

Иммунологическое изучение цитокинового профиля при лечении больных красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта

Ю.А. МАКЕДОНОВА*, **, к. м. н., доцент, научный сотрудник

И.В. ФИРСОВА*, д. м. н., доцент, зав. кафедрой

С.В. ПОРОЙСКИЙ**, д. м. н., доцент, зав. лабораторией, проректор по учебной работе

*Кафедра терапевтической стоматологии

**Лаборатория моделирования патологии

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Immunological study of the cytokine profile in the treatment of patients with red lichen planus mucosa of the oral cavity

Yu.A. MAKEDONOVA, I.V. FIRSOVA, S.V. POROYSKIY

Резюме

В данной работе проведено иммунологическое исследование ротовой жидкости больных эрозивно-язвенной формой красного плоского лишая. Пациенты были сопоставимы по полу, возрасту, клиническим проявлениям воспалительно-дистрофического процесса в полости рта. Больным в комплексном лечении применяли аппликации лекарственной композицией Тизоль с L-аргинином. Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) в ротовой жидкости обследуемых лиц проводилось определение количественного содержания медиаторов иммунитета с провоспалительным – интерлейкин-1 бета (IL-1β), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-альфа (TNF-α), интерферон-альфа (IFN-α) и противовоспалительным действием – интерлейкин-4 (IL-4) с использованием стандартных наборов в соответствии с инструкциями производителя. Контроль эффективности лечения больных с КПЛ осуществляли на основе определения локального цитокинового профиля и иммуноглобулинов до лечения и на 3-й, 7-й, 14-й, 21-й день наблюдения. В результате медикаментозной терапии для всех определенных показателей наблюдалось статистически значимое снижение их концентрации. Однако характер изменения на этапах наблюдения был разным.

Ключевые слова: красный плоский лишай, цитокиновый профиль, Тизоль, L-аргинин.

Abstract

In this work, an immunological study of the oral fluid of patients with an erosive ulcerous form of red flat lichen was carried out. Patients were comparable by sex, age, clinical manifestations of the inflammatory-dystrophic process in the oral cavity. Patients in the complex treatment used the application of the drug Tizol with L-arginine. The quantitative content of mediators of immunity with pro-inflammatory-interleukin-1 beta (IL-1β), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) was measured by solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) α), interferon-alpha (IFN-α) and anti-inflammatory action – interleukin-4 (IL-4) using standard kits according to the manufacturer's instructions. Control of the effectiveness of treatment of patients with CPL was carried out on the basis of local cytokine profile and immunoglobulins before treatment and on the 3rd, 7th, 14th, 21st day of observation. As a result of drug therapy, a statistically significant decrease in their concentration was observed for all the defined indicators. However, the nature of the change at the observation stages was different.

Key words: lichen planus, cytokine profile, Tysol, L-arginine.

ВВЕДЕНИЕ

Красный плоский лишай (КПЛ) — хроническое заболевание, поражающее покровные ткани; клинически проявляется на коже и слизистых оболочках [4, 7, 13]. Иммунологические механизмы развития КПЛ обуславливают поражения тканей эпителия (эпидермиса) и собственной пластинки по типу поздней иммунологической реакции с цитотоксическим эффектом [2, 9, 11]. Как известно, про- и противовоспалительные цитокины участвуют

в патогенезе различных процессов (особенно иммунных, воспалительных и опухолевых), обеспечивая взаимную регуляцию [1]. Цитокины — это продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, осуществляющие коротко-дистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. Цитокины определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз клеток [5]. Способность регулировать перечисленные функции

обусловлена тем, что после взаимодействия цитокинов с комплементарными рецепторами на поверхности клеток сигнал через элементы внутриклеточной трансдукции передается в ядро, где активируются соответствующие гены [10]. Белки, продукты активированных цитокинами генов, синтезируются клетками и регулируют перечисленные выше процессы [12].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение динамики концентрации про- и противовоспалительных цитокинов слюны пациентов с эрозивно-язвенными поражениями КПЛ на фоне медикаментозного лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выявления особенностей иммунологического статуса больных с эрозивно-язвенной формой красного плоского лишая, объективизации клинической картины, а также контроля результатов лечения, проводилось иммунологическое исследование ротовой жидкости пациентов, заключающееся в оценке цитокинового профиля, уровня иммуноглобулинов.

В качестве материала для исследования служила ротовая жидкость больных красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта. Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) в ротовой жидкости обследуемых лиц проводилось определение количественного содержания медиаторов иммунитета с провоспалительным – интерлейкин-1 бета (IL-1 β), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерферон-альфа (IFN- α) и противовоспалительным действием – интерлейкин-4 (IL-4) с использованием стандартных наборов в соответствии с инструкциями производителя.

Забор нестимулированной смешанной слюны был проведен у больных по общепринятой стандартной методике. Образцы слюны больных собирали в первой половине дня. Пациентам перед забором слюны рекомендовалось воздержаться от приема пищи, курения, а непосредственно перед процедурой прополоскать рот. Образцы слюны были собраны в 1,5 мл микропробирки «Эппендорф» и немедленно заморожены при температуре –20 °С до использования.

Пациентам проводилась базовая общепринятая схема лечения красного плоского лишая, определяемая как «традиционное лечение», рекомендованное Национальным руководством по терапевтической стоматологии [3].

Традиционное лечение включало в себя:

1. Мотивацию пациентов к предстоящему лечению, рекомендации по предметам, средствам гигиены, а также методике чистки зубов и уходу за протезами.
2. Профессиональную гигиену полости рта: удаление зубных отложений (ручными и ультразвуковыми способами — аппаратом UDS-L Woodpecker (Китай)) с использованием антисептика (раствор хлоргексидина 0,06%) с последующим полированием зубов резиновыми головками и щеточкой с абразивной пастой.
3. Сошлифовывание острых краев зубов.
4. Избирательное шлифование зубов по методике, предложенной Jankelson B.A. (1972) с целью гармонизации окклюзионно-артикуляционных

взаимоотношений зубных рядов и устранения травматических супраконтактов.

5. Санацию полости рта: устранение местных раздражающих факторов, а также очагов хронической инфекции – лечение зубов, пораженных кариесом и его осложнениями.
6. Оценку состоятельности ортопедических конструкций (при необходимости — их дальнейшую перебазировку или замену), консультации с врачами-ортопедами.
7. Местное применение антисептиков: 0,01% раствор Мирамистина, в виде орошений слизистой оболочки полости рта два раза в день в течение 10–14 дней.
8. Аппликации кератопластиков на пораженную слизистую оболочку (масляный раствор витамина А).

В дополнение к местному медикаментозному лечению применялись аппликации лекарственной композиции Тизоля с L-аргинином. Также больным КПЛ назначали общую медикаментозную терапию: назначение поливитаминных комплексов, препарат «Имудон» по 6 таблеток для рассасывания в сутки с интервалом 10 часов, в течение 10 дней, препарата «Вазотон», «Тенотен» [6].

Лабораторные исследования проводили на 3-й, 7-й, 14-й, 21-й день лечения. Анализ и статистическую обработку результатов исследований проводили методом математической статистики с помощью персонального компьютера и программы Microsoft Excel к программной операционной системе MS Windows 7 (Microsoft Corp., США) в соответствии с общепринятыми методами медицинской статистики.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На момент первичного обследования до начала лечения у всех пациентов отмечались следующие значения показателей местного иммунитета ротовой жидкости. Уровень провоспалительных цитокинов составил: интерлейкин-1 β (IL-1 β) — $41,24 \pm 1,87$ пг/мл, интерлейкин — 8 (IL-8) — $51,30 \pm 1,21$ пг/мл, фактор некроза опухоли альфа (Tumor necrosis factor, TNF α) — $3,95 \pm 0,37$ пг/мл, интерферон гамма (IFN γ) — $6,33 \pm 0,54$ пг/мл. Концентрация противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 (IL-4) составила $10,1 \pm 1,3$ пг/мл. Уровень иммуноглобулина А (IgA) составил $0,43 \pm 0,01$ МЕ/мл, иммуноглобулина G (IgG) — $0,022 \pm 0,001$ МЕ/мл, иммуноглобулина М (IgM) — $0,15 \pm 0,01$ МЕ/мл. Приведенные данные свидетельствуют о том, что у больных наблюдается выраженный воспалительный процесс в полости рта, о чем свидетельствует повышенная концентрация провоспалительных цитокинов.

На фоне медикаментозного лечения для всех определенных провоспалительных цитокинов и иммуноглобулинов наблюдалось статистически значимое снижение в результате терапии.

При местной медикаментозной терапии 30 больных эрозивно-язвенной формой красного плоского лишая во II группе применяли аппликации лекарственной композиции Тизоля с L-аргинином с использованием «сэндвич-техники». Анализ результатов иммунологических показателей на всех сроках наблюдения отличался от аналогичных до начала лечения. Так, уже на третий день медикаментозной терапии концентрация провоспалительных цитокинов снизилась по отношению к первоначальным данным, но данная разница была статистически недостоверной ($p >$

0,05). Так, концентрация интерлейкина-1 β составила $36,70 \pm 1,23$ пг/мл, что на 12% меньше, чем до начала терапии. Уровень интерлейкина-8 уменьшился на 9,8% и равнялся $46,70 \pm 1,02$ пг/мл. Содержание TNF α и IFN γ составило $3,24 \pm 0,35$ пг/мл и $5,65 \pm 0,23$ пг/мл соответственно. На 11% повысился уровень противовоспалительного цитокина IL-4 — $11,2 \pm 2,3$ пг/мл, данная разница является статистически недостоверной ($p > 0,05$). Уровень sIgA составил $0,43 \pm 0,07$ МЕ/мл, IgM — $0,22 \pm 0,01$ МЕ/мл и IgG — $0,025 \pm 0,001$ МЕ/мл. Можно отметить, что уже на третий день на фоне медикаментозного лечения аппликаций Тизоля с L-аргинином отмечалась определенная динамика показателей местного иммунитета в полости рта, проявляющаяся в снижении провоспалительных цитокинов.

На седьмой день наблюдений описанные выше тенденции к снижению уровня провоспалительных цитокинов в ротовой жидкости продолжались. Так, концентрация IL-1 β составила $32,1 \pm 0,83$ пг/мл, IL-8 — $38,90 \pm 1,01$ пг/мл, TNF α — $2,61 \pm 0,16$ пг/мл и IFN γ — $4,83 \pm 0,21$ пг/мл. Вышеперечисленные показатели статистически достоверно отличались от первоначальных значений ($p < 0,05$). Концентрация интерлейкина-4 незначительно повысилась и составила $12,8 \pm 2,1$ пг/мл. Повышение данного показателя на фоне лечения было статистически недостоверным относительно третьего дня и начала лечения ($p > 0,05$). Концентрация IgG и IgM продолжала нарастать даже после начала лечения и равнялась $0,026 \pm 0,001$ МЕ/мл и $0,24 \pm 0,01$ МЕ/мл. Концентрация sIgA также незначительно изменила свое значение — $0,37 \pm 0,08$ МЕ/мл.

Полученные данные спустя 14 дней от начала лечения свидетельствуют о нормализации иммунологической реактивности организма. Концентрация IL-1 β достоверно снизилась по отношению к первоначальным данным и ко всем срокам наблюдения: $11,20 \pm 0,21$ пг/мл ($p < 0,05$). Уровень IL-8 достоверно уменьшился относительно ранее полученных данных и составил $34,59 \pm 1,07$ пг/мл. На 58% уменьшился уровень TNF α относительно первого дня наблюдения и составил $1,53 \pm 0,25$ пг/мл ($p < 0,05$). Концентрация провоспалительного цитокина IFN γ также уменьшилась на 47% относительно первоначального показателя — $4,30 \pm 0,12$ пг/мл ($p < 0,05$). Уровень IL-4 уменьшился на 9,4% относительно семи дней ($p > 0,05$) и все-таки значение IL-4 повышено на 15,8% по отношению к первому дню лечения ($p > 0,05$) и составил $11,7 \pm 1,1$ пг/мл. Концентрация иммуноглобулина А составила $0,44 \pm 0,09$ МЕ/мл, что на 21,6% выше предыдущего значения ($p > 0,05$). Уровень IgG и IgM уменьшился и достиг практически первоначального значения — $0,023 \pm 0,001$ МЕ/мл и $0,15 \pm 0,01$ МЕ/мл.

К 21 дню отмеченная ранее тенденция к снижению лабораторных показателей во всех группах продолжилась, что подтверждалось статистически. Исключением является sIgA, который на 18% повысился относительно 14 дней и на 21% по отношению к первоначальным данным — $0,52 \pm 0,07$ МЕ/мл. Концентрация иммуноглобулинов G и M достоверно не изменилась и составила $0,210 \pm 0,001$ МЕ/мл и $0,13 \pm 0,01$ МЕ/мл. Концентрация провоспалительных цитокинов практически оставалась на том же уровне относительно 14 дней: IL-1 β — $11,06 \pm 0,35$ МЕ/мл, IL-8 — $36,20 \pm 1,02$ пг/мл, TNF α — $2,25 \pm 0,21$ пг/мл и IFN γ — $3,80 \pm 0,31$ пг/мл. Полученные данные свидетельствуют

о развитии в полости рта компенсаторных реакций, направленных на подавление воспалительного процесса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты иммунологического исследования продемонстрировали высокую эффективность медикаментозной терапии при лечении больных эрозивно-язвенной формой КПЛ. При включении в терапию КПЛ сосудорасширяющих препаратов, препаратов — регуляторов метаболического обмена, увеличивается способность слизистой оболочки полости рта к иммунологической защите.

IL-1 β и TNF α усиливает экспрессию молекул адгезии, синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, белков острой фазы, ферментов фагоцитарных клеток и т.д. Наряду с IL-1 β TNF α участвует в формировании всех основных местных, а также некоторых системных проявлений воспаления. Он активирует эндотелиальные клетки, стимулирует ангиогенез, усиливает миграцию и активирует лейкоциты. TNF α в большей степени, чем IL-1 β , влияет на активацию и пролиферацию лимфоцитов. При этом TNF α выявляют в кровотоке раньше других провоспалительных цитокинов — уже через 20–30 минут после индукции воспаления, что связано со «сбрасыванием» клетками мембранной формы молекулы, а возможно также с выбросом TNF α в составе содержимого гранул. Таким образом, соответствующие изменения IL-1 β и TNF α свидетельствуют о снижении и нейтрализации воспаления, а также отсутствия факторов, вызывающих иммунный ответ. Провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β , TNF α , а также микроорганизмы активируют моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки, благодаря чему последние вырабатывают IL-8, главная функция которого состоит в обеспечении экстравазации нейтрофилов и их направленной миграции в очаг воспаления, характерного для эрозивно-язвенной и буллезной форм КПЛ. При этом IL-8 связан с поверхностью эндотелиальной клетки через глюкозаминогликаны. С эндотелием может связываться также IL-8, диффундирующий к сосудам из очага воспаления. Прикрепившись к базальной поверхности эндотелиоцита, IL-8 подвергается транцитозу и перемещается на апикальную поверхность клетки, обращенную в просвет сосуда. Градиент IL-8, формирующийся при его фиксации на межклеточном матриксе, обеспечивает выход нейтрофилов из сосудистого русла и миграцию этих клеток в очаг воспаления. В очаге воспаления IL-8 продолжает проявлять свою активность. Он активирует находящиеся там нейтрофилы, способствует дегрануляции клеток, стимулирует выработку мононуклеарами цитокинов. Таким образом, соответствующие изменения IL8 также свидетельствуют о снижении и нейтрализации воспаления и отсутствии факторов, вызывающих иммунный ответ. Рецепторы для IFN γ экспрессируют практически все популяции лейкоцитов, а также эндотелиальные, эпителиальные и некоторые другие клетки.

Основные мишени действия IFN γ — моноциты и макрофаги. При помощи IFN γ Th1-клетки активируют макрофаги. Это приводит к активации экспрессии макрофагами некоторых ферментов, в том числе ответственных за формирование активных форм кислорода и, что особенно важно, за экспрессию индуцибельной NO-синтазы и образование NO. Комплекс радикалов кислорода и нитрита натрия

необходим для внутриклеточного киллинга наиболее резистентных микроорганизмов, таких как микобактерии. Эти события определяют роль IFN γ в реализации клеточного иммунного ответа воспалительного типа, то есть функция этого цитокина проявляется в большей степени в рамках адаптивного иммунитета. Уровень интерферона гамма также активно снижался на всех сроках наблюдения. Данные изменения IFN γ свидетельствуют о снижении цитотоксических CD8 $^{+}$ Т-клетки и Th1-клетки и, как следствие, об отсутствии факторов, вызывающих иммунный ответ при КПЛ, на фоне реализуемых терапевтических линий.

Подавляя активность макрофагов и синтез ими IL-1 β , TNF α , IL-6 и других провоспалительных цитокинов, IL-4 выступает в роли противовоспалительного цитокина. Кроме того, IL-4 – единственный цитокин, способный индуцировать дифференцировку Th2-клеток. Действуя на CD8 $^{+}$ Т-клетки, он индуцирует развитие цитотоксических Т-лимфоцитов, секретирующих IL-4 и другие Th2-цитокины. В настоящем исследовании было показано, что значения концентрации IL-4 в ротовой жидкости до лечения составляла в среднем $10,1 \pm 1,3$ пг/мл, при этом она клинически значимо повышалась до 14 дня терапии. Спустя 21 день наблюдения концентрация IL-4 снизилась до $9,3 \pm 0,3$ пг/мл. Выявленное повышение IL-4 сопоставимо со снижением значений до 14 дня исследуемых провоспалительных цитокинов, так как именно их повышенные концентрации и стимулировали (в том числе) активную выработку IL-4. В то же время повышение концентрации IL-4 способствовало снижению концентраций исследуемых провоспалительных цитокинов, так как он подавляет активность макрофагов и синтез данных цитокинов.

Установлено достоверное повышение у больных КПЛ содержание в слюне IgM ($0,15 \pm 0,01$ МЕ/мл), который постепенно увеличивался во всех группах наблюдения вплоть до 14 дня, что свидетельствовало о напряжении противоинфекционной защиты и развитии воспалительного процесса. Последнее подтверждалось снижением в слюне уровня sIgA. Только через две недели концентрация IgM перестала расти, отмечалась положительная динамика в снижении данного показателя (соответственно увеличивалась и концентрация sIgA).

Таким образом, показанные механизмы действия L-аргинина в составе аквакомплекса титана глицеросолята (Тизоль) на воспалительный процесс характеризует эффективный терапевтический результат. Тизоль способствует точной доставке L-аргинина в неизменном виде в очаг воспаления [8]. Далее под действием NO-синтазы происходит синтез NO из L-аргинина. Промежуточным первичным продуктом при превращении L-аргинина является N-гидрокси-L-аргинин. Далее N-гидрокси-L-аргинин под воздействием супероксиданиона продолжает метаболизироваться, генерируя при этом оксид азота. При этом основным индуктором индуцибельной NO-синтазы (iNOS) является IFN γ , а активатором – тетрагидроптерин, который в свою очередь активируется TNF α . Оптимальное условие индукции iNOS – сочетанное действие IFN γ и TNF α . В то же время увеличение концентрации L-аргинина в тканях, способствует увеличению концентрации NO-синтазы, которая помимо того, что обеспечивает синтез NO, также контролирует биосинтез интерлейкинов IL-4, IL-11,

IL-13, которые относятся к ингибиторам воспалительной реакции.

Полученные иммунологические данные подтверждают клиническую эффективность медикаментозной терапии при лечении больных эрозивно-язвенной формой КПЛ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высокоэффективные технологии в медицине. Тизоль: Сборник материалов межобластной научно-практической конференции. – Екатеринбург, ГОУ ВПО УГМА Росздздрава, 2001–80 с.
Vysokoeffektivnye tehnologii v medicene. Tizol': Sbornik materialov mezhoblastnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. – Ekaterinburg, GOU VPO UGMA Roszdzdrava, 2001–80 s.
2. Гилева О. С., Кошкин С. В., Либик Т. В., Городилова Е. А., Халаявина И. Н. Пародонтологические аспекты заболеваний слизистой оболочки полости рта: красный плоский лишай // Пародонтология. 2017. Т. 22. № 3. С. 9–14.
Gileva O. S., Koshkin S. V., Libik T. V., Gorodilova E. A., Haljavina I. N. Parodontologicheskie aspekty zabolevanij slizistoj obolochki polosti rta: krasnyj ploskij lishaj // Parodontologija. 2017. T. 22. № 3. S. 9–14.
3. Дмитриева Л. А. Терапевтическая стоматология. Национальное руководство. – М.: Гэотар-Медиа, 2009. — с. 894.
Dmitrieva L. A. Terapevticheskaja stomatologija. Nacional'noe rukovodstvo. – M.: GEOTAR-Media, 2009. — S. 894.
4. Дмитриева Л. А., Глыбина Н. А., Глыбина Т. А., Бабаниязов Х. Х., Ларионов Е. В., Туманов В. П., Ружицкая Е. А. Экспериментальное обоснование использования нового антиоксидантного препарата при лечении эрозивно-язвенных поражений // Пародонтология. 2012. Т. 17. № 4. С. 52–58.
Dmitrieva L. A., Glybina N. A., Glybina T. A., Babanijazov H. H., Lari-onov E. V., Tumanov V. P., Ruzhickaja E. A. Eksperimental'noe obosnovanie ispol'zovanija novogo antioksidantnogo preparata pri lechenii erozivno-jazvennyh porazhenij // Parodontologija. 2012. T. 17. № 4. S. 52–58.
5. Иванова Е. В., Рабинович И. М., Тупицын Н. Н. Иммуноморфологическая характеристика плоского лишая слизистой оболочки рта // Стоматология. 2003. № 5. С. 23–27.
Ivanova E. V., Rabinovich I. M., Tupicyn N. H. Immunomorfologicheskaja harakteristika ploskogo lishaja slizistoj obolochki rta // Stomatologija. 2003. № 5. S. 23–27.
6. Македонова Ю. А., Федотова Ю. М., Фирсова И. В., Порожский С. В. Эффективность стоматологического лечения пациентов с красным плоским лишаем слизистой полости рта // Пародонтология. 2016. Т. 21. № 2 (79). С. 61–64.
Makedonova Ju. A., Fedotova Ju. M., Firsova I. V., Porojskij S. V. Effektivnost' stomatologicheskogo lechenija pacientov s krasnym ploskim lishaem slizistoj polosti rta // Parodontologija. 2016. T. 21. № 2 (79). S. 61–64.
7. Севбитов А. В., Невдах А. С., Платонова В. В. Новый подход к лечению травматогенных эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки полости рта у ортодонтических пациентов // Пародонтология. 2016. № 3. С. 12–14.
Sevbitov A. V., Nevdah A. S., Platonova V. V. Novyj podhod k lecheniju travmatogennyh erozivno-jazvennyh povrezhdenij slizistoj obolochki polosti rta u ortodonticheskix pacientov // Parodontologija. 2016. № 3. S. 12–14.
8. Смагина Т. А. Фармакотехнологические исследования комплексных препаратов с Тизолом / Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Новые технологии в медицине и фармации. Тизоль». – Екатеринбург, 2010.

• Полный список литературы находится в редакции.

Поступила 12.01.2018

Координаты для связи с авторами:
400005, г. Волгоград, ул. Герцена, д. 10
E-mail: mihai-m@yandex.ru