

Осипова Ю.Л.<sup>1</sup>, Акимова С.А.<sup>1</sup>, Булкина Н.В.<sup>1</sup>, Николаев А.И.<sup>2</sup>УДК 616.314-089.28  
DOI 10.25694/URMJ.2020.10.40

## Взаимосвязь показателей клеточной пролиферации, апоптоза тканей пародонта и цитокинового дисбаланса десневой жидкости у больных быстро прогрессирующим пародонтитом

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО Смоленская государственная академия Минздрава России, г. Смоленск

Osipova Yu.L., Akimova S.A., Bulkina N.V., Nikolaev A.I.

### Interrelation of indicators of cell proliferation, apoptosis of periodontal tissues and cytokine imbalance of gingival fluid in patients with rapidly progressive periodontitis

#### Резюме

В настоящее время наблюдается неуклонный рост частоты встречаемости агрессивных форм пародонтита, в том числе и быстро прогрессирующего пародонтита, характерного для пациентов 18-35 лет. Цель исследования состояла в изучении влияния цитокинового дисбаланса десневой жидкости на процессы клеточного обновления в пародонте. В исследовании приняли участие 20 добровольцев с интактным пародонтом, 35 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП); 35 пациентов с быстро прогрессирующим пародонтитом (БПП). При помощи твердофазного иммуноферментного анализа определены концентрации ключевых цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 в десневой жидкости. На основании иммуногистохимического исследования биоптатов десны получены показатели индекса пролиферации (IKi-67) и индекса апоптоза (Ip53). Итогом данного исследования установлен характер взаимосвязей между цитокиновым профилем содержимого пародонтальных карманов, показателями клеточного обновления и клиническим течением быстро прогрессирующего пародонтита

**Ключевые слова:** быстро прогрессирующий пародонтит, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, пролиферация, апоптоз, IKi-67, Ip53

**Для цитирования:** Осипова Ю.Л., Акимова С.А., Булкина Н.В., Николаев А.И., Взаимосвязь показателей клеточной пролиферации, апоптоза тканей пародонта и цитокинового дисбаланса десневой жидкости у больных быстро прогрессирующим пародонтитом, Уральский медицинский журнал, №10 (193) 2020, с. 69 - 72, DOI 10.25694/URMJ.2020.10.40

#### Summary

Currently, there is a steady increase in the incidence of aggressive forms of periodontitis, including rapidly progressive periodontitis, which is typical for patients aged 18-35 years. The aim of the study was to study the effect of cytokine imbalance in the gingival fluid on the processes of cellular renewal in the periodontium. The study involved 20 volunteers with intact periodontal disease, 35 patients with chronic generalized periodontitis (GGP); 35 patients with rapidly progressive periodontitis (RPP). Using an enzyme-linked immunosorbent assay, the concentrations of the key cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 in the gingival fluid were determined. On the basis of immunohistochemical study of gingival biopsy specimens, indicators of proliferation index (IKi-67) and apoptosis index (Ip53) were obtained. As a result of this study, the nature of the relationship between the cytokine profile of the contents of periodontal pockets, indicators of cell renewal and the clinical course of rapidly progressive periodontitis was established

**Key words:** rapidly progressive periodontitis, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, proliferation, apoptosis, IKi-67

**For citation:** Osipova Yu.L., Akimova S.A., Bulkina N.V., Nikolaev A.I., Interrelation of indicators of cell proliferation, apoptosis of periodontal tissues and cytokine imbalance of gingival fluid in patients with rapidly progressive periodontitis, Ural Medical Journal, No. 10 (193) 2020, p. 69 - 72, DOI 10.25694/URMJ.2020.10.40

## Введение

Воспалительные заболевания пародонта занимают ведущее место в статистике заболеваемости патологий стоматологической направленности. На сегодняшний день можно констатировать, что возраст пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями пародонта, снижается, при чем все чаще воспалительный процесс в пародонте приобретает агрессивный характер течения, что неизбежно приводит к скорой утрате зубов. В настоящее время некоторые аспекты патогенеза быстро прогрессирующего пародонтита, изучены недостаточно. Нарушение клеточной регуляции во многом определяет развитие и исходы хронических воспалительных заболеваний. Регуляция процессов пролиферации и клеточного обновления эпителиоцитов полости рта определяется различными факторами, в том числе адекватной выработкой *ki-67*, уровнем апоптоза (*p53*) [1,2,3]. Патогенез БПП представляет собой сложный многокомпонентный процесс, ключевое значение в котором имеет извращенная, неконтролируемая иммунная реакция, возникающая в ответ на инвазию патогенных микроорганизмов. Одним из важных компонентов местного иммунитета является десневая жидкость и ее цитокиновый состав [4,5]. Согласно литературным данным при быстро прогрессирующем пародонтите наблюдаются существенные изменения концентраций ключевых цитокинов десневой жидкости [3], однако влияние цитокинового дисбаланса на процессы клеточного обновления тканей пародонта изучены недостаточно.

Цель исследования: выявить характер влияния дисбаланса цитокинов десневой жидкости на процессы пролиферации и апоптоза у пациентов с быстро прогрессирующим пародонтитом.

## Материалы и методы

Основную группу составили мужчины и женщины в возрасте от 18 до 35 лет с диагнозом быстро прогрессирующий пародонтит средней и тяжелой степеней тяжести (35 человек). В группу сравнения вошли 35 пациентов с хроническим пародонтитом средней и тяжелой степеней тяжести и 20 добровольцев с интактным пародонтом. Все участники получили подробную информацию о целях и сущности исследования. Пациенты были обследованы по стандартной схеме с определением индекса РМА (Parma, 1960), PI (Russel A.L., 1956) и гигиенического индекса ОНI-S (Green J.C., Vermillion J.R., 1964).

Для достижения поставленных целей практическая часть исследования была разделена на 2 этапа. На первом этапе исследования производился забор десневой жидкости пародонтального кармана с дальнейшей постановкой реакции твердофазного иммуноферментного анализа с целью определения содержания IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 («Bender MedSystems», Австрия). На втором этапе проводился забор биоптатов десны для иммуногистохимического исследования. Для определения показателей клеточного обновления эпителиальных клеток *Iki-67*, *Ip53* были использованы моноклональные мышиные антитела к белку *ki-67* (MB-1, Ventana) и к протеину *p53* (Spring Bio Science, USA) в разведении 1:200.

Индекс пролиферации (*Iki-67*) определялся как отношение количества клеток с положительной экспрессией *Ki-67* к общему количеству подсчитанных в 30 полях зрения клеток. Индекс апоптоза (*Ip53*) подсчитывался как отношение количества экспрессирующих ядер *p53* к общему количеству ядер клеток, подсчитанных также в 30 полях зрения. Статистический анализ полученных результатов проводился при помощи пакета прикладных программ «SPSS» version 21, Microsoft Office Excel 2010. Проверка количественных числовых показателей на соответствие нормальному распределению проводилась с применением критерия Шапиро-Франкиса. Для проверки гипотез о различии средних значений нормально распределенных характеристик были применены критерии Стьюдента и Фишера, для выявления различий в значениях прочих характеристик использовались ранговые критерии Манна-Уитни, Уилкоксона и Джонкхиера.

## Результаты и обсуждение

По результатам индексной оценки пародонта было выявлено, что как в основной группе, так и в группе сравнения гигиеническое состояние полости рта соответствовало плохому уровню гигиены, при этом индекс ОНI-s при БПП составил  $2,92 \pm 1,06$ , при ХГП -  $3,05 \pm 0,41$ . В группе здоровых данный показатель был равен  $1,01 \pm 0,47$ , что позволяет охарактеризовать гигиенический статус контингента данной группы как удовлетворительный. По результатам статистической обработки данных достоверных различий в гигиеническом статусе пациентов основной группы и группы сравнения не выявлено ( $p < 0,05$ ). Однако, несмотря схожий уровень гигиены были отмечены существенные различия в значениях индексов РМА и PI. Так при БПП индекс РМА был равен  $55,14 \pm 0,18\%$ , индекс PI -  $6,23 \pm 0,84$  при ХГП индекс РМА составил  $74,15 \pm 9,25\%$ , PI -  $5,22 \pm 0,89$ . Значения данных показателей свидетельствуют в пользу того, что при быстро прогрессирующем пародонтите наблюдалась более массивная деструкция костной ткани при менее выраженной воспалительной реакции тканей десны. В свою очередь при хроническом пародонтите было выявлено более выраженное воспаление десны при умеренном уровне деструкции тканей. Десневая жидкость, будучи важным компонентом реализации иммунного ответа, представляет высокую диагностическую ценность. Результаты иммунологического исследования позволили констатировать повышение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  как в основной группе, так и в группе сравнения. Содержание IL-1 $\beta$  у пациентов с быстро прогрессирующим пародонтитом составило  $445,51 \pm 48,47$  пкг/мл, что в 2 раза выше, чем в группе пациентов с хроническим пародонтитом, где данный показатель был равен  $228,22 \pm 31,18$  пкг/мл. В свою очередь данные показатели превышают контрольные значения в 4,3 и 2,2 раза соответственно. При этом контрольные значения составили  $103,52 \pm 15,2$  пкг/мл. Концентрация TNF $\alpha$  в образцах десневой жидкости больных быстро прогрессирующим пародонтитом была равна  $756,45 \pm 41,68$  пкг/мл, в группе сравнения данный показатель составил

417,88±51,42 пкг/мл, что выше нормальных показателей (77,18±13,64 пкг/мл) в 9,8 и 5,4 раза соответственно. Также содержание данного цитокина при БПП превышает значения, полученные в группе сравнения в 1,8 раз. TGF-β1 является важнейшим цитокином, обладающим противовоспалительной активностью и принимающим участие в регуляции процессов клеточного обновления. Определено повышенное содержание данного цитокина в десневой жидкости пациентов с ХГП, и с БПП. В основной группе концентрация TGF-β1 составила 243,18±24,55 пкг/мл. Данный показатель превышал норму (95,31±18,74 пкг/мл) в 2,6 раза. В группе сравнения содержание TGF-β1 было равно 191,27±35,52 пкг/мл, что превышало значения, полученные в группе контроля в 2 раза.

Соотношение концентраций TGF-β1 и IL-1β в интактном пародонте составляло 1:1,1, при БПП -1:1,8, в группе сравнения при ХГП незначительно отличается от нормы -1:1,2. Таким образом, можно констатировать смещение цитокинового баланса десневой жидкости в пользу провоспалительных фракций, как при ХГП, так и при БПП, однако в случае быстропрогрессирующего пародонтита, данная дезорганизация цитокинового состава представляется более выраженной.

Иммуногистохимические исследования позволили определить экспрессию белка ki-67, присутствующего в клетке в различные фазы митоза, исключая фазу G0, и белка p53, который выявляется в клетках подлежащих апоптотической гибели. На основании полученных данных были подсчитаны Iki-67 и Ip53, позволяющие оценить пролиферативную и апоптотическую активность клеток пародонта. Так Iki-67 при быстропрогрессирующем пародонтите составлял 3,21±1,07%, что в 2,7 раза ниже показателей интактного пародонта (Iki-67=8,67±0,29 %). При этом Ip53 был равен 2,41±0,52%, что превышало показатели здорового пародонта (Ip53=0,38±0,04%) в 6,3 раза. У пациентов с ХГП Iki-67 не имел достоверных отличий по сравнению с группой контроля (8,47±1,39%). Ip53 в группе сравнения составлял 1,23±0,34%. Соотношение индекса пролиферации и апоптоза в здоровом пародонте имело соотношение 1:22,8. При хроническом пародонтите Ip53 имел повышенные значения, и наблюдалось смещение пролиферативно-апоптотического соотношения в сторону активации апоптоза (1:6,9), что определяло преобладание процессов деструкции над процессами репарации. При быстропрогрессирующем пародонтите данное соотношение характеризовалось еще более выраженным смещением в сторону процессов апоптотической гибели клеток и составляло 1:1,3, данный факт безусловно способствовал прогрессированию деструкции тканей парадонтального комплекса.

Провоспалительные цитокины IL-1β и TNFα, являясь пусковыми, инициируют каскад воспалительных

реакций, результатом которых является в том числе прогрессирующая деструкция тканей пародонтального комплекса. Данный факт подтверждается результатами статистической обработки полученных данных. Так была выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между содержанием IL-1β и Ip53 ( $r = 0,81$ ), и обратная между IL-1β и Iki-67 ( $r = -0,76$ ). Аналогичные зависимости были выявлены у показателей TNFα, обладающих провоспалительным эффектом. Взаимосвязь между концентрацией TNFα и Ip53 определялась как прямая корреляционная ( $r = 0,78$ ), между содержанием TNFα и Iki-67 – обратная корреляционная ( $r = -0,63$ ).

Полученные данные позволяют констатировать, что повышение уровня провоспалительных цитокинов IL-1β и TNFα способствует активации остеорезорбтивных процессов, разрушению соединительно-тканного каркаса пародонта и чем более выражено увеличение концентрации провоспалительных цитокинов, тем более выражена деструкция тканей пародонтального комплекса. У лиц с интактным пародонтом мы наблюдали низкую апоптотическую активность клеток на фоне умеренного уровня пролиферации в условиях отсутствия массивной бактериальной инвазии. У пациентов с ХГП было выявлено повышение пролиферативной активности на фоне высоких значений индекса апоптоза, что указывало, на сохранность защитно-репаративных механизмов в тканях, включающихся при инвазии бактериального агента. Быстропрогрессирующий пародонтит демонстрировал низкий уровень показателей пролиферативной активности клеток, на фоне высоких значений апоптоза, что указывает на срыв защитно-адаптационных механизмов тканей в ответ на внедрение патогенных микроорганизмов.

## Заключение

Проведение иммунологических, иммуногистохимических исследований, а также клинической оценки состояния тканей пародонта позволит более полно охарактеризовать динамику течения воспалительного процесса, и расширить частные вопросы патогенеза быстропрогрессирующего пародонтита. ■

*Осипова Юлия Львовна, Акимова Светлана Анатольевна, Булкина Наталья Вячеславовна, ФГБОУ ВО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов; Николаев Александр Иванович, ФГБОУ ВО Смоленская государственная академия Минздрава России, 214019 г. Смоленск. Автор, ответственный за переписку: Осипова Ю. Л., Саратовский Государственный Медицинский Университет, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112. 410012, osipova-sgmu@mail.ru*

## Литература:

1. Akimova S.A., Bulkina N.V., Osipova Yu.L., Ostrovskaya L.Yu., Zylkina L.A., Vedyeva A.P. et al. Gingival mucosa

proliferative activity and epitheliocytes apoptosis indicators in patients with rapidly progressing periodontitis. Archiv

- EuroMedica*. 2019; 9 (2): 130-133.
2. Осипова Ю.Л., Акимова С.А. Показатели клеточного обновления и апоптоз эпителиоцитов десны у больных быстро прогрессирующим пародонтитом. *Морфология*. 2018; 153(3): 209-210.
  3. Bulkina N.V., Morgunova V.M., Osipova Yu.L., Pronina N.S., Polosukhina E.N., Guseva O.Yu., et al. Cytokine profile of periodontal pocket contents in estimating the severity and efficiency of treatment offered to patients with refractory periodontitis. *Archiv EuroMedica*. 2019; 9(2): 133-136.
  4. Lu R.F., Feng X.H., Xu L., Meng H.X. Clinical and putative periodontal pathogens» features of different sites with probing depth reduction after non-sergical periodontal treatment of patients with aggressive periodontitis. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2015; 47 (1): 13-18.
  5. Горбунова И.Л., Вишнягова Н.А., Вишнягова В.В. Взаимодействие местных и общих факторов в патогенезе хронического генерализованного пародонтита. *Материалы XXIV международного юбилейного симпозиума "Инновационные технологии в стоматологии", посвященного 60-летию стоматологического факультета Омского государственного медицинского университета. Омск: Общество с ограниченной ответственностью "Издательский центр КАН". 2017: 109-120.*