

УДК 16.153.96:57.083.3

DOI: 10.14427/jipai.2021.4.14

## Секреторные абзимные IgA, ферменты и ДНК ротовой жидкости при хроническом периодонтите

О.Л. Коротина, И.И. Генералов

Витебский государственный медицинский университет

## Secretory abzyme IgA, enzymes and DNA of oral fluid in chronic periodontitis

O.L. Korotina, I.I. Generalov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

В настоящей работе изучалась абзимная активность иммуноглобулинов класса А и активность соответствующих энзимов полости рта (ротовой жидкости) при хроническом периодонтите. Контрольную группу составили практически здоровые лица. Исследовались различные виды протеолитической, оксидоредуктазной и нуклеазной активности, дополнительно определяли концентрацию ДНК в ротовой жидкости.

Методом аффинной хроматографии на матрице с поликлональными антителами против IgA человека из ротовой жидкости выделяли фракцию иммуноглобулинов класса А. Эластазную, протеолитическую, катепсиноподобную и амидазную активности исследовали фотометрическими методами. ДНКазную активность определяли по риваноловому сгустку ДНК. Концентрации свободной ДНК в ротовой жидкости оценивали при помощи флюориметрического теста с красителем PicoGreen.

Установлено, что отдельные виды абзимной активности IgA ротовой жидкости и ее ферментов высокозначимо ( $p < 0,01-0,001$ ) увеличиваются при обострении хронического периодонтита в сравнении со значениями контрольной группы. К данным видам следует отнести эластазную, пероксидазную, катепсиноподобную и каталазную активность ротовой жидкости. Развитие хронического периодонтита также сопровождается существенным ( $p < 0,001$ ) повышением количества ДНК в ротовой жидкости пациентов. Для диагностики хронического периодонтита ROC-анализ исследованных лабораторных маркеров выявил высокую диагностическую значимость теста определения эластазы ротовой жидкости (специфичность теста 0,97; чувствительность теста 0,85).

### Ключевые слова

Ротовая жидкость, слюна, ферментативная активность, IgA, абзим, эластаза, пероксидаза, каталаза, катепсин, ДНКаз.

### Summary

Catalytic abzyme activity of IgA and corresponding enzymes of oral fluid in patients with chronic periodontitis was studied. The individuals with healthy state of oral cavity were used as controls. Various kinds of proteolytic, oxidoreductase, and DNase activity were investigated; the concentration of oral fluid DNA was evaluated as well.

IgA fractions were isolated from the oral fluids by affinity chromatography on a matrix with polyclonal antibodies against human IgA, Elastase, proteolytic, cathepsin-like and amidase activities were investigated by colorimetric methods. DNase activity was assessed by the rivanol clot test. DNA concentrations in the oral fluid were determined by fluorimetric DNA test with PicoGreen fluorochrome.

It has been established that certain kinds of IgA abzyme activities and oral fluid enzymes become substantially elevated following the exacerbations of chronic periodontitis in comparison with healthy controls ( $p < 0.01-0.001$ ). It refers to elastase, peroxidase, cathepsin, and catalase activity of oral cavity. The progression of chronic periodontitis is also characterized by high levels of patients' DNA contents in oral fluid ( $p < 0.001$ ). For the diagnosis of chronic periodontitis the ROC-analysis of examined laboratory markers found the maximum diagnostic value of oral elastase testing (specificity of the test – 0,97; sensitivity – 0,85).

### Keywords

Oral fluid, saliva, enzymatic activity, IgA, abzyme, elastase, peroxidase, catalase, cathepsin, DNase.

## Введение

Хронический периодонтит (ХП) является широко распространенным заболеванием человека, которое характеризуется потерей костной ткани вокруг зубов, становясь ведущей причиной вторичной адентии [1, 2]. Он поражает более 30% взрослого населения. В процесс деструкции вовлекаются все поддерживающие ткани зуба (периодонтальная связка, костная ткань альвеолы, цемент корня и др.) При этом происходит деградация коллагена, резорбция альвеолярной кости с последующей утратой зуба.

Ответная иммуновоспалительная реакция также может приводить к деструкции периодонтальных тканей. В очаг воспаления из поврежденных сосудов проникают макрофаги и нейтрофилы. Их активация способствует высвобождению окислительно-восстановительных и гидролитических энзимов, провоспалительных цитокинов свободных радикалов, дефензинов. При несостоятельности фагоцитоза ДНК и энзимы гранул выделяются из лейкоцитов с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек, локализующиеся в зубодесневом кармане. Энзимы нейтрофилов и макрофагов (эластаза нейтрофилов, NADPH-оксидаза, миелопероксидаза, катепсины, матриксные металлопротеазы, лизоцим, гиалуронидаза, лактоферрин и другие) длительное время сохраняются в тканях и вызывают их дополнительное повреждение.

С другой стороны, многие составляющие ротовой жидкости (РЖ) реализуют защитную функцию – связывают и нейтрализуют факторы микробной агрессии. К ним относятся короткоцепочечные антимикробные пептиды – гистатины, цистатины, муцины и гликопротеины, ферменты мурамидаза и пероксидаза слюны и мн. др. Особое место во врожденном и приобретенном иммунитете ротовой полости занимает секреторный иммуноглобулин класса А. Он продуцируется плазматическими клетками, локализованными, главным образом, в строме желез ротовой полости [3]. Существуют единичные работы, указывающие, что секреторные IgA могут проявлять собственную ферментативную (или абзимную) активность в отношении различных субстратов, при этом каталитическая активность IgA существенно превышает абзимную активность IgG [4]. Тем не менее, при болезнях полости рта, в том числе – при хроническом периодонтите, каталитические IgA остаются совершенно неизученными, несмотря на высокую вероятность их участия в развитии данной патологии.

Использование клинических индексов [1], включающих состояние десны, глубину периодонтальных карманов, наличие зубного камня и т.д., наряду с данными рентгенологического обследования составляет основу клинической диагностики хронического периодонтита.

Тем не менее, по-прежнему существует необходимость объективизации диагноза ХП при помощи методов лабораторного анализа состояния ротовой полости. В многочисленных исследованиях [5, 6, 7, 8] изучались самые различные маркеры, присутствующие в ротовой жидкости и/или зубодесневом кармане, содержание которых отражает тяжесть воспаления и деструктивных процессов при ХП. К ним относят факторы специфического и неспецифического иммунитета, ферменты ротовой жидкости, разнообразные клеточные элементы, реагирующие на воспаление и повреждение. Однако единых критериев лабораторного подтверждения диагноза хронического периодонтита, его обострения или прогрессирования до настоящего времени не выработано.

Целью нашего исследования явилось определение содержания ДНК и различных видов ферментативной и абзимной активности IgA ротовой жидкости с установлением их диагностической значимости при хроническом периодонтите.

В ходе исследования предполагалось также, что будут разработаны быстрые и доступные лабораторные методы, позволяющие проводить диагностику непосредственно в ходе клинического обследования пациентов («on-chair» или «point-of-care» тесты, [9]).

## Материалы и методы

Материал для исследования – образцы ротовой жидкости 92 пациентов УЗ «Витебская областная стоматологическая поликлиника», у которых был установлен диагноз «хронический маргинальный периодонтит». В качестве контроля обследовалась группа лиц, не имеющих патологии периодонта по данным клинического обследования (n=31).

Этапы обработки образцов РЖ заключались в следующем:

1. забор исследуемого материала натошак без стимуляции, чистки зубов и полоскания;
2. удаление детрита и клеточного дебриса центрифугированием и фильтрованием через бактериальные фильтры;
3. хранение при -20°C до постановки ферментативных реакций.

Часть материала после обработки использовали для выделения секреторных IgA.

Выделение проводили на сорбенте с антителами (АТ) против общих IgA человека (анти-IgA сефароза, Sigma, США). Полученные пробы диализовали, Содержание IgA оценивали фотометрией с максимумом поглощения белка при 280 нм.

Гомогенность выделенных препаратов IgA оценивали гель-электрофорезом по Laemmli с концентрацией акриламида 10%-12% в диссоциирующей системе в присутствии додецилсульфата натрия с окраской Кумасси R250 [10].

Концентрацию ДНК РЖ определяли по реакции с высокочувствительным флуорохромом PicoGreen (Invitrogen, США, [11]).

Все виды определения ферментативной активности выполняли в планшетах [10]. Для оценки протеолитической активности нейтрофильной эластазы, БАПНА-амидазы, а также катепсинов G, B и C использовали микромодификации методов их определения, изложенные в работах [12, 13, 14]. Каталазную и пероксидазную активность определяли, как описано ранее [10].

Реакции учитывали фотометрически (фотометре Ф300, ОАО «Витязь», Республика Беларусь). Измерения проводили при 405 нм и 620 нм для всех реакций, кроме пероксидазной. Пероксидазную активность измеряли на 450 и 620 нм. Полученные результаты оценивали в единицах активности (Ед), эквивалентных значениям оптической плотности [10].

Результаты определения ДНКазной активности методом риванольного сгусткообразования [15] выражали в условных единицах по балльной шкале (от 0 до 5 баллов, где 0 – это отсутствие активности; 5 баллов – максимальная ДНКазная активность [15]).

Определение концентрации ДНК РЖ проводили в реакции с флуорохромом PicoGreen [11]. Для регистрации использовали светодиодную панель, включающую 8 светодиодов (465-470 нм). Результаты реакции в виде цифрового изображения обрабатывали в программе ImageJ (Fiji) версии 1.52i (НИН, США). Калибровочную кривую строили по тимусной ДНК телят (Sigma, США) и выражали в единицах концентрации (нг/мл ротовой жидкости). В качестве контрольного метода сравнения применяли спектрофлуориметрию комплексов «ДНК-PicoGreen» (флуориметр CM 2203, ЗАО «Солар»).

Анализ полученных результатов данных выполняли с помощью пакета для анализа статистических данных Statgraphics centurion XVII. Исходя из характера полученных распределений данных (Шapiro-Уилка критерий), значения выражали через их медиану и межквартильный размах (верхний

и нижний квартили). Для обнаружения статистических различий между двумя выборками применяли критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Анализ корреляций проводили методом Спирмена.

Для оценки операционных характеристик изученных показателей в диагностике хронического периодонтита проводили Receiver operating characteristic analysis (ROC-анализ) в программе MedCalc 12.7.0.0.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В таблице 1 представлены данные по абзимной активности IgA в ротовой жидкости при хроническом периодонтите. Соответствующие им результаты определения ферментативной активности ротовой жидкости приведены в таблице 2.

Учитывая существенные различия в абзимной и ферментативной активности РЖ пациентов и здоровых лиц, далее была проведена оценка диагностической значимости данных показателей для лабораторного подтверждения диагноза хронического периодонтита. С этой целью использовали ROC-анализ.

Результаты сравнения ROC-кривых для наиболее значимых лабораторных тестов приведены на рисунке 1.

Вышеприведенные данные указывают, что наибольшей диагностической эффективностью здесь обладают показатели, отражающие процессы активного воспаления и деструкции тканей при хроническом периодонтите. Здесь, в первую очередь, следует отметить эластазную, каталазную и пероксидазную активности РЖ, а также содержание свободной ДНК. Меньшую значимость имеют показатели абзимной активности. Предполагается, что это может быть связано с тем, что базальный уровень абзимной активности IgA (как компонента врожденного иммунитета) определяется и у здоровых лиц.

Тест определения эластазы РЖ при ХП обладает максимальной чувствительностью и специфичностью (84,6% и 96,7%; площадь под кривой ROC-анализа – 0,927,  $p < 0,001$ ). Исходя из установленных градаций, существующих для лабораторных методов [16], его можно отнести к максимально полезным диагностическим тестам. Время инкубации РЖ с субстратом – 2 часа, применяемый в методе субстрат Glp-Pro-Val-p-нитроанилид специфичен для гранулоцитарной эластазы; его активный распад подтверждает иммуновоспалительный характер поражения.

Тесты определения пероксидазы и каталазы обладают сопоставимыми операционными характе-

**Таблица 1. Уровни абзимной активности IgA в РЖ**

Абзимная активность IgA, Ед	Группа пациентов	Контроль	Уровень значимости различий между группами (p)
Эластаза	0,2 (0,078:0,53) n=78	0,07 (0,008:0,25) n=30	p<0,01
Пероксидаза	0,48 (0,09:1,09) n=83	0,055 (0,02:0,112) n=31	p<0,001
Каталаза	3,19 (1,1:9,71) n=83	4,5 (2,78:6,84) n=28	p=0,27
БАПНА-амидаза	0,007 (0:0,015) n=52	0,010 (0,007:0,014) n=30	p=0,17
Катепсин В	0,003 (0:0,014) n=43	0,006 (0:0,011) n=29	p=0,85
Катепсин G	0,01 (0,004:0,034) n=78	0,04 (0,013:0,095) n=29	p<0,01
ДНКаза (баллы)	1,0 (0,5:2,0) n=83	0,5 (0:0,75) n=31	p<0,01

Примечание: абзимной активности катепсина С в обеих группах обнаружено не было

**Таблица 2. Уровни каталитической активности ферментов ротовой жидкости**

Каталитическая активность РЖ, Ед	Группа пациентов	Контроль	Уровень значимости различий между группами (p)
Эластазная активность	0,45(0,18:0,91) n=78	0,018 (0:0,04) n=30	p<0,001
Пероксидазная активность	0,47 (0,171:0,88) n=84	0,051 (0,03:0,239) n=31	p<0,001
Каталазная активность	74,2 (55,42:92,70) n=81	13,35 (6,55:27,56) n=30	p<0,001
БАПНА-амидазная активность	0,245 (0,162:0,335) n=84	0,088 (0,054:0,198) n=29	p<0,001
Катепсин В	0,193 (0,119:0,404) n=79	0,048 (0,03:0,104) n=30	p<0,001
Катепсин G	0,265 (0,119:0,511) n=77	0,209 (0,118:0,31) n=30	p>0,05
Катепсин С	0,024 (0:0,51) n=47	0,021 (0,011:0,042) n=30	p>0,05
ДНКазная активность (баллы)	5,0 (3,0:5,0) n=82	4,0 (1,0:4,5) n=31	p<0,001
ДНК РЖ (нг/мл)	1550 (96,0:4565,3) n=75	2,99 (0,107:18,2) n=29	p<0,001

ристиками. Однако на их результаты могут влиять примеси крови в образцах ротовой жидкости.

К лабораторным экспресс-методам следует отнести определение свободной ДНК в РЖ. Методика проста в исполнении, время проведения реакции ДНК с красителем PicoGreen составляет 5 минут. Качественную оценку результатов можно проводить сразу после выполнения теста, используя ранее подготовленную цветовую шкалу. Тест обладает хорошей чувствительностью и

специфичностью (76,0% и 93,1%; площадь под ROC-кривой – 0,873, p<0,001). При отсутствии отдельного устройства для возбуждения флюоресценции (синие светодиоды с максимумом испускания 465-470 нм) его возможно заменить стоматологической светодиодной лампой, работающей в данном спектре. Это позволяет быстро оценивать единичные образцы РЖ. Тем самым данный метод представляется оптимальным кандидатом для «point-of-care» (или «on-chair»)

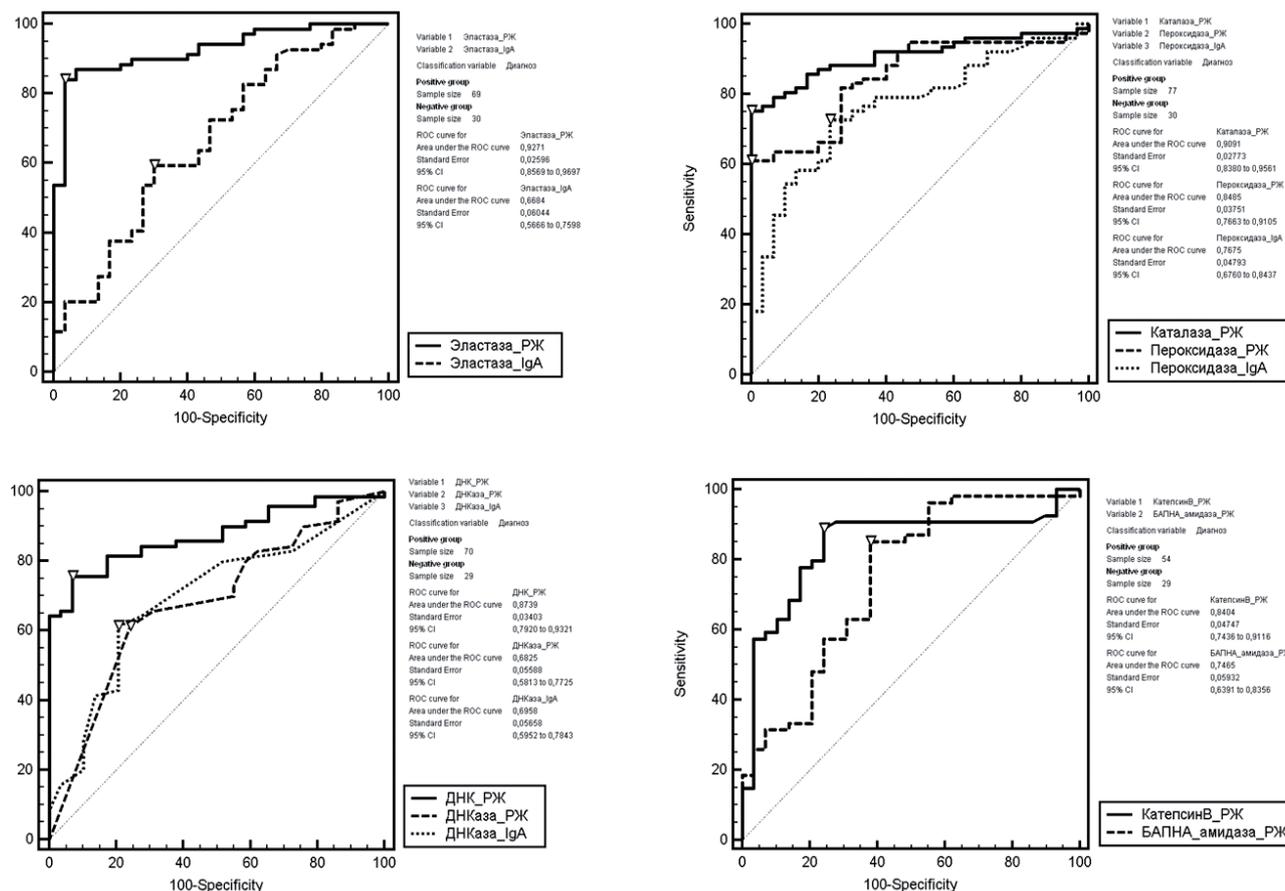


Рис. 1. Результаты ROC-анализа IgA-абзимов и ферментов ротовой жидкости при хроническом периодонтите

теста при лабораторном подтверждении диагноза хронического периодонтита. Хотя стоимость современных флуоресцентных ДНК-красителей является достаточно высокой, расход красителя PicoGreen в разработанном варианте метода минимален (0,5 мкл красителя в пробе).

Дополнительно было проведено исследование корреляций вышеуказанных признаков между собой, а также с другими параметрами, характеризующими хронический маргинальный периодонтит.

Результаты анализа оказались ожидаемыми в отношении взаимосвязей ферментов ротовой жидкости, в первую очередь, между собой, а также с абзимной каталитической активностью. Обострение периодонтита сопровождается усилением цитолиза с выходом многих ферментов из пораженных клеток, активацией нейтрофилов с их последующим разрушением или превращением в нейтрофильные внеклеточные ловушки, состоящие из ДНК и высокоактивных ферментов. Параллельно нарастает синтез гуморальных защитных факторов естественного иммунитета, включая такие энзимы, как пероксидаза ротовой жидкости.

Соответственно, нами установлены средней силы корреляционные связи между пероксидазой, ДНКазой и эластазой, а также активностью катепсина G ротовой жидкости (коэффициенты корреляции  $R > 0,3-0,4$  при  $p < 0,01-0,05$ ). Сходные взаимоотношения наблюдались между ДНКазой ротовой жидкости и активностью БАПНА-амидазы и катепсина G; содержание ДНК в ротовой жидкости коррелировало с уровнем эластазы ( $R = 0,35$ ;  $p < 0,01$ ). Эластазная активность РЖ, в свою очередь коррелировала с каталазной ( $R = 0,32$ ;  $p < 0,01$ ).

Корреляции между абзимной активностью и соответствующими ферментами ротовой жидкости были слабыми ( $R = 0,2-0,3$ ). Это может определяться различной природой и разными механизмами регуляции синтеза абзимных АТ и ферментов. Некоторые виды абзимной активности, различные по типу катализируемой реакции, коррелировали между собой, например пероксидазная и эластазная активность АТ ( $R = 0,58$ ;  $p < 0,001$ ). Отдельно следует отметить каталазную активность АТ. В отличие от других видов, она выказывала отрицательную взаимосвязь с другими абзимами и ферментами

цитолита (ДНКазой, эластазой, катепсином G;  $R = (-0,3-0,4)$  при  $p < 0,01$ ), и ее величины не отличались от значений здоровых лиц. Это косвенно свидетельствует об ассоциации каталазных АТ с нормальным состоянием ротовой полости.

Наконец, обнаружен ряд связей между отдельными видами активностей и стадиями периодонтита. В частности, положительные корреляции со стадией болезни обнаружены у эластазной активности РЖ, эластазной активности абзимов, ДНКазной и БАПНА-амидазной активности РЖ ( $R > 0,2-0,5$  при  $p < 0,001-0,05$ ). В свою очередь, отрицательная связь найдена для каталазной активности АТ ( $R = (-0,28)$ ;  $p < 0,01$ ). Эти результаты подтверждают вышеприведенные закономерности.

У пациентов с ХП уровень свободной ДНК ротовой полости слабо коррелировал с индексом КРУ ( $R = 0,27$ ;  $p < 0,05$ ), отражающими состояние ротовой полости.

Таким образом, исходя из всех полученных нами результатов, рассматриваемые показатели ферментативной активности, в первую очередь – нейтрофильная эластаза, пероксидаза, каталаза,

а также содержание ДНК в ротовой жидкости, являются объективными диагностическими маркерами, которые возможно использовать при необходимости лабораторного подтверждения диагноза хронического периодонтита у пациентов.

## Выводы

1. Установлен ряд лабораторных показателей ротовой жидкости, характерных для хронического периодонтита. К ним относятся свободная ДНК ротовой жидкости, а также оксидоредуктазная (пероксидазная, каталазная) и эластазная ферментативная и абзимная активность.
2. Максимальной диагностической эффективностью при ХП обладает тест определения нейтрофильной эластазы ротовой жидкости (специфичность теста – 96,7%; чувствительность – 85%). Ускоренным диагностическим тестом при данном заболевании является определение свободной ДНК ротовой жидкости (специфичность теста – 93,1%; чувствительность – 76%, время реакции ДНК с красителем – 5-10 минут).

## Литература

1. Дедова Л.Н. Диагностика болезней периодонта: учеб.-метод. пособие. Мн.: БГМУ, 2004: 70.
2. Horz H.-P. Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis. *Expert. Rev. Anti-Infect. Ther.* 2007, Vol.5, №4: 703-715.
3. Marcotte H., Lavoie M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 1998; Vol. 62, №1: 71-109.
4. Planque S., Mitsuda Yu., Taguchi H. et al. Characterization of gp120 hydrolysis by IgA antibodies from humans without HIV infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2007; Vol. 23, №12: 1541-1553.
5. González-Ramírez J., Serafin-Higuera N., Concepción Silva Mancilla M. et al. Use of biomarkers for the diagnosis of periodontitis, periodontal disease – diagnostic and adjunctive non-surgical considerations. Nermin Mohammed Ahmed Yussif, *Intech Open*. (March 25th 2019), DOI: 10.5772/intechopen.85394.
6. Gul S.S., Abdulkareem A.A., Sha A.M. et al. Diagnostic accuracy of oral fluids biomarker profile to determine the current and future status of periodontal and peri-implant diseases. *Diagnostics* 2020; Vol. 10, 838: 1-28. DOI:10.3390/diagnostics10100838.
7. Srivastava N., Naya P.A. Rana S. Point of care – a novel approach to periodontal diagnosis – a review. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017; Vol. 11, №8: 1-6ZE01-ZE06. DOI: 10.7860/JCDR/2017/26626.10411
8. Zia A. Oral biomarkers in the diagnosis and progression of periodontal diseases. *Biology and Medicine*. 2011, Vol. 3, №2: 45-52.
9. Leppilahti J.M. Oral rinse MMP-8 point-of-care immuno test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden. *Oral Diseases*. 2011, Vol. 17: 115-122.
10. Генералов И.И., Коротина О.Л., Жерулик С.В. Методы определения и виды каталитической активности поликлональных иммуноглобулинов класса А. *Иммунопатол., аллергол, инфектол.* 2015; № 1: 6-17.
11. Dragan A.I. Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding. *Biophys. J.* 2010, Vol. 99: 3010-3019.
12. Elkaim R. P. gingivalis regulates the expression of cathepsin B and cystatin C. *J. Dent. Res.* 2008, Vol. 87, №10: 932-936.
13. Horn M. Arginine-based structures are specific inhibitors of cathepsin C. Application of peptide combinatorial libraries. *Eur. J. Biochem.* 2000, Vol. 267: 3330-3336.
14. Nakajima K. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha1-protease inhibitor reactive site. *J. Biol. Chem.* 1979; Vol. 254, №10: 4027-4032.
15. Kundzer A.V. Deoxyribonuclease activity of polyclonal IgGs: a putative serological marker in patients with spondyloarthritides. *Immunol. Res.* 2013; Vol. 56, №1: 383-392.
16. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний. М.: Изд. ЗАО «Биохиммак». 2006, 74 с.

## Сведения об авторах

Коротина Ольга Львовна – ассистент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». E-mail: korol-med@mail.ru.

Генералов Игорь Иванович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». E-mail: g2@tut.by.

Поступила 23.11.2021 г.