

УДК 615. 281 [6:539] – 022.532

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ФЕРМЕНТОВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С ПАРОДОНТИТАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Василиадис Р.А., Бельская Н.А., Вайнер Г.Б., Денисова С.Г., Бородулин В.Б.

*ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России,
Саратов, e-mail: Roman_yasiliadis@mail.ru*

В результате проведенного исследования обнаружены изменения активности, скорости ферментативной реакции и величины константы Михаэлиса для ферментов амилазы, щелочной фосфатазы (ЩФ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) ротовой жидкости у больных с пародонтитом различной степени тяжести. В исследованиях *in vitro* установлено снижение активности амилазы на фоне увеличения активности ферментов ЛДГ и ЩФ. Для диагностики степени воспалительного процесса предложено использовать соотношение активности, скорости ферментативной реакции и изменение величины константы Михаэлиса для ферментов ЛДГ/амилаза и ЩФ/амилаза. Соотношение ЛДГ/амилаза увеличивалось прямо пропорционально степени повреждения пародонта. Показатель ЩФ/амилаза также возрастал при сравнении результатов, полученных при интактном пародонте с результатами, наблюдаемыми при пародонтитах первой, второй и третьей степеней тяжести.

Ключевые слова: пародонтит, ротовая жидкость, амилаза, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа

CLINICAL AND DIAGNOSTIC EVALUATION OF ORAL FLUID ENZYMES IN PATIENTS WITH VARYING SEVERITY OF PERIODONTITIS

Vasiliadis R.A., Belskaya N.A., Vayner G.B., Denisova S.G., Borodulin V.B.

*State Education Institution of Higher Professional Education «Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky» of the Ministry of Healthcare of Russia,
Saratov, e-mail: Roman_yasiliadis@mail.ru*

As a result of the undertaken investigation we uncovered changes of activity and speed of enzymatic reaction and the value of Michaelis's constant for amylase enzymes, alkaline phosphatase (AP) and lactate dehydrogenase (LDH) of oral fluid in patients with varying severity of periodontitis. We defined the decreasing activity of amylase at the time of the increasing activity of LDH and AP enzymes *in vitro*. In order to diagnosticate the inflammatory process level we suggested using correlation of activity and speed of enzymatic reaction and change of the value of Michaelis's constant for LDH/ amylase and AP/ amylase enzymes. The LDH/amylase ratio was on the increase in proportion to the periodont's impairment degree. The same results were established for AP/ amylase ratio as compared their indexes (listed above), derived in the intact periodont with corresponding date in periodontitis of the first, second and third severity degree.

Keywords: periodontitis, oral fluid, amylase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase

Распространенность воспалительных заболеваний пародонта среди взрослого и детского населения Российской Федерации остается довольно высокой, несмотря на большое количество научных исследований и методов лечения [1, 2]. Одним из ведущих факторов в этиологии и патогенезе заболеваний пародонта является микробная флора полости рта. Согласно современным представлениям, бактериальная агрессия, являясь одним из инициальных факторов в развитии заболеваний пародонта, вызывает различные формы поражения пародонтального комплекса [3–5]. Полученные данные о роли анаэробной и смешанной бактериальной флоры в развитии заболеваний пародонта позволили выделить группу так называемых пародонтопатогенных бактерий. Ротовая жидкость содержит в своем составе различные биологически активные соедине-

ния – ферменты, пептиды, метаболиты, гормоны, иммуноглобулины [6–8]. Изменение состава ротовой жидкости происходит при развитии кариозного процесса, а также при гингивите и различных формах пародонтита, что сопровождается в свою очередь изменением активности ферментов ротовой жидкости. Оценка подобной активности с использованием биохимических методов поможет более точно оценить степень поражения пародонта и более полно мониторировать процесс лечения.

Материалы и методы исследования

Клинические методы исследования

Клинические данные регистрировали в разрабатываемые нами формализованные истории болезни. При клиническом осмотре отмечали зубную формулу, состояние слизистой оболочки полости рта, наличие некариозных поражений, мягкий зубной налет, над- и поддесневые зубные отложения, наличие или отсутствие аномалий зубов и прикуса.

Для объективной оценки гигиенического состояния полости рта и тканей пародонта в процессе наблюдения использовали следующий тест, пародонтальный индекс (ПИ).

Индекс ПИ необходим для выявления степени выраженности воспалительно-деструктивных изменений в тканях пародонта. Оценивают состояние пародонта у каждого зуба: 0 – нет воспаления, 1 – легкий гингивит, воспаление не окружает весь зуб, 2 – гингивит, воспаление полностью окружает зуб, но повреждения прикрепленного эпителия нет, 6 – гингивит с образованием патологического зубо-десневого кармана, прикрепленный эпителий поврежден, жевательная функция зуба не нарушена, зуб неподвижен, 8 – выраженная деструкция тканей пародонта с потерей жевательной функции, зуб легко подвижен, может быть смещен.

Интерпретация индекса: 0,1–1,5 – начальная, I стадия пародонтита, 1,5–4,0 – II стадия, 4,0–8,0 – III стадия.

Определение активности ферментов в ротовой жидкости: щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и α -амилазы

Объектом исследования являлась нестимулированная ротовая жидкость, полученная путем сплевывания. Собранная ротовая жидкость в количестве 2 мл использовалась для определения активности и кинетических параметров ферментов – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и амилазы.

В работе использовали набор жидких реагентов, готовых к определению активности щелочной фосфатазы, ЛДГ и α -амилазы в ротовой жидкости. Производитель ЗАО «Диакон».

Данная часть исследования проводилась с помощью готового набора химических реагентов и биохимического анализатора «Hospitex», Швейцария. Для получения разведений образцов ротовой жидкости использовали бидистиллированную воду.

Щелочную фосфатазу определяли по методу W. Kubler, 1973. Щелочная фосфатаза катализирует реакцию гидролиза нитрофенилфосфата с образованием эквимольного количества нитрофенола и фосфата. Скорость образования нитрофенола прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм.

Амилазу определяли по методу В.А. Ткачук и соавт., 2002. Использовали колориметрический ферментативный анализ. Субстратом является 4,6-этилен-нитрофенил-мальтогептозид. Метод основан на полной переработке всех нитрофенилолигомальтозидов – продуктов амилазной активности. Анализ дает суммарную амилазную активность (все изоферменты).

Активность лактатдегидрогеназы определяли по методу D. Weissar, 1975. Принципом определения активности лактатдегидрогеназы является ультрафиолетовый метод. Пируват превращается в лактат с одновременным окислением НАДН. Скорость уменьшения экстинкции при 340 нм, связанная с окислением НАДН, прямо пропорциональна активности ЛДГ в пробе.

Определение скорости и константы Михаэлиса – Ментен ферментативной реакции

Скорость реакции определяется как количество вещества, превращенного (образовавшегося или распавшегося) в единицу времени. Она является функцией концентраций участвующих в реакции веществ, которые непрерывно меняются по мере протекания реакции. Поэтому однозначное определение скоро-

сти реакции может быть дано только в случае если конечное изменение количества вещества в единицу времени заменить на дифференциальную разность, относящуюся к бесконечно малому времени dt . Количество превращенных веществ обычно выражают в виде изменения объемной концентрации с.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования обнаружены изменения активности ферментов (амилаза, ЩФ, ЛДГ) ротовой жидкости у пациентов с пародонтитом различной степени, в исследованиях *in vitro* установлено снижение активности амилазы на фоне увеличения активности ферментов ЛДГ и ЩФ (табл. 1, рис. 1).

При разработке прогностического коэффициента активности ЛДГ/амилаза и оценке его значения для диагностики пародонтита на различных его стадиях следует обратить внимание на то, что концентрация ионов водорода будет находиться в прямой зависимости от активности ЛДГ (в процессе метаболизма глюкозы происходит увеличение концентрации лактата в ротовой жидкости), в то время как активность амилазы слюны будет находиться в обратной зависимости от концентрации ионов водорода и снижается при уменьшении значений pH меньше 6,8. Анализ проведенных исследований показал, что в контроле (при интактном пародонте) данный показатель составляет 2,83 безразмерных единиц, на I стадии пародонтита индекс составил 3,30 безразмерных единиц, на 2 стадии пародонтита – 4,85 и на 3 стадии пародонтита 6,10 безразмерных единиц активности. Увеличение индекса активности ЛДГ/амилаза для пародонтита 3 степени по сравнению с показателем интактного пародонта происходит в 2,2 раза.

Кроме показателя ЛДГ/амилаза можно использовать и показатель ЩФ/амилаза, так как активность ЩФ будет в большей степени определяться количеством бактериальных клеток в ротовой жидкости и, следовательно, процессы закисления среды также будут обратно пропорционально коррелировать с активностью амилазы слюны. Анализ проведенных исследований показал, что в контроле (при интактном пародонте) данный показатель составляет 0,32 безразмерных единиц, на I стадии пародонтита индекс составил 0,38 безразмерных единиц, на 2 стадии пародонтита – 0,52 и на 3 стадии пародонтита – 0,66 безразмерных единиц активности.

Увеличение индекса активности ЩФ/амилаза для пародонтита 3 степени по сравнению с показателем интактного пародонта происходит в 2 раза.

Таблица 1

Изменение активности ферментов ротовой жидкости у пациентов с интактным пародонтом и при пародонтитах различной степени тяжести (*in vitro*) (ЕД/л)

	Амилаза М ± m	ЛДГ М ± m	ЩФ М ± m
Интактный пародонт	68 ± 2,3	193,0 ± 7,3	22 ± 1,3
Пародонтит 1 степени	63 ± 3,1	207,2 ± 8,2 *	24 ± 1,2
Пародонтит 2 степени	48 ± 3,5**	233,0 ± 8,8**	25 ± 1,7*
Пародонтит 3 степени	41 ± 2,0**	250,6 ± 11,6**	27 ± 1,2**

Пр и м е ч а н и е . * – достоверность при сравнении активности ферментов ротовой жидкости у пациентов с интактным пародонтом в сравнении с активностью ферментов при пародонтитах различной степени тяжести $p > 0,05$; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

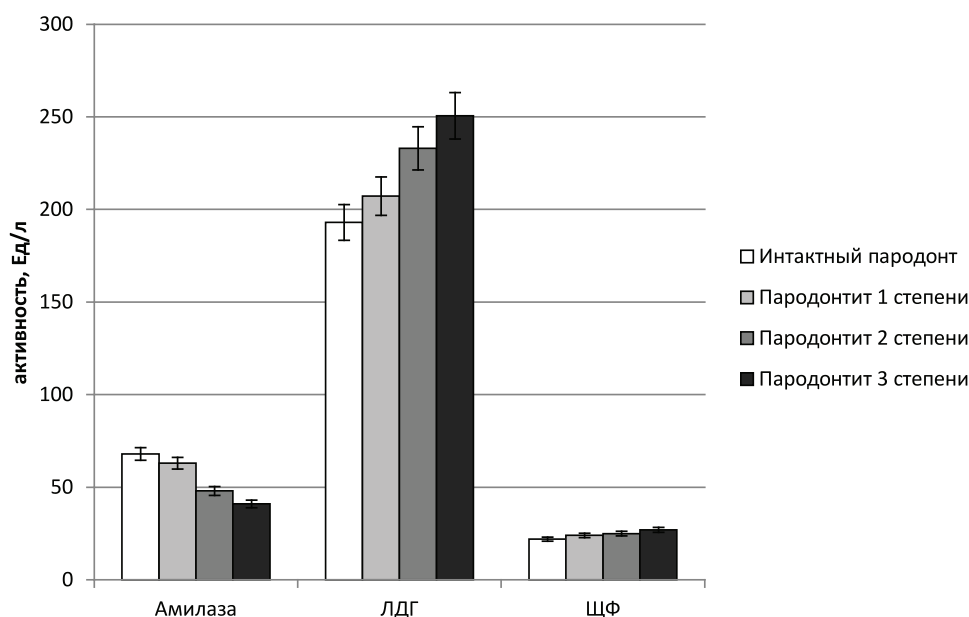


Рис. 1. Изменение активности ферментов ротовой жидкости у пациентов с интактным пародонтом в сравнении с активностью ферментов при пародонтитах различной степени тяжести (*in vitro*)

Таким образом, для диагностики степени воспалительного процесса можно использовать соотношение активности ферментов ЛДГ и амилазы, а также ЩФ и амилазы.

Анализ проведенных исследований показал, что в контроле (при интактном пародонте) показатель скорости биохимической реакции для индекса ЛДГ/амилаза составляет 2,2 безразмерных единиц, на 1 стадии пародонтита индекс составил 3,40 безразмерных единиц, на 2 стадии пародонтита – 5,3 и на 3 стадии пародонтита 7,0 безразмерных единиц активности. Увеличение индекса скорости биохимической реакции ЛДГ/амилаза для пародонтита 3 степени по сравнению с показателем интактного пародонта происходит в 3 раза.

Кроме показателя ЛДГ/амилаза можно использовать и показатель ЩФ/амилаза, так как активность ЩФ будет в большей степени

определяться количеством бактериальных клеток в ротовой жидкости и, следовательно, процессы закисления среды также будут обратно пропорционально коррелировать с активностью амилазы слюны. Анализ проведенных исследований показал, что в контроле (при интактном пародонте) данный показатель составляет 1,3 безразмерных единиц, на 1 стадии пародонтита индекс составил 2,7 безразмерных единиц, на 2 стадии пародонтита – 4,0 и на 3 стадии пародонтита 5,0 безразмерных единиц активности.

Увеличение индекса скорости биохимической реакции ЩФ/амилаза для пародонтита 3 степени по сравнению с показателем интактного пародонта происходит в 4 раза.

Таким образом, для диагностики степени воспалительного процесса можно использовать соотношение скоростей реакций ферментов ЛДГ и амилазы, а также ЩФ и амилазы.

Таблица 2

Изменение скорости биохимической реакции ферментов ротовой жидкости с интактным пародонтом и пародонтитом различной степени тяжести *in vitro* (М/л·с)

	Амилаза М ± m	ЛДГ М ± m	ЩФ М ± m
Интактный пародонт	24 ± 2,2	53 ± 4,5	32 ± 2,4
Пародонтит 1 степени	22 ± 1,2	74 ± 6,5**	58 ± 3,3**
Пародонтит 2 степени	18 ± 1,4*	96 ± 5,4**	74 ± 5,4**
Пародонтит 3 степени	16 ± 1,1**	110 ± 7,3**	81 ± 4,2**

Примечание. * – достоверность при сравнении скорости реакции ферментов ротовой жидкости у больных с кариесом $p > 0,05$; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

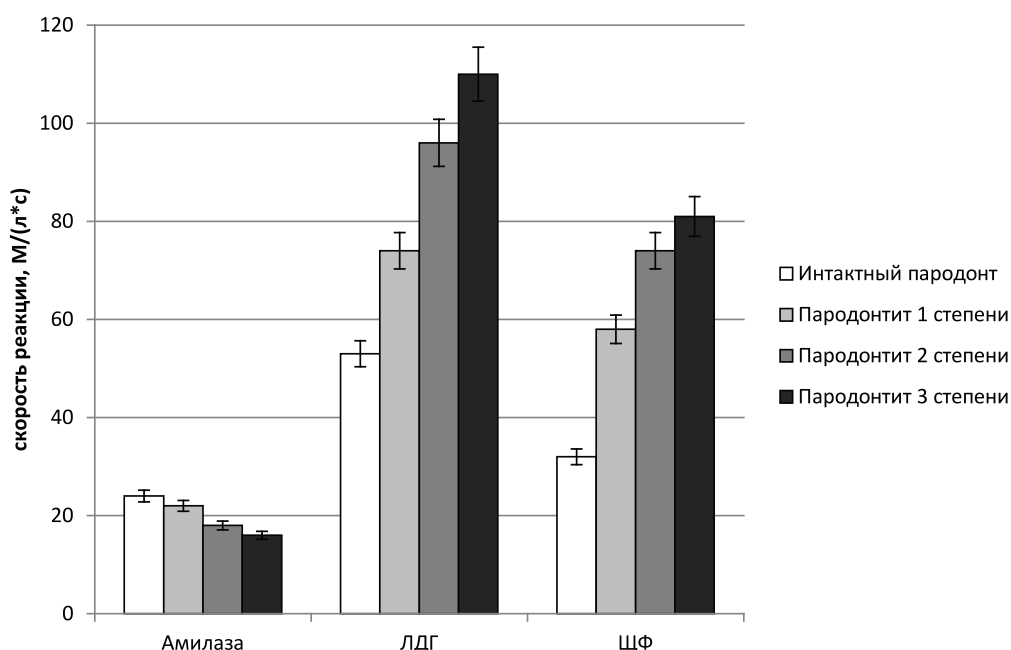


Рис. 2. Изменение скорости биохимической реакции ферментов ротовой жидкости у пациентов с интактным пародонтом в сравнении со скоростью ферментов при пародонтитах различной степени тяжести (*in vitro*)

Проведенные исследования показали, что в контроле (при интактном пародонте) показатель – константа Михаэлиса – составляет 0,24 безразмерных единиц, на 1 стадии пародонтита индекс составил 0,30 безразмерных единиц, на 2 стадии пародонтита – 0,40 и на 3 стадии пародонтита 0,43 безразмерных единиц активности. Увеличение индекса для константы Михаэлиса ЛДГ/амилаза для пародонтита 3 степени по сравнению с показателем интактного пародонта происходит в 2 раза.

Кроме показателя ЛДГ/амилаза можно использовать и показатель ЩФ/амилаза, так как активность ЩФ будет в большей степени определяться количеством бакте-

риальных клеток в ротовой жидкости и, следовательно, процессы закисления среды также будут обратно пропорционально коррелировать с активностью амилазы слюны. Анализ проведенных исследований показал, что в контроле (при интактном пародонте) данный показатель составляет 0,46 безразмерных единиц, на 1 стадии пародонтита индекс составил 0,52 безразмерных единиц, на 2 стадии пародонтита – 0,72 и на 3 стадии пародонтита 0,88 безразмерных единиц активности.

Увеличение индекса для константы Михаэлиса ЩФ/амилаза для пародонтита 3 степени по сравнению с показателем интактного пародонта происходит примерно в 2 раза.

Таблица 3

Изменение константы Михаэлиса (K_m) ферментов ротовой жидкости с интактным пародонтом и у больных пародонтитом с различной степенью тяжести *in vitro* ($\cdot 10^{-3}$ М)

	Амилаза М ± m	ЛДГ М ± m	ЩФ М ± m
Интактный пародонт	5,8 ± 0,2	1,4 ± 0,04	2,7 ± 0,03
Пародонтит 1 степени	6,1 ± 0,1	1,8 ± 0,03*	3,2 ± 0,02*
Пародонтит 2 степени	6,5 ± 0,3*	2,6 ± 0,04**	4,8 ± 0,03**
Пародонтит 3 степени	6,7 ± 0,4**	2,9 ± 0,05**	5,9 ± 0,05**

Примечание. * – достоверность при сравнении скорости реакции ферментов ротовой жидкости у больных с кариесом $p > 0,05$; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

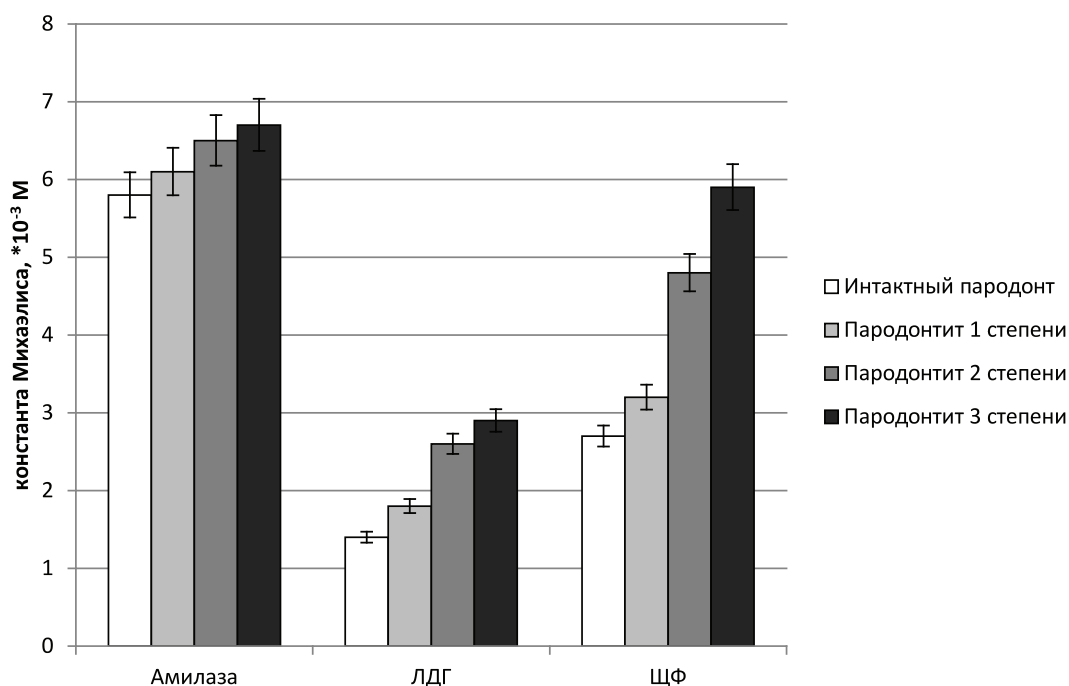


Рис. 3. Изменение константы Михаэлиса ферментов ротовой жидкости у пациентов с интактным пародонтом в сравнении с константой Михаэлиса ферментов при пародонтитах различной степени тяжести (*in vitro*)

Заключение

В исследованиях *in vitro* установлено снижение активности амилазы на фоне увеличения активности ферментов ЛДГ и ЩФ. Для диагностики степени воспалительного процесса предложено использовать соотношение активности, скорости ферментативной реакции и изменение величины константы Михаэлиса для ферментов ЛДГ\амилаза и ЩФ\амилаза. Использование индексов ферментов в диагностике стадий пародонтита позволит более точно прогнозировать развитие патологического процесса в пародонте и назначить своевременное лечение этого заболевания.

Список литературы

1. Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение / А.С. Григорьян, А.И. Грудянов, Н.А. Рабухина, О.А. Фролова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 320.: ил.
2. Современные аспекты клинической пародонтологии / под ред. Л.А. Дмитриевой. – М.: МЕДпресс, 2001. – 128 с.
3. Дунызина Т.М., Калинина Н.М., Никифорова И.Д. Современные методы диагностики заболеваний пародонта / Т.М. Дунызина, Н.М. Калинина, И.Д. Никифорова. – СПб. институт стоматологии, 2001. – 47 с.
4. Житков М.Ю., Леонтьев В.К. Возможные механизмы иммобилизации щелочной фосфатазы и α -амилазы на эмали зубов / М.Ю. Житков, В.К. Леонтьев // Стоматология. – 1997. – № 6. – С. 9–12.
5. Гильминов Э.М. Стоматологический и соматический статус организма в показателях метаболизма рото-

вой полости: автореф. дис. ... д-ра мед.наук. – Самара, 2002. – 45 с.

6. Григорьев И.В., Николаева Л.В., Артамонов И.Д. Белковый состав слюны человека на фоне различных психоэмоциональных состояний / И.В. Григорьев, Л.В. Николаева, И.Д. Артамонов // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 4. – С. 501–503.

7. Кунин А.А., Ипполитов Ю.А., Лепехина Л.И., Быков Э.Г. Клиническая гистохимия барьерной функции слизистой оболочки десны при пародонтите / А.А. Кунин, Ю.А. Ипполитов, Л.И. Лепехина, Э.Г. Быков // Стоматология. – 2001. – № 80 (1). – С. 13–16.

8. Лебедев К.А., Максимовский Ю.М., Митронин А.В., Понякина И.Д. Новое понимание патогенеза болезней пародонта в свете работ о роли образзраспознающих рецепторов. Аналитический обзор литературы / К.А. Лебедев, Ю.М. Максимовский, А.В. Митронин, И.Д. Понякина // Стоматология для всех. – 2006. – № 2. – С. 24–29.

References

1. Bolezni parodonta. Patogeneza, diagnostika, lečenje / A.S. Grigor'jan, A.I. Grudjanov, N.A. Rabuhina, O.A. Frolova. M.: Medicinskoje informacionnoje agestvo, 2004. 320.

2. Sovremennye aspekty klinicheskoj parodontologii / Pod red. L.A. Dmitrijevoj. M.: MEDpress, 2001. 128 p.

3. Dunjazina T.M., Kalinina N.M., Nikiforova I.D. Sovremennye metody diagnostiki zabolevanij parodonta / T.M. Dunjazina, N.M. Kalinina, I.D. Nikiforova. SPb. institut stomatologii, 2001. 47 p.

4. Zhitkov M.Ju., Leont'ev V.K. Vozmozhnye mehanizmy immobilizacii shhelochnoj fosfatazy i α amilazy na jemali zubov / M.Ju. Zhitkov, V.K. Leont'ev // Stomatologija. 1997. no. 6. pp. 9–12.

5. Gil'minov Je.M. Stomatologičeskij i somatičeskij status organizma v pokazateljah metabolizma rotovoj polosti / Je.M. Gil'minov: Avtoref. dis...d-ra med.nauk. Samara, 2002. 45 p.

6. Grigor'ev I.V., Nikolaeva L.V., Artamonov I.D. Belkovyj sostav sljunny cheloveka na fone razlichnyh psihojemocial'nyh sostojanij / I.V. Grigor'ev, L.V. Nikolaeva, I.D. Artamonov // Biohimija. 2003. T. 68, no. 4. pp. 501–503.

7. Kunin A.A., Ippolitov Ju.A., Lephina L.I., Bykov Je.G. Kliničeskaja gistohimija bar'ernoj funkcii slizistoj obolochki desny pri parodontite / A.A. Kunin, Ju.A. Ippolitov, L.I. Lephina, Je.G. Bykov // Stomatologija. 2001. no. 80 (1). pp. 13–16.

8. Lebedev K.A., Maksimovskij Ju.M., Mitronin A.V., Ponjakina I.D. Novoe ponimanie patogeneza boleznej parodonta v svete rabot o roli obrazzraspoznajushhih receptorov. Analitičeskij obzor literatury / K.A. Lebedev, Ju.M. Maksimovskij, A.V. Mitronin, I.D. Ponjakina // Stomatologija dlja vseh. 2006. no. 2. pp. 24–29.

Рецензенты:

Гладилин Г.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФПК и ППС, ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Саратов;

Коршунов Г.В., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований ГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 24.11.2014.