

Особенности биохимического состава ротовой жидкости у пациентов с психоневрологическими расстройствами

Салеев Р. А., д.м.н., профессор кафедры ортопедической стоматологии, декан стоматологического факультета
 Абдрашитова А. Б., к.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста
 Гайнуллина Д. К., аспирант кафедры стоматологии детского возраста
 Сафина Н. А., кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии
 Мустафин И. Г., д.м.н., профессор, проректор по научной и инновационной работе
 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
 «Казанский государственный медицинский университет»
 Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань, Россия

Резюме

Актуальность. Разработка высокотехнологических методик анализа ротовой жидкости, а также расширение знаний в понимании изменения ее физико-химических свойств позволяют повысить диагностическую ценность на этапе доклинических проявлений.

Материалы и методы. Проведено исследование уровня активности лизоцима, общей концентрации белка и активности протеолитических ферментов в ротовой жидкости пациентов с психоневрологическими расстройствами.

Результаты. У пациентов с психоневрологическими расстройствами значительно отличается биохимический состав ротовой жидкости. В исследуемом материале выявлены как металл-зависимые, так и низкомолекулярные сериновые протеиназы, общая активность протеолитических ферментов у пациентов данной группы значительно выше ($p \leq 0,05$), чем в группе сравнения. В ротовой жидкости пациентов с психоневрологическими расстройствами значительно снижен уровень активности лизоцима ($10,20 \pm 0,32\%$), что указывает на низкую степень неспецифической резистентности.

Выводы. Возможно, что исследование уровня лизоцима и биохимического состава ротовой жидкости позволит оценить эффективность назначения средств индивидуальной гигиены рта и программы профилактики стоматологических заболеваний.

Ключевые слова: стоматология, ротовая жидкость, пациенты с психоневрологическими расстройствами, активность лизоцима, протеолитические ферменты.

Для цитирования: Салеев Р.А., Абдрашитова А.Б., Гайнуллина Д.К., Сафина Н.А., Мустафин И.Г. Особенности биохимического состава ротовой жидкости у пациентов с психоневрологическими расстройствами. Стоматология детского возраста и профилактика. 2019;19(3):43-46. DOI: 10.33925/1683-3031-2019-19-3-43-46.

Features of biochemical composition of oral fluid in patients with psychoneurological disorders

R. A. Saleev, DSc, Professor of the Department of orthopaedic dentistry, Dean of Faculty of Dentistry Department
 A. B. Abdrashitova, PhD, Associate Professor of Pediatric Dentistry Department
 D. K. Gainullina, MD of of Pediatric Dentistry Department
 N. A. Safina, candidate of biological Sciences, Assistant Professor, Department of biochemistry
 I. G. Mustafin, DSc, Professor, chief of the department of biochemistry, prorektor
 Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kazan State Medical University,
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russia

Abstract

Relevance. The development of high-tech methods of analysis of oral fluid, as well as the expansion of knowledge in the understanding of changes in its physical and chemical properties can increase the diagnostic value at the stage of preclinical manifestations.

Materials and methods. The level of lysozyme activity, total protein concentration and proteolytic enzyme activity in the oral fluid of patients with psychoneurological disorders were studied.

Results and discussion. The biochemical composition of oral fluid in patients with psychoneurological disorders is significantly different. Both metal-dependent and low-molecular serine proteases were found in the study material. The total activity of proteolytic enzymes in patients of this group is significantly higher ($p \leq 0.05$) than in the comparison group. The level of lysozyme activity ($10.2 \pm 0.32\%$) was significantly reduced in the oral fluid of patients with psychoneurological disorders, indicating a low degree of nonspecific resistance.

Conclusions. It is possible that the study of the lysozyme level and the biochemical composition of the oral fluid will allow to evaluate the effectiveness of prescribing personal hygiene products and the dental disease prevention programs.

Key words: dentistry, oral fluid, patients with psychoneurological disorders, lysozyme activity, proteolytic enzymes.

For citation: R. A. Saleev, A. B. Abdrashitova, D. K. Gainullina, N. A. Safina, I. G. Mustafin. Features of Biochemical Composition of Oral Fluid in Patients with Psychoneurological Disorders. Pediatric dentistry and dental prophylaxis. 2019;19(3):43-46. DOI: 10.33925/1683-3031-2019-19-3-43-46.

Ротовая жидкость – сложная биологическая субстанция, вырабатываемая слюнными железами, имеющая ряд определенных характеристик, определяющих ее качественный и количественный состав [1].

У пациентов с психоневрологическими расстройствами существует проблема оказания стоматологической медицинской помощи из-за определенных особенностей: психоэмоциональное реагирование на манипуляции; сложности в проведении адекватного осмотра рта, диагностических исследований челюстно-лицевой области (радиовизиография, ортопантограмма, конусно-лучевая компьютерная томография); отсутствие навыков общения врача-стоматолога с данной группой пациентов; отсутствие адекватного проведения гигиены рта родителем, опекуном, самим пациентом; невозможность установления окончательного стоматологического диагноза без включения сознания [2-4]. Согласно исследованиям многих авторов, у данной группы пациентов определяется высокий уровень интенсивности и активности кариозного процесса, а также воспалительных заболеваний слизистой рта [5, 6].

Воспалительные заболевания рта сопровождаются синтезом протеолитических ферментов, которые способны вызывать деструкцию белков межклеточного матрикса и усугублять воспаление [7]. С другой стороны, эти ферменты могут иметь противоположный эффект, принимая участие в процессинге противовоспалительных цитокинов [8]. Другими важными составляющими компонентами ротовой жидкости являются факторы специфической и неспецифической местной резистентности, представителем последней является лизоцим. Оценка нормы активности лизоцима в биологических жидкостях отличается при использовании различных методик. Существует метод количественной оценки состояния местного иммунитета, в котором указывается условная норма активности лизоцима, составляющая 40% [9]. В то же время Стогний В. И. и соавт. при модификации методики определения активности лизоцима в биологических жидкостях указывают на уровень активности в пределах 68–71 ± 0,7% [9]. Разработка высокотехнологических методик анализа ротовой жидкости, а также расширение

знаний в понимании изменения ее физико-химических свойств позволяют повысить диагностическую ценность на этапе доклинических проявлений [10, 11].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить особенности биохимического состава ротовой жидкости у пациентов с психоневрологическими расстройствами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие пациенты (группа 1, n = 54) в возрасте 17-20 лет с отягощенным соматическим статусом (психоневрологические расстройства с компенсированной адаптационной формой (пациенты способны самостоятельно проводить индивидуальную гигиену рта)). Контрольную группу составили пациенты в возрасте 17-20 лет, обратившиеся с целью профилактического стоматологического осмотра (группа 2, n = 45), стоматологический статус которых соответствовал пациентам группы 1 (индекс интенсивности кариеса > 9, индекс гигиены по методу Федорова Ю. А. и Володиной В. В. > 2 балла, 3-я степень активности кариеса по Виноградовой Т.Ф.). У всех пациентов проводился забор ротовой жидкости натошак. Активность лизоцима в ротовой жидкости определяли по модифицированной методике Ермолаевой З. В. [9] и вычисляли по формуле: $L = (D0 - D1) / D0 \times 100\%$, где L – активность лизоцима (%); D0 – оптическая плотность до ин-

кубации; D1 – оптическая плотность после инкубации. Активность протеаз и их распределение по молекулярным массам определяли зимографическим методом, который заключается в проведении SDS-электрофореза ротовой жидкости в 10%-м акриламидном геле с добавлением желатина в качестве субстрата. Активность ферментов рассчитывали относительно трипсина с известным содержанием активной фракции. Тип активных центров определяли с помощью ингибиторов ЭДТА и соевого ингибитора трипсина. Для этого электрофорез проводили в трех вариантах: без ингибиторов, а также в присутствии динатриевой соли ЭДТА и соевого ингибитора сериновых протеиназ. Окончательный пересчет активности ферментов производили на концентрацию белка. Концентрацию белка ротовой жидкости определяли по методу Бредфорда. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics 23.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность лизоцима ротовой жидкости пациентов с интактным стоматологическим статусом в Республике Татарстан составля-

Таблица 1. Концентрация белка и общая активность протеолитических ферментов в ротовой жидкости в исследуемых группах

Table 1. Protein concentration and total activity of proteolytic enzymes in oral fluid in the study groups

Пациенты Patients	Уровень общего белка (мкг/мл) Total protein level (µg/ml)	Активность ферментов ПУ/мкг белка Enzyme activity of PU/ mcg protein
Группа 1 / Group 1		
M ± m	58,37 ± 5,26	15,49 ± 2,48
95% ДИ	64,35-59,84	18,32-16,41
Мин.-макс.	52,02-68,3	10,22-19,7
Группа 2 / Group 2		
M±m	58,52 ± 3,97	6,211 ± 1,180
95% ДИ	61,03-59,41	8,31-6,45
Мин.-макс.	55,3-65,41	4,32-8,05
Достоверность (P) p-value (P)	P ≥ 0,05	P ≤ 0,05

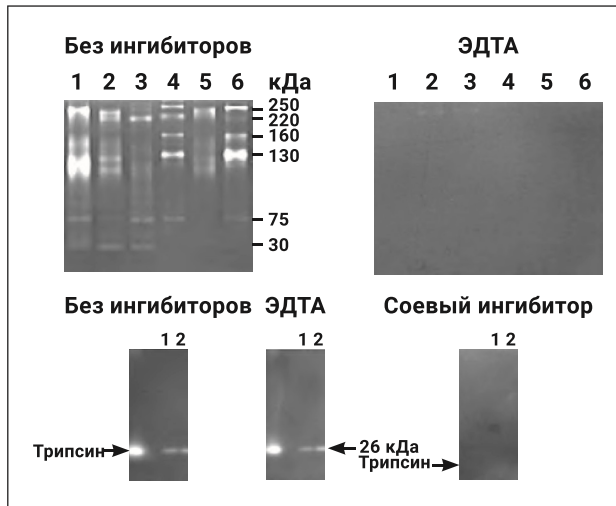


Рис. 1. Зимограммы ротовой жидкости пациентов группы 1

Fig. 1. Zymograms of oral fluid in group 1 patients

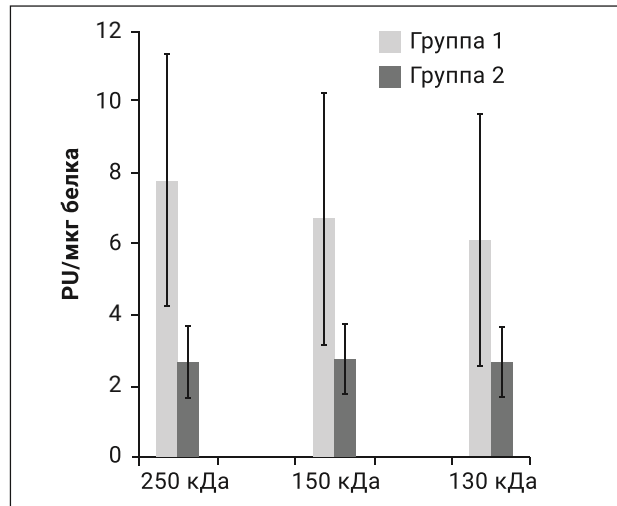


Рис. 2. Активность отдельных протеолитических ферментов в исследуемых группах

Fig. 2. The activity of individual proteolytic enzymes in the study groups

ет $32,00 \pm 0,17\%$ [12]. У пациентов контрольной группы исследуемый показатель колебался от 15,2% до 21,4%, составив в среднем $17,20 \pm 0,32\%$. В группе 1 активность лизоцима составила в среднем $10,20 \pm 0,32\%$. Таким образом, у пациентов исследуемых групп выявлено изменение неспецифической резистентности рта в сторону деактивации факторов местного иммунитета. Результаты наших исследований согласуются с данными Стволыгина А. В. и соавт. [13], которые в своих исследованиях показали, что уровень активности лизоцима зависит от срока действия раздражающего фактора. В данном исследовании сопутствующими факторами, влияющими на снижение уровня активности лизоцима, являются неудовлетворительная гигиена рта, высокая активность кариозного процесса, в том числе у пациентов группы 1 – отягощенность соматического статуса.

В обеих группах у исследуемых пациентов выявлено изменение уровня саливации, ротовая жидкость при заборе представляла вязкую субстанцию. Во всех пробах была определена общая активность протеолитических ферментов ротовой жидкости, их распределение по молекулярным массам и типу активных центров (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, активность ферментов ротовой жидкости была значительно и достоверно выше ($P \leq 0,05$) у пациентов группы 1, чем у пациентов группы контроля.

Далее нами проанализирован спектр протеолитических ферментов по молекулярным массам и типу активных центров. В ротовой жидкости пациентов группы 2 были обнаружены ферменты с молекулярными массами 250 кДа, 160 кДа и 13 кДа, которые блокировались в присутствии ЭДТА, и соответственно, принадлежали к металл-зависимым ферментам (рис. 1).

В ротовой жидкости пациентов группы 1 выявлены протеолитические ферменты в виде одной полосы просветления с молекулярной массой приблизительно 25-30 Кд, эти ферменты не блокировались ЭДТА, но ингибировались в присутствии соевого ингибитора, то есть принадлежали к сериновым протеиназам (рис. 1).

Нами установлен разный уровень протеолитических ферментов и частота его встречаемости в ротовой жидкости у пациентов с психоневрологическими расстройствами и без отягощенного соматического статуса.

У пациентов обеих групп с одинаковой частотой встречались ферменты с молекулярными массами 250 кДа, 160 кДа и 130 кДа, а ферменты с меньшей молекулярной массой (от 26 до 75 кДа) встречались только у пациентов 1-й группы. Однако активность ферментов 250 кДа, 160 кДа и 130 кДа была значительно и достоверно выше ($P \leq 0,05$) у пациентов 1-й группы по сравнению с пациентами 2-й группы (рис. 2).

Выявленную разницу, как по активности, так и спектру протеиназ ротовой жидкости у пациентов

группы 1 по сравнению с группой контроля (2) можно объяснить активацией и длительностью течения воспалительного процесса. Источниками этих ферментов могут быть резидентные клетки (фиibroblasts, эпителиальные и эндотелиальные клетки), рекрутированные в область воспаления нейтрофилы, макрофаги, а также представители микробиоты рта.

На сегодняшний день все обнаруженные ферменты нуждаются в идентификации. Исходя из их электрофоретических характеристик и типу активных центров, мы можем предположить, что часть из них принадлежит к матриксным металлопротеиназам (ММП), об участии которых в воспалительных процессах указывается в научной литературе [14].

Матриксные металлопротеиназы – семейство протеиназ, способных специфически гидролизовать основные белки внеклеточного матрикса. ММП играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития и ремоделирования клеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, воспалительных процессах и опухолевой трансформации. В настоящее время активно изучается уровень ММП при заболеваниях соединительной ткани, аутоиммунных поражениях кожи, сосудистых патологиях [15].

В проведенном исследовании изучены металлопротеиназы в ротовой жидкости пациентов с «отрицательным» стоматологическим статусом (индекс интенсивности

кариеса > 9, индекс гигиены по методу Ю.А.Федорова и В.В. Володкиной > 2 балла, 3-я степень активности кариеса по Т.Ф. Виноградовой), в том числе и у пациентов с психоневрологическими расстройствами. Так, фермент с молекулярной массой 130 кДа может быть димером ММП-9, концентрация которого, как известно, увеличена при воспалении, главным ее источником являются нейтрофилы [16]. Протеиназы с молекулярной массой 40 кДа могут быть ММП-3, -8, -10, -11, -13, подвергнутые протеолитическому процессингу, но сохранившие биологическую активность, а ферменты с молеку-

лярной массой 75 кДа могут быть гликозилированной формы ММП-8, ММП-2, главным источником которых также являются нейтрофилы [17]. Обнаруженные нами ферменты в исследуемых материалах способны вызывать деструкцию белков межклеточного матрикса и усугублять воспаление.

Выводы

У пациентов с психоневрологическими расстройствами значительно отличается биохимический состав ротовой жидкости. В исследуемом материале выявлены как метал-зависимые, так и низкомолекулярные сериновые протеиназы,

общая активность протеолитических ферментов у пациентов данной группы значительно выше ($p \leq 0,05$), чем в группе сравнения. В ротовой жидкости пациентов с психоневрологическими расстройствами значительно снижен уровень активности лизоцима ($10,20 \pm 0,32\%$), что указывает на низкую степень неспецифической резистентности. Возможно, что исследование уровня лизоцима и биохимического состава ротовой жидкости позволит в дальнейшем оценить эффективность назначения средств индивидуальной гигиены рта и программы профилактики стоматологических заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Иргалиева В. Р., Аверьянов С. В. Физико-химические показатели ротовой жидкости слабывидящих детей. Стоматология детского возраста и профилактика. 2017;2(61):17-19. [V. R. Irgaliev, S. V. Aver'yanov. Physical and chemical parameters of oral fluid of visually impaired children. Pediatric dentistry and dental prophylaxis. 2017;2(61):17-19. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=29206044>.
2. Гавриленко М. А. Цитологическое исследование осадочной части слюны у детей с ограниченными возможностями. Современная педиатрия. 2015;4(68):132. [M. A. Gavrilenko. Cytological study of the sedimentary part of saliva in children with disabilities. Sovremennaya pediatriya. 2015;4(68):132. (In Russ.)]. <http://journals.urau.ru/index.php/1992-5913/article/view/SP2015.68.132>.
3. Данилова М. А., Кирко Г. Е., Залазаева Е. А. Особенности микрокристаллизации слюны и течения кариеса у детей со спастическими формами детского церебрального паралича. Стоматология детского возраста и профилактика. 2012;3(42):52-56. [M. A. Danilova, G. E. Kirko, E. A. Zalazayeva. Features of microcrystallization of saliva and caries in children with spastic forms of cerebral palsy. Pediatric dentistry and dental prophylaxis. 2012;3(42):52-56. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18336535>.
4. Скрипкина Г. И. Взаимосвязь физико-химических параметров ротовой жидкости кариесрезистентных детей. Стоматология детского возраста и профилактика. 2011;3:22-25. [G. I. Skripkina. Interrelation of physical and chemical parameters of oral fluid of caries-resistant children. Pediatric dentistry and dental prophylaxis. 2011;3:22-25. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=16753221>.
5. Ушницкий И. Д., Яворская Т. Е., Саввинов Н. В., Дегтярева А. М. Клинико-физиологическая характеристика состава и свойств ротовой жидкости и твердых тканей зубов у детей младшего школьного возраста, проживающих в условиях высоких широт. Эндодонтия today. 2012;4:43-45. [I. D. Ushnickiy, T. E. Yavorskaya, N. V. Savvinov, A. M. Degtyareva. Clinical and physiological characteristics of the composition and properties of oral fluid and hard tissues of teeth in children of primary school age living in high latitudes. Endodontia today. 2012;4:43-45. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18304353>.
6. Галкина О. П., Безруков С. Г., Каладзе Н. Н. Саливадиагностика у больных ювенильным ревматоидным артритом. Стоматология детского возраста и профилактика. 2018;2(65):24-28. [O. P. Galkina, S. G. Bezrukov, N. N. Kaladze. Salivadiagnostics in patients with juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric dentistry and

- dental prophylaxis. 2018;2(65):24-28. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25636/PMP3.2018.2.4>.
7. Доменок Д. А., Давыдов Б. Н., Гильмиева Ф. Н., Ивченко Л. Г. Особенности цитокинового профиля ротовой жидкости у детей с сахарным диабетом I типа на различных стадиях компенсации заболевания. Стоматология детского возраста и профилактика. 2017;1(60):68-76. [D. A. Domenyuk, B. N. Davydov, F. N. Gil'miyarova, L. G. Ivchenko. Features of cytokine profile of oral fluid in children with type I diabetes mellitus at various stages of disease compensation. Pediatric dentistry and dental prophylaxis. 2017;1(60):68-76. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=29206040>.
8. Вавилова Т. П., Янушевич О. О., Островская И. Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: БИНОМ. 2014;312. [T. P. Vavilova, O. O. Yanushevich, I. G. Ostrovskaya. Slyuna. Analytical capabilities and perspectives. M.: BINOM. 2014;312. (In Russ.)].
9. Стогний В. И., Голик В. П., Ткаченко В. В. и др. Способ определения активности лизоцима в слюне и сыворотке крови. Лабораторное дело. 1989;8:54. [V. I. Stogniy, V. P. Golik, V. V. Tkachenko et al. Method for determining the activity of lysozyme in saliva and serum. Laboratornoye delo. 1989;8:54. (In Russ.)].
10. Тирская О. И., Казанова Е. М. Влияние пенообразующих компонентов зубных паст на некоторые показатели неспецифического иммунитета полости рта. Стоматология детского возраста и профилактика. 2018;1(64):60-62. [O. I. Tirskaya, E. M. Kazanova. Influence of foaming components of toothpastes on some indicators of nonspecific immunity of the oral cavity. Pediatric dentistry and dental prophylaxis. 2018;1(64):60-62. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25636/rmp.3.2018.1.10>.
11. Авакова Д. Р., Митронин А. В., Торопцова Н. В. и др. Анализ факторов местной защиты в полости рта у больных ревматоидным артритом (сравнительное клинико-иммунологическое и биохимическое исследование). Эндодонтия today. 2017;4:19-23. [D. R. Avakova, A. V. Mitronin, N. V. Toropova et al. Analysis of local protection factors in the oral cavity in patients with rheumatoid arthritis (comparative clinical, immunological and biochemical study). Endodontia today. 2017;4:19-23. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=32402693>.
12. Егорова А. Б., Мусина Л. Т., Мустафин И. Г., Уразова Р. З. Состояние местного иммунитета полости рта при использовании антисептических зубных паст в качестве лечебно-профилактических средств. Иммунология. 2012;3:159-161. [A. B. Egorova, L. T. Musina, I. G. Mustafin, R. Z. Urazova. The state of local

immunity of the oral cavity when using antiseptic toothpastes as therapeutic and prophylactic agents. Immunologiya. 2012;3:159-161. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18043876>.

13. Стволыгин А. В. и др. Влияние лечебно-профилактической зубной пасты Мексидол Дент Актив на состояние местного иммунитета полости рта у лиц с хроническим катаральным гингивитом. Клиническая иммунология. 2007;1:12-14. [A. V. Stvolynin et al. Effect of therapeutic and prophylactic toothpaste «Mexidol Dent Active» on the state of local immunity of the oral cavity in persons with chronic catarrhal gingivitis. Klinicheskaya immunologiya. 2007;1:12-14. (In Russ.)].

14. M. Maciejczyk, A. Pietrzykowska, A. Zalewska et al. The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases. Adv Clin Exp Med. 2016;2:383-390.

15. Ярмолинская М. И., Молотков А. С., Денисова В. М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. Журнал акушерства и женских болезней. 2012;1:113-125. [M. I. Yarmolinskaya, A. S. Molotkov, V. M. Denisova. Matrix metalloproteinases and inhibitors: classification, mechanism of action. Jurnal akusherstva i zhenskikh boleznej. 2012;1:113-125. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=17837799>.

16. M. Nędzi-Góra, J. Kostrzewa-Janicka, R. Górka. Elastase and metalloproteinase-9 concentrations in saliva in patients with chronic periodontitis. Cent Eur J Immunol. 2014;3:357-364.

17. A. Lundmark, G. Johannsen, K. Eriksson et al. Mucin 4 and matrix metalloproteinase 7 as novel salivary biomarkers for periodontitis. J Clin Periodontol. 2017;3:247-254.

Конфликт интересов:

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов/
Conflict of interests:

The authors declare no conflict of interests

Поступила/Article received 17.12.2018

Координаты для связи с авторами /
Coordinates for communication with the authors:

Салеев Р. А. / R. A. Saleev
rinat.saleev@gmail.com

Абдрашитова А. Б. / A. B. Abdrashitova
egorova-alena@mail.ru

Гайнуллина Д. К. / D. K. Gaynullina
dilya.gaynullina@mail.ru

Сафина Н. А. / N. A. Safina
nellyasafina@mail.ru

Мустафин И. Г. / I. G. Mustafin
ilshat.mustafin@kazangmu.ru