

МЕТОД ОЦЕНКИ МЕСТНОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЧЕЛОВЕКА ПО СОДЕРЖАНИЮ РОДАНИДОВ В СЛЮНЕ

В статье рассмотрена проблема оценки местного неспецифического иммунитета ротовой полости человека. Разработана методика количественного анализа содержания роданидов в слюне, являющаяся маркером состояния местного неспецифического иммунитета ротовой полости человека. Установлено снижение местной иммунной защитной реакции организма по содержанию роданидов в слюне среди курящих студентов и с признаками ОРВИ. Полученные результаты могут использоваться в скрининговых исследованиях по оценке местного неспецифического иммунитета ротовой полости человека.

Ключевые слова: слюна, роданиды железа, лактопероксидаза, иммунитет, ротовая полость

В последние годы изучению слюны уделяется особое внимание, так как установлена важная роль слюны в поддержании местного иммунитета ротовой полости человека. Состав слюны каждого человека индивидуален, рядом исследователей было установлено, что изменение состава слюны способствует развитию кариеса и пародонтоза [1].

Кроме того установлено, что слюна, как биологическая жидкость, может являться индикатором нарушений иммунного статуса человека. Как известно, оценка иммунного статуса человека заключается в определении состояния гуморальных и клеточных звеньев иммунитета [10]. Для проведения иммунологического мониторинга населения необходимо использовать информативные и неинвазивные методы обследования, поэтому использование слюны, как одной из легкодоступных биологических жидкостей организма, является весьма перспективным методом [5].

Известно, что элементный статус слюны зависит от генетических, временных, биосоциальных и климатических факторов [4]. При этом не достаточно данных о влиянии на состояние местного иммунитета ротовой полости такого фактора, как курение.

Проведенными ранее исследованиями [2], установлено, что бактерицидные свойства слюны обусловлены как главными гликопротеинами слюны (муцинами, гликопротеинами, содержащими пролин, и другими иммуноглобулинами), так и минорными гликопротеинами,

включающими лактопероксидазу, агглютинин, лактоферрин, цистатин и лизоцим. До настоящего времени в литературе нет данных по исследованию местного неспецифического иммунитета ротовой полости человека по содержанию солей роданидов.

Нарушение иммунитета полости рта часто имеет не изолированный характер, а является свидетельством общих расстройств иммунных или обменных процессов в организме. Известно, что элементный обмен у человека в норме существенно зависит от экологических и временных факторов. Нарушение гомеостатической регуляции, в соответствии с теорией пороговых концентраций, возникает при недостаточном поступлении химических веществ (ниже пороговых значений) или при их избытке (выше верхнего порога). Нормальная реакция обменных процессов, осуществляется в том случае, когда возможна адаптация организмов, заложенная их генотипом [10].

Гистологическими исследованиями установлено, что в месте повреждения слизистой оболочки полости рта происходит миграция гранулоцитов, которые принимают участие в защитных реакциях. В гранулоцитах локализован фермент лактопероксидаза, которая окисляет имеющееся в слюне вещество роданид с помощью перекиси водорода бактериального происхождения в гипотиоционат (или гипоционат). Гипотиоционат чрезвычайно бактерициден и совместно с H_2O_2 или ее радикалами действует антикарисогенно [10].

Результаты изучения ряда показателей иммунитета ротовой полости у школьников, страдающих патологией желудочно-кишечного тракта свидетельствуют о выраженном снижении, как адаптивных возможностей, так и противомикробной резистентности тканей полости рта [3]. Многочисленными исследованиями установлено, что основными причинами гингивита является ослабление местного иммунитета тканей ротовой полости и возникновение зубной бляшки [1].

Согласно литературным данным содержание роданидов велико в слюне курильщиков, что связано с поступлением в их организм синильной кислоты табачного дыма [6]. Муртазиной Ф.Ф. установлено, что одним из местных факторов риска в этиопатогенезе воспалительных заболеваний пародонта является курение. Курение относится к основным факторам риска всех сердечно - сосудистых заболеваний и сопровождается патологическими изменениями в сосудах практически всех тканей организма. В результате проведенных исследований было установлено, что у курильщиков десневые сосуды подвержены стенозу, и их общее количество уменьшено. По сравнению с некурящими, при десневом зондировании у них достоверно реже отмечается повышенная кровоточивость, гиперемия и отек. Проведенное Муртазиной Ф.Ф. исследование показало, что курение значительно изменяет микроциркуляторные показатели в пародонте и способствует развитию пародонтита у курильщиков [7]. Однако сравнительный анализ бактерицидных свойств слюны курящих и некурящих людей не проводился.

Изменение защитных свойств слюны связано не только с нарушением десневой микроциркуляции, но и с непосредственным воздействием табачного дыма на ротовую полость. Установленным фактом является и то, что интенсивное курение многократно повышает риск возникновения злокачественных опухолей ротовой полости, носоглотки, бронхов и легких. Однако до настоящего времени считалось, что канцерогены содержащиеся в табачной смоле и табачном дыме воздействуют на эпителий слизистой оболочки ротовой полости и носоглотки как самостоятельный канцерогенный фактор, а состав слюны при этом не изменяется. Поэто-

му исследование качественного и количественного состава слюны у курильщиков является весьма актуальным.

Одним из показателей местной защитной реакции ротовой полости человека является активность фермента пероксидазы. Различают собственно пероксидазу и йодидпероксидазу. Первый фермент синтезируется полиморфно-ядерными лейкоцитами (миелопероксидаза), паренхиматозными клетками молочных желез (лактопероксидаза) и слюнных желез. Второй фермент обнаружен в щитовидной железе и слюнных железах. По механизму действия они схожи и отличаются лишь субстратной специфичностью. Фермент разлагает пероксид водорода, который продуцируют микроорганизмы и относится к ферментам антиоксидантной защитной системы организма. Повреждающее действие системы "пероксидаза - перекись водорода" на микроорганизмы опосредуется образованием промежуточных окислителей органической и неорганической природы. Для этого необходимо участие одного из анионов: CNS^- , Cl^- , Br^- . Эти анионы взаимозаменяемы, но для пероксидазы слюны более специфичен роданид ион. Результатом взаимодействия является образование гипотиоционата. Объектом действия последнего являются аминокислоты белков микроорганизмов. Поэтому способность слюнных желез секретировать в значительных количествах ионы тиоцианата, йодида, бромиды, хлориды можно отнести к антимикробной гуморальной иммунной реакции. При совместном действии всех указанных ионов возникает взаимоусиливающий эффект [11]. Поэтому количественное определение тиоцианатов (роданидов) в слюне может свидетельствовать о состоянии местного иммунного статуса ротовой полости. Изучение бактерицидных свойств слюны по содержанию роданидов имеет первостепенное значение для оценки гуморального иммунного барьера ротовой полости. В настоящее время отсутствуют исследования бактерицидных свойств слюны по содержанию роданидов.

Целью нашего исследования стало изучение состояния гуморальной неспецифической иммунной защиты ротовой полости человека по содержанию роданидов в слюне. В изученной нами литературе до настоящего времени не

была описана методика количественного определения роданидов в слюне. Поэтому одной из задач нашего исследования является разработка методики количественного определения роданидов в слюне. Также в нашей работе решались задачи сравнительной оценки содержания роданидов с учетом пола, факторов курения и ОРВИ.

Материалы и методы

Исследование проводилось в период с 2010 по 2013 года на базе биохимической лаборатории кафедры биохимии и молекулярной биологии Оренбургского государственного университета. В исследовании приняли участие 58 студентов. Средний возраст обследованных студентов составил 19,5 лет, из них 35 девушек и 23 юноши. Объектом исследования служила смешанная слюна, собранная натощак.

Исследование проводилось в два этапа:

– на первом этапе исследования мы разработали методику количественного анализа содержания роданидов в слюне с построением калибровочного графика (оценка коэффициента пропускания раствора методом спектрофотометрии);

– на втором этапе было определено содержание роданидов в образцах слюны с учетом пола, наличия фактора курения и признаков ОРВИ среди обследованных студентов.

Нами были обследованы студенты, курящие более одной сигареты в неделю. Среду курящих были юноши и девушки в количестве 20 человек. Контрольную группу составляли здоровые некурящие студенты в количестве 38 человек. Также мы провели обследование студентов, которые на момент обследования имели признаки острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) – 21 человек, контрольную группу составили студенты без признаков ОРВИ, их насчитывалось 37 человек [9].

Отбор пробы слюны осуществлялся через 1,5–2 часа после еды или натощак (после ночного перерыва в приеме пищи). Для построения графика предварительно отбирали порции рабочего стандартного раствора NH_4SCN различной концентрации 0,01 н, 0,001 н, 0,0001 н, 0,00001 н и 0,000001 н.

Результаты исследования

Сущность предложенного метода количественной оценки содержания роданидов в слюне заключается в следующем: чем больше концентрация роданидов железа в растворе, тем насыщенней цвет. Для построения калибровочного графика, был проведен расчет массы навески хлорида железа по формуле (1):

$$m = n \cdot M, \quad (1)$$

где m – масса хлорида железа, мг;

M – молярная масса FeCl_3 , моль;

n – количество растворённого вещества, мг/моль.

Количество растворенного вещества неизвестно, но известны концентрация и объем, следовательно, для расчета количества вещества, мы использовали формулу (2):

$$C = \frac{n}{V}, \quad (2)$$

где n – количество растворённого вещества, моль;

V – общий объём раствора, л.

Далее из формулы (2) вывели формулу (3):

$$n = C \cdot V \quad (3)$$

$$n = 0,01 \cdot (56 + 35,3 \cdot 3) = 0,5417 \text{ мг.}$$

Затем полученную массу хлорида железа (FeCl_3) растворяли в 100 мл воды. Фотометрический метод определения NCS - в виде роданида железа (III) основан на том, что при обработке пробы концентрированным раствором хлорида цинка цианид-ионы (из простых и комплексных цианидов) и гексацианоферрат-ионы связываются в нерастворимые цинковые соли. При добавлении к фильтрату соли железа (III) образуется красный раствор роданида железа (III). Нерастворимые вещества осаждают хлоридом цинка и отфильтровывают. Осаждение хлоридом цинка приводит к отделению также сульфид- и тиосульфат-ионов, ксантоге-

натов, многих органических кислот, а также различных коллоидных частиц. Роданид цинка очень хорошо растворим в воде и переходит количественно в фильтрат.

Далее измеряли коэффициент пропускания фильтрата роданида по отношению к раствору холостого опыта при длине волны $\lambda = 480$ нм на спектрофотометре ПЭ – 5000 ВИ (таблица 1).

Прибор ПЭ – 5000 ВИ разработан в соответствии с требованиями, предъявляемым к спектральным приборам химико-аналитических лабораторий и внесен в государственный реестр № 44866-10.

На основании полученных данных был построен калибровочный график. По оси абсцисс (X) откладывались значения концентрации роданистых солей. По оси ординат (Y) – значение коэффициента пропускания для соответствующих концентраций.

Полученная калибровочная кривая послужила основой для проведения количественной оценки содержания роданидов в слюне студентов.

Таким образом, была подтверждена зависимость изменения коэффициента пропускания от содержания в слюне солей роданидов, и ус-

тановлено, что интенсивность окрашивания тем выше, чем выше концентрация роданистых солей.

Среднее содержание роданидов в слюне всех обследованных студентов представлено в таблице 2 и составило 62,74 моль/л, при этом, выявлены достоверные различия в концентрации исследуемого вещества с учетом пола обследуемых студентов. Так содержание роданидов в слюне девушек составило 63,82 моль/л, что значительно превысило содержание роданидов в слюне обследованных юношей (51,72 моль/л), $p \leq 0,01$.

Полученные результаты могут свидетельствовать о повышении местных неспецифических иммунных реакций в ротовой полости девушек по сравнению с юношами.

Из таблицы 3 видно среднее содержание роданидов в слюне некурящих $67,06 \pm 1,99$ моль/л, в слюне курящих $47,15 \pm 1,75$ моль/л.

Расчет показателей достоверности различий между сравниваемыми группами по критерию Стьюдента составил $p \leq 0,001$, таким образом установлено достоверное уменьшение содержания роданидов в слюне курящих студентов, что является признаком снижения местной неспецифической защиты в ротовой полости.

Таблица 1. Коэффициенты пропускания фильтрата роданида железа по отношению к раствору холостого опыта

Концентрация фиксана, С	Коэффициент пропускания, T1	Коэффициент пропускания, T2	Коэффициент пропускания, T3	Среднее значение коэффициента пропускания, Тср.
0,01	12,7	11,7	11,6	12
0,001	38,6	38,7	38,8	38,7
0,0001	62,4	62,5	62,3	62,4
0,00001	80	80,1	80	80,03333
0,000001	95,2	95,3	95,2	95,23333

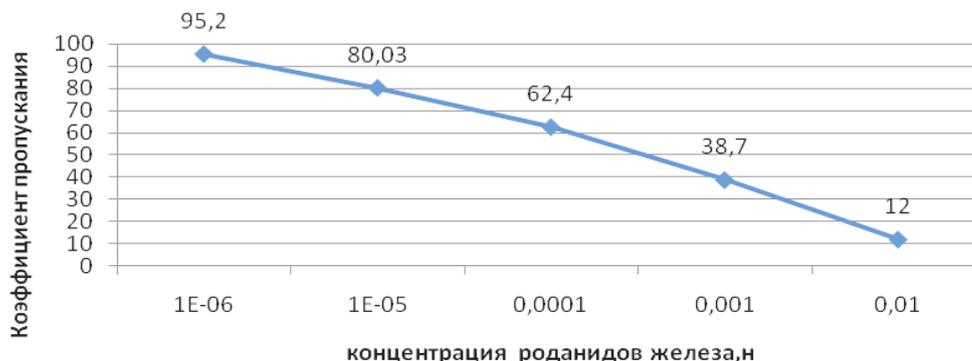


Рисунок 1. Калибровочная кривая

Как видно из таблицы 4 среднее содержание роданидов в слюне студентов с признаками ОРВИ составило $68,07 \pm 3,04$ моль/л, в слюне здоровых – $53,89 \pm 3,19$ моль/л.

Расчет показателей достоверности различий по критерию Стьюдента составил $p \leq 0,01$, таким образом установлено повышение содержания роданидов в слюне в группе студентов с признаками ОРВИ, что подтверждает увеличение местного неспецифического иммунитета в ответ на вирусную инфекцию.

Проведенный нами корреляционный анализ, в соответствии с таблицей 5, не выявил прямой зависимости между факторами курения, ОРВИ, половыми различиями и количественным содержанием роданидов в слюне.

Обсуждение результатов исследования

Полученные результаты можно объяснить тем, что содержание роданидов в слюне, а, следовательно, и состояние местной иммунной защиты ротовой полости связано с действием других факторов, в наибольшей степени оказывающих влияние на неспецифический и специфический иммунитет ротовой полости [8], [9].

Возможно, такими факторами являются:

- микробиоценоз ротовой полости;
- наличие хронических заболеваний системы пищеварения и ротовой полости (гингивиты, стоматиты и др.).

Полученные нами результаты требуют выявления и уточнения причин снижения местной иммунной защиты организма, поскольку не установлены четкие корреляционные связи между изученными факторами и содержанием роданидов в слюне.

Таким образом, разработанный нами метод оценки местного неспецифического иммунитета ротовой полости человека позволяет:

– давать количественную оценку содержания роданидов железа в слюне, основанную на зависимости коэффициента пропускания раствора от концентрации роданидов в стандартных разведениях и может служить основой для проведения массовых скрининговых обследований по оценке состояния местной иммунной защиты;

– получить достоверные данные о снижении концентрации роданидов в слюне юношей, что свидетельствует о снижении местной иммунной защиты;

Таблица 2. Концентрации роданидов в слюне с учетом пола обследуемых студентов

Пол	Количество человек (n)	Среднее значение моль/л
Девушки	35	$63,82^{**} \pm 2,59$
Юноши	23	$51,72^{**} \pm 4,48$
Общий результат	58	$62,74 \pm 1,87$

Примечание: ** – достоверные различия ($p \leq 0,01$)

Таблица 3. Содержание роданидов в слюне с учетом курения обследуемых студентов

Наличие курения	Количество человек (n)	Содержание роданидных смол в (моль/л)
Некурящие	39	$67,06^{***} \pm 1,99$
Курящие	19	$47,15^{***} \pm 1,75$
Общий результат	58	$62,74 \pm 1,87$

Примечание: *** – достоверные различия ($p \leq 0,001$)

Таблица 4. Содержание роданидов в слюне студентов с признаками ОРВИ

Наличие фактора	Количество человек (n)	Содержание роданидных смол в (моль/л)
Здоровые	37	$53,89^{**} \pm 3,19$
С признаками ОРВИ	21	$68,07^{**} \pm 3,04$
Общий результат	58	$62,74 \pm 1,87$

Примечание: ** – достоверные различия ($p \leq 0,01$)

Таблица 5. Корреляционный анализ содержания роданидов в слюне

Группы обследованных	Среднее содержание роданидов в популяции	Среднее содержание роданидов в слюне юношей	Среднее содержание роданидов в слюне девушек
	Ранг корреляции	Ранг корреляции	Ранг корреляции
Пол			-0,446
Курение	-0,681	-0,261	-0,681
ОРВИ	-0,16	-4,92	-0,16

Примечание: ** – достоверные различия ($p \leq 0,01$)

– выявить различия содержания роданидов в слюне курящих студентов по сравнению с некурящими, подтверждающие предположение, что курение снижает местную неспецифическую защиту ротовой полости;

– утверждать, что выявленное снижение содержания роданидов в слюне студентов с при-

знаками ОРВИ, свидетельствует об изменении гуморального звена неспецифического иммунитета в ответ на вирусную инфекцию.

Полученные результаты могут использоваться в скрининговых исследованиях по оценке местной иммунной защитной реакции ротовой полости человека.

24.11.2014

Список литературы:

1. Боровский, Е.В. Биология полости рта / Е.В. Боровский, В.К. Леонтьев. – М.: НГМА, 2001. – 304 с.
2. Будихина, А.С. Новый метод определения бактерицидной активности биологических жидкостей с помощью лазерной проточной цитофлюориметрии / А.С. Будихина, Н.С. Олиферук, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2006. – №4. – С. 249–252.
3. Гаврилова, О.А. Местный иммунитет полости рта у школьников с патологией органов пищеварения // Стоматология. – 2009. – №5. – С. 71–73.
4. Деряпа, Н.Р. Проблемы медицинской биоритмологии [Текст] / Н.Р. Деряпа, М.П. Мошкин, В.С. Посный – М.: Медицина, 1985. – 208 с.
5. Иммунологические показатели слюны и крови при воспалительных заболеваниях тканей пародонта / М.Я. Левин [и др.] // Пародонтология. – 1999. – №2. – С. 10–13.
6. Морозов, Г.В. Курение как фактор риска / Г.В. Морозов, И.В. Стрельчук // Курение и иммунитет. – 2011. – №6. – С. 13–14.
7. Муртазина, Ф.Ф. Ранняя диагностика заболеваний пародонта у курящих лиц молодого возраста: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ф.Ф. Муртазина. – Пермь. – 2006. – 225 с.
8. Исследование механизма повреждающего действия избыточных концентраций кадмия на состояние антиоксидантных ферментов кресс-салата / О.А. Науменко [и др.] // Вестник ОГУ. – 2013. – №10. – С. 205–207.
9. Науменко, О. А. Опыт внедрения программы «Образование и здоровье» в Оренбургском государственном университете / О. А. Науменко // Вестник ОГУ, приложение «Здоровьесберегающие технологии в образовании». – 2005. – С. 16–19.
10. Папилько, И.В. Суточная динамика иммунологических показателей ротовой жидкости / И.В. Папилько, Г.В. Никулина // Материалы Сателитного симпозиума 20 съезда физиологов России «Экология и здоровье». – М.: Изд-во РУДН. – 2007. – С. 126.
11. Исследование иммунологических показателей ротовой жидкости в разное время суток / И.В. Радыш [и др.] // Вестник РУДН. – 2007. – №6. – С. 75–79.
12. Ротовая полость и её секреты как система антибактериальной и антирадикальной защиты организма / П.Г. Сторожук [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2009. – №3. – С. 350–357.

Сведения об авторе:

Науменко Ольга Александровна, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии
Оренбургского государственного университета, кандидат медицинских наук, доцент

460018, г. Оренбург, пр-т Победы 13, ауд. 3017, тел.: (3532) 372484, e-mail: prf3@mail.ru

Саблина Елена Владимировна, старший преподаватель кафедры начертательной геометрии,
инженерной и компьютерной графики Оренбургского государственного университета

460018, г. Оренбург, пр-т Победы 13, ауд. 3403, тел.: (3532) 372523, e-mail: evsablina@yandex.ru

Соколова Ольга Ярославовна, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии
Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент

460018, г. Оренбург, пр-т Победы 13, ауд. 16416, тел.: (3532) 340635, e-mail: Gera20093@rambler.ru

Костенецкая Елена Альбертовна, старший преподаватель кафедры начертательной геометрии,
инженерной и компьютерной графики Оренбургского государственного университета

460018, г. Оренбург, пр-т Победы 13, ауд. 3403, тел.: (3532) 372523, e-mail: kosteneckaja_73@mail.ru