

На правах рукописи

ПОЛУШИНА

Лариса Георгиевна

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ
В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА**

14.03.03 — Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Екатеринбург—2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Базарный Владимир Викторович
Мандра Юлия Владимировна

Официальные оппоненты:

Камилов Фэликс Хусаинович — заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Гусев Евгений Юрьевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «04» февраля 2020 г. в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 208.102.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке им. В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17 и на сайте университета <http://www.usma.ru>, а с авторефератом на сайте ВАК при Минобрнауки России: vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Базарный
Владимир Викторович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Воспаление, как типический патологический процесс, является предметом исследования со времен И.И. Мечникова и до настоящего времени. По современным представлениям, это ответ организма на нарушение гомеостаза ткани, включающий комплекс молекулярных, клеточных и тканевых реакций. «Неконтролируемое» воспаление ведет к прогрессированию альтерации тканей, хронизации процесса и нарушению функции, а успешное разрешение воспалительного процесса связано с активацией эндогенных программ саногенеза (Balta M.G. et al., 2017; Stahl D. et al., 2016; Straub R.H. et al., 2016; Fougère V. et al., 2017).

Практически каждое десятилетие описываются новые медиаторы воспаления: специфические липидные медиаторы; реактивные формы кислорода и миелопероксидазы; синдеканы (сульфатированные протеоглики) и другие белки внеклеточного матрикса; анексин 1, факторы апоптоза и т.д. (Alessandri A.L. et al., 2017; Żukowski P. et al., 2018; Agere S.A. et al., 2018; Vanhamme L et al., 2018).

Одним из ключевых регуляторов воспалительного процесса являются цитокины. Во всем мире неуклонно растет количество публикаций по этой проблеме. Так, в одной из ведущих библиографических баз PubMed только за 2018 год представлено более 598000 статей, посвященных различным аспектам цитокиновой регуляции воспаления. Однако при обилии имеющихся данных о значении различных интерлейкинов (ИЛ) в патогенезе воспалительных процессов и их использовании в лабораторной диагностике в качестве биомаркеров воспаления противоречивы (Rashmi N. et al., 2017; Balaji A et al., 2017). Это диктует необходимость пересмотра патогенетического значения отдельных факторов и механизмов воспалительного процесса и оценки их клинической значимости.

Одной из удобных моделей для изучения механизмов воспаления является пародонтит — воспалительное заболевание тканей пародонта, характеризующееся прогрессирующим разрушением нормальной структуры альвеолярного отростка челюсти (Naik VK et al., 2018).

Хронический пародонтит (ХП) — одно из распространённых заболеваний зубочелюстной системы (Gross A.J. et al., 2017; Al-Harhi L.S. et al., 2017; Balaji S.K. et al., 2018; Holtfreter V. et al., 2015). Данное заболевание ведет не только к потере зубов и снижению качества жизни, но и повышает риск развития различных заболеваний — болезни Альцгеймера, сахарного диабета и многих других (Teixeira F.V. et al., 2017; Chen C.K. et al., 2017; Joshipura K.J. et al., 2018; Jayakumar V. et al., 2018). Все эти обстоятельства делают проблему изучения патогенеза пародонтита актуальной для клинической медицины. Многие исследователи считают, что прогресс в этой области может быть связан с углубленным изучением механизмов иммунологической реактивности, важнейшими факторами которой являются цитокины (AlMoharib H.S. et al., 2017; Balta M.G et al., 2017; Chen X.T. et al., 2017; de Oliveira Nóbrega F.J et al., 2017).

Степень разработанности проблемы

В настоящее время имеется достаточно большое количество публикаций о роли иммунной системы в патогенезе ХП. Бесспорно, что нарушения «цитокинового баланса» претендуют на ключевую роль в патогенезе данного заболевания. Однако данные об изменениях цитокинов в биожидкостях у пациентов, их патогенетическом и диагностическом значении противоречивы (Berezniakova A.I. et al., 2017; Cheremisina V.F. et al., 2017; Rashmi et al., 2017; Balaji A et al., 2017). Вместе с тем в литературе отсутствует общепринятая концепция ХП, учитывающая взаимосвязь локальных (мукозальных) и системных иммунных реакций, их взаимодействие с буккальным эпителием, значение тканевых ферментов — матриксных металлопротеиназ (ММП).

Цель исследования

Установить закономерности иммунных реакций организма и буккального эпителия в патогенезе хронического пародонтита и на этой основе патогенетически обосновать лабораторный мониторинг пациентов.

Задачи

1. Разработать экспериментальную модель хронического пародонтита и на ее основе изучить системные реакции организма при воспалительных заболеваниях пародонта.
2. Оценить изменения цитокинового статуса и секреторного иммунитета полости рта при хроническом пародонтите разной степени тяжести.
3. Выявить цитологические особенности буккального эпителия при хроническом пародонтите.
4. Разработать патогенетически обоснованный алгоритм лабораторного обследования при хроническом пародонтите.

Научная новизна исследования

Разработана адекватная модель хронического пародонтита на лабораторных животных, позволяющая дать оценку системных реакций организма (Патент № 2654598 «Способ моделирования экспериментального пародонтита», опубл. 21.05.2018). Обнаружено усиление продукции острофазовых реактантов и нарушение процессов костного ремоделирования.

Показаны разнонаправленные изменения ThI- и ThII-зависимых путей активации иммунного ответа в полости рта в патогенезе ХП и установлена их связь с процессами тканевой деструкции.

Впервые комплексно и системно описаны особенности буккального эпителия при хроническом пародонтите, позволившие выявить нарушения тканевого гомеостаза с преобладанием процессов апоптоза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработана адекватная модель экспериментального пародонтита для разработки новых схем патогенетической терапии.

Полученные данные о нарушениях цитокинового спектра при ХП позволили не только расширить представления о патогенезе заболевания, но и выделить наиболее диагностически эффективные параметры ротовой жидкости — интерлейкина-4, интерлейкина-6, матриксная металлопротеиназа-8.

Определена диагностическая значимость выявленных иммунологических и цитологических параметров, на основе которых предложен способ диагностики ХП (Патент № 2687746 «Способ оценки степени тяжести хронического генерализованного пародонтита», опубл. 16.05.2019).

На основании полученных данных предложен патогенетически обоснованный алгоритм лабораторной диагностики и лабораторного мониторинга пациентов с ХП.

Методология и методы диссертационного исследования

Для изучения системных и локальных реакций организма, предполагающих инвазивные вмешательства, была создана экспериментальная модель хронического пародонтита. У пациентов проведен анализ результатов клинических, химико-микроскопических, гематологических, иммунологических и морфологических данных. Комплекс лабораторных тестов соответствует современному методическому уровню экспериментальных и лабораторных исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана экспериментальная модель хронического пародонтита, которая позволила выявить умеренную активацию системных реакций организма при выраженных изменениях в тканях пародонта.

2. Локальные реакции при хроническом пародонтите характеризуются изменениями секреторного иммунитета и цитокинового статуса ротовой

жидкости. Интерлейкин-4 и матриксная металлопротеиназа-8 являются наиболее информативными маркерами активности хронического пародонтита.

3. Нарушения иммунореактивности тканей рта при хроническом пародонтите приводит к развитию реактивных изменений буккального эпителия, дисбалансу процессов пролиферации и апоптоза. Цитологическое исследование буккального эпителия является адекватным инструментом для оценки воспалительно-репаративных процессов при хроническом пародонтите.

4. Выявленные иммунологические и цитологические особенности тканей рта являются патогенетическим обоснованием алгоритма лабораторного мониторинга пациентов с хроническим пародонтитом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов и обоснованность выводов определяются использованием современных лабораторных методов исследования, применением адекватных задачам методов статистического анализа.

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на Всероссийской научной конференции «Лабораторная диагностика в фундаментальной и клинической медицине» (г. Санкт-Петербург, 2013 г.); конференции специалистов клинической лабораторной диагностики Уральского Федерального округа «Инновации в лабораторной медицине» (г. Екатеринбург, 2015 г.); Национальном конгрессе с международным участием «Паринские чтения 2016» (г. Минск, 2016 г.); конференции «Актуальные проблемы лабораторной диагностики» (г. Екатеринбург, 2017 г.); Евразийских конгрессах «Инновации в медицине: образование, наука, практика» (г. Екатеринбург, 2017 г., 2019 г.); Российских конгрессах лабораторной медицины (г. Москва, 2018 г., 2019 г.); Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (г. Москва, 2019 г.); Межрегиональном медицинском форуме УФО «Технологии эффективного здравоохранения» в рамках международной выставки-форума «Здравоохранение Урала-2019» (г. Екатеринбург, 2019 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 6 публикаций — в печатных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных материалов кандидатских диссертаций, 2 публикации — в журналах, индексируемых в международной базе (Scopus).

Структура и объём диссертации

Работа написана на русском языке, изложена на 121 странице машинописного текста и состоит из введения, 4-х глав, общего заключения, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 21 таблицей. Список литературы включает 200 источников, из них 56 отечественных, 144 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Для решения задач исследования было проведено клинико-экспериментальное исследование.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 40 белых крысах массой 170-220 грамм. Все исследования проводили с соблюдением принципа гуманной методологии медико-биологических экспериментов на животных, учитывая требования ГОСТ Р ИСО 10993.2-99 от 01.07.2010, главы 25, ст. 245 УК РФ. Дизайн экспериментального исследования, его новизна, допустимость и приемлемость были утверждены на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России от 16.12.2016 (протокол № 10). Животные были разделены на 2 группы — контрольную (интактные крысы) и основную (с экспериментальным хроническим пародонтитом).

Для моделирования пародонтита у крыс использовано комплексное воздействие на ткани пародонта — механическое повреждение (разрыв

циркулярной связки зуба), бактериальное обсеменение раневой поверхности, нарушение микроциркуляции тканей. Способ осуществлялся следующим образом: болезненные манипуляции животным выполнялись в условиях контролируемого наркоза 0,15 мг ксилазина, 0,15 мг золетила 100, придавали положение лежа на спине, отводили десну нижних зубов и разрывали круговую связку зуба при помощи серповидной гладилки, далее вводили зубные отложения — зубной налет и камень, инфицированные *St. sanguis*, *St. milleri*, *P. gingivalis*, *E. coli*. На зубы наносили самопротравливающую адгезивную систему (Adper Prompt L-Pop, 3М ESPE), отсвечивали ее при помощи фотополимерной лампы Elipar S10, накладывали ортодонтическую проволоку и фиксировали ее при помощи жидкотекучего композиционного материала Filtek™ Ultimate Flowable (3М ESPE).

Клиническое обследование и лечение пародонтологических больных нами проведено в стоматологической клинике ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. Работа основана на исследовании 240 человек. Диагноз «Хронический пародонтит» (K05.3 по МКБ-10) был установлен на основании клинико-рентгенологических критериев в соответствии с клиническими рекомендациями (протоколами лечения) при диагнозе «Пародонтит», утвержденных «Стоматологической Ассоциацией России» (2013) с изменениями и дополнениями на основании постановления № 15 Совета «Стоматологической Ассоциацией России» от 30.09.2014, актуализированные 02.08.2018 [<http://www.e-stomatology.ru/director/protokols/>]. Пациенты с пародонтитом были распределены на три группы.

Основная группа 133 пациента (53 — пародонтит легкой степени, 38 — пародонтит средней степени, 42 — пародонтит тяжелой степени).

Распределение пациентов проводили в соответствии с традиционной «Ереванской» классификацией (1983) и учетом новой классификации, которая была представлена в Амстердаме на EuroPerio в 2018 году (Needeleman, Tonetti et al.) на основе стадии процесса, определяемой степенью тяжести (в зависимости от уровня потери клинического прикрепления, рентгенологической потери костной ткани и потери зуба).

Лабораторные исследования

Комплекс лабораторных исследований включал оценку физико-химических свойств ротовой жидкости (РЖ): рН (кислотность); удельный вес; общий белок; лейкоциты – эстеразный тест.

Гематологические исследования крови, для оценки иммуногенеза и кроветворения у лабораторных животных исследовали клеточный состав селезенки и костного мозга. Из селезенки делали мазки-отпечатки для подсчета спленоцитограммы. Высушенные препараты фиксировали красителем-фиксатором Май-Грюнвальда и окрашивали азур-эозином по Романовскому.

Биохимическое исследование, для оценки процессов костного ремоделирования определяли активность щелочной фосфатазы кинетическим методом. Кроме того, оценивали уровень термолабильную фракцию щелочной фосфатазы, что по мнению ряда исследователей отражает активность «костной» фракции (Трифорова Е.Б. 2011; Tamaki J. 2013). Учет результатов проводили с помощью автоматического анализатора Сапфир-400.

Иммунохимический анализ. Иммунохимический анализ сывороток крыс и ротовой жидкости человека включал определение ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-17, γ ИФ, ФРЭС, ЛФ, IgA, С- реактивного белка (СРБ), гидроксипролина, методом твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА). Для выполнения анализа применяли комплекс, включающий планшетный иммуноферментный анализатор «Thermo Scientific» Multiskan GO (Япония); вошер Thermo Scientific Wellwash (Япония), шейкер-термостат Elmi (ST-3L), Латвия. Выбор данного набора цитокинов обоснован тем, что они продуцируются разными клетками и отражают разнонаправленную активацию Th1/Th2-зависимых путей иммунного ответа (таблица 1).

Таблица 1 — Продукция цитокинов различными клеточными популяциями

Виды клеток	Продуцируемые цитокины
Th1	ИЛ-2
Th2	ИЛ-4
Th17	ИЛ-17
Фибробласты	ИЛ-6, γ ИФ, ФРЭС
Лимфоциты/макрофаги/нейтрофилы	ИЛ-6, γ ИФ

Матриксные металлопротеиназы (ММП-1, ММП-7, ММП-8, ММП-12, ММП-13) определяли методом **мультипараметрического флуоресцентного анализа** с применением магнитных микросфер (Xmap-технология, Luminex) с использованием тест-систем Invitrogen (eBioscience) и мультиплексного анализатора Luminex 200 с программным обеспечением xPONENT.

Морфологические исследования. Для оценки воспалительных и репаративных процессов в тканях проводили морфологическое исследование. Для этого у исследуемых животных выполнялась резекция нижней челюсти до начала исследования, на 3 сутки, 7 сутки, 14 сутки, 21 сутки и 35 сутки, ткани фиксировали 10% раствором формалина. Проводили восковую заливку, срез тканей, препарат окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Гистологические срезы изучали при увеличении в 100, 200 и 400 раз. Микрофото получены с помощью программы «Видео-Тест Морфология 5.0».

Морфометрическое исследование проводилось на микроскопе Leica DM 250, с использованием программы Leica Application Suitu (V4), который включал подсчет количества эозинофилов, нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов и остекластов. Подсчет клеток производился в единице площади в двадцати полях зрения при увеличении в 1000 раз.

Цитологическое исследование буккального эпителия. Для цитологического исследования материал собирали с внутренней поверхности щеки с помощью цитощетки и переносили на предметное стекло, равномерно распределяя биоматериал. Фиксация препаратов осуществлялась красителем-фиксатором эозин-метиленовый синий Лейшмана в течение 2 минут с последующей окраской раствором азур-эозина по Романовскому в течение 20

минут. При подсчете 1000 клеток выявили цитологические аномалии в частности - кариологические аномалии: клетки с микроядрами, двуядерные клетки, клетки с протрузиями, клетки с признаками кариопикноза, кариорексиса, кариолизиса, клетки с апоптозными тельцами и перинуклеарной вакуолью, результат выражали в %. С целью комплексной оценки цитограммы использовали расчетные индексы: цитогенетический индекс – сумма клеток с микроядрами, протрузиями; индекс апоптоза – сумма клеток с конденсацией хроматина, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и апоптозными тельцами.

Бактериологическое исследование. Соскоб с поверхности зуба помещали в транспортную среду и доставляли в лабораторию. Культивирование и идентификацию микроорганизмов проводили с использованием автоматического анализатора Bactek в клинко-диагностической лаборатории ГУЗ СО СОКБ № 1.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась на основании принципов вариационной статистики. Для количественных исследований была проверена гипотеза о том, что выборки имеют различное распределение помощью критерия Колмогорова-Смирнова, поэтому использовались параметрические критерии при обработке показателей животных и непараметрические - при обработке данных, полученных при обследовании здоровых добровольцев и пациентов.

Статистическая обработка с использованием параметрических критериев включала определение средних величин (M) и ошибки средней арифметической (m), результаты в таблицах представлены в виде $M \pm m$. Достоверность различий (p) между средними значениями в группах оценивали согласно t -критерию Стьюдента для независимых выборок.

Результаты лабораторных исследований пациентов представлены непараметрическими критериями и сравнивались при помощи критерия Манна-Уитни, данные представлены как медиана (Me), 25-й; 75-й квартиль ($Q1$; $Q3$).

Для установления взаимосвязей между параметрами применили корреляционный анализ с использованием коэффициента парной корреляции Пирсона. Для оценки диагностических характеристик изучаемых показателей

рассчитывали диагностическую чувствительность (ДЧ), диагностическую специфичность (ДС) и прогностическую ценность (ПЦ) положительного результата. Для статистической обработки данных применен классический дискриминантный анализ на базе программного пакета статистического анализа Statistica.

Для оценки диагностической эффективности лабораторных показателей использован ROC-анализ, заключающийся в построении характеристической кривой и определении площади под ней (AUC - Area Under Curve).

Для решения графических задач применяли электронные таблицы EXCEL 2007 (Windows 7: Home Premium, Microsoft, США), для решения задач многомерной статистики – программу «Gretal», расчет диагностических характеристик показателей и прогностической ценности производился с использованием приложения для EXCEL 2007 – «Analyse-it».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки системных реакций, организма при ХП была разработана модель экспериментального пародонтита, основанная на сочетанном воздействии ряда этиологических и патогенетических факторов: бактериальное обсеменение, механическое повреждение (разрыв циркулярной связки зуба), нарушение микроциркуляции тканей.

Адекватность модели была подтверждена прежде всего морфологическими данными: показаны выраженные изменения в тканях пародонта и в альвеолярной кости - признаки острого воспаления (альтерация, нарушения микроциркуляции, экссудация и эмиграция клеток), завершающиеся репаративными процессами организации, формирования соединительно-тканной капсулы. Кроме того, появляются отчетливые фокусы резорбции костного матрикса, костных балок.

Выявленная морфологически усиленная остеокластическая резорбция сопровождалась довольно типичной динамикой уровня общепринятых

биохимических маркеров костного ремоделирования — гидроксипролина и «костной» щелочной фосфатазой в сыворотке лабораторных животных (рисунок 1).

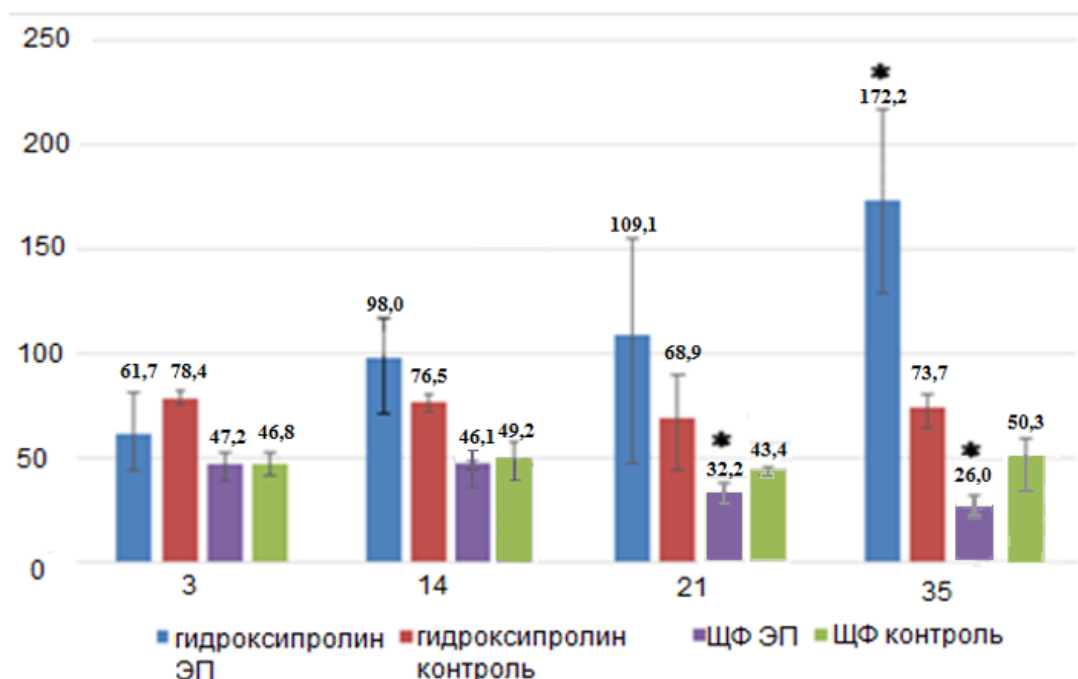


Рисунок 1 — Маркеры костного ремоделирования в сыворотке крыс при экспериментальном пародонтите

Формирование хронического пародонтита выраженные локальные изменения в тканях пародонта сопровождались достаточно стереотипной острофазной реакцией у животных — нейтрофильным лейкоцитозом (умеренно выраженным), при этом заметных изменений кроветворения в селезенке не было обнаружено. Отмечалось повышение концентрации СРБ и цитокинов: ИЛ-6 в 1,7 раза ($p=0,04$) и γ ИФ в 10,5 раз ($p=0,05$) к 7-ым суткам.

Для оценки локальных реакций в полости рта исследовали параметры РЖ. Показаны характерные для воспалительного процесса увеличение концентрации белка и количества лейкоцитов в РЖ.

Согласно общепринятым представлениям, одним из звеньев патогенеза воспалительного процесса пародонта является активация мукозального иммунитета. Иммунологическое исследование выявило увеличение

концентрации сIgA и лактоферрина, свидетельствующей об активации мукозального иммунитета.

Существующая парадигма патогенеза ХП основана на переходе от эффективного клеточного иммунитета к нарушенному гуморальному (Th1/Th2). Нами были рассмотрены основные цитокины про- и противовоспалительного ответа (рисунок 2).

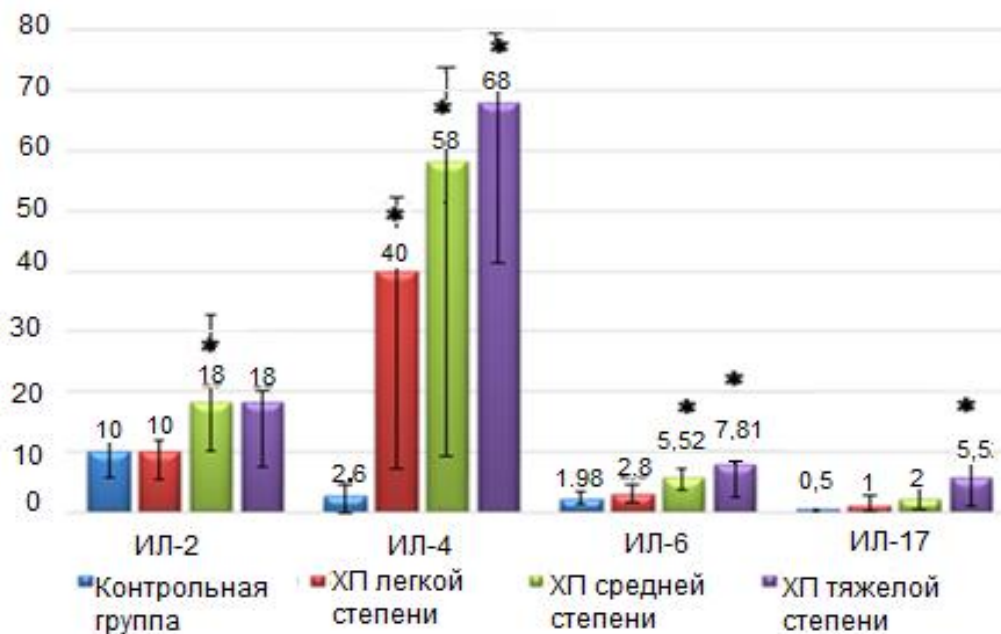


Рисунок 2 — Концентрация цитокинов в РЖ пациентов с ХП

Это позволило выявить их дисбаланс, прежде всего - активацию секреции ИЛ-4, и в меньшей степени – ИЛ-6. Можно полагать, что данные цитокины реализуют свои патогенетические (иммуноопосредованная деструкция тканей) и протективные эффекты (стимуляция противомикробного иммунитета) при ХП. Изменение соотношения про- и противовоспалительных интерлейкинов определяет дальнейшее прогрессирование воспалительного процесса.

Усиленная продукция цитокинов индуцирует активацию протеолитических ферментов, в том числе и ММП. Нами были рассмотрены ММП, относящиеся к коллагеназам и матрилизинам (таблица 2).

Таблица 2 — Содержание ММП в РЖ пациентов с ХП

Показатель	Контрольная группа n=10	Пациенты с ХП n=15	p
ММП-1 пг/мл Me (Q1;Q3)	260,1 (241,6; 309,2)	194,1 (131,8; 266,1)	P=0,06
ММП-7 пг/мл Me (Q1;Q3)	2927,2 (2826,2; 6940,4)	4421,2 (3169,7; 7100,4)	P=0,03
ММП-8 пг/мл Me (Q1;Q3)	6507,3 (6341,1; 7341,1)	17779,6 (10211,7; 24390,0)	P=0,01
ММП-12 пг/мл Me (Q1;Q3)	1308,0 (1218,7; 1402,5)	2008,7 (1498,7; 2694,5)	P=0,01
ММП-13 пг/мл Me (Q1;Q3)	635,7 (613,1; 646,7)	395,4 (296,8; 456,4)	P=0,06

Концентрация ММП-7 повышается в 1,5 раза у пациентов с ХП в сравнении с контролем ($p=0,03$). Это объясняет механизм прогрессирования поражения ткани пародонта. ММП-7 синтезируется эпителиальными клетками, в том числе – БЭ, который принимает участие в патогенезе заболевания. Отмечалась тенденция к увеличению ММП-12. Повышенная продукция ММП-12 приводит к альтерации базальной мембраны эпителия, что является важным механизмом запуска воспалительного процесса в тканях, в том числе – пародонта.

Выявлено, что наиболее значимое изменение активности отмечено со стороны ММП-8, продуцируемой различными клеточными элементами воспалительного очага (нейтрофилы, эпителиоциты, макрофаги, плазмоциты), которая является ключевым ферментом разрушения экстрацеллюлярного матрикса. Кроме того, она участвует в деминерализации дентина и в дальнейшем при прогрессировании способна вызывать разрушение альвеолярной кости. ММП-8 оказывает влияние на клетки буккального эпителия, активируя в них апоптоз.

Выявленное нами повышение концентрации ФРЭС в РЖ, который некоторыми авторами рассматривается как фактор неоангиогенеза и дополнительный маркер эндотелиальной дисфункции (Shibuya M. 2015), в комплексе с морфологическими данными подтверждает нарушение микроциркуляции при ХП.

Результаты многочисленных исследований по нарушениям цитокиновой регуляции при ХП не дают ответа на вопрос о клинической ценности обнаруженных изменений. Поэтому для оценки диагностической эффективности изучаемых показателей использован ROC-анализ, описанный в главе 2. В результате установлено, что наиболее высокую информативность в диагностике ХП имеет концентрация ИЛ-4 в РЖ: диагностическая чувствительность — 88%, диагностическая специфичность — 99%, AUC при сопутствующем критическом значении — 0,95. Также диагностически эффективными оказались показатели ИЛ-6, ММП-7, ММП 8, ММП-12.

Важнейшим защитным механизмом полости рта является буккальный эпителий. При его цитологическом исследовании был выявлен ряд цитоплазматических и кариологических аномалий у пациентов с ХП (рисунок 3).

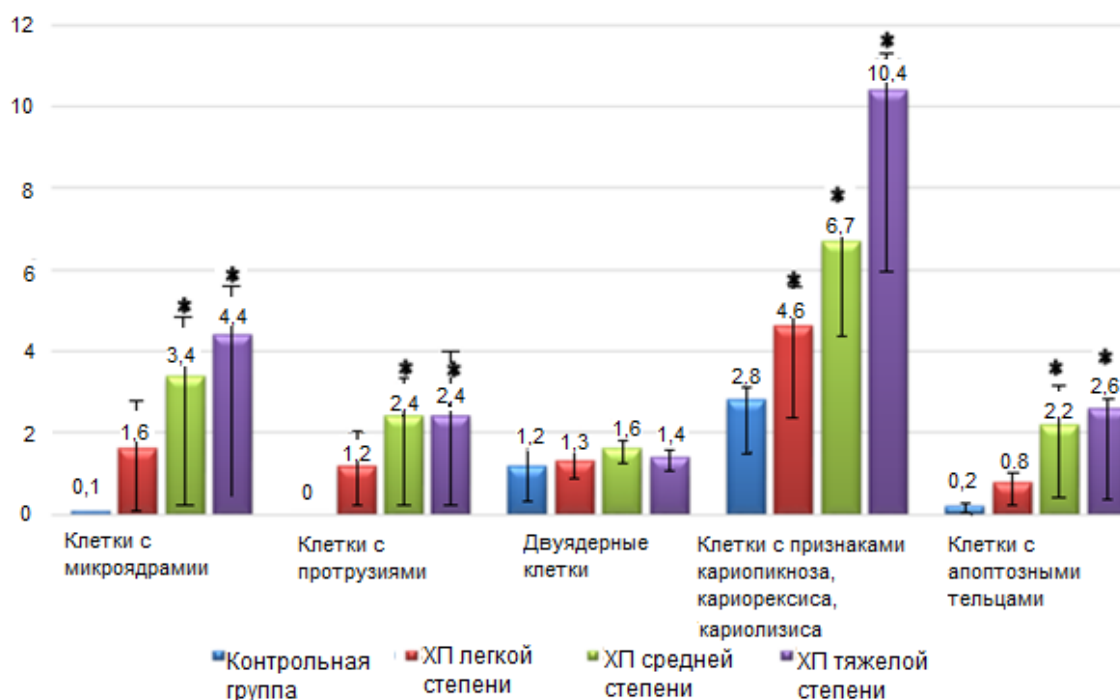


Рисунок 3 — Буккальная цитогарма пациентов с ХП

В частности, зафиксировано нарастание числа клеток с микроядрами и другими маркерами цитогенетических нарушений (клетки с протрузией, двуядерные клетки) при более тяжелых формах ХП. Это связано не только с активностью воспалительного процесса, но и с другими факторами (окружающей средой, образом жизни и др.). Отмечено, что прогрессирование пародонтита сопровождается усилением апоптоза в клетках, о чем свидетельствует увеличение апоптического индекса. Возможно, что установленные реактивные изменения БЭ патогенетически взаимосвязаны с указанными выше иммунологическими сдвигами и активностью ММП-8, которая напрямую влияет на внутриядерные изменения в буккальных эпителиоцитах, вызывая усиление некроза и апоптоза в клетках. Дискриминантный анализ и оценка диагностической эффективности параметров БЭ показали, что при легкой степени ХП АUC выше у клеток с кариопикнозом, а при средней и тяжелой степени более показательными аномалиями можно считать количество клеток с микроядрами, с кариолизисом, апоптозными тельцами и конденсированным хроматином.

В процессе проведенного исследования нами было изучено 25 лабораторных параметра РЖ и БЭ у 240 человек. На основании оценки их диагностических характеристик были выделены наиболее информативные слюварные биомаркеры при ХП: лейкоциты, ИЛ-4, ИЛ-6, ММП-7, ММП-8, ММП-12, индекс апоптоза, цитогенетический индекс. Для разработки алгоритма лабораторного мониторинга ХП у тестов с наиболее высокой ДЧ и ДС была рассчитана предсказательная ценность положительного результата (рисунок 4). Это позволило предложить оптимизированный алгоритм лабораторной диагностики ХП.

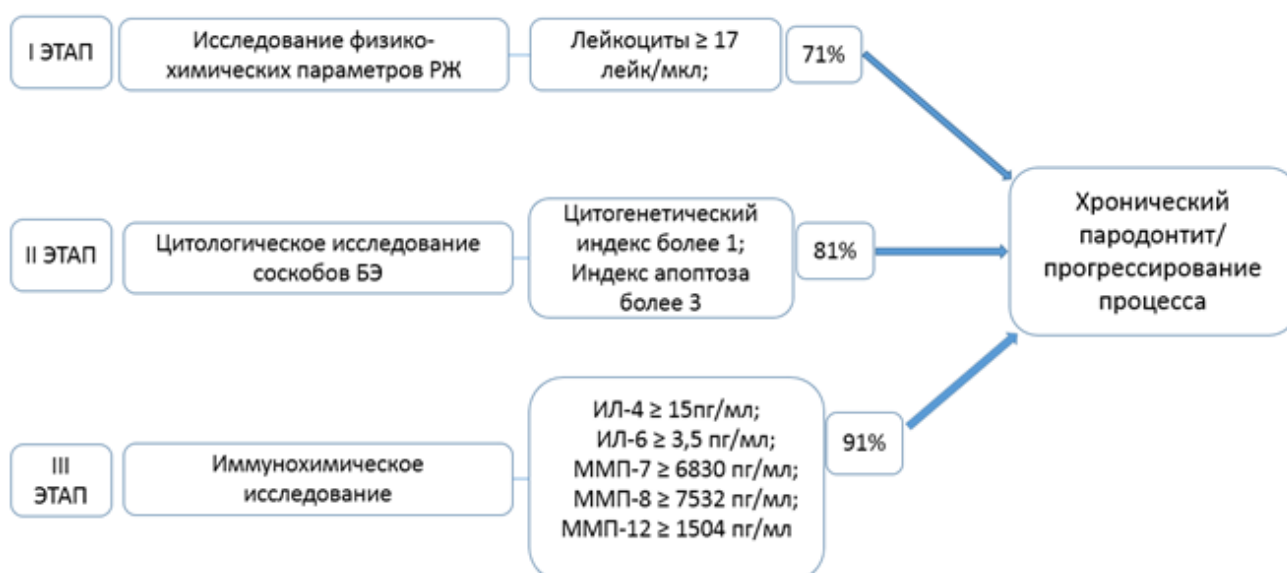


Рисунок 4 — Алгоритм лабораторного мониторинга при хроническом пародонтите

Анализ полученных данных в сочетании с обширными результатами других авторов позволяет представить патогенез ХП следующим образом.

ХП представляет собой воспалительный процесс, являющийся результатом взаимодействия между пародонтогенными микроорганизмами, иммунной системой хозяина и факторами окружающей среды (Balta M.G. et al., 2017; Hajishengallis G. 2014). При нарушении механизмов иммунорегуляции, в частности, дисбалансе Th-I/Th-II, продуцируемых цитокинов, что развивает «неконтролируемый» воспалительный ответ, который приводит к прогрессированию заболевания (Fougère B. et al., 2017; Naufel A.O. et al., 2017).

Микроорганизмы вызывают целый каскад иммунопатофизиологических реакций в полости рта и тканях пародонта при ХП. Прежде всего, липополисахариды грамотрицательных бактерий взаимодействуют с мембранными рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток (Toll, Fc, CD4, CD8, CD14), а также белками крови (LBP – ЛПС-связывающий белок), что приводит к активации этих клеток (Sekici A. et al., 2014; Swaminathan V. et al., 2013), результатом чего является синтез цитокинов, ключевыми среди них являются ИЛ-1 β /ФНО- α , которые, в свою очередь, стимулируют синтез ИЛ-

6, ИЛ-4 моноцитами / макрофагами и Т-лимфоцитами (Кузнецова О.А., 2015). Так начинается сложный каскад разнонаправленных цитокиновых реакций.

Изменения уровней ИЛ1- β /ФНО- α при ХП детально изучены в многочисленных работах (Орехова Л.Ю. и др., 2017; Eivazi M. et al., 2017). В нашем исследовании акцент сделан на ИЛ-6 и ИЛ-4, изменения концентрации которых были наиболее значимы. Эти цитокины обладают плеiotропным эффектом. При этом ИЛ-6 является преимущественно провоспалительным, а ИЛ-4 — противовоспалительным цитокином. Их функции в патогенезе ХП заключаются том, что они, с одной стороны, активируют мукозальный иммунитет (синтез антимикробных пептидов и секреторного IgA) (Шафеев И.Р. и др., 2016), а с другой, совместно с ИЛ-2 и ИФ γ способствуют сдвигу ремоделирования в сторону остеокластической резорбции. Аналогичными свойствами обладает ИЛ-17. Кроме того, что ИЛ-17 является клеточным регулятором секреторного иммунитета, он ещё способствует остеокластогенезу (Abusleme L. et al., 2017).

При хроническом пародонтите выявлено нарушение микроциркуляции, что является важным патогенетическим механизмом развития воспалительного процесса. Нами установлено, что наряду с известными медиаторами определённая роль при этом отводится ФРЭС (Zhu H. et al., 2015).

Цитокины (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и др.) индуцируют синтез протеаз макрофагами, нейтрофилами, фибробластами, эндотелием. В частности, результат активации ММП-8 приводит к деградации внеклеточного матрикса, способствуя деструкции тканей пародонта.

Кроме пародонтальных тканей, клетками мишенями цитокинов и матриксных металлопротеиназ является буккальный эпителий. Повышение уровня ИЛ-4 и ММП-7, 8, 12 сопровождается усилением некроза и апоптоза, а также нарастанием цитогенетических аномалий в эпителиальных клетках. Аналогичное заключение ранее было сделано и другими авторами (Crowley L.C. et al., 2015).

Таким образом, в исследовании показана высокая активность (как Th-I, так и Th-II) путей иммунного ответа. Если при остром воспалении «сбалансированная» реакция иммунной системы приводит к восстановлению соотношения Th-I/Th-II, то при ХП наблюдается активация про- и противовоспалительных механизмов со сдвигом в сторону Th-II, что подвержено снижением индекса ИЛ-2/ИЛ-4. В результате «разрешения» воспаления не происходит. Из этого следует, что дисбаланс продукции разнонаправленных цитокинов приводит к прогрессированию воспалительного процесса и усилению деструкции не только мягких тканей пародонта, но и резорбции кости.

Описанные механизмы влияния цитокинов на ткани пародонта при прогрессировании ХП, на основании данных литературы и проведенных исследований, представлены на рисунке 5.

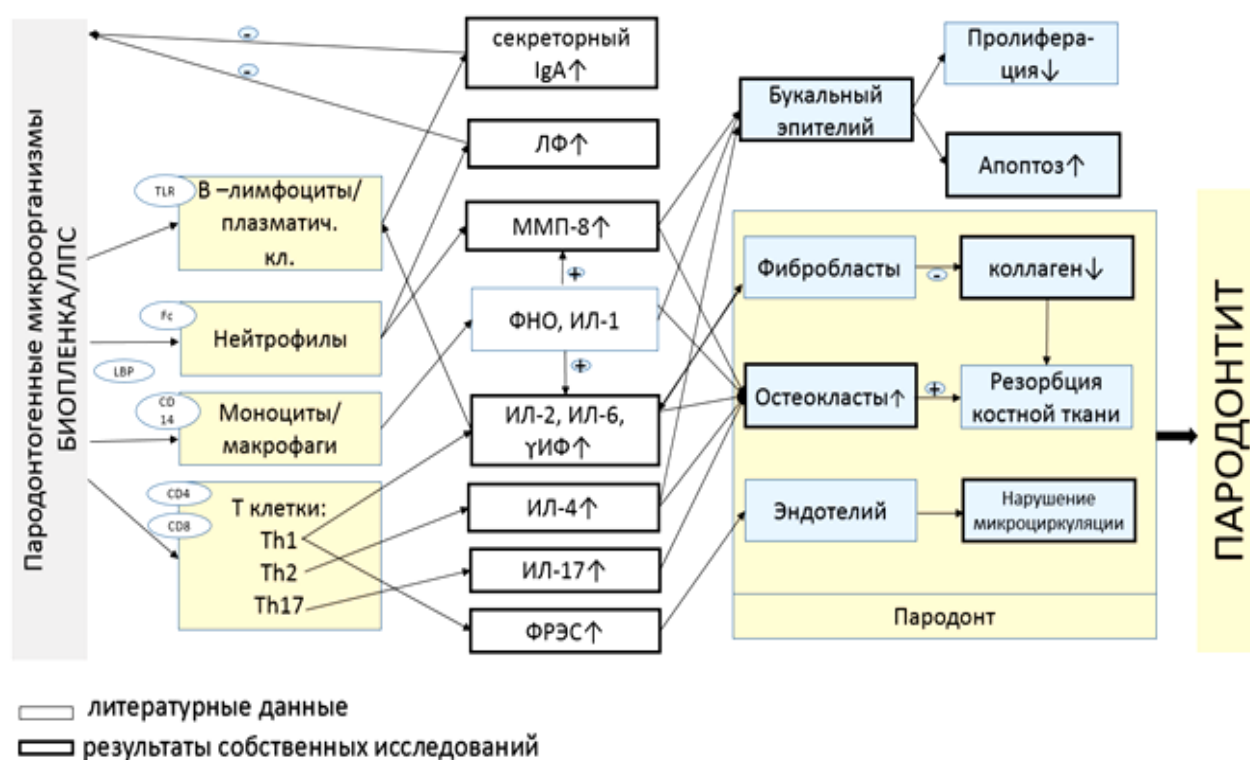


Рисунок 5 — Особенности иммунологической реактивности при ХП

ВЫВОДЫ

1. Разработана экспериментальная модель хронического пародонтита, которая позволила выявить выраженные локальные изменения тканей пародонта в виде усиления костной резорбции, что сопровождается повышением концентрации в сыворотке крови концентрации гидроксипролина и снижением активности «костной» фракции щелочной фосфатазы, свидетельствующих о нарушении костного ремоделирования. Системная реакция крови выражается умеренной лейкоцитарной реакцией и повышенной продукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6 и гамма-интерферона).

2. У пациентов с хроническим пародонтитом наряду со стимуляцией мукозального иммунитета (увеличение концентрации лактоферрина и секреторного иммуноглобулина А) выявлены разнонаправленные изменения цитокинового статуса ротовой жидкости, которые свидетельствуют о Th-2 зависимой активации клеточного иммунитета.

3. Прогрессирование хронического пародонтита характеризуется увеличением продукции цитокина интерлейкина-4 и активацией матриксной металлопротеиназы-8 в ротовой жидкости.

4. Нарушение иммунореактивности при хроническом пародонтите сопровождается развитием цитологических аномалий буккального эпителия. Наибольшей диагностической информативностью среди них обладают количество клеток с микроядрами и признаками апоптоза.

5. Алгоритм лабораторного мониторинга хронического пародонтита основан на определении уровня цитокинов, активности металлопротеиназы-8 в ротовой жидкости и оценке буккальной цитограммы (количества клеток с микроядрами; количества клеток в состоянии апоптоза), позволяет оценить степень и динамику воспалительного процесса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная модель хронического пародонтита на лабораторных животных должна использоваться в дальнейших научных исследованиях, разработке и апробации новых лечебно-профилактических технологий.

2. Маркерами прогрессирования хронического пародонтита в буккальной цитограмме является увеличение числа клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями ядра: кариопикнозом, кариорексисом и кариолизисом, определение цитокинового статуса и активности матриксных металлопротеиназ (при значении в ротовой жидкости уровня интерлейкина-4 \geq 15 пг/мл и интерлейкина-6 \geq 3,5 пг/мл, активность ММП-7 \geq 6830 пг/мл, ММП-8 \geq 7532 пг/мл, ММП-12 \geq 1504 пг/мл диагностируется активность хронического пародонтита).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Полушина, Л. Г. Иммунологический анализ ротовой жидкости как потенциальный диагностический инструмент / Л. Г. Полушина, В. В. Базарный, Е. А. Ваневская // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т.8, №3 (17). – С. 769-771.**

2. **Клинико-патогенетическое значение некоторых цитокинов при пародонтите / Л. Г. Полушина, Е. Н. Светлакова, Е. А. Семенова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19(6). – С. 803-806.**

3. **К вопросу диагностики пародонтита: существующие возможности и клинические потребности / Е. Н. Светлакова, Е. А. Семенова, Л. Г. Полушина [и др.] // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т.19, № 3. – С. 34-37.**

4. **Значение некоторых интерлейкинов в патогенезе пародонтита / В. В. Базарный, Л. Г. Полушина, Е. А. Семенова [и др.] // Вестник**

Уральской медицинской академической науки. – 2017. – Т.14, № 1. – С. 35-39.

6. Моделирование хронического пародонтита на лабораторных животных / В. В. Базарный, Л. Г. Полушина, Е. Н. Светлакова [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2018. – Т.15, № 4. – С. 563-569.

7. Цитологическая характеристика процессов пролиферации и апоптоза в буккальном эпителии при хроническом гингивите / В.В. Базарный, Л.Г. Полушина, А.Ю. Максимова [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2019. - Т.16,№ 1. - С. 22-26.

8. Полушина, Л. Г. О целесообразности определения некоторых цитокинов в ротовой жидкости при гингивитах / Л. Г. Полушина, В. В. Базарный // Актуальные вопросы современной медицины. Межвузовская ежегодная заочная научно-практическая конференция с международным участием: сборник статей. – 2014. – С. 90-91.

9. Полушина, Л. Г. Оценка цитокинового статуса ротовой жидкости при пародонтите / Л. Г. Полушина, В. В. Базарный, Е. А. Ваневская // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17. – С 341.

10. Полушина, Л. Г. Клинико-лабораторная характеристика слизистой оболочки полости рта / Л. Г. Полушина, В. В. Базарный, Е. А. Семенцова, Н. И. Шарипова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т.9(62). – С. 518.

11. Цитологическая характеристика буккального эпителия при хроническом генерализованном пародонтите / В. В. Базарный, Л. Г. Полушина, А. Ю. Максимова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т.63, № 12. – С. 773-776.

12. Диагностика пародонтита: нужны ли инновационные подходы? / Е.А. Семенцова, Е.Н. Светлакова, Л.Г. Полушина [и др.] // Стоматология Большого Урала : материалы Международного конгресса «Молодежная научная школа по проблемам фундаментальной стоматологии». – 2017. – С. 117-119.

13. Создание экспериментальной модели пародонтита на лабораторных животных / Е. Н. Светлакова, Ю. В. Мандра, Л. Г. Полушина [и др.] // Стоматология Большого Урала : материалы Международного конгресса «Молодежная научная школа по проблемам фундаментальной стоматологии». – 2017. – С. 107-109.

14. Полушина, Л. Г. Микроядерный тест как один из методов диагностики хронического пародонтита / А. Ю. Максимова, Л. Г. Полушина, В. В. Базарный // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения : Материалы II Международной (72 Всероссийской) научно-практической конференции молодых ученых и студентов, II Всероссийского форума медицинских и фармацевтических вузов «За качественное образование». Сборник статей. – 2017. – С. 185-190.

15. Новые возможности лабораторной иммунодиагностики хронического пародонтита / В. В. Базарный, Л. Г. Полушина, Е. Н. Светлакова [и др.] // Лабораторная служба. – 2017. – Т.6, № 3. – С. 34-35.

16. Цитологические особенности буккального эпителия в норме и при патологии полости рта / В. В. Базарный, Л. Г. Полушина, А. Ю. Максимова [и др.] // Лабораторная служба. – 2018. – Т.7, № 3. – С.45-46.

17. Разработка алгоритма для неинвазивной оценки реактивности организма человека / Л. Г. Полушина, А. С. Сарapultова, М. И. Щербакова [и др.] // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: материалы III Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, III Форума медицинских и фармацевтических ВУЗов России «За качественное образование». Сборник статей. – 2018. – С. 891-894.

Патенты на изобретения

Патент № 2654598 Российская Федерация. Способ моделирования экспериментального пародонтита : 2017111552 : заявл. 05.04.2017 : опубл. 21.05.2018 / Светлакова Е. Н., Полушина Л. Г., Тесленко А. Ю. [и др.] ; заявитель ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. – 6 с. : ил. – Текст : непосредственный.

Патент № 2687746 Российская Федерация, МПК G01N 33/48. Способ оценки степени тяжести хронического генерализованного пародонтита : 2018125095 : заявл. 09.07.2018 : опубл. 16.05.2019 / Базарный В. В., Полушина Л. Г., Максимова А. Ю. [и др.] ; заявитель ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. – 7 с. : ил. – Текст : непосредственный.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЭ	– буккальный эпителий
ИЛ	– интерлейкин
ИФ	– интерферон-гамма
ЛПС	– липополисахарид
ЛФ	– лактоферрин
ММП	– матриксная металлопротеиназа
Нф	– нейтрофилы
ОАК	– общий анализ крови
РЖ	– ротовая жидкость
СРБ	– С реактивный белок
ФРЭС	– фактор роста эндотелия сосудов
ХП	– хронический пародонтит
ЩФ	– «костная» щелочная фосфатаза
ЭП	– экспериментальный пародонтит
Ig	– иммуноглобулин
HGB	– гемоглобин
PLT	– тромбоциты
PMA	– папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс
RBC	– эритроциты
WBC	– лейкоциты
TLR	– Toll подобные рецепторы

Полушина Лариса Георгиевна

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ
В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА

14.03.03 — Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета Д 208.102.03
от 22.11.2019 г.

Подписано в печать 22.11.2019 г. Формат 60 × 84 1/16. Усл. печ. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ № 223. Отпечатано в ООО «Типография для Вас»:
620073, г. Екатеринбург, ул. Крестинского, д. 37.