлейкина- 1Ra (ИЛ-1Ra), интерлейкина – 4 (ИЛ-4), трансформирующего фактора роста - β-1 (ТФРβ-1) В работе использовали коммерческие наборы Pro Con ИЛ-1, Pro Con ФНО-α, Pro Con ИЛ-4, Pro Con ИЛ-8 производства ТОО "Протеиновый контур" и ТОО "Цитокин" (Санкт-Петербург), ТФР β-1 "Quintikin" (США) для постановки твердофазного иммуноферментного метода согласно рекомендуемым методикам Учет результатов проводили с помощью спектрофотометра "Multiscan", измеряя оптическую плотность при длине волны 450 нм. Используя полученные данные, строили калибровочные кривые для соответствующих цитокинов.

Для цитологических исследований образцы слюны и десневой жидкости наносили на обезжиренное предметное стекло, высушивали, фиксировали и окрашивали по Романовскому – Гимзе в модификации Е К Баландиной [Саидкаримова У.А , 1991]. Подсчет количества клеток эпителия и их стадии созревания проводили в 10 полях зрения [Банченко Г В и др , 1987] Одновременно в мазках вели подсчет количества нейтрофильных лейкоцитов

Материалы для бактериологического исследования десневой жидкости отбирали с помощью стерильных бумажных полосок размером 0,3-0,8 мм Одновременно в момент исследования в пробирку собирали слюну и стерильным ватным тампоном снимали зубной налет. Посевы производили на среде Шедлера, инкубация образцов осуществлялась в течение 5-7 суток. Дальнейшую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили общепринятыми методами, а также с использованием коммерческих тест-систем для идентификации стафилококков, стрептококков и анаэробов API Strep и Rapid 20A фирмы "Bio Merenoc" Франция.

Уровень саливации определяли методом сбора смешанной слюны (нестимулированной) натощак, утром в течение 6 минут, аккумулируя слюну в полости рта по 2 мин 3 раза, стимуляцию слюноотделения осуществляли нанесением двух капель на спинку языка 2% раствора лимонной кислоты

Для иммунодиагностики нарушений системного иммунитета были использованы следующие методы [Хаитов Р М , Пинегин Б В и др , 1995]· оценка выработки активных форм кислорода нейтрофилами методом люминолзависимой хемилюминесценции (оценка фагоцитоза); оценка сывороточной тимической активности с помощью азатиоприновогo теста (Bach Y F. et al., Dardenne, 1973), этим же методом определяли тимическую активность в слюне; оценка популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов (относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов и их субпопуляций), В-клеток, естественных киллеров с помощью моноклональных антител методом лазерной проточной цитометрии на цитометре Facs Calibus (USA); определение содержания сывороточных иммуноглобулинов классов М, G, А методом радиальной иммунодиффузии по Манчини.

Комплексное лечение больных пародонтитом включало в себя как местное, так и общее лечение

Местное лечение заключалось в проведении противовоспалительной терапии, хирургических и ортопедических мероприятий: санация полости рта, удаление зубных отложений, избирательная шлифовка зубов, удаление травматических узлов, применение антисептиков и противомикробных средств, хирургический кюретаж и лоскутные операции, уход за полостью рта, регулярная чистка зубов

Общая терапия включала: витаминотерапию, десенсибилизирующее лечение, антибактериальные препараты при абсцедировании и гноетечении из патологических карманов.

Иммунокорригирующая терапия тактивином назначалась после завершения традиционного лечения. Объективным показанием для назначения иммунотерапии в комплексном лечении пародонтита считали нарушения в иммунной системе после постановки соответствующих тестов.

Тактивин использовали в виде 0,01% раствора во флаконах по 1 мл, с содержанием действующего вещества - 100 мкг.

Препарат вводили в инъекциях в предплечье либо под слизистую оболочку полости рта ежедневно в течение 5 дней по 1,0 мл (100 мкг).

Поддерживающий курс лечения – по 1 инъекции в неделю в течении 1 месяца, затем по 1 инъекции в две недели в течении 1 месяца.

Всего на курс 10-11 инъекций (1000-1100 мкг на полный курс).

Применение тактивина локально (полоскание, аппликации) было проведено по предложенной выше схеме. Содержимое флакона вносили в полость рта и полоскали в течение 1-2 минут.

Разработка схемы лечения больных пародонтитом с использованием локальной цитокинотерапии.

Изучение действия ЕКЦ на фагоцитоз нейтрофилов здоровых доноров и больных пародонтитом было проведено в микротесте на покровном стекле [Чередеев А.Н. и соавт., 1981] К нейтрофилам за 60 минут до нанесения латекса добавляли раствор, содержащий ЕКЦ. Учет фагоцитарной

активности проводили, определяя фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарный индекс (ФИ).

При изучении действия ЕКЦ на фибробласты десны человека использовали первично установленные и поддерживаемые пассированием культуры клеток Определение пролиферативной активности фибробластов проводили по включению 3Н-тимидина [Хаймен Д и др , 1976] Содержание секретируемого в среду коллагена в культуре фибробластов оценивали, используя модификацию радиоизотопных методов [Peterhofsky B et al , 1971; Postlethwaite A et al , 1984], разработанную в лаборатории соединительной ткани института медицинской и биологической химии РАМН (зав лаб , д м.н. Дельвиг А А.).

Методы локальной цитокинотерапии заключались в нанесении на раневую поверхность раствора, содержащего естественный комплекс цитокинов (ЕКЦ), полученных из крови больного (аутоцитокинотерапия) или гетерологичный комплекс цитокинов (препарат «Суперлимф»)

Сотрудниками кафедры иммунологии РГМУ совместно с нами был разработан метод цитокинотерапии – аутоцитокинотерапия

Он заключался в локальном применении ЕКЦ, полученного при культивировании стимулированных лейкоцитов пациента [Ковальчук Л В , Ганковская Л.В., 1987, 1995]

За 24 часа до начала лечения кровь больного в количестве 10 мл забирали из локтевой вены Из нее приготавливали бесклеточный стерильный супернатант.

Во время хирургического кюретажа или лоскутных операций раневую поверхность орошали стерильным аутосупернатантом, затем накладывали швы.

При этом дополнительная обработка лекарственными веществами или введение антибиотиков не требовались

Методика применения препарата «Суперлимф» идентична методу аутолимфокинотерапии Лиофилизированный препарат (100 усл ед

активности в 1 ампуле) растворяли в 2 мл физиологического раствора и проводили орошение раневой поверхности из шприца в количестве 0,5-1,0мл

Статистическую обработку проводили с использованием общепринятых, стандартных методов вариационной статистики [Лакин Г.Ф., 1990; Гланц С., 1999], рассчитывая в группах данных: среднее арифметическое (M) и ошибку среднего (m).

Оценку достоверности различий результатов между двумя сравниваемыми группами проводили по критерию Стьюдента, вычисляя коэффициент достоверности (t).

Различия средних показателей считали достоверными, если величина t соответствовала уровню значимости $p < 0,05$.

В ряде исследований оценку достоверности различий между двумя группами проводили по непараметрическому U – критерию Уилкоксона.

Результаты исследования и их обсуждение.

В настоящей работе было проведено комплексное исследование защитных механизмов слизистой оболочки полости рта.

Исследование фагоцитоза нейтрофилов, полученных из крови пародонта показало снижение фагоцитарного числа (ФЧ) у больных пародонтитом по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$). ФЧ у больных пародонтитом в периферической крови было равно 26,5±10,1%, а у здоровых -- 48,5±4,2%, в крови из пародонтита ФЧ у больных пародонтитом было равно 28,0±5,8%, а у здоровых – 45,4±6,3%

Полученные результаты свидетельствуют о снижении функциональной активности нейтрофилов при пародонтите, не только в очаге воспаления, но и в периферической крови.

Анализ уровня цитокинов в десневой жидкости и слюне у больных пародонтитом.

Проведенное нами определение цитокинов в ДЖ у здоровых людей показало, что существует баланс про- и противовоспалительных цитокинов

(табл.1). При пародонтите отмечено повышение в 2,5-3 раза показателей провоспалительных цитокинов (ИЛ-I, ФНОα, ИЛ-8) по сравнению со здоровыми лицами (табл 1)

Можно предположить, что резко возросшая концентрация в ДЖ ИЛ-I, ФНОα, ИЛ-8 является результатом привлечения и активации в очаге воспаления макрофагов, являющихся основными продуцентами этих цитокинов.

Таблица 1

Содержание цитокинов и МИФ-фактора в десневой жидкости здоровых лиц и больных пародонтитом

Показатели пкг/мл	Здоровые лица n = 15	Больные пародонтитом, степень тяжести	
		Легкая, n=20	Средне-тяжелая, n=20
ИЛ-1	362,0±29,0	882,0±169,0*	909,0±122,0*
ФНОα	146,2±10,0	270,0±26,5*	354,5±61,4*
ИЛ-8	500,0±84,5	784,0±68,0*	1687,5±252,0*
ИНФγ	415,0±25,0	295,0±29,0*	200,0±24,0*
ИЛ-4	360,8±29,0	225,3±24,0*	200,0±13,0*
$ТФР_{β-1}$	96,2±4,5	169,7±18,0*	279,0±28,0*
ИЛ-1Ra	385,0±31,0	605,0±46,0*	848,0±82,0*
МИФ	0,48±0,04	0,57±0,05*	0,67±0,03*

Примечание * - знаком отмечены различия (p<0,05) между здоровыми лицами и больными пародонтитом

Наряду с изучением провоспалительных цитокинов определялось содержание и противовоспалительных цитокинов ТФРβ-I, ИЛ-4, а также рецепторного антагониста ИЛ-1 (ИЛ-1 Ra).

Содержание ТФРβ-I было в 1,5-2,5 раза выше уровня этого цитокина в ДЖ здоровых лиц Это повышение связано с включением компенсаторных

механизмов, поскольку ТФРβ-I супрессирует синтез провоспалительных цитокинов.

На ряду с повышением противоспалительного цитокина ТФРβ-I выявлено увеличение рецепторного антагониста ИЛ-1 который, связываясь с рецепторами на клетках-мишенях блокирует эффект ИЛ-1 (табл 1).

Интересные результаты были получены при исследовании наличия в ДЖ при пародонтите ИЛ-4. По нашим данным его среднее содержание было достоверно ($p<0,05$) ниже показателей в здоровой группе и составляло при легкой степени – 225,3±24,0, а при тяжелой - 200,0±13,0 пкг/мг. Исходя из значимости ИЛ-4 в регуляции воспалительных процессов, это снижение можно рассматривать как феномен, сопровождающий пародонтит и подтверждающий концепцию о дисбалансе в системе цитокинов на уровне слизистой полости рта при пародонтите

Выявлено снижение уровня ИНФγ в ДЖ при пародонтите в 2 раза, по сравнению со здоровыми лицами ($P<0,05$) Дефект секреции ИНФγ, являющегося важным фактором противовирусной резистентности согласуется с точкой зрения Contreras A et al , о ведущей роли вирусной инфекции в этиологии данного заболевания.

У больных пародонтитом в десневой жидкости было снижено содержание фактора МИФ: при легкой степени – 43,0±5% (ИМ=0,57±0,05), при тяжелой - 33,0±3% (ИМ=0,67±0,03) ($P<0,05$), у здоровых – 52,0±4% (0,48±0,04) Фактор МИФ способствует локализации в ткани пародонта моноцитов и активации функции макрофагов.

Сравнительный анализ концентрации цитокинов в ДЖ у больных пародонтитом показал зависимость от степени тяжести заболевания При тяжелой степени пародонтита выработка провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ФНО α, ИЛ-8) значительно повышена, а противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4) снижена (табл 1).

Параллельное определение цитокинов в ДЖ и слюне свидетельствовало, что у больных пародонтитом увеличивалась концентрация ФНОα, как в ДЖ, так и в слюне. Уровень ФНОα в слюне больных пародонтитом равен 139,0±18,9, а у здоровых - 80,7±1,6 пкг/мл ($P<0,05$) Однако у больных пародонтитом в слюне содержание цитокина ФНОα было меньше, чем в ДЖ. Это указывает на местную их продукцию

Уровень ИЛ-4 в слюне больных пародонтитом равен 225,4±5,5, а здоровых - 203,4±10,8 пкг/мл. Содержание ИЛ-4 были различны в ДЖ и слюне. На фоне снижения концентрации ИЛ-4 в ДЖ ($P<0,05$) показатели в слюне не менялись ($P>0,05$) и были в пределах нормы.

Показатели МИФ-активности у больных пародонтитом были снижены, как в ДЖ, так и слюне ($p<0,05$) (36,0±2%, ИМ = 0,64±18; 29,0±1%, ИМ = 0,71 ± 0,1 соответственно). У здоровых в слюне ИМ=0,51±0,03.

Таким образом, в развитии воспалительных заболеваний пародонта важную роль играет макрофагальное звено иммунитета и дисбаланс в системе про- и противовоспалительных цитокинов Показатели цитокинов в ДЖ более точно отражают нарушения местных защитных механизмов при пародонтите Высокий уровень провоспалительных цитокинов (ФНОα) в слюне свидетельствует о заинтересованности ее защитных механизмов Уровень противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4) в слюне были в пределах нормы, что подтверждает значение цитокинов ДЖ в развитии воспаления в пародонте

На основании наших данных и данных литературы [Katz J et al 1989, Shapiza L et al 1992; Wang P L et al , 2000; Roberts F A , 1997; Murakami S , 1997] нами дополнена и обобщена схема участия цитокинов в развитии хронического воспаления в тканях пародонта (рис 1).

Согласно этой схеме микроорганизмы способны активировать синтез и секрецию макрофагами (Мф) широкого спектра белковых молекул, в частности, цитокинов, простагландинов, гидролитических ферментов

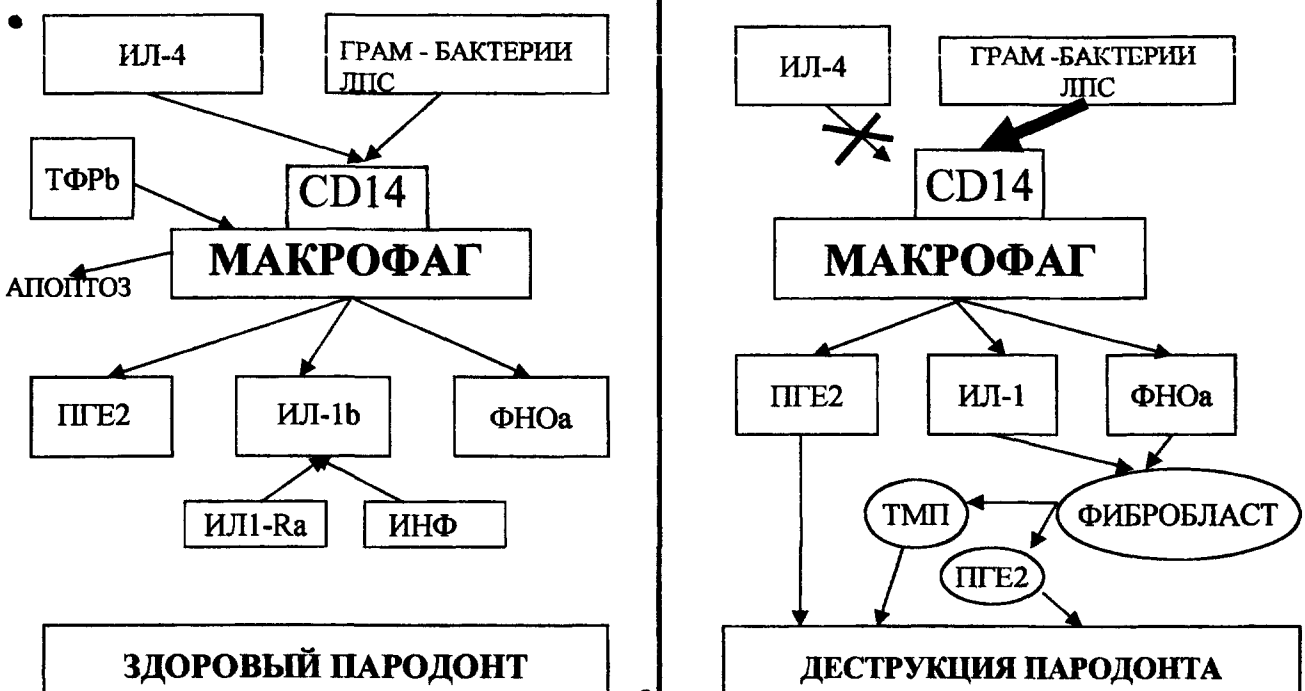
Взаимодействие липополисахаридов (ЛПС) клеточной стенки бактерий с Мф осуществляется через специальный рецептор CD14

Этот сигнал индуцирует в Мф синтез ИЛ-1β и ФНОα. Эти цитокины обладают мощной провоспалительной активностью и играют важную роль в повреждении тканей пародонта. При постоянном массивном поступлении микробных агентов выработка цитокинов становится неуправляемой Далее в процесс вовлекаются фибробласты, которые вместе с Мф секретируют металлопротеиназы, сериновые протеазы Эти ферменты вызывают деградацию внеклеточного матрикса ИЛ-1β и ФНОα стимулируют остеокласты к резорбции кости.

Неблагоприятным прогностическим признаком является низкий уровень или отсутствие в ДЖ ИЛ-4 Секретируемый Т-хелперами 2 типа, этот цитокин не только принимает активное участие в регуляции В-клеточного ответа, но и взаимодействуя с рецепторами CD14 на Мф, снимает ЛПС-индуцированные эффекты, в числе которых секреция ИЛ-1β, ФНОα, ПГЕ2. Кроме того, ИЛ-4 способен индуцировать выход в апоптоз макрофагов в месте воспаления. Известно, что ЛПС, ИЛ-1β, ФНОα снижают частоту запрограммированной клеточной гибели Таким образом, ИЛ-4 который является регулятором присутствия в очаге воспаления активированных макрофагов, может способствовать снижению воспалительной реакции (рис.1)

Функциональным антагонистом ИЛ-1 является ТФРβ, который отвечает за процессы тканевой репарации Данный цитокин также проявляет свои функции в отношении макрофагов, ингибируя при этом продукцию супероксидных и нитроксидных радикалов, при снижается повышенная микробицидность макрофагов. Кроме того, для ослабления биологических эффектов ИЛ-1, клетки вырабатывают ИЛ-1Ra, который связывается с рецепторами и блокирует действие ИЛ-1. Как показали наши исследования, у

Рис. 1 СХЕМА УЧАСТИЯ ЦИТОКИНОВ В РАЗВИТИИ ПАРОДОНТИТА



больных пародонтитом повышено содержание в десневой жидкости ТФРβ и ИЛ-1Ra.

ЛПС клеточной стенки пародонтогенных бактерий стимулирует макрофаги к выработке ИЛ-1, последний постоянно усиливает темпы своей продукции по аутокринному механизму С другой стороны, ИФНγ должен блокировать эту аутостимуляцию, однако, при пародонтите, как свидетельствуют наши данные, уровень ИНФγ снижен Таким образом, каждый из перечисленных цитокинов участвует в развитии воспаления в пародонте

Результаты цитологического исследования слюны и десневой жидкости у больных пародонтитом.

Результаты цитологического исследования слюны и десневой жидкости (ДЖ) у больных пародонтитом и здоровых лиц представлены на рисунке 2 Как видно из полученных данных у больных пародонтитом отмечается увеличение количества эпителиальных клеток, как в ДЖ, так и в слюне по сравнению с контрольной группой У больных пародонтитом с легким течением заболевания в 3 раза повышено содержание эпителиальных клеток в слюне и десневой жидкости (5,3±1,8 и 4,6±1,8, соответственно, $p<0,05$) по сравнению со здоровыми людьми (1,7±0,2 и 1,6±0,26) У больных пародонтитом со средне-тяжелым течением также повышено количество эпителиальных клеток в этих средах (2,2±0,4 и 2,9±0,6, соответственно, $p>0,05$), при этом различия менее выраженны, чем при легком течении

В сравниваемых группах имелись различия в стадиях созревания эпителиальных клеток. У здоровых людей в 96% случаев эпителиальные клетки находились в 6-й фазе созревания и только в 4% случаев имелась 5-я фаза У больных пародонтитом отмечалось перераспределение соотношения зрелых и незрелых клеток. В 6-й фазе созревания эпителиальные клетки были в 58% случаев, а в 42% случаев - в 5-й и даже в 4-й фазах

Количество лейкоцитов в ДЖ и в слюне у больных ХГП было достоверно повышено (р <0,05) по сравнению с контролем и не зависело от степени тяжести заболевания (рис.2) При легкой степени пародонтита количество лейкоцитов в слюне и десневой жидкости (3,0±1,2 и 5,1±1,9, соответственно) достоверно не отличалось от показателей у больных средне-тяжелой степенью (3,1±0,9 и 4,1±1,0, р>0,05) У здоровых лиц количество лейкоцитов в слюне и десневой жидкости было равно 0,9±0,2 и 1,2±0,3

СОДЕРЖАНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ЛЕЙКОЦИТОВ В СЛЮНЕ И ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ

* - значения достоверно отличаются от здоровых лиц (Р<0,05).

Рис. 2

Таким образом, у больных пародонтитом отмечалось существенное изменение цитологической картины по сравнению со здоровыми лицами, как в слюне, так и ДЖ. В данных биологических средах в 3 раза увеличилось количество эпителиальных клеток и лейкоцитов Большой процент эпителиальных клеток был в незавершенной фазе созревания, что указывает на интенсивные процессы пролиферации со стороны слизистой оболочки полости рта и одновременно текущие процессы пролиферации и воспаления в пародонте

Результаты определения объема слюны показали, что у больных пародонтитом количество нестимулированной слюны в 2,0-2,5 раза больше, чем у здоровых людей (3,6±0,45 и 2,7±0,6, соответственно $p<0,05$)

После стимуляции объем слюны увеличивался в контрольной группе в среднем в 7 раз и был равен 8,5±1,5, а у больных пародонтитом в 2,5-3 раза и был равен 6,7±0,7.

Таким образом, повышенное слюноотделение у больных пародонтитом отражает ответную реакцию организма на воспалительный процесс в пародонте

Сравнительная характеристика микрофлоры в разных суббиотопах полости рта.

Качественный состав микроорганизмов слюны, десневой жидкости и зубного налета у здоровых лиц характеризовался преобладанием представителей нормальной микрофлоры (Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus lactis) В слюне у здоровых лиц в 71,4% случаев преобладали бифидобактерии, а в зубной бляшке бифидо- и лактобактерии были в равном количестве (42,8%). Количество Streptococcus lactis у здоровых лиц и при пародонтите в слюне было одинаковым, а в зубной бляшке уровень данного микроорганизма встречался в меньшем количестве (28,6% и 14,4%, соответственно), чем лактобактерий (28,6% и 42,8%, соответственно).

В десневой жидкости представители нормальной микрофлоры не были обнаружены

У больных пародонтом в отличии от здоровых лиц данные представители нормальной микрофлоры в изучаемых суббиотопах либо отсутствовали, либо их количество было резко снижено

В слюне у больных пародонтитом число бифидобактерий было снижено, в среднем в 4 раза и составляло 19,0%, а в зубной бляшке в 4,5 раза меньше - 9,5%.

Содержание лактобактерий у больных пародонтитом было снижено в 4,5 раза в зубной бляшке (9,5%) и в 1,5 раза слюне (19%)

Содержание Streptococcus lactis в слюне больных пародонтитом было снижено в 1,5 раза (9,5%)

Низкую частоту обнаружения представителей нормальной микрофлоры, играющих важную роль в поддержании колонизационной резистентности, можно считать предрасполагающим фактором, способствующим развитию хронического воспалительного заболевания пародонта

Патогенные микроорганизмы Actinomyces sp, Clostridium sp, Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus anaerobium, Peptostreptococcus gingivalis встречались в зубной бляшке и десневой жидкости в единичных вариантах, как у здоровых лиц, так и у больных пародонтитом и совсем не определялись в слюне

При пародонтите во всех изучаемых средах были выявлены условно-патогенные микроорганизмы, которые не встречались у здоровых лиц.

В слюне у больных пародонтитом в отличии от здоровых лиц отмечалось большое разнообразие условно-патогенных микроорганизмов и значительно увеличивалась частота встречаемости отдельных из них (Streptococcus pyogenes, Str. salivarius, Str agalacticae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Haemophilus, Neisseria, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus Saprophyticus, Klebsiella oxytoca, Pseudomonas)

В зубной бляшке больных пародонтитом выявлялись условно-патогенные микроорганизмы, которые не выявлялись у здоровых лиц

(Streptococcus mitis, Str pneumoniae, Str pyogenes, Str. salivarius, Str viridans, Neisseria, Pseudomonas).

В десневой жидкости у больных пародонтитом выявлены условно-патогенные микроорганизмы, которые не встречались у здоровых лиц (Streptococcus mitis, Str pyogenes, Str agalacticae, Str. viridans, Haemophilus, Klebsiella oxytoca, Pseudomonas, Str. aureus).

Полученные результаты служат доказательством участия микроорганизмов зубной бляшки и других суббиотопов полости рта в развитии пародонтита Данная патология развивается на фоне сниженного содержания представителей нормальной микрофлоры, что приводит к появлению новых видов условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих воспаление в пародонте

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о важной роли микроорганизмов различных суббиотопов полости рта в этиологии и патогенезе пародонтита, с одной стороны, и о снижении локальных механизмов иммунной защиты, с другой Проведенное микробиологическое исследование разных суббиотопов полости рта показало, что у больных пародонтитом снижено количество представителей нормальной микрофлоры (бифидо- и лактобактерий) и изменен видовой состав условно-патогенной микрофлоры, отличающейся от здоровых лиц, что расценивается как дисбактериоз полости рта Полученные данные свидетельствуют о дефиците локальных защитных факторов и требуют их коррекции

Результаты исследования системного иммунитета выявили при тяжелом течении пародонтита снижение фагоцитарной активности нейтрофилов, понижение уровня (относительного и абсолютного) основных популяций и субпопуляций лимфоцитов – Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов, натуральных киллеров

Исследование гуморального иммунитета показало, что у больных пародонтитом повышено содержание сывороточных IgM и IgA,

свидетельствующее о наличии воспалительного процесса в слизистой оболочке полости рта

Результаты исследования тимической активности у больных пародонтитом в сыворотке и слюне.

Регулирующая функция тимуса на иммунитет осуществляется с помощью пептидов Среди известных пептидов тимуса для клиницистов представляет интерес сывороточный тимический фактор (СТА)

Проведенные нами исследования показали, что пародонтит протекает на фоне сниженной функциональной активности тимуса (табл. 2)

Рассмотрение показателей СТА у больных пародонтитом в зависимости от степени тяжести заболевания показало снижение его во всех исследуемых группах (табл 2).

Снижение СТА у больных пародонтитом легкой степени выявлено в 56% случаев (14 больных из 25), при средней – в 80,8% (21 больной из 26), при тяжелой – в 51,2% (21 больной из 41)

Учитывая тот факт, что определение СТА требует частого забора крови из вены, нами была проведена попытка определения данного фактора локально в биологической среде - слюне

Таблица 2

Показатели СТА и ТПФС у больных пародонтитом с разной степенью заболевания

Возрастные группы	Показатели log_2 СТА	Доноры	Пародонтит, степень тяжести		
			легкая	средняя	Тяжелая
Группа I n	СТА	5,4±0,7 20	2,5±0,7** 14	2,14±0,7 7	2,7±0,9 9
Группа II n	СТА	3,8±0,2 12	2,3±0,9 11	1,8±0,7* 19	2,1±0,8 32
Группа I n	ТПФС	2,7±0,9 15	2,0±0,7** 14	2,4±0,6 7	1,9±0,8* 9
Группа II n	ТПФС	2,9±0,7 7	2,4±0,9 11	2,0±0,8 19	2,3±0,7 32

Примечание· * - достоверность различий (P<0,05) между контролем и больными пародонтитом, ** - между СТА и ТПФС

I группа – возраст 20-35 лет, II группа – возраст 36-55 лет

Как видно из полученных данных (табл 2) в слюне возможно определение фактора, подобного фактору тимуса в сыворотке Тимикоподобный фактор слюны (ТПФС) отмечался в высоких титрах в контрольной группе, т.е при отсутствии воспаления в пародонте У больных пародонтитом фактор ТПФС снижен по сравнению с контролем во всех исследуемых группах.

Между уровнями СТА и ТПФС имеется прямая корреляционная связь. Коэффициент корреляции составляет – 0,33.

Все выше сказанное обосновывает необходимость коррекции нарушенных локальных и системных иммунных механизмов иммуномодулирующими препаратами

Клиническая оценка эффективности применения тактивина.

Снижение сывороточной тимической активности (СТА) и содержания популяций и субпопуляций лимфоцитов явилось показанием для назначения иммуномодулирующего препарата тактивина в комплексном лечении пародонтита.

В группе больных пародонтитом, принимавших тактивин в инъекциях и полосканиях, через 2-3 недели отмечались бледно-розовый цвет десны, уменьшение ее отечности, плотное прилегание слизистой оболочки к шейкам зубов, исчезновение кровоточивости

Осложнений после применения тактивина не отмечено ни в одном случае.

На рисунке 3 представлены показатели СТА у больных пародонтитом в динамике после лечения тактивином в инъекциях и без него В контрольной группе после традиционного лечения в ранние сроки отмечалась тенденция к повышению СТА (СТА до лечения - 2,5±0,2, после –3,0±0,1, в норме - 3,0-4,5). Повышение исходно сниженного уровня СТА выявлено у 23 из 40

обследованных (57,5% больных) У остальных больных проведенное лечение не оказывало влияния на содержание СТА.

В группе принимавших тактивин в инъекциях под слизистую оболочку полости рта сниженные титры СТА повысились до нормы после лечения у 33-х из 36 больных (91,6% обследованных). Средний показатель содержания СТА был достоверно выше, чем в контроле ($P< 0,05$)· уровень СТА до лечения равен 2,1±0,4, после - 3,8±0,2.

Через 4-6 месяцев после лечения тактивином уровень СТА не изменялся. После 4-6 месяцев начинается снижение СТА в обеих группах

Рис. 3

В сроки 7-12 месяцев в контрольной группе уровень СТА по средним значениям вернулся к исходному уровню до лечения, только у 6 больных из

23 (26% обследованных) отмечался нормальный показатель СТА. Тоже самое наблюдалось и в группе лиц, принимавших тактивин, нормальные показатели были у 8 больных из 33 (24%), однако степень снижения содержания СТА была менее выражена.

Таким образом, при проводимом оздоровлении пародонта нормализуются показатели иммунной системы, но клинический эффект незначителен и кратковременен, до 3 месяцев у 47,8% больных, до 6 месяцев у 26% больных

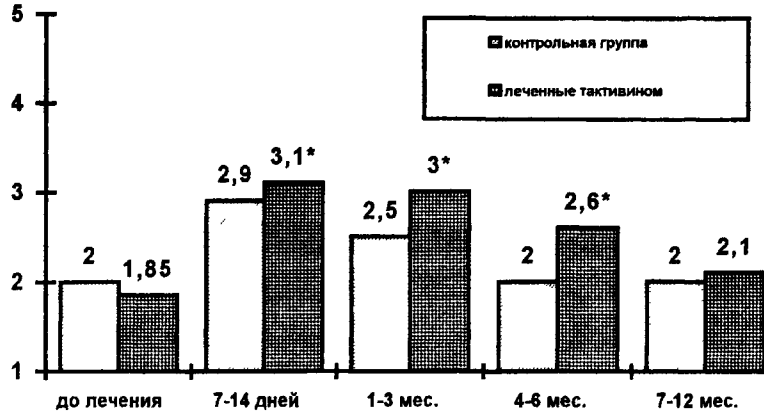
Включение в традиционное лечение иммунотерапии тактивином способствовало нормализации сниженных показателей иммунитета до 6-9 месяцев у 54,5% больных (18 из 33 больных), до 12 месяцев у 24% больных (8 из 33 больных). Однако через 6-9 месяцев действие тактивина прекращалось и следовало назначать повторные курсы Вместе с тем после достигнутой нормализации уровня СТА, в результате действия тактивина, его снижение было постепенно по сравнению с контролем. Возможно, с этим связана более длительная ремиссия заболевания при использовании тактивина.

Представляло интерес рассмотреть уровнь ТПФС после лечения.

Показатели ТПФС в динамике после традиционного лечения и с применением тактивина представлены на рисунке 4 После проведения традиционного лечения (контрольная группа) происходит повышение сниженных показателей После окончания лечения показатели ТПФС нормализовались у 11 из 21 обследованного (52,4%)

Высокие показатели ТПФС в контрольной группе держались на этом уровне до сроков 1-3 месяца у большинства больных, а затем снижались к исходному уровню.

ПОКАЗАТЕЛИ ФАКТОРА ТИМУСА В СЛЮНЕ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ



*- значение достоверно отличаются от показателя до лечения (P<0,05).

Рис. 4.

После курса тактивина в инъекциях под слизистую оболочку полости рта в слюне повысился уровень ТПФС до нормальных значений и держался до 6 месяцев у 9 больных из 14 обследованных (64,2%), до 12 месяцев у 5 больных (35,8%) Клинически у этих больных также были положительные результаты, заключающиеся в отсутствии кровоточивости, сохранении нормального цвета десны.

При применении тактивина в виде орошений, также выявлена положительная динамика в показателях ТПФС.

Таким образом, иммунологические показатели слюны быстро реагируют на проведение санации пародонта. Низкие показатели ТПФС могут служить прогнозом неполноценного лечения воспаления в пародонте

Проведение традиционного лечения повышает показатель ТПФС, в основном, на 3 месяца (в 82% случаев).

Иммунотерапия тактивином удлиняет ремиссию заболевания до 6-9 месяцев, при этом сохраняются высокие уровни ТПФС

Применение тактивина в комплексном лечении больных пародонтитом выявило следующие особенности изменения в содержании основных популяций и субпопуляций лимфоцитов периферической крови При исходно сниженных иммунологических показателях применение тактивина нормализует их, при этом удлиняется ремиссия заболевания до года (срок наблюдения) у 60% больных

В группе больных, принимавших тактивин в виде полосканий и аппликаций, исходно сниженные показатели клеточного иммунитета в ранние сроки восстанавливались до нормы. В этой группе больных клиническая ремиссия до 4-6 месяцев была отмечена у 82% больных.

Срок 4-6 месяцев является периодом для назначения повторных курсов иммунотерапии. Клиническую ремиссию сопровождают нормальные показатели клеточного иммунитета Снижение показателей Т-системы иммунитета указывает на возможность рецидива пародонтита. Поэтому необходимо через 4-6 месяцев (в первые 2 года после иммунотерапии) проводить иммунологическое обследование и при снижении показателей Т-системы иммунитета проводить повторные курсы иммунотерапии

Показатели клинической эффективности применения аутоцитокинотерапии.

Проведенное нами обследование больных пародонтита выявило значительное угнетение иммунных процессов на уровне слизистой оболочки полости рта С целью активации угнетенной функции фагоцитов и фибробластов, нам представлялось целесообразным применение средств, для их стимуляции - цитокины.

Применение в стоматологической практике нового способа лечения пародонтита заключалось в использовании аутологичного супернатанта культур лимфоцитов больного, содержащего пептиды, активирующие клетки фагоцитарной системы и фибробласты (аутоцитокинотерапия)

Данный метод лечения был включен в комплексное лечение 38 больных пародонтитом. Клинический эффект применения аутоцитокинотерапии представлен в таблице 3

Таблица 3

Клиническая эффективность локальной цитокинотерапии больных пародонтитом

Признаки	Без иммуно-терапии	Локальная цитокино-терапия
	n=11	n=24
Традиционное лечение		
1 Снятие воспаления	3,0±0,1 сутки	1,0±0,1* сутки
2. Наличие боли	1,0±0,1 сутки	отсутствует
3. Индекс Грина-Вермильона на 1-3 сут.	0,5±0,1	0,1±0,1*
4. Применение антибиотиков и антисептиков	обязательно	ограничено*
5. Возникновение аллергии	Возможно	исключено
Хирургическое лечение (лоскутные операции)		
	n=14	n=11
1. Исчезновение болей	1,0±0,1 сутки	3,0±0,1 час*
2. Исчезновение признаков воспаления	2,0±0,3 нед.	4,0±0,1 сут.*
3 Отпадение швов	10,0±0,4 сут	3,0±0,1 сут.*
4. Полная эпителизация	12,0±3,0 сут	5,0±0,2 сут.*

*- достоверность различий показателей по сравнению с контролем, $p < 0,01$.

Он заключается в быстром исчезновении признаков воспаления (1-ые сутки), по сравнению с традиционным комплексным лечением (3-и сутки) Использование аутоцитокинотерапии ограничивала применение антибиотиков и антисептиков Супернатант культур МНК не является чужеродным для пациента и совершенно безвреден для него в отношении вирусов гепатита В и ВИЧ Он исключает воздействие на организм химических факторов и его аллергизацию.

К преимуществам данного метода можно отнести и возможность применения его в процессе хирургического лечения.

Как видно из таблицы 3, в послеоперационном периоде после лоскутной операции у 11 больных пародонтитом с применением аутологичных цитокинов в 1-й день отмечалось отсутствие болевого симптома, слизистая оболочка имела розовый цвет. Воспалительная реакция (отек, гиперемия) отсутствовала, раневая поверхность с краев раны эпителизировалась, швы сохранялись только в центре раны К 5-7 дню отмечалась полная эпителизация слизистой, десна плотно прилегала к шейкам зубов, имела розовый цвет Без данного лечения все процессы заживления и полной эпителизации слизистой проходили к концу 2-й недели.

Изучение действия естественного комплекса цитокинов (препарат «Суперлимф») на клетки фагоцитарной системы и фибробласты в модельных системах in vitro.

Для объяснения положительного клинического эффекта аутоцитокинотерапии было рассмотрено действие естественного комплекса цитокинов (ЕКЦ) на фагоцитоз нейтрофилов и функцию фибробластов у больных пародонтитом in vitro.

Таблица 4

Действие ЕКЦ на фагоцитарную активность нейтрофилов

Показатели	Здоровые люди n=6		Больные пародонтитом n=11	
	ФЧ%	ФИ	ФЧ%	ФИ
Исходные	46,7±8,9	1,4±0,04	22,6±10,1	1,5±0,04
После действия ЕКЦ	50,7±5,6	1,2±0,05	42,0±7,4*	1,58±0,04
После действия тактивина	37,8±4,2	1,2±0,07	25,6±5,6	1,3±0,04

Примечание в таблице даны результаты исследований крови из пальца, * -отмечена достоверность различий показателей по сравнению с исходными данными (P≤0,05), n - число обследованных

РОС НАЦИОНАЛЬНАЯ БИБЛИОТЕКА С Петербург 200 РК

В таблице 4 представлены данные действия ЕКЦ (препарат «Суперлимф») на фагоцитоз нейтрофилов здоровых людей и больных пародонтитом in vitro.

Как видно из таблицы 4 ЕКЦ повышал резко сниженный показатель ФЧ до нормы у больных пародонтитом (ФЧ исходно – 22,6±10,1, после - 42,0±7,4%, $p<0,05$), не влияя на нормальные показатели у здоровых людей (ФЧ исходно – 46,7±8,9, после - 50,7±5,6%, $p>0,05$).

Обработка нейтрофилов тактивином также влияла на показатели нейтрофилов, но по сравнению с ЕКЦ незначительно ($p>0,05$).

Исследование влияния ЕКЦ на пролиферацию и синтез коллагена фибробластами десны человека in vitro было проведено совместно с Карасевой М.В. (1991).

Первичные культуры фибробластов выделяли из кусочков десны, полученных при удалении ретинированных зубов У данных пациентов не наблюдалось хронических воспалительных заболеваний в полости рта. В эксперименте использовались фибробласты, полученные от здоровых доноров.

В результате исследования было установлено, что инкубация фибробластов с ЕКЦ приводила к повышению пролиферативной активности клеток (ПОКЦ равен 174,98±13,5%, показатель в контроле – 100,0±10,0%, $P<0,05$).

Влияние ЕКЦ на фибробласты того же штамма на более поздних пассажах (18-20 пассажи), у которых уровень продукции коллагена оказался исходно сниженным, выявило стимулирующий эффект цитокинов на синтез коллагена (ПОКЦ равен 196,7±9,6%, показатель в контроле – 100,0±10,0%, $P<0,05$).

Проведенная работа позволяет сделать вывод о регуляции функций фибробластов ЕКЦ.

Таким образом, данное клинико-лабораторное исследование позволило обосновать и разработать способ локальной иммунокоррекции при воспалительных процессах пародонта, для оказания анальгизирующего, противовоспалительного эффекта и активации процессов заживления

Эффективное применение аутоцитокинотерапии, а также положительные лабораторные результаты открыли перспективы в создании стандартного препарата На кафедре иммунологии РГМУ был создан препарат «Суперлимф», с успехом прошедший клинические испытания и хорошо зарекомендовавший себя в клинической практике

Нами был применен препарат «Суперлимф» в комплексном лечении 25 больных пародонтитом. После применения данного препарата наблюдалось быстрое снятие болевых ощущений, исчезновение воспалительных явлений (отека, гиперемии), наступала ранняя эпителизация после хирургического кюретажа. Все эти признаки наступали в 2-3 раза быстрее, чем при традиционном лечении без препарата «Суперлимф» Он легко переносился больными, не имел неприятного вкуса Осложнений после его применения мы не отмечали

Ремиссия до 6 месяцев наблюдалась у 60% больных, принимавших препарат «Суперлимф», в контрольной группе только у 35% больных

Мы сравнили клиническую эффективность препарата «Суперлимф» с другими препаратами – имудоном и тактивином (табл 5) Как показали наши наблюдения препарат «Суперлимф» имел перед ними ряд преимуществ, а также ряд качеств, уступающих им К важным преимуществам можно отнести его свойство ускорять эпителизацию с образованием нежного рубца, он не требовал дополнительного использования лекарственных средств при хирургическом лечении, не вызывал гнойных осложнений. Этих качеств лишены имудон и тактивин

Однако, после препарата «Суперлимф» клиническая ремиссия в большинстве случаев наблюдалась до 6 месяцев, а после препарата тактивин, применяемого в инъекциях мы наблюдали ремиссию до 1,5 и 2 лет

Таблица 5

Сравнительная характеристика клинической эффективности иммунотропных препаратов

Показатели	Имудон n=15	Тактивин n=15	Суперлимф n=25
1 Лекарственная форма	леденцовые таблетки	раствор для инъекции	раствор для орошения
2. Этап назначения иммунотерапии	после МПВТ	после МПВТ	во время МПВТ
3 Применение антисептиков и лекарственных средств	требуется	требуется	не требуется
4 Возможность нанесения на раневую поверхность	не наносится	не наносится	Возможно
5 Гнойные осложнения	может вызвать	может вызвать	не вызывает
6 Сроки клинической ремиссии	1-3 мес	6-12 мес	3-6 мес

Имудон в отличии от «Суперлимфа» обладает хорошими вкусовыми качествами, в виде леденцовой таблетки не только удобен для применения больными, но этим создается возможность длительного депонирования его в полости рта.

Динамика изменений локальных иммунных механизмов под влиянием иммунотерапии препаратом «Суперлимф».

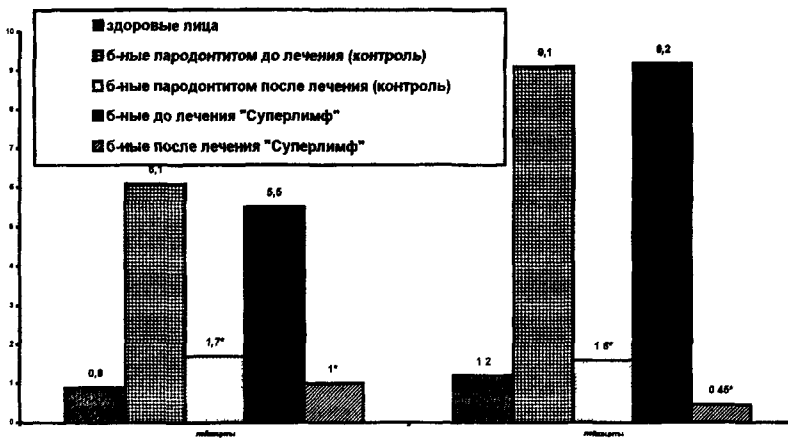
Учитывая положительный клинический эффект, вызываемый препаратом «Суперлимф», проведено изучение влияния данного препарата на локальные иммунные механизмы при пародонтите

Как показали цитологические исследования после применения препарата «Суперлимф» более выражено уменьшение исходно высокого количества лейкоцитов, в слюне – в 5,7 раз, в десневой жидкости - в 20 раз В контрольной группе эти показатели были - в 3,6 и в 5,6 раз соответственно (рис.5)

Объем слюны у больных пародонтитом после лечения в контрольной группе и группе, принимавших препарат «Суперлимф» нормализовался с 3,2±0,2 до 1,7±0,2 и с 3,4±0,3 до 1,4±0,1, $p<0,05$, соответственно. Достоверных различий между этими группами не выявлено ($P>0,05$). Однако,

объем стимулированной слюны после лечения в контрольной группе увеличился только в 5,4 раза (у здоровых лиц в 7 раз), а в группе, принимавших препарат «Суперлимф» - в 10,4 раза.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СЛЮНЫ И ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ



* - значение достоверно отличаются от показателей до лечения, P<0,05

Рис. 5

Эффективность лечения больных пародонтитом с применением препарата «Суперлимф» была оценена нами по результатам изменений содержания цитокинов в зубодесневой жидкости.

Применение препарата «Суперлимф» позволило добиться улучшения показателей в изучаемом спектре цитокинов, снизить содержание провоспалительных цитокинов – ИЛ-1, ФНОα, а также хемокина – ИЛ-8 (P<0,05) Сниженный уровень противовоспалительного цитокина – ИЛ-4 нормализовался, чего не наблюдалось в контрольной группе. Препарат

способствовал нормализации уровня других цитокинов – ИНФγ, антагониста ИЛ-1 (ИЛ-1Ra), а также МИФ-фактора Все полученные данные свидетельствовали о его модулирующем действии на содержание различных цитокинов (табл 6).

Таблица 6

Уровень цитокинов в десневой жидкости больных пародонтитом после лечения

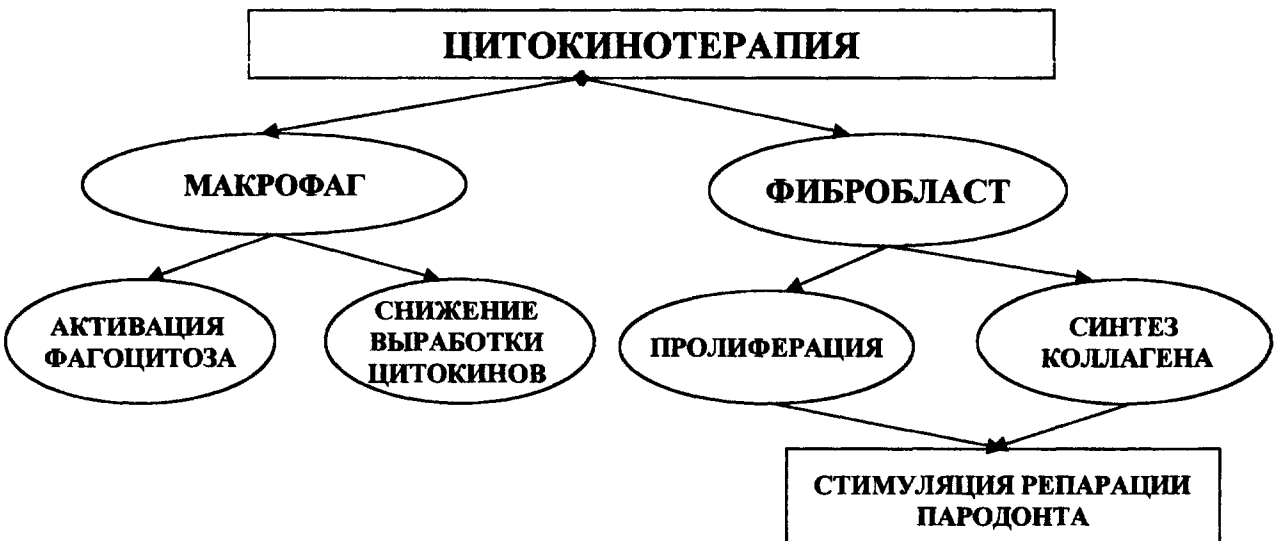
Показатели пкг /мл	Здоровые лица n=15	Без иммунотерапии n=20		Применение «Суперлимф» n=20	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
ИЛ-1	362,0±29,0	608,0±34,0*	424,0±22,0**	583,0±45,0*	374,0±40,0**
ФНОα	146,0±10,0	317,0±18,0*	191,0±20,0**	348,0±27,0*	170,0±21,0**
ИЛ-8	500,0±85,0	1237,0±119,0*	609,0±48,0**	1393,0±78,0*	531,0±48,0**
ИЛ-4	360,8±29,0	209,0±13,0*	275,0±33,0	213,0±25,0*	332,0±27,0**
ТФРβ	96,0±4,5	203,0±29,0*	146,5±28,0	188,0±27,0*	113,5±22,0
ИНФγ	415,0±25,0	223,0±28,0*	363,0±42,0**	248,0±35,0*	398,0±19,0**
ИЛ-1Ra	385,0±31,0	723,0±61,0*	551,0±124,0	714,0±83,0*	252,0±102,0**
МИФ	0,48±0,04	0,64±0,05*	0,62±0,04	0,54±0,02*	0,48±0,02**

Примечание· * - знаком отмечено достоверность различий ($p<0,05$) по сравнению со здоровыми лицами, ** - достоверность различий ($p<0,05$) до и после лечения.

В контрольной группе уровни цитокинов сохранялись измененными

Основываясь на собственных результатов механизм действия цитокинотерапии при пародонтите можно представить в виде схемы (рис 6) Локальное применение цитокинотерапии воздействует на функцию макрофагов, активируя фагоцитоз и снижает выработку провоспалительных цитокинов.

Рис. 6 МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ



Стимуляция фибробластов приводит к их пролиферации и выработке ими коллагена, благодаря этому ускоряется репаративные процессы в пародонте.

Таким образом, применение иммунотерапии в комплексном лечении пародонтита позволяет повысить эффективность лечения, продлевает ремиссию заболевания и служит средством профилактики воспалительных заболеваний пародонта.

ВЫВОДЫ.

1 При пародонтите играют ведущую роль иммунные механизмы на уровне слизистой оболочки полости рта Нарушения системного иммунитета выражены при тяжелом течении пародонтита

2 Установлено, что у больных пародонтитом нарушается нормальное соотношение микроорганизмов в слюне, зубном налете, десневой жидкости, которые характеризуются дефицитом бифидобактерий и лактобацилл и преобладанием условно-патогенных микроорганизмов, по видовому составу отличающихся от здоровых лиц

3 Изменения иммунных механизмов на уровне слизистой оболочки при пародонтите (снижение фагоцитоза нейтрофилов, дисбаланс в системе провоспалительных и противовоспалительных цитокинов десневой жидкости) позволяют обосновать применение локальной иммунотерапии в комплексном лечении пародонтита

4 При пародонтите снижена функциональная активность тимуса В сыворотке и в слюне отмечены низкие показатели тимического фактора Показатель тимической активности имеет обратную корреляционную связь с клиническими индексами, показывающими тяжесть течения пародонтита ($r= -0,4$).

5. Установлены изменения показателей системного иммунитета при пародонтите, в частности, снижение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов, естественных киллеров, снижение функциональной

активности нейтрофилов, повышение уровня сывороточных иммуноглобулинов классов М и А при тяжелом течении пародонтита

6 Лечение пародонтита с применением иммуномодулятора тактивина приводит к высокой клинической эффективности, выражающейся в увеличении сроков ремиссии до 12 месяцев у 60% больных Иммунотерапия тактивином приводит к положительной динамике исходно сниженных иммунологических показателей

7 Включение в комплексное лечение больных пародонтитом локальной цитокинотерапии (аутологичных и гетерологичных комплексов цитокинов) оказывает положительный клинический эффект, заключающийся в быстром снятии симптомов воспаления и стимуляции репаративных процессов, при этом нормализуется фагоцитарная активность нейтрофилов, восстанавливается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов в десневой жидкости, стимулируется функциональная активность фибробластов

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1 Для определения состояния биоценоза полости рта необходимо изучение микробных ассоциаций в различных суббиотопах – слюне, зубном налете, десневой жидкости

2 Для определения состояния иммунных механизмов на уровне слизистой оболочки десны следует определить· содержание комплекса цитокинов в десневой жидкости, фагоцитоз нейтрофилов крови пародонта, количество лейкоцитов и эпителиальных клеток в слюне и десневой жидкости, уровень тимического фактора в слюне

3 При тяжелом течении пародонтита рекомендовано применение тактивина в дозе 100 мкг во флаконе по 1 мл под слизистую оболочку ежедневно в течение 5 дней (основной курс), затем 1 инъекцию в неделю (поддерживающий курс) Всего 10-11 инъекций

4 Для локальной иммунокоррекции при пародонтите рекомендуется применение препарата «Суперлимф» для нормализации фагоцитарного звена

иммунитета и стимуляции репаративных процессов Противопоказаний для его применения нет Показано растворить лиофилизированный препарат (100 усл.ед активности в 1 ампуле) в 2 мл физиологического раствора и проводить орошение раневой поверхности их шприца в количестве 1-2 мл при хирургическом лечении пародонтита.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Регуляция лимфокинами фагоцитарной активности нейтрофилов больных воспалительными заболеваниями пародонта // Стоматология – 1989 - №6 - с 51-52. (В соавт с Баярт Б , Ганковской Л В , Ковальчук Л.В , Каплун Б.В).

2. Исследование иммунокорригирующего действия лимфокинов в системах ин витро // Монгольская медицина – 1989 - №1. - с 44-46 (В соавт с Баярт Б , Ганковской Л.В , Ковальчук Л В., Исаевым В.Н)

3. Иммунокорригирующее действие эфферентных лимфокинов в системах ин витро // Республик сб. науч трудов «Интерлейкины и другие медиаторы в клинической иммунологии» – 1989. - с 83-87 (В соавт с Баярт Б , Юрканским В Н)

4. Эндогенные лимфокины в лечении воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области // Труды междунар. симпозиума «Проблемы иммунофармакологии». – Тбилиси – 1990 - с 22 (В соавт. с Ковальчук Л В , Ганковской Л.В , Карасевой М В)

5 Использование соотношения субпопуляций лимфоцитов больных пародонтитом для прогнозирования течения болезней пародонта и оценки эффективности лечения. // Материалы симп «Заболевания пародонта и иммунная система». – Казань. – 1990. - с 9-10 (В соавт. с Козаревой Р.А , Ольшанецкой Н В , Шаповаловым В.Д.)

6 Применение Т-активина в комплексном лечении больных пародонтитом // Советская медицина - Д-19509 от 05 04 1990 НПО союз мед. информ (В соавт. с Арион В Я., Исаевым В Н , Рудавиным Н Г , Юрканским В.Н., Полатовым А А., Барышковым Н.А.).

7 Комбинация естественных цитокинов в лечении раневого процесса // Труды 2-го Европейского симпозиума по иммунологии – Хельсинки – 1991. - с 16-13 (В соавт с Ковальчук Л В , Ганковской Л В., Карасевой М.В).

8 Комплекс естественных иммунопептидов в лечении раневого процесса // Тезисы докладов I съезда иммунологов России – Новосибирск – 1992 - с 220 (В соавт. с Ковальчук Л.В , Хоревой М.В.)

9 Иммунокоррекция при воспалительных заболеваниях пародонта // Иммунология. – 1996. - №6. - с. 57-59 (В соавт с Рыбаковым А И., Исаевым В Н., Арион В Я , Шаповаловым В Д , Лусс Л В)

10 Использование иммунологических показателей для оценки тяжести течения пародонтита и эффективности лечения // Стоматология. – 1996 - №1 - с 15-18. (В соавт с Бажановым Н Н , Тер-Асатуровым Г.П., Кассиным В.Ю , Арион В Я , Симоновой А В.).

11 Обнаружение тимикоподобной активности в слюне человека // Тезисы докладов в сб трудов 3-й международ симп «Неинвазивные методы диагностики». - М – 1997. - с. 58 (В соавт с Арион В Я., Москвиной С Н , Сысоевой О Б., Кругляковой Е.П.).

12 Использование тактивина в комплексном лечении флегмон ЧЛО. // Сб науч работ «ММСИ-75 лет». - М. – 1997. - с 231-232 (В соавт. с Бажановым Н Н., Кругляковой Е.П , Арион В Я., Москвиной С Н, Сысоевой О Б)

13 Функциональное состояние тимуса при пародонтите // Там же - с 231 (В соавт с Кругляковой Е П., Бажановым Н Н , Тер-Асатуровым, Арион В.Я , Москвиным С Н., Зиминой И.В , Сысоевой О Б).

14 Обоснование подходов к локальной цитокинотерапии больных пародонтитом // Сб. науч. трудов «ММСИ-75 лет» - М – 1997 - с 242-243 (В соавт с Ковальчук Л.В , Ганковской Л В Емиленко Г И.)

15 Иммунные механизмы патогенеза пародонтита // Сб «Наука-практике» материалы научной сессии ЦНИИС, посв 35-летию института -

М. – 1998 - с. 103-104 (В соавт. с Бажановым Н Н , Тер-Асатуровым Г П , Ганковской Л.В., Симоновой А.В., Хорошиловой Н.В.).

16 Роль антителопродукции в патогенезе хронического пародонтита // Материалы 2-го Национального конгресса РААКИ - М. – 1998 - с. 610 (В соавт. с Симоновой А.В , Хорошиловой А.В , Макаровой С А.).

17 Тимикоподобная активность в слюне человека. // там же. – с. 366 (В соавт с Кругляковой Е П., Москвиной С Н , Сысоевой О.Б , Арион В Я., Бажановым Н.Н.).

18 Цитокиновая концепция патогенеза и лечения воспалительных заболеваний пародонта. // Сб. трудов 2-го Национального конгресса РААКИ - М. – 1998. - с. 371. (В соавт с Ковальчук Л В., Ганковской Л В., Радыгиной Т.В., Шабановой Н А., Аль-Танани Е.П.).

19 Локальная цитокинотерапия в лечении хронического пародонтита // Международн науч. практ конф «Достижения и перспективы стоматология». - М. – 1999. - с. 201-203 (В соавт с Емиленко Г.И , Ганковской Л В).

20 Роль цитокинов в развитии хронического воспаления в тканях пародонта // Труды 5-го съезда Стоматологической Ассоциации России - М. – 1999. - с. 131 (В соавт. с Ганковской Л.В., Роговой М А).

21 Цитокины в механизмах развития хронического воспаления в пародонта // Тезисы докл 2-й съезд иммунологов России - М – 1999 - с (В соавт. с Ганковской Л В , Ковальчук Л В , Роговой М.А , Емиленко Г И)

22. Комплексное изучение механизмов развития хронического воспаления при пародонтите // Стоматология. – 2000 - №4. - с. 13-16 (В соавт с Ганковской Л.В., Ковальчук Л В., Тер-Асатуровым Г П., Кассиным В.Ю., Будановой Е.В.).

23 Роль цитокинов в механизмах развития хронического воспаления в ткани пародонта // Иммунология – 2000 - №6. - с 24-26 (В соавт. с Ковальчук Л В , Ганковской Л.В., Роговой М А , Будановой Е В., Шабановой Н.В.).

24 Особенности микрофлоры полости рта и локальные факторы иммунитета больных хроническим пародонтитом // Тезисы докл 6-го съезда Стоматологической Ассоциации России - М – 2000 - с 206-207 (В соавт с Тер-Асатуровым Г П., Будановой Е В , Хорошиловой Н В , Ганковской Л В , Роговой М А.).

25 Локальная иммуноцитокинотерапия в лечении воспалительных заболеваний пародонта // Иммунология – 2000 - №1 - с. 46-48 (В соавт с Ковальчук Л.В , Ганковской Л.В , Хоревой М В., Емиленко Г.И.)

26 Цитокинотерапия хронических воспалительных заболеваний пародонта // Тезисы VI Международного конгресса по иммунореабилитации и реабилитации в медицине – 2000 - т 2 - №2 - с 89 (В соавт. с Ковальчук Л В., Ганковской Л.В., Роговой М А , Сайгитовым Р.Т.)

27 Оценка уровня иммунодефицитного состояния и необходимости иммунотерапии у больных с флегмонами ЧЛО // Тезисы докл 6-й Международной конференции челюстно-лицевых хирургов и стоматологов. - С-Петербург – 2001 - с. 53 (В соавт с Бажановым Н Н , Тер-Асатуровым Г П , Каргиной И Б , Кругляковой Е П , Давыдовой Т.Р , Хакниной Е Ю)

28 Оценка миграционной способности и МИФ активности лейкоцитов у больных пародонтитом. // там же - С-Петербург – 2001 - с 54 (В соавт с Ганковской Л В., Каргиной И.Б., Емиленко Г И , Роговой М.А.)

29 Локальная продукция цитокинов и перспективы иммунотерапии у пациентов с пародонтитом // Тезисы докл 11-го интернационального конгресса иммунологов - Scandinavian Journal of Immunology - v 54 - suppl 1 – 2001 - v 3 - wed 5 3/ 1307 (В соавт с Хорошиловой Н В , Ганковской Л В)

30 Фенотип лимфоцитов крови при хроническом пародонте // В кн «Фенотип лимфоцитов крови при воспалительных заболеваниях человека» - М - «ИНТО» – 2001 - с. 116-121 (В соавт с Симоновой А В)

31 Иммунокорректоры в комплексном лечении хронического пародонтита // Тезисы докладов IX Российского национального конгресса

«Человек и лекарство». - М. – 2002 - с. 176 (В соавт. с Тер-Асатуровым Г.П., Хорошиловой Н.В., Бажановым Н.Н, Симоновой А.В., Арион В.Я., Емиленко Г.И.).

32 Способ лечения пародонтита // Авторское свидетельство на изобретение № 1514377 от 15 июня 1989г (В соавт с Ковальчук Л.В., Ганковской Л В., Гвоздевой Н.А., Исаевым В.Н , Юрканским В.Г.)

РНБ Русский фонд

2004-4

9672

Рос
национальная
библиотека
в С.Петербурге

Отпечатано ООО ППК «Эксклюзив»

26 СЕН 2002