

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

На правах рукописи

ПОЛУШИНА

Лариса Георгиевна

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ
В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА**

14.03.03 — Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Базарный Владимир Викторович

доктор медицинских наук, профессор

Мандра Юлия Владимировна

Екатеринбург—2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....		4
Глава 1. ХРОНИЧЕСКИЙ ПАРОДОНТИТ КАК МОДЕЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....		11
1.1. Современные представления о патогенезе хронического пародонтита.....		11
1.2. Исследование ротовой жидкости как инструмент изучения локальных реакций тканей полости рта.....		20
1.3. Буккальный эпителий как модель для оценки клеточных реакций.....		24
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....		31
2.1. Дизайн исследования.....		31
2.2. Характеристика экспериментального исследования.....		32
2.3. Моделирование экспериментального пародонтита.....		33
2.4. Характеристика клинического исследования.....		35
2.5. Лабораторные исследования.....		41
2.5.1. Исследование ротовой жидкости.....		41
2.5.2. Гематологические исследования.....		42
2.5.3. Биохимическое исследование.....		43
2.5.4. Иммунохимические исследования.....		43
2.5.5. Гистологические исследования.....		44
2.5.6. Цитологическое исследование буккального эпителия.....		45
2.5.7. Бактериологическое исследование.....		46
2.6. Статистическая обработка данных.....		47
Глава 3. ЛОКАЛЬНЫЕ И СИСТЕМНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ.....		49
3.1. Моделирование хронического пародонтита на лабораторных животных.....		49
3.2. Морфологическое исследование нижней челюсти		

лабораторных животных с экспериментальным пародонтитом.....	50
3.3. Лабораторная оценка системных реакции у лабораторных животных с экспериментальным пародонтитом.....	56
Глава 4. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ.....	64
4.1. Исследование ротовой жидкости при хроническом пародонтите.....	64
4.2. Оценка диагностической эффективности лабораторных параметров ротовой жидкости.....	73
4.3. Цитологическое характеристика буккального эпителия при хроническом пародонтите.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ.....	97
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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 [68, 85, 171, 172].

Практически каждое десятилетие описываются новые медиаторы воспаления: специфические липидные медиаторы; реактивные формы кислорода и миелопероксидазы; синдеканы (сульфатированные протеогликаны) и другие белки внеклеточного матрикса; анексин 1, факторы апоптоза и т.д. [115, 162, 177, 190, 200].

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 [63, 65]. 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 хронический пародонтит (ХП) – воспалительное заболевание тканей пародонта, характеризующееся прогрессирующим разрушением нормальной структуры альвеолярного отростка челюсти [50, 81,150].

Хронический пародонтит – одно из распространённых заболеваний зубочелюстной системы [59, 66, 87, 128]. 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 [82, 99, 152, 134]. Данные обстоятельства делают проблему изучения патогенеза ХП 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 [68, 83, 147, 173].

Степень разработанности проблемы

В настоящее время имеется достаточно большое количество публикаций о роли иммунной системы в патогенезе ХП [43, 53, 54, 57, 58, 68, 82, 83, 113, 117, 147, 154, 199]. 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 [63, 65, 73]. 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 исследования

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 диагностических и лечебно-профилактических технологий.

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. Разработанная модель экспериментального пародонтита может быть использована для разработки новых схем патогенетической терапии.

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 (Москва, 2018 г., 2019 г.), Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (Москва, 2019 г.); Межрегиональном медицинском форуме УФО «Технологии

эффективного здравоохранения» в рамках международной выставки-форума «Здравоохранение Урала-2019» (г. Екатеринбург, 2019 г.); Межрегиональном медицинском форуме УФО «Технологии эффективного здравоохранения» в рамках международной выставки-форума «Здравоохранение Урала-2019» (г. Екатеринбург, 2019 г.).

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании исследования, анализе научной литературы, проведении экспериментов и лабораторных исследований, статистической обработке первичных данных и их анализе, написании статей и глав диссертации.

Разработка рабочей гипотезы, определение методологии и концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем Базарным В.В. Отбор пациентов осуществлялся сотрудниками кафедры терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ (Семенцовой Е.А., Светлаковой Е.Н.) в стоматологической клинике ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России.

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанная модель экспериментального ХП используется в отделе общей патологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ для разработки новых диагностических и лечебно-профилактических технологий.

Предложенный алгоритм лабораторного мониторинга включен в программы дополнительного профессионального образования на кафедрах клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФПК и ПП, терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ, клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава РФ. Разработанный способ

моделирования пародонтита включен в преподавании раздела «Воспаление» на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ. Результаты исследования внедрены в практику стоматологической поликлиники ФГБОУ ВО УГМУ. Учебное пособие «Лабораторное исследование ротовой жидкости и буккального эпителия» внедрено в научно-исследовательскую и практическую работу отдела «Лабораторно-диагностические технологии» ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора.

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 рисунком и 21 таблицей. Список литературы включает 200 источников, из них 56 отечественных, 144 зарубежных авторов.

Глава 1.

ХРОНИЧЕСКИЙ ПАРОДОНТИТ КАК МОДЕЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Современные представления о патогенезе хронического пародонтита

Хронический пародонтит — хроническое воспалительное заболевание, которое приводит к потере соединительной ткани пародонта и поддержки альвеолярной кости вокруг зубов. По данным ВОЗ, очень высокий уровень заболеваний пародонта отмечается в возрасте 35-44 лет (65-98%). Несмотря на успехи стоматологии, частота патологии пародонта, в частности – у молодежи, растет [1, 15, 24, 27, 29]. Многочисленные исследования показали, что нелеченый пародонтит может привести к потере зубов, что неизбежно приводит к снижению качества жизни [189].

Воспаление традиционно рассматривается патофизиологами как типический патологический процесс в ответ на повреждение, направленный на восстановление тканевого гомеостаза. Механизмы воспалительного процесса являются предметом исследований на протяжении веков, что приводит к периодическому пересмотру всей концепции воспаления.

В частности, в последние годы показано, что это тщательно организованный активный процесс [115], к числу ключевых регуляторов которого относятся цитокины. Именно они являются стимулами, регулирующими разрешение острых воспалительных реакций и тесно взаимосвязаны с медиаторами, инициирующими эти реакции [170]. Действуя как агонисты или частичные агонисты специфических рецепторов, связанных с G-белком (ChemR23, BLT1, ALX / FPR2, GPR32 и GPR18), цитокины вызывают целый спектр ответов для определенных типов клеток, которые в совокупности блокируют воспалительный процесс [153]. Важнейшими предпосылками для завершения воспаления являются прекращение воздействия провоцирующих факторов, торможение иммиграции лейкоцитов, катаболизм провоспалительных медиаторов, фагоцитоз, удаление апоптотических

клеток [108]. По причинам, которые недостаточно изучены, один или несколько из вышеупомянутых путей торможения воспаления могут быть недостаточно задействованы, что позволяет острой воспалительной реакции приводить к хронической патологии.

Изучение механизмов воспаления имеет прежде всего клиническое значение, поскольку несвоевременное или неадекватное его разрешение является патогенетической основой многих заболеваний.

Сказанное в полной мере относится к хроническому пародонтиту – одному из наиболее распространенных заболеваний, приводящим к снижению качества жизни человека. В современной концепции патогенеза данного заболевания важное место отводят цитокинам [2, 3, 63, 65]. Во всем мире растет количество публикаций по этой проблеме, но полученные данные часто противоречивы и не нашли пока достаточного применения в клинической практике. Кроме того, в патогенезе пародонтита важными участниками считают клетки крови и костной ткани, в то время как роль буккального эпителия четко не определена [83, 92, 131].

Этиология и патогенез ХП по-прежнему остаются предметом дискуссий. К настоящему времени сформировалось представление о том, что ведущим этиологическим фактором заболевания является нарушение микробиоты ротовой полости и формирование биопленок [16, 75].

К основным пародонтогенным микроорганизмам относят грамотрицательные палочки *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Actinobacillus* и другие. Они вызывают пародонтальное воспаление, которое связано с образованием бактериального налета [113]. В здоровой десневой щели эти микроорганизмы не определяются или находятся в очень малых количествах. Однако при отсутствии или плохой гигиене полости рта происходит накопление бляшек вокруг края десны (поддесневые бляшки), что приводит к воспалению (гингивиту) и к увеличению количества жидкости на дне десневой щели. Это обеспечивает питательными веществами бактерии, что способствует росту облигатных анаэробов, неспорообразующих грамотрицательных бактерий,

особенно при увеличении размеров десневой щели и формировании зубодесневых карманов [68].

Пародонтогенные микроорганизмы вызывают целый каскад иммунопатологических реакций в полости рта и в тканях пародонта, в частности. Острое воспаление, является физиологическим ответом на микробное воздействие для миграции иммунных клеток в место заражения, путем продуцирования цитокинов и хемокинов. Если инфекция не устраняется, то острый процесс переходит в хроническое поражение. Показано, что *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* из зубодесневых карманов увеличивают деструкцию альвеолярных костей [68, 96, 174].

Важная роль в развитии пародонтита принадлежит врожденному иммунитету. Фагоциты - макрофаги и нейтрофилы, имеют поверхностные рецепторы, которые распознают и связывают поверхностные молекулы бактерий [117, 135]. После распознавания микроорганизмов и посторонних веществ хемокины секретируются для привлечения фагоцитов. Система комплемента также генерирует биологически активные белки, включая анафилотоксины C3a, C4a и C5a, которые «притягивают» моноциты, лимфоциты и нейтрофилы. Белки комплемента также могут непосредственно уничтожать определенные бактерии. Гистамин-индуцированная вазодилатация тучными клетками увеличивает кровоток и миграцию фагоцитов [86, 93, 113].

Активация комплемента при хроническом происходит вследствие выработки бактериальными клетками полисахаридов (зимозан, липополисахарид - ЛПС), агрегированный IgA, с помощью фактора Р (правильдин). Бактериальные антигены активируют клеточный иммунитет - презентуются лимфоцитами, макрофагами и дендритными клетками [117].

Характеристике данных клеток при ХП посвящено значительное количество обзоров, в которых показаны довольно однозначные изменения. [30, 83, 145, 148, 194]. Активными участниками воспаления в пародонте являются Т-лимфоциты, которые подразделяются на основе клеточной экспрессии молекул CD4 или CD8. CD4 + Т-клетки (Т-хелперы) классифицированы как Т-хелпер I типа (Th-I), Т-

хелпер II (Th-II), «нулевые» клетки (Th-0), отличающиеся способностью секретировать цитокины [123, 135]. Th-I клетки участвуют в воспалительных реакциях, некоторые цитокины, обладают провоспалительной активностью, а также стимулируют цитотоксические клетки. Th-II синтезируют широкий спектр интерлейкинов (ИЛ) в ротовой жидкости, усиливают образование антител. Помимо всего, цитокины, выделяемые Th-I, способны подавлять активность Th-II, и наоборот Th-I-ответ усиливает фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [168]. Например, ИЛ-4 продуцируемый в ходе Th-II-ответа, активируют В-клетки и начинается выработка антител [105].

Прошлые исследования показали, что Th-I являются доминирующими клетками при гингивите, в то время как Th-II клетки являются доминирующими при пародонтите. Такой переход от эффективного клеточного иммунитета к нарушенному гуморальному называется парадигмой Th-I/Th-II [71]. В последнее время в литературе появились противоречивые данные об этой парадигме. Некоторые исследования демонстрируют высокую активность Th-I при пародонтите по сравнению с Th-II [187]; другие исследования показывают равное присутствие обеих этих Т-клеточных групп при прогрессирующих поражениях пародонтита [102].

В последние годы особое внимание в патогенезе воспаления придается Т-регуляторным клеткам (Treg). Они играют защитную роль при повреждении ткани, в частности - пародонта. Природные Treg представляют собой CD 25 - экспрессирующие Т-клетки, которые специфически регулируют активацию, пролиферацию и эффекторные функции активированных Т-клеток. Они обнаружены в РЖ при пародонтите. Цитокины, продуцируемые T-reg, обладают противовоспалительной активностью. В частности, ИЛ-10, ТФР-бета и другие уменьшают прогрессирование болезни [131]. Однако в литературе отмечается, что при ХП происходит нарушение цитокинового баланса, что приводит к прогрессированию болезни [83, 92].

Другой важной антигенпредставляющей клеткой является макрофаг. Классический воспалительный макрофаг активируется гамма-интерфероном и

ЛПС. Альтернативно активированные макрофаги являются важными клетками в разрешении воспаления – они уменьшают способность продуцировать провоспалительные цитокины [116, 135].

Переход от патологического процесса, в котором доминируют Т- и В-клетки, к активному воспалению (прогрессивному пародонту) недостаточно изучен. Известно, что дендритные клетки также экспрессируют основные молекулы системы HLA [61] класса II и обладают костной активностью. Уникальная способность В-клеток связывать и интернализировать антигены через их рецепторы иммуноглобулина имеет важное значение для активации Т-лимфоцитов, указывая на то, что в В-клетках присутствуют костимулирующие молекулы [123]. Стало ясно, что Т-клетки CD4 и некоторые врожденные иммунные клетки, такие как дендритные клетки, моноциты и нейтрофилы, прекрасно взаимодействуют через сети цитокинов [199].

Очевидно, что врожденные и адаптивные системы иммунитета участвуют в воспалительной реакции и деструкции тканей. При ХП отмечается дисбаланс различных звеньев иммунной системы и дисрегуляция механизмов воспаления, иммунитета и регенерации. Например, Т-клетки, выделенные из пораженных пародонтальных тканей, проявляют сниженный ответ на антигены/митогены, что указывает на депрессию клеточного иммунного ответа у пациентов с пародонтитом [81]. После пародонтальной терапии реакционная способность лимфоцитов возвращается к норме [58].

В последние годы особое внимание привлекает проблема функционирования Toll-подобных рецепторов (TLR) в норме и патологии. Они являются уникальными рецепторами, которые распознают микроорганизмы, точнее - множественные патоген-ассоциированные молекулярные структуры (РАМР), включая ЛПС, бактериальные липопроотеины и липотейхоевые кислоты, флагеллин, ДНК бактерий и вирусов, двухцепочечную РНК и одноцепочечную вирусную РНК. Кроме того, TLR распознают метаболиты бактерий [179]. Этот путь при участии Toll-подобных рецепторов, является одним из решающих этапов воспаления ткани пародонта [81, 175, 185].

Когда TLR связывают PAMP, инициируется серия внутриклеточных событий, приводящих к образованию цитокинов, хемокинов и антимикробных пептидов [156].

Считается, что TLR влияют на воспалительную реакцию в микроокружении кости и могут играть решающую роль в модулировании индуцированного воспалением остеокластогенеза и потери костной массы [11].

Было показано, что распознавание молекулярных структур посредством связывания с этими рецепторами, вызывает секрецию хемоаттрактантных белков, а именно хемокинов, которые, в свою очередь, привлекают нейтрофилы (Нф) в месте заражения (рисунок 1). Это обуславливает важнейший механизм воспаления – экссудацию и эмиграцию клеток. Экстравазированные нейтрофилы проникают в десневые ткани и затем попадают в щель между эндотелиальными клетками. Этот механизм опосредуется совместным действием высоко- и низкоаффинных адгезивных взаимодействий и подразумевает морфологические изменения в эндотелиальных клетках [157]. Тканевые цитокины усиливают экспрессию молекул эндотелиальной адгезии, тогда как хемокины, полученные из тканей, вызывают изменения со стороны интегринов лейкоцитов, что позволяет им приобретать высокое сродство [112]. Первоначальный контакт, а именно «связывание» с сосудистой стенкой и прилипание к эндотелиальным клеткам, опосредуется селектинами и их лигандами. L-селектин экспрессируется лейкоцитами, тогда как P- и E-селектины экспрессируются на активированных эндотелиальных клетках и тромбоцитах, тем самым замедляя скорость циркулирующих Нф способствуя плотному прилеганию к эндотелиальным клеткам. Благодаря взаимодействию с эндотелиальными контррецепторами $\beta 2$ -интегрины, а также ассоциированный с лимфоцитами антиген, играют важную роль в регулировании прочной адгезии Нф к эндотелию. Указанные события останавливают Нф на сосудистой стенке и это позволяет включить процесс диапедеза в инфицированную ткань [94, 111].

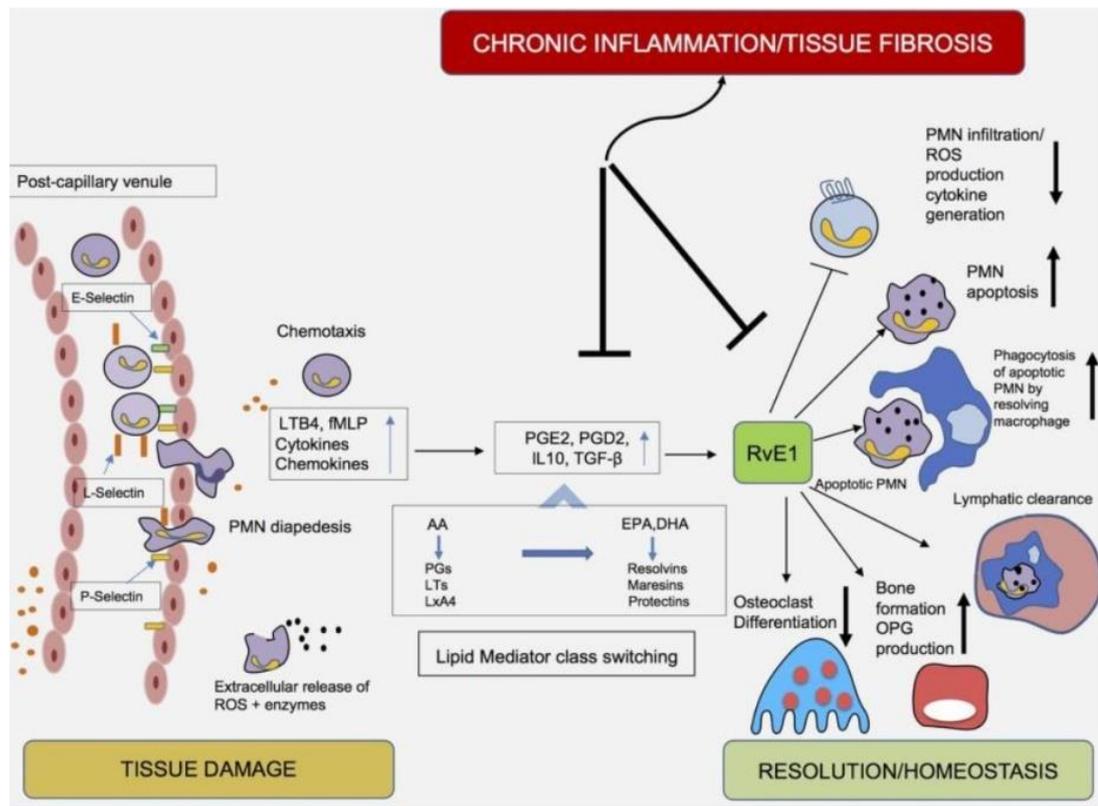


Рисунок 1 — Хроническое воспаление тканей пародонта при ХП (цитируется по Balta M.G. et al., 2017)

Таким образом Нф участвуют в нейтрализации патогена, поглощая их посредством фагоцитоза, высвобождая бактерицидные белки и супероксид-анион [111, 160]. Активированные лейкоциты в дальнейшем подвергаются апоптозу, а затем апоптотические тельца фагоцитируются макрофагами [101].

В последние годы открыт новый механизм антибактериальной защиты – формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек [4], но их вклад в патогенез ХП не изучен [192].

Регуляция лейкоцитарной реакции в очаге воспаления осуществляется с вовлечением механизмов обратной связи («петля» обратной связи), которые находятся под цитокиновым контролем. В частности, усиление экспрессии интерлейкина-23 подавляет генерацию ИЛ-17 и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и таким образом, снижает продукцию гранулоцитов в костном мозге и их миграцию в воспаленную ткань [57].

Данные процессы довольно типично протекают в различных тканях, в том числе пародонта. У пациентов с пародонтитом выявляется большое количество Нф в десневых тканях по сравнению со здоровыми лицами [122].

На более поздней стадии воспалительной реакции моноциты / макрофаги мигрируют в очаг воспаления, их рекрутирование стимулируют факторы, секретлируемые Нф [116]. Моноциты / макрофаги сменяют Нф в очаге воспаления и выполняют функции, связанные с устранением бактериальных стимулов, рекрутированием других клеток в очаг, образованием цитокинов / хемокинов и активация лимфоцитов, что относится к адаптивному иммунному ответу [140].

Можно полагать, что описанные выше процессы активации нейтрофильных, лимфоцитарных, моноцитарно/макрофагальных реакций, приводящих к воспалению и деструкции пародонтальных тканей, инициируются пародонтогенными микроорганизмами.

Например, выделяемые нейтрофилами цитокины, представляют собой низкомолекулярные белки, участвующие в инициации и последующих стадиях воспаления, в которых они регулируют активность и продолжительность реакции [118].

Одними из первых в очаге воспаления при пародонтите образуются цитокины, например, фактор некроза опухоли α (ФНО- α), ИЛ-1 β и ИЛ-4 [22, 34, 52, 182, 198]. Участие ФНО- α и ИЛ-1 β в патогенезе пародонтита хорошо изучено. ФНО- α , как провоспалительный цитокин иммунной системы играет, важную роль в патогенезе различных воспалительных состояний организма человека [69]. У этого воспалительного маркера есть некоторые другие действия, такие как: резорбция кости через ИЛ-1, стимуляция гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), ингибирование выработки коллагена, индукция коллагеназы внутри тканей и индукция дифференцировки остеокласта через ГМ-КСФ [129]. ФНО- α вызывает, прямо или косвенно, резорбцию кости и ингибирование ее образования [121]. ФНО- α и ИЛ-1 обладают сходными провоспалительными эффектами, детально описанными в научной литературе [182]. В частности, при ХП показано, что они повышают экспрессию

молекул адгезивности, способствуя миграции клеток, усиливают эндотелиально-нейтрофильные взаимодействия и выход лейкоцитов в ткань [119].

ИЛ-4 относится к числу противовоспалительных цитокинов, который индуцирует пролиферацию Т-клеток и регулирует секрецию антител В-лимфоцитами/плазмócитами. Он, как и другие ИЛ вовлечен в сложно организованную цитокиновую сеть, ингибирует продукцию провоспалительных агентов, таких как ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-2 и других [81]. Кроме того, ИЛ-4 ингибирует продукцию матриксных металлопротеиназ.

В патогенезе пародонтита и его прогрессировании важная роль принадлежит механизмам резорбции костной ткани, то есть превалированию остеокластических процессов над остеобластическими [89]. Потеря костной массы пародонта в ответ на инфекцию хорошо изучена. Этот механизм индуцируют как воспалительные цитокины, так и липополисахариды. Бактериальные продукты (ЛПС) непосредственно стимулируют резорбцию кости при добавлении к культурам предшественников остеокластов, содержащих остеобласты или стромальные клетки и кроме того, они индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов с остеорезорбтивной активностью [125].

В последние годы получены убедительные доказательства того, что наряду с коллагеназами важную роль в разрушении тканей пародонта играют матриксные металлопротеиназы (ММП). Они участвуют в физиологических процессах, таких как развитие тканей, ремоделирование и заживление ран. Установлено, что уровень ММП-8 и ММП-9 повышается в очаге пародонтального воспаления [8, 23, 26, 143], что ведет к деградации внеклеточного матрикса и сигнальных эффекторных клеток. То есть, выделяемые нейтрофилами ММП-8 и ММП-9 являются основным коллаген-деградирующими факторами при ХП [29, 20, 173].

Таким образом, хронический пародонтит – это воспалительное заболевание, в котором этиологические факторы бактериальной природы вызывают ряд реакций в организме, приводящие к воспалению. В дальнейшем у пациентов формируется хронический очаг воспаления, а в последствии – разрушение костной ткани. Активными участниками этих процессов являются цитокины.

1.2 Исследование ротовой жидкости как инструмент изучения локальных реакций тканей полости рта

Интерес к использованию биожидкостей, таких как ротовая и десневая жидкости в последнее десятилетие возрос. Несмотря на успехи клинической лабораторной диагностики, исследование альтернативных биожидкостей не применяется в практическом здравоохранении. Отсутствие стандартизованных алгоритмов к подготовке образцов, оценки полученных результатов, не дает полноценно воспользоваться возможностями этого материала. Неинвазивность и простота сбора образцов в сравнении с сывороткой и ликвором представляет большую диагностическую значимость при различных патологических состояниях. Изучение именно этих биожидкости вызывает особый интерес, так как они представляет собой среду, в которой на протяжении всей жизни находятся органы полости рта [4, 14, 21, 31, 34, 41, 42, 44, 46, 126, 147, 158].

Ротовая жидкость (РЖ) или смешанная слюна — биологическая жидкость, которая постоянно находится в полости рта, участвует в пищеварении, выполняет бактерицидную роль, осуществляет механическую очистку и защиту поверхности зубов и слизистой оболочки от бактериальных и химических воздействий, а также ряд других функций. Она включает в себя суммарные секреты околоушных, поднижнечелюстных, подъязычных и малых слюнных желез, а также содержимое зубодесневых бороздок, эпителиальные клетки, бактерии, лейкоциты (главным образом, из зубодесневых бороздок), а иногда и остатки пищи, кровь и вирусы.

Химический состав РЖ в норме и патологии достаточно изучен, он представлен водой, электролитами, ферментами, и многочисленными пептидами [28, 137].

Особое место в составе РЖ занимают иммуноактивные пептиды (бактерицидные белки, иммуноглобулины, интерфероны и другие цитокины), у здоровых лиц они помогают поддерживать гомеостаз пародонтальной среды [34, 149] Эпителиальные клетки десны, при воздействии бактерий, начинают активно вырабатывать пептиды [137]. Выявлено около двадцати генетических нарушений

связанных с экспрессией антимикробных пептидов при различных заболеваниях пародонта [146].

Широкий спектр молекул присутствующих в РЖ представляют ценную информацию для клинической диагностики системных заболеваний и может использоваться для выявления таких заболеваний как Синдром Шегрена, рассеянный склероз, саркоидоз [183]. Имеются данные об определении уровней биомаркеров в РЖ при сердечно сосудистых заболеваниях (острый коронарный синдром), болезни коры надпочечников, новообразований [136]. В последние годы показана диагностическая значимость некоторых иммунологических показателей РЖ при вирусных поражениях ротовой полости. Проведен анализ оценки параметров РЖ не только в диагностике, но и в оценке эффективности лечения [31, 33, 67].

Данные показывают, что исследования биологических маркеров в РЖ позволяют оценивать локальные патофизиологические процессы в полости рта.

Хронические воспалительные заболевания слизистой оболочки полости рта (СОПР), тканей пародонта и парасимпатических вегетативных ганглиев (прежде всего – крылонебных) справедливо считаются одной из распространенных патологий, которые, в частности, являются наиболее частой причиной потери зуба, рецидивирующих болей, снижения качества жизни [31,33, 62, 195].

Этим объясняется интерес к механизмам антимикробной защиты слизистой оболочки полости рта. В ряде исследований последних лет показана активация как локальной, так и системной воспалительной реакции. При этом не всегда выявлены изменения лабораторных показателей крови даже при тяжелых (агрессивных) пародонтитах [180].

По мнению ряда исследователей, изменение скорости продукции РЖ и ее состава приводят к нарушению состояния механизмов иммунной защиты ротовой полости и развитию воспалительных заболеваний (дентальный кариес и другие). В то же время, при ряде патологических состояний в полости рта уровень факторов иммунной защиты повышается, например, секреторного иммуноглобулина А при пародонтите [62]. Однако несмотря на то, что исследование данной биожидкости может быть неинвазивным и эффективным

методом лабораторной иммунодиагностики, следует признать, что диагностическая ценность иммунологического исследования РЖ до конца не расшифрована и требует дальнейших поисков.

Особый интерес вызывает исследование РЖ при ХП. Это связано с тем, что пародонтит в настоящее время диагностируется с использованием рентгенографии и клинических измерений таких как, глубины зондирующего кармана, кровоточивость при зондировании и клинического уровня прикрепления. Однако эти традиционные клинические измерения занимают много времени и дают ограниченную информацию, поскольку они являются показателями предшествующего пародонтального заболевания, а не активности настоящего заболевания. Более того, они неадекватны для прогнозирования групп риска [127]. Существует необходимость диагностировать пародонтит на начальных этапах, используя простой, безопасный и легкодоступный метод. РЖ является оптимальным кандидатом в качестве исследуемой жидкости, которая соответствует многим параметрам. На сегодняшний день имеются сообщения о исследовании десневой жидкости с использованием такого метода, как иммунохроматография [143].

Сбор РЖ безопасен, может собираться повторно с минимальным дискомфортом для пациента. Ряд перспективных биомаркеров уже идентифицирован в РЖ, которые коррелируют с клиническими параметрами пародонта [147]. В частности, РЖ содержит локальные и системные медиаторы, которые могут быть использованы в оценке патологии пародонта. Большинство биомаркеров РЖ являются индикаторами воспалительных реакций, другие свидетельствуют о резорбции альвеолярной кости [147, 158].

Среди иммуноактивных белков РЖ при ХП активно изучаются цитокины, так как рядом авторов существенная роль в патогенезе отводится цитокинам. Так, при анализе библиографической базы данных PUBMED большое количество статей посвящено цитокинам в РЖ при пародонтите.

Цитокины являются ведущими медиаторами воспалительного процесса, контролируя иммунный ответ на всех этапах воспаления, начиная от инвазии

пародонта микроорганизмами и заканчивая деструкцией альвеолярной кости. [118].

Ведется сбор информации об изменении различных показателей в РЖ при заболевании пародонта, сопутствующей патологии (таблица 1).

Таблица 1 — Изменения содержания показателей РЖ при воспалительных заболеваниях пародонта

Показатель	Характер изменения	Источник данных
Альбумин	Повышение при патологии пародонта	[159, 191]
cIg A	Повышение при пародонтите	[34, 54, 88]
ИЛ-6	Повышается при пародонтите, СД1, после дентальной имплантации	[52, 54, 78, 154]
ФНО- α	Повышается при пародонтите, СД 1, гингивит, после дентальной имплантации, воспалительных заболеваниях слизистой оболочки полости рта (афтозный стоматит)	[22, 37, 52]
Лактоферрин	Повышается при герпесвирусной инфекции, воспалительных заболеваниях слизистой оболочки полости рта (афтозный стоматит)	[14, 42]
IgG	Повышается при воспалительных заболеваниях слизистой оболочки полости рта (афтозный стоматит), не изменяется воспалительных заболеваниях пародонта	[34, 42, 54]
IgM	Повышается при воспалительных заболеваниях слизистой оболочки полости рта (афтозный стоматит), пародонтите, не изменяется воспалительных заболеваниях пародонта	[34, 42, 54]
ИЛ-1	Повышение при пародонтите, гингивит, СД1, хронический апикальный периодонтит, после дентальной имплантации	[52, 70, 78]
ИЛ-4	Повышается при пародонтите, после дентальной имплантации, не изменяется воспалительных заболеваниях пародонта	[37, 54, 103]
ИЛ-10	Повышается при гингивите, пародонтите	[33, 133]
ИЛ-12	Повышение при гингивите	[33]
ИЛ-8	Повышается при пародонтите, хроническом апикальном периодонтите	[21, 22]

Однако клиническое использование этих данных в диагностике пародонтита пока проблематично. Вопрос поиска высокочувствительных маркеров сохраняет свою актуальность.

1.3 Буккальный эпителий как модель для оценки клеточных реакций

Цитологическое исследование буккального эпителия (БЭ), выстилающего полость рта, используется в исследовательской практике, медико-генетическом консультировании и редко – в рутинной цитологической диагностике. Однако в последние годы накапливаются данные о возможности оценки цитоморфометрических характеристик эпителиальных клеток полости рта для изучения локальных и системных реактивных и патологических процессов [5, 72, 163]. Так, например, плоский неороговевающий эпителий, выстилающий слизистую оболочку полости рта, в качестве диагностического материала, в последнее время привлекает все больше внимание, так как было установлено, что он является индикатором оценки патологических процессов пищеварительного канала, иммунного статуса организма, общего уровня активности и пролиферации клеточных систем [46, 79, 110]. Обладая чувствительностью к различным экзогенным и эндогенным воздействиям, буккальный эпителий подвергается морфофункциональным изменениям при различных нарушениях локального и системного гомеостаза [45]. Однако в большинстве случаев диагностика первичных и вторичных поражений слизистой оболочки полости рта осложняется, поскольку клиническая картина неспецифична и часто нивелируется дополнительными неблагоприятными местными — недостаточная гигиена, травма, вторичная инфекция и общими — гиповитаминозы, соматическая патология факторами.

В полости рта можно выделить три типа многослойного эпителия: плоский неороговевающий, плоский ороговевающий путем ортокератоза, плоский ороговевающий путем паракератоза (рисунок 2).

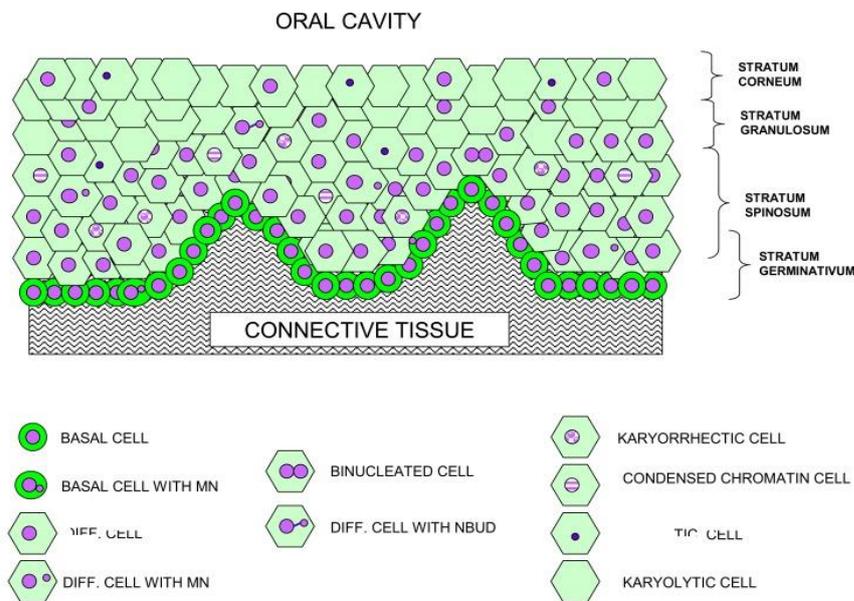


Рисунок 2 — Схема послойного строения эпителия слизистой оболочки щеки (цитируется по Migliore L. et al., 2011)

Цитограмма БЭ здорового человека включает нормальные эпителиальные клетки (в основном – промежуточные и поверхностные, а базальные клетки встречаются в цитологических препаратах редко). Промежуточные имеют полигональную форму, ядро клетки пузырьковидное, с четкой структурой хроматина, размером не более 6 мкм. Поверхностные клетки крупные, полигональной формы, около 50 мкм в диаметре. Ядро в клетках поверхностного слоя имеет круглую, либо овоидную форму и располагается, как правило, эксцентрично. Его размеры от 8 до 15 мкм. Ядерно-цитоплазматический индекс 1/7-1/9 [139].

Анализируя данные литературы, цитоморфологические изменения клеток БЭ в условиях воздействия экзогенных факторов и при патологии можно условно разделить на 4 группы.

1. Цитогенетические аномалии — показатели нестабильности генома.

Микроядра — это хроматиновые округлые тела с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, лежащие отдельно от основного ядра, не преломляющие свет, с интенсивно окрашенным рисунком хроматина, как у основного ядра, и находящиеся в одной плоскости с ядром. Микроядро может быть образовано фрагментом хромосомы в результате повреждения ДНК.

Повышение частоты клеток с микроядрами может свидетельствовать об индукции хромосомных и, в результате, возможно и генных мутаций при нарушении последовательности считывания нуклеотидов. Микроядро может быть результатом повреждения веретена деления (нарушение белкового аппарата клетки) и образовано одной или более целыми хромосомами, отставшими в анафазе митоза и не вошедшими в основное ядро. В этом случае микроядро содержит количество центромер, соответствующее числу вошедших в него хромосом. Появление таких микроядер характеризует изменение числа хромосом в основном ядре и указывает на геномные мутации. Микроядра, образованные в результате разрыва ДНК имеют значительно меньший размер по сравнению с микроядрами, образованными одной или несколькими целыми хромосомами [5, 13, 17, 48, 49, 53].

Протрузии могут быть образованы фрагментами хромосом или отставшими при нарушении веретена деления целыми хромосомами, ядерная оболочка вокруг которых соединилась с ядерной оболочкой основного ядра. Некоторые протрузии образуются при «выбухании» в интерфазном ядре длинных плеч маркерных дицентрических хромосом. Могут быть образованы почкованием интерфазных ядер, в связи с отсутствием в ядре и клетке амплифицированной ДНК и элиминации из ядра ДНК-репарационных комплексов [56].

2. Показатели пролиферации.

Двухядерные клетки образуются, преимущественно, в результате полиплоидизирующего незавершенного ацитокINETического (без цитотомии) митоза. Образование двухядерных клеток может происходить в результате прямого деления ядра - амитоза или путем слияния двух одноядерных клеток. При воздействии факторов разной природы частота таких клеток изменяется. Увеличение частоты двухядерных клеток происходит при токсическом действии многих химических соединений. Частота двухядерных клеток увеличивается при воспалении, при онкогенных процессах в организме. Биологическое значение увеличения частоты двухядерных клеток в ответ на действие токсических веществ, состоит в том, что они образуются в процессе увеличения клеточной пролиферации, направленной на образование новых клеток, замещающих

поврежденные или погибшие. Таким способом осуществляется клеточная восстановительная регенерация. Полиплоидизация клеток – важный и нередко основной фактор постнатального роста тканей. При этом полиплоидия выступает как эквивалент клеточного размножения. С одной стороны, у таких клеток выше функциональная активность, а с другой – генетическая защищенность, поскольку полиплоидизация придает клеткам устойчивость при возникновении аберрантного генома. Клетки со сдвоенными ядрами являются полиплоидными и служат индикатором пролиферативной активности. Но, по-видимому, они, как и двуядерные клетки, образуются в процессе незавершенного митоза в результате повреждения веретена деления, и при этом нарушена не только цитотомия, но и кариотомия. В результате оба ядра остаются плотно соединенными между собой [48, 49].

3. Показатели апоптоза.

Значение апоптоза состоит в элиминации клеток, прошедших жизненный цикл или функционально неполноценных и поддержание постоянного количества клеточных элементов в органах и тканях организма. Тем самым апоптоз наряду с пролиферацией обеспечивает физиологическую регенерацию ткани. Интенсивность апоптоза регулируется генетически. Морфологически апоптоз начинается с разрушения ядра клетки. При действии определенных факторов опосредовано, через воздействие на генетический аппарат, апоптоз может усиливаться или снижаться. Механизмы и значение апоптоза и некроза различны. Некроз клеток однозначно трактуют, как цитотоксический процесс [90]. Апоптоз контролируется генетически, поэтому некоторые авторы относят изменение интенсивности апоптоза к генотоксическим событиям [36].

4. Дегенеративно-дистрофические изменения.

Перинуклеарная вакуоль – высветленный участок цитоплазмы округлой формы с четкими границами, расположенный вблизи ядра и вызывающий смещение хроматина, или расположенный над ядром светлый участок с размытыми границами. Перинуклеарная вакуоль может образоваться как полость в межмембранном пространстве кариолеммы. Иначе этот показатель называют инвагинацией кариолеммы. Образование перинуклеарной вакуоли

сопровождается более бледным окрашиванием цитоплазмы, появлением других вакуолей в цитоплазме. Перинуклеарные вакуоли считают признаком некроза клетки.

Конденсированный хроматин (гетерохроматин) представлен конститутивным (постоянным), который составляет 10-15% от объема ядра, и факультативным, который образуется при компактизации неактивного эухроматина. В эксфолиативных клетках значительная степень компактизации хроматина является началом деструкции ядра и клетки.

Кариорексис — дегенеративное изменение ядра в клетке, сопровождающееся распадом его на отдельные интенсивно окрашенные части с гомогенной структурой, которые после лизиса кариолеммы попадают в цитоплазму и подвергаются рассасыванию. Морфологически кариорексис представляет собой клетку с несколькими крупными или многочисленными мелкими плотными окрашенными фрагментами ядра в цитоплазме.

Кариолизис — дегенеративное изменение ядра в клетке, сопровождающееся потерей способности к окрашиванию хроматина с последующим полным его исчезновением. Морфологически представляет собой клетку с гомогенной бледной окраской ядра и нечеткой, разрушающейся кариолеммой (ранняя стадия кариоли-зиса) или клетку с полным отсутствием окраски ядра, когда на фоне окрашенной цитоплазмы она имеет вид тени (полная стадия кариолизиса).

Кариолизис – это окончательным этапом деструкции ядра. Морфологически это состояние выглядит как очень бледно окрашенный гомогенный хроматин, от ядра остается лишь «тень». Возможен вариант кариолизиса, при котором гомогенный хроматин слабо окрашен на одной стороне ядра, тогда как на второй стороне остается только «тень ядра» [56, 48].

Таким образом, подсчет цитограммы БЭ с выявлением различных типов клеток (промежуточные, базальные и др.), а также выявление цитогенетических аномалий (микроядра и др.) позволяет оценивать реактивность слизистой оболочки полости рта в ответ на действие токсических и радиационных факторов при воспалении и других патологических процесса. Однако, несмотря на то что

ткани слизистой щеки контактирует с очагом инфекции при ХП, состояние БЭ изучено недостаточно [18].

Исследование БЭ вызывает большое интерес ученых по всему миру. В 1997 году был создан проект HUMN XL (HUMAN MicroNucleus project on eXfoliated buccal cells, <http://ehsdiv.sph.berkeley.edu/holland/humn/> посвященный микроядерному тесту слущивающихся клеток ротовой полости). Это обусловлено тем, что микроядерный тест клеток слизистой оболочки ротовой полости позволяет проводить экспресс-оценку без использования инвазивных методов диагностики, позволяет проводить прижизненное обследование неограниченное число раз, не требует специального оборудования для культивирования клеток, при этом эффективно отражает степень воспалительного процесса. Суть метода состоит в регистрации клеток, имеющих в своем составе микроядра, протрузии и другие нарушения, что является практически значимым и высокоинформативным диагностическим показателем многих заболеваний.

Следует принять во внимание факт, что микроядерный тест слущивающихся эпителиоцитов ротовой полости позволяет проводить экспресс-оценку без использования инвазивных методов диагностики и использования дорогостоящего оборудования, при этом эффективно отражая степень воспалительного процесса [60].

Микроядерный тест буккального эпителия слизистой оболочки щеки используется в качестве биомаркера для выявления воздействия окружающей среды (например, пестицида, мышьяка и формальдегида), генетических повреждений при терапевтическом вмешательстве (например, лучевой терапии и / или химиотерапии) или факторов естественной жизни (например, недоедания, или потребления алкоголя и табака), а также используется для выявления врожденных генетических дефектов восстановления ДНК [97, 104, 130]. Отдельные исследования проводятся с использованием морфологической оценке буккального эпителия при болезни Альцгеймера, сахарный диабет 2 типа, талассемия [79, 80, 166, 186].

Исследования БЭ при различной патологии (в том числе – не связанной с челюстно-лицевой областью) закономерны. Это связано с тем, что данная

клеточная популяция формирует пограничную зону между внутренней и внешней средой организма. Букаральные эпителиоциты являются довольно реактивными клетками, поэтому они «чутко» реагируют на воздействие эндогенных и экзогенных факторов.

Поэтому оценка цитологических особенностей БЭ может найти широкое применение не только в качестве метода неинвазивной диагностики, но и для изучения нарушений реакций системного и локального гомеостаза.

Резюме

Воспаление пародонта, по устоявшемуся мнению многих патологов, представляет собой ответа организма на нарушение гомеостаза ткани после инфицирования пародонтогенными микроорганизмами [68]. Его основными участниками являются клетки иммунной системы и цитокины. На всех этапах хронического пародонтита цитокины контролируют комплекс реакций повреждения и восстановления, начиная от инвазии пародонта микроорганизмами и заканчивая деструкцией альвеолярной кости. Несмотря на доказанное участие цитокинов и других факторов иммунной системы, в литературе имеются разнообразные по этому вопросу, что требует дальнейшего изучения механизмов реактивности при ХП с целью совершенствования патогенетической концепции заболевания.

Цитокины являются медиаторами межклеточных взаимодействий. Логично предположить, что они могут оказывать влияние не только на пародонтальные ткани, но и буккальный эпителий. Данные о состоянии БЭ ограничены исследованиями изменения его адгезивных (колонизационных) свойств.

Цитокины изучались в основном в крови, реже в РЖ. Ограниченное число исследований описывает системные и локальные реакции при ХП. Многими выявленные изменения лабораторных параметров требуют как патофизиологической интерпретации, так и уточнения их диагностической ценности.

Глава 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Работа является клинико-экспериментальным исследованием, проводилась в два этапа — экспериментальный и клинический.

Необходимость экспериментального исследования на животных была связана с поставленной задачей оценки системных и тканевых реакций организма при ХП. Это предполагало определение лабораторных показателей крови, морфологических особенностей тканей, что включало инвазивные для пациента вмешательства. Поэтому для решения данной задачи была создана экспериментальная модель пародонтита на лабораторных животных.

Клинические исследования на пациентах и добровольцах проводились с целью изучения локальных реакций тканей полости рта и разработки алгоритма лабораторной диагностики ХП с использованием неинвазивных методик. Дизайн исследования представлен на рис.3.

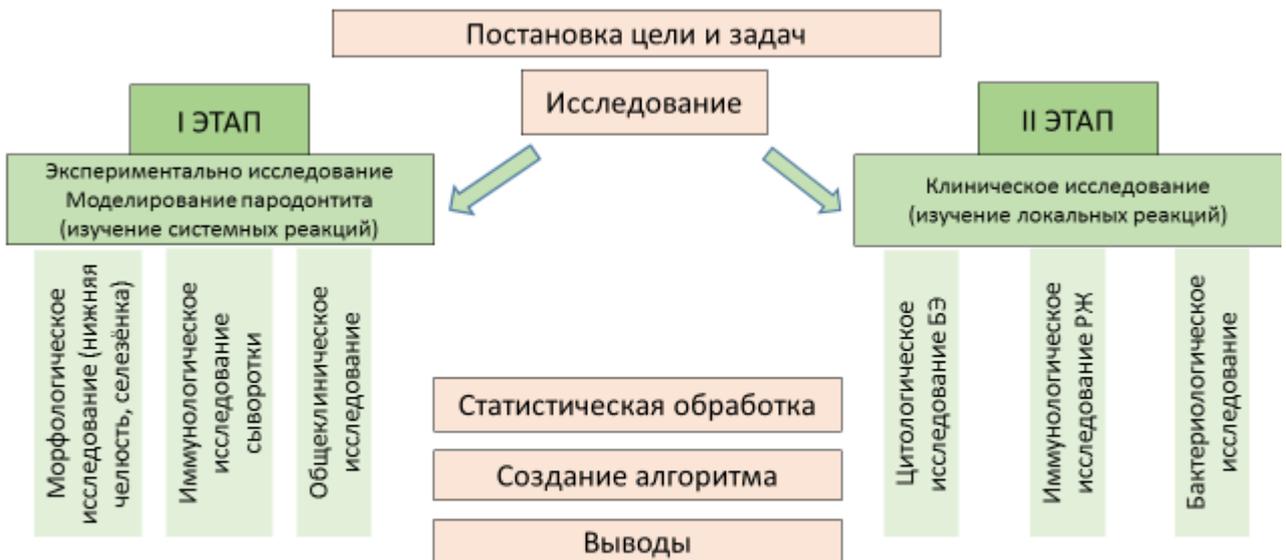


Рисунок 3 — Дизайн исследования

2.2 Характеристика экспериментального исследования

Исследование проведено на 40 белых крысах-самцах подтипа линии Вистар массой 170-220 г.

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, Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях №123, от 18.03.1986 и протокола к ней от 22.06.1998, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» Международного совета медицинских научных организаций (CIOMS), 1985 года.

Болезненные манипуляции животным выполняли в условиях контролируемого наркоза.

Дизайн экспериментального исследования, его новизна, допустимость и приемлемость были утверждены на заседании локального этического комитета ФГБУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ от 16.12.2016 (протокол № 10). Крыс содержали в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. Животные содержались при температуре 18 - 20,5°C, при естественном световом цикле, на стандартной диете, при свободном доступе к воде и пище. В эксперимент отбирали только здоровых животных, прошедших двухнедельную адаптацию к условиям вивария.

Животные были разделены на 2 группы: контрольная (интактные крысы) и основная – с экспериментальным хроническим пародонтитом (описание модели ниже).

2.3 Моделирование экспериментального пародонтита

В настоящее время описано несколько моделей экспериментального пародонтита (ЭП) на лабораторных животных.

Модели, основанные на «хирургической» (механической) травматизации тканей пародонта, например, – хирургической иглой, вызывающей воспаление [32, 47]. Подобные модели нельзя признать полностью адекватными, поскольку они хотя и вызывают травматическое повреждение тканей пародонта, но не воспроизводят всех патогенетических механизмов заболевания, особенно – остеокластическую резорбцию. Кроме того, доказано, что одним из основных этиологических факторов ХП являются пародонтогенные микроорганизмы [75, 113] что не учитывается в данной модели.

1. Модели ЭП, основанные на лигатур-индуцированных нарушениях микроциркуляции в тканях пародонта. Такой подход наиболее часто описывается в зарубежной литературе [95, 98, 197]. Для этого авторы предложили использовать «лигатурную модель», суть которой сводится к наложению шелковой, хлопковой лигатуры или витой проволоки вокруг зуба, что приводит к нарушению микроциркуляции, ишемии маргинальных периодонтальных тканей и облегчает накопление зубного налета, увеличение роста бактерий, что в дальнейшем вызывает развитие пародонтита [74].

2. Химические модели. Травматическое и инфекционное повреждение некоторые исследователи заменили на химическое повреждающее воздействие. Так, например, в опытах на белых крысах была воспроизведена экспериментальная модель пародонтита с помощью хронического введения клотримазола - ингибитора цитохрома P450-ароматазы [74]. Иногда для этой цели используют введение этилового спирта или стероидов, усиливающих резорбцию костной ткани [38, 39].

3. Инфекционная модель. Принято считать, что одним из главных этиологических факторов заболевания являются пародонтогенные микроорганизмы - *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. Denticola* [151], поэтому ряд

исследователей предлагают инфицирование ротовой полости животных культурой *Porphyromonas gingivalis* в течение 10 дней [55, 169]. Признавая эффективность такой модели следует отметить, что развитие ХП связано не только с инфектом, но и с реактивностью макроорганизма, которая может не изменяться при стандартном содержании крыс в виварии.

4. «Иммунологическая модель». Учитывая важную роль иммунной системы в развитии хронического воспаления и ремоделировании костной ткани, имеется положительный опыт воспроизведения ЭП с помощью иммунодепрессантов, в частности – циклоспорина [91], но и такой подход не воспроизводит всего разнообразия патогенетических механизмов ЭП, позволяя лишь углубленно изучить значение иммунореактивности.

У данных моделей имеются недостатки, связанные с тем, что в них не учитываются все основные этиологические факторы развития пародонтита.

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 мкг ксилазина, 0,15 мкг 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, 3M ESPE), отсвечивали ее при помощи фотополимерной лампы Elipar S10, накладывали ортодонтическую проволоку и фиксировали ее при помощи жидкотекучего композиционного материала Filtek™ Ultimate Flowable (3M ESPE) (рисунок 4).

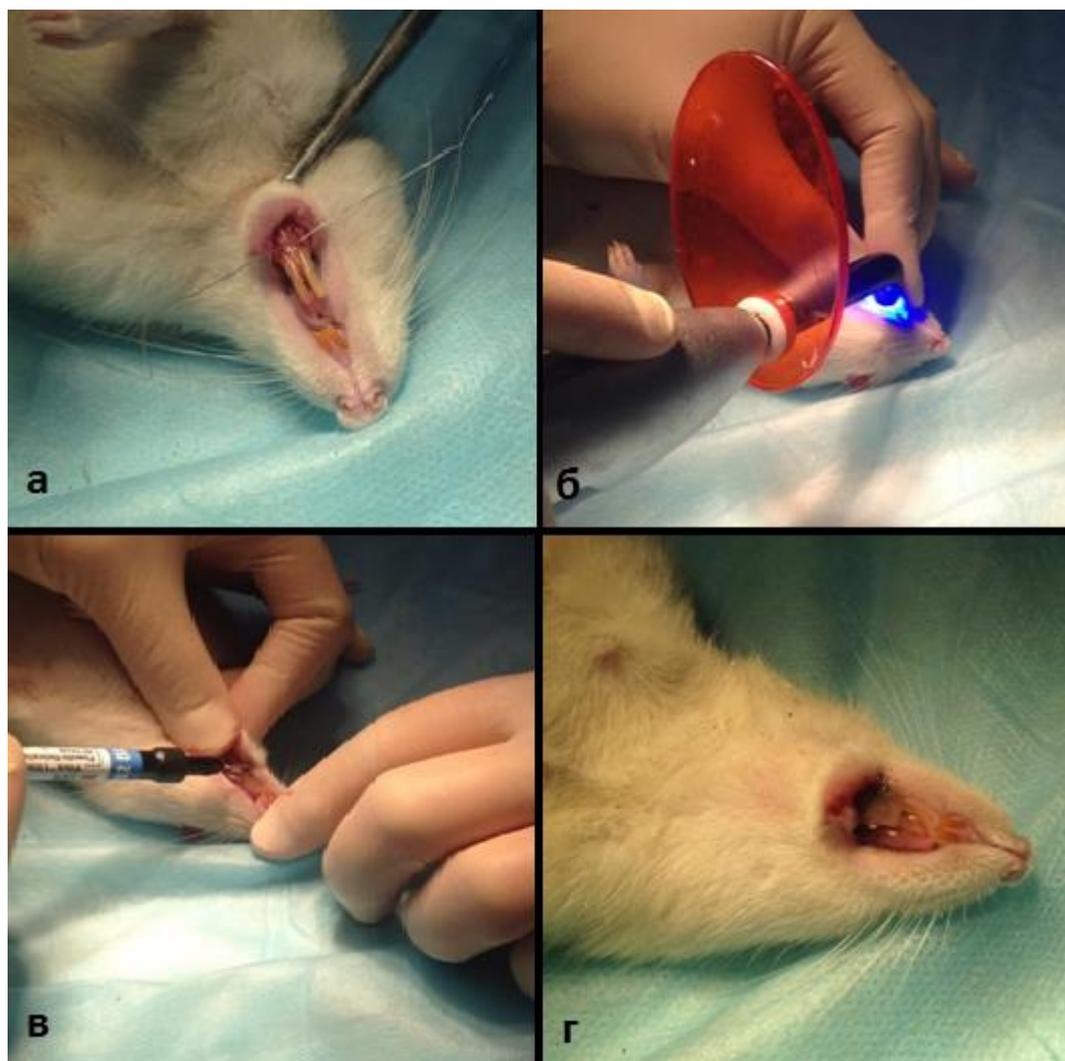


Рисунок 4 — Моделирование пародонтита у крыс: а, в) наложение ортодонтической проволоку и фиксация при помощи жидкотекучего композиционного материала; б) отсвечивание при помощи фотополимерной лампы

2.4 Характеристика клинического исследования

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/>].

Критерии включения пациентов в исследование:

- возраст от 18 до 55 лет;
- общесоматическое состояние пациентов в стадии компенсации;
- пациенты, обратившиеся в стоматологическую поликлинику УГМУ с жалобами на кровоточивость десен;
- пациенты на поддерживающей пародонтальной терапии.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- беременность;
- лица моложе 18 лет;
- химиотерапия, наличие онкологического заболевания;
- курение;
- прием гормональных препаратов в том числе гормональных контрацептивов;
- тяжелая соматическая патология в стадии декомпенсации.

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 2018 (Needeleman, Tonetti et al.) году на основе стадии процесса, определяемой степенью тяжести (в зависимости от уровня потери клинического прикрепления, рентгенологической потери костной ткани и потери зуба) (таблица 2).

Контрольная группа представлена 107 практически здоровыми добровольцами.

Таблица 2 — Распределение пациентов с хроническим пародонтитом

Степень тяжести (Ереван, 1983г/ Амстердам, 2018 Needeleman et al.)	Потеря прикрепления, измеренная интрадентально (глубина зондирования)	Рентгенологическая потеря костной ткани	Подвижность зубов
Легкая/II стадия	до 4 мм	корональная треть до 33%	отсутствие подвижности
Средняя/III стадия	до 5,5 мм	Распространение до середины или апикальной трети корня зуба	подвижность по причине пародонтита менее 4 зубов
Тяжелая/IV стадия	более 6 мм	Распространение до середины или апикальной трети корня зуба	подвижность по причине пародонтита более 5 зубов

При проведении исследований соблюдались этические принципы, принятые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2000). Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом УГМУ, выписка из протокола № 10 от 16 декабря 2016 г.

Клиническое обследование пациентов с ХП начинали с анализа жалоб: кровоточивость, болезненные ощущения, зуд, чувство дискомфорта в области десен, изменение цвета, формы, рельефа десневого края; связь жалоб с приемом пищи, чисткой зубов, разговором, приемом медикаментов, использованием конкретных средств гигиены полости рта; подвижность зубов; неприятный запах изо рта; общие жалобы (недомогание, субфебрильная температура, нарушение сна, нарушение социализации и др.). При осмотре преддверия полости рта, оценивали его глубину, уровень прикрепления, длину тяжей и уздечек губ, языка, характер взаимоотношения зубных рядов. Обращали внимание на гигиеническое состояние полости рта, интенсивность поражения зубов кариесом, наличие

дефектов зубного ряда, наличие и состояние зубных протезов, пломб. Целевое пародонтологическое обследование начинали с осмотра и зондирования десны, оценивали ее цвет, контуры, плотность прилегания десневого края, состояние межзубных сосочков и прикрепленной десны, наличие или отсутствие кровоточивости при зондировании. С помощью градуированного пуговчатого пародонтального зонда исследовали наличие поддесневого зубного камня, глубину пародонтального кармана, клиническую потерю прикрепления, рецессию десны.

Для объективной оценки состояния пародонта использовали рентгенологическое исследование: ортопантомография (аппарат ORTOPHOS3 (Sirona) Германия). Рентгенологический метод - занимает особое место в диагностике заболеваний пародонта, так как он позволяет выявить степень поражения кости, характер процесса.

У пациентов оценивались стоматологические индексы:

1. КПУ зубов – сумма кариозных, пломбированных и удаленных зубов у одного пациента.

2. Упрощенный индекс гигиены полости рта *OHI-S* (Green – Vermillion, 1964), для чего обследовали вестибулярные поверхности 1.6, 1.1., 2.6, 3.1 зубов и язычные поверхности 3.6 и 4.6 зубов после окрашивания их раствором Люголя. Определение зубного налета проводили визуально, полученные значения складывались, сумма делилась на количество обследованных поверхностей с последующим суммированием обоих значений (зубного налета и зубного камня).

$$OHI-S = \frac{\text{сумма значений налета (ЗН)} + \text{сумма значений камня (ЗК)}}{\text{количество поверхностей} + \text{количество поверхностей}}$$

Коды выявляемых результатов представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Оценочные критерии упрощенного индекса гигиены

Зубной налет (ЗН)		Зубной камень (ЗК)	
Признаки	Коды	Признаки	Коды
ЗН не обнаружен	0	ЗК не обнаружен	0
Мягкий ЗН покрывает 1/3 поверхности зуба и/или плотный коричневый налет (любое количество)	1	Наддесневой ЗК покрывает 1/3 поверхности зуба	1
Мягкий ЗН покрывает 2/3 поверхности зуба	2	Наддесневой ЗК покрывает 2/3 поверхности зуба и/или поддесневой ЗК в виде отдельных конгломератов	2
Мягкий ЗН покрывает >2/3 поверхности зуба	3	Наддесневой ЗК покрывает >2/3 поверхности зуба и/или поддесневой ЗК – пришеечную часть зуба	3

Для оценки индекса гигиены использовали следующие критерии:

0 – 0,6 – хороший уровень гигиены полости рта;

0,7 – 1,6 – удовлетворительный уровень гигиены полости рта;

1,7 – 2,5 – неудовлетворительный уровень гигиены полости рта;

2,6 и более – плохой уровень гигиены полости рта.

В норме значения индекса ОНІ-S не должны превышать 1,61 [10].

3. Папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА) в модификации С. Parma (1960) вычисляли путем суммирования оценок состояния окрашенной раствором Шиллера – Писарева десны у каждого зуба. Индекс РМА рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{РМА} = \frac{\text{Сумма баллов}}{3 \times \text{число зубов}} \times 100 \%$$

Индекс РМА позволяет выявить наличие и распространенность воспаления в десне, т.е. является индексом тяжести гингивита. Интенсивность окрашивания десны оценивали по следующим критериям: отсутствие воспаления – 0 баллов; воспаление только десневого сосочка (Р) – 1 балл; воспаление маргинальной

десны (М) – 2 балла; воспаление альвеолярной десны (А) – 3 балла. При определении тяжести гингивита использовали следующие оценочные критерии: 30% и менее – легкая степень тяжести гингивита; 31 – 60% – средняя степень тяжести гингивита; $\geq 61\%$ - тяжелая степень гингивита.

4. Пародонтальный индекс Рассела (ПИ) отражает воспаление десны, образование карманов с последующей резорбцией альвеолярной кости, фактическую потерю функции зуба.

Критерии оценки в баллах каждого зуба оценивают по схеме:

0 – интактный пародонтит;

1 – легкий гингивит, воспаление десны не охватывает зуб циркулярно;

2 – гингивит по всему периметру зуба, без нарушения целостности зубодесневого соединения;

4 – начальная степень резорбции межзубных перегородок (оценка дается только рентгенологически);

6 – воспаление десны, имеется пародонтальный кармана, зуб устойчив, его функция не нарушена;

8 – выраженная деструкция тканей пародонта с потерей жевательной функции (зуб подвижен, возможно смещение), резорбция превышает длины корня, возможно определение внутрикостного кармана.

Сумма баллов

ПИ= -----

Число обследованных зубов

Оценка индексов.

0,1 — 0,2 балла — клинически здоровая десна;

0,3 — 1,5 балла — гингивит;

1,5 — 4,0 балла — пародонтит средней степени тяжести;

4,0 — 8,0 балла — пародонтит тяжелой степени тяжести.

Клиническое обследование и лечение пародонтологических больных проведено в стоматологической клинике ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (врачи – к.м.н. Семенцова Е.А и к.м.н. Светлакова Е.Н., главный врач – д.м.н. Мягкова Н.В.).

2.5 Лабораторные исследования

2.5.1 Исследование ротовой жидкости

РЖ – это удобный биологический анализ, который имеет ряд преимуществ по сравнению с сывороткой крови. В частности, ее получение производится неинвазивно и с минимальным дискомфортом для пациента. Поскольку РЖ в лабораторной медицине считается «нестандартизированной» то при ее исследовании особое внимание следует уделять преаналитическому этапу.

Нестимулированную ротовую жидкость (РЖ) получали не ранее чем через 3 часа после приема пищи и полоскания полости рта, собирали в пробирки SalivaCapsSet. Пробирки маркировались и замораживались и хранились при температуре -20 С. Перед исследованием биологических материал размораживался и центрифугировался 10 минут при 1500 оборотов/мин. с использованием лабораторной центрифуги ЦЛМН-Р10-01-«Элекон».

Лабораторное исследование РЖ включало анализ физико-химических свойств и иммунохимический анализ.

Физико-химические свойства определяли с помощью технологии «сухой химии» с использованием диагностических тест плосок UroColor 10. Для оценки результатов применяли отражательный фотометр Clinitek Status+ (Siemens). Изучаемые параметры включали:

- рН (кислотность) – метод с двумя индикаторами (метилового красный, бромтимоловый синий);
- удельный вес – метод с применением обработанных полиэлектролитов;

- общий белок – метод с использованием тетрабромфенолового синего;
- лейкоциты – эстеразный тест.

Иммунохимическое исследование РЖ включало определение интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-17 (ИЛ-17), интерферона гамма (γ ИФ), васкуло-эндотелиального фактора роста (ФРЭС), лактоферрина (ЛФ), секреторного иммуноглобулина А (IgA), матриксных металлопротеиназ (ММП-1, ММП-7, ММП-8, ММП-12, ММП-13). Эти тесты описаны в разделе 2.5.4.

2.5.2 Гематологические исследования

Для исследования системных реакций организма крыс при экспериментальном пародонтите использован комплекс лабораторных тестов: общеклинический анализ крови (анализатор МЕК 6400), включающий подсчет лейкоцитов (WBC) эритроцитов (RBC), тромбоцитов (PLT) и определение гемоглобина (HGB). Исследование выполняли в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем прибора. Подсчет лейкоцитарной формулы проводили унифицированным методом в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Подсчитывали процентное содержание лейкоцитов (на 100 клеток) в периферической крови. Результат выражали в процентах и абсолютных значениях. Кроме того, рассчитывали ядерный индекс нейтрофилов (ЯИН) как соотношения палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов.

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.

2.5.3 Биохимическое исследование

Для оценки процессов костного ремоделирования определяли активность щелочной фосфатазы с использованием тест систем «Вектор-Бест». Кроме того, оценивали уровень термолабильную фракцию щелочной фосфатазы, что по мнению ряда исследователей отражает активность «костной» фракции [40, 51 77]. Учет результатов проводили с помощью автоматического анализатора Сапфир-400.

2.5.4 Иммунохимические исследования

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) с использованием тест-систем «Вектор-Бест». Для выполнения анализа применяли комплекс, включающий планшетный иммуноферментный анализатор «Thermo Scirntific» 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 4).

Таблица 4 — 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.

2.5.5 Гистологические 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 остеокластов. Подсчет клеток производился в единице площади в двадцати полях зрения при увеличении в 1000 раз.

При морфометрическом исследовании подсчет клеток производился в единице площади в двадцати полях зрения и выражалось в количестве клеток в 1 мм² среза. Расчет производился по формуле:

$$K = M(K) \times S$$

где K – количество клеток в мм² среза;

M(K) – среднее значение клеток в 20 полях зрения;

S – площадь поля зрения (12,509 мм²).

Морфологические исследования проводились совместно со старшим научным сотрудником ИИФ УрО РАН к.м.н. Медведевой Светланой Юрьевной.

2.5.6 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 определяли соотношение базальных, промежуточных и поверхностных клеток. Кроме того, оценивались следующие 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 %. Для удобства интерпретации полученных буккальных цитограмм нами был предложен бланк (рисунок 5).

Цитологическое исследование буккального эпителия	
ФИО	
Дата рождения Пол	
Дата забора материала	
Диагноз	
Клетки	Реф. Интервал
Базальные клетки	0-2%
Промежуточные клетки	60-80%
Поверхностные клетки	40-20%
Цитогенетические аномалии	
Клетки с микроядрами	0-0,7%
Клетки с протрузией	0-0,5%
Двуядерные клетки	0-1,5%
Дегенеративные изменения в цитоплазме	
Клетки с пренуклеарной вакуолью	0-0,5%
Вакуолизация цитоплазмы	0-0,3%
Показатели апоптоза	
Клетки с кариопикнозом	0-1,2%
Клетки с кариолизисом	0-1,0%
Клетки с кариорексисом	0-1,7%
Клетки с апоптозными тельцами	0-0,5%
Индексы	
Цитогенетический индекс	0-1
Индекс апоптоза	0-4,5

Рисунок 5 — Бланк цитологического исследования БЭ

С целью комплексной оценки цитограммы использовали расчетные индексы:

1. Цитогенетический индекс – сумма клеток с микроядрами, протрузиями.
2. Индекс апоптоза – сумма клеток с конденсацией хроматина, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и апоптозными тельцами.

2.5.7 Бактериологическое исследование

Соскоб с поверхности зуба помещали в транспортную среду и доставляли в лабораторию. Культивирование и идентификацию микроорганизмов проводили с использованием автоматического анализатора Bactek.

У с зубного налета пациентов наиболее часто определялись следующая смешанная микрофлора (таблица 5).

Таблица 5 — Микроорганизмы с зубного камня пациентов с пародонтитом

Выделенные микроорганизмы	Выраженность
<i>Streptococcus sanguis</i>	Обильный рост
<i>Streptococcus milleri</i>	Умеренный рост
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	Умеренный рост
<i>Eikenella corrodens</i>	Умеренный рост
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Обильный рост
<i>Escherichia coli</i>	Скудный рост
<i>Enterococcus faecalis</i>	Умеренный рост
<i>Prevotella intermedia</i>	Умеренный рост

Исследование выполнено в клинко-диагностической лаборатории ГУЗ СО СОКБ № 1, научный руководитель КДЛ – проф. Базарный В.В.

2.6 Статистическая обработка данных

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 интерпретации использования корреляционной связи оценивали по шкале Чеддока:

- $0.1 < r_{xy} < 0.3$: слабая;
- $0.3 < r_{xy} < 0.5$: умеренная;
- $0.5 < r_{xy} < 0.7$: заметная;
- $0.7 < r_{xy} < 0.9$: высокая;
- $0.9 < r_{xy} < 1$: весьма высокая.

Для оценки диагностических характеристик изучаемых показателей рассчитывали диагностическую чувствительность (ДЧ), диагностическую специфичность (ДС) и прогностическую ценность (ПЦ) положительного результата.

Диагностическую чувствительность рассчитывали по формуле:

$$ДЧ = \frac{ИП}{КЗ} \times 100\%$$

где ИП – истинно положительный результат;

КЗ – количество всех заболевших.

Диагностическую специфичность рассчитывали по формуле:

$$ДС = \frac{ИО}{ЗП} \times 100\%$$

где ИО – истинно отрицательный результат;

ЗП – здоровые пациенты.

Прогностическая ценность положительного результата оценивалась по формуле:

$$ПЦ = \frac{ИП}{ИП + ЛП} \times 100\%$$

где ПЦ – прогностическая ценность положительного результата;

ИП – истинно положительный результат;

ЛО – ложноположительный результат.

Для оценки диагностической эффективности использован ROC-анализ, заключающийся в построении и определении площади под ROC кривой - AUC (Area Under Curve). Чем выше AUC, тем большую ценность имеет представленный метод. Максимальное значение AUC равно 1. Площадь под ROC-кривой (AUC) отражает диагностическую эффективность (ДЭ) [106].

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». Для статистической обработки данных применен классический дискриминантный анализ на базе программного пакета статистического анализа Statistica.

Глава 3.

ЛОКАЛЬНЫЕ И СИСТЕМНЫЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРОДОНТИТЕ

3.1 Моделирование хронического пародонтита на лабораторных животных

Существующие проблемы в диагностике и лечении пародонтита [10, 62, 100, 188] диктуют необходимость разработки новых лечебно-диагностических технологий в пародонтологии. Решение данной задачи в свою очередь требует создания адекватной модели хронического пародонтита на экспериментальных животных.

Имеющиеся модели ЭП имеют ряд существенных недостатков, связанных с воздействием на один или два механизма патогенеза заболевания, что не учитывает мультифакторность пародонтита и ограничивает возможности их использования для апробации новых лечебно-профилактических средств. В описаниях часто отсутствуют убедительные морфологические доказательства развития изменений ткани пародонта, характерных для ХП. В связи с этим разработка новых моделей данного заболевания по-прежнему актуальна, что определило задачу данного исследования – создание модели хронического пародонтита у лабораторных животных на основе современных представлений об этиологии и патогенезе данного заболевания. Поэтому нами использован комплексный подход, заключающийся в использовании лигатура-индуцированной модели, дополненной механическим повреждением тканей и бактериальным обсеменением зоны повреждения пародонтогенными микроорганизмами.

Существующие модели и подробная методика воспроизведения экспериментального пародонтита (ЭП) представлена во 2 главе.

3.2 Морфологическое исследование нижней челюсти лабораторных животных с экспериментальным пародонтитом

Доказательством адекватности воспроизведенной модели хронического пародонтита являются результаты морфологического исследования.

При гистологическом исследовании альвеолярной части десны крысы контрольной группы определяется пласт многослойного плоского эпителия с признаками ороговения и подлежащей плотной неоформленной соединительной тканью без воспалительных и деструктивных изменений (рисунок 6).

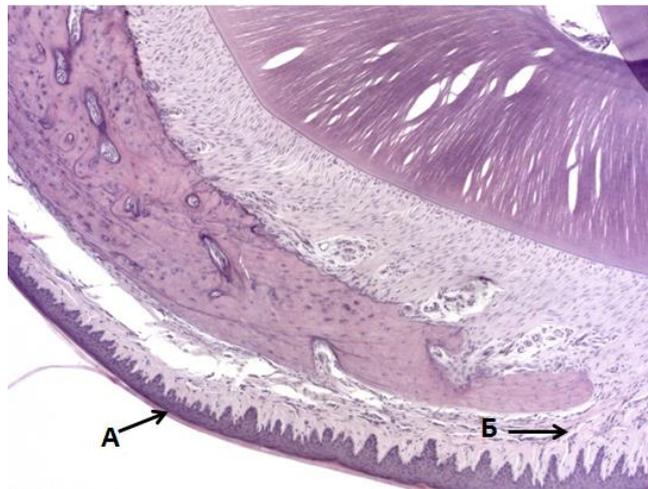


Рисунок 6 — Слизистая оболочка альвеолярной части десны контрольной группы животных. Многослойный плоский эпителий с признаками ороговения (А) и подлежащая плотная соединительная ткань (Б).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 40

На третьи сутки после выполненного хирургического вмешательства при гистологическом исследовании альвеолярной части десны в проекции зоны моделируемого пародонтита в субэпителиально расположенной соединительной ткани определяется участки мукоидного и фибриноидного набухания, отёк, полнокровие, рыхлая воспалительная инфильтрация лимфоцитами и эозинофилами; единичные лимфоциты проникают в эпителий слизистой оболочки (рисунок 7). В перифокальных мягких тканях пародонта, обнаруживаются

признаки острого экссудативного воспаления, характеризующиеся полнокровными сосудами, краевым стоянием лейкоцитов в сосудах микроциркуляторного русла и лейкодиapedезом, а также определяется диффузная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами.

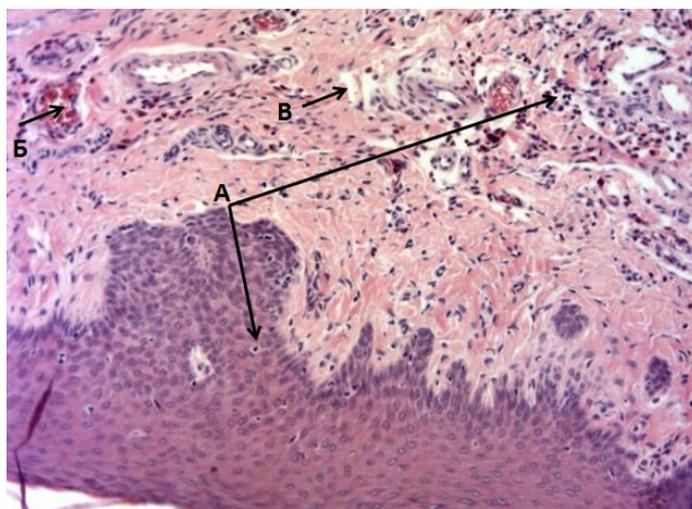


Рисунок 7 — Слизистая оболочка десны экспериментальной группы животных на 3 сутки эксперимента. Лейкоцитарная инфильтрация лимфоцитами и эозинофилами с проникновением лимфоцитов в эпителий десны (А), полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (Б), отёк (В).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

Морфологическое исследование на 7 сутки показало, что в связочном аппарате выражен отёк, определяются полнокровные сосуды с очаговым диаapedезом эритроцитов, лимфоцитарная инфильтрация структур связочного аппарата, появляются фокусы просветленного костного матрикса в костной альвеоле (рисунок 8). В прилежащих мягких тканях пародонта определяются расширенные полнокровные сосуды и диффузная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами с преобладанием эозинофилов.

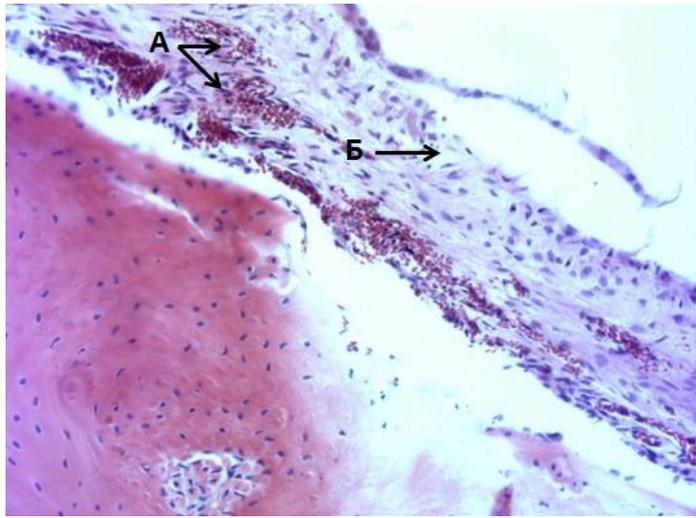


Рисунок 8 — Связочный аппарат и костная альвеола экспериментальной группы животных на 7 сутки эксперимента. Полнокровные капилляры с очагами диапедеза эритроцитов (А), отёк (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

На 14 сутки эксперимента в тканях пародонта признаки экссудативного воспаления сохраняются, определяются участки с формированием микроабсцессов, наряду с этим появляется грануляционная ткань с выраженным воспалительным компонентом (рисунок 9).

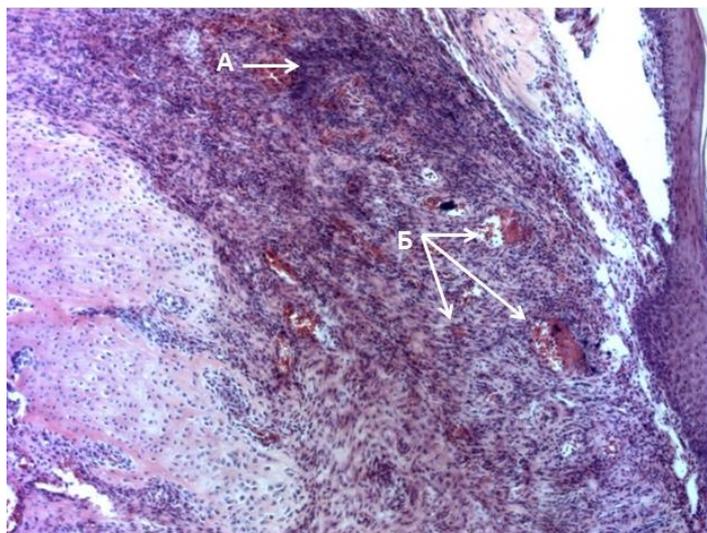


Рисунок 9 — Мягкие ткани пародонта экспериментальной группы животных на 14 сутки эксперимента. Формирующийся микроабсцесс (А), грануляционная ткань с воспалительным компонентом (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

При гистологическом исследовании на 21 сутки эксперимента визуализируется связочный аппарат с признаками диффузной воспалительной инфильтрации лейкоцитами (лимфоцитами, эозинофилами, нейтрофилами). Сосуды микроциркуляторного русла полнокровны, в части из них определяется краевое стояние лейкоцитов и признаки лейкодиapedеза. В области корня зуба под связочным аппаратом определяются кровоизлияния, выраженное полнокровие сосудов, а между костными балками обнаруживается формирующийся абсцесс (рисунок 10), в перифокальной зоне отмечается миграция остеокластов и фокусы резорбции костного матрикса.

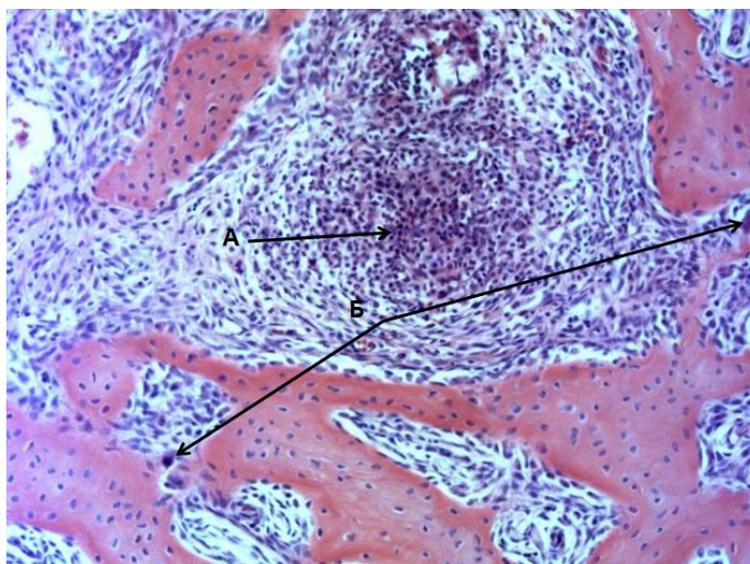


Рисунок 10 — Формирующийся абсцесс между костными балками (А), миграция единичных остеокластов (Б) в экспериментальной группе на 21 сутки.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

При гистохимическом исследовании по Ван Гизон на коллагеновые структуры и костный матрикс определяются множественные формирующиеся гранулёмы с признаками перифокальной организации и фокусы резорбции костного матрикса, костных балок (рисунок 11).

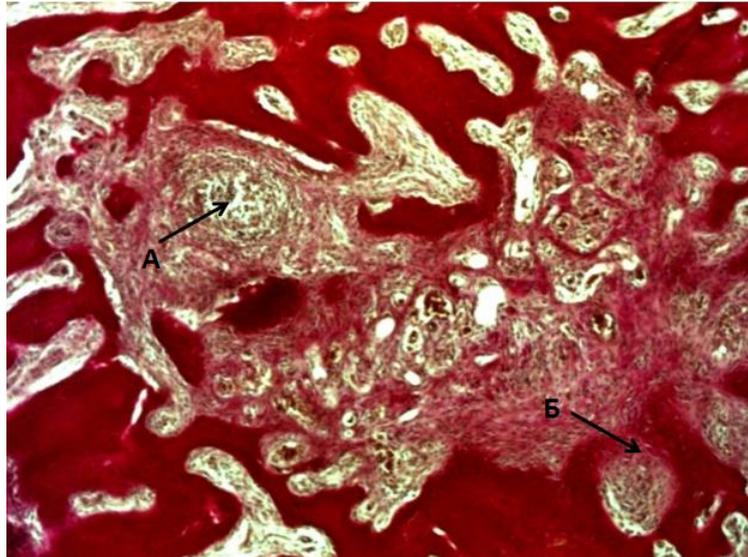


Рисунок 11 — Формирующиеся гранулемы с признаками перифокальной организации (А) и фокусы резорбции костных балок (Б) в экспериментальной группе на 21 сутки. Окраска фуксином и пикриновой кислотой. Ув. 100

При морфологическом исследовании на 35 сутки эксперимента в мягких тканях пародонта определяются признаки организации с пролиферацией клеток фибробластического ряда в перифокальной области (рисунок 12). В структурах связочного аппарата обнаруживается диффузная лимфоцитарная инфильтрация.

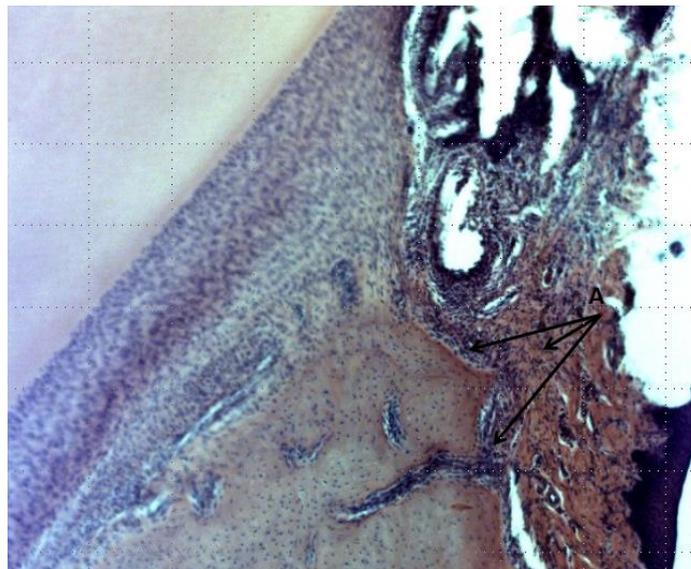


Рисунок 12 — Формирование пародонтального кармана у животного исследуемой группы на 35 сутки. Очаг склероза с пролиферацией клеток фибробластического ряда (А). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

Указанные морфологические изменения в тканях пародонта крыс аналогичны описанным при пародонтите у человека [10, 114].

Для количественной оценки изменений в ткани пародонта испытуемых крыс, был произведен морфометрический анализ основных клеточных маркеров воспаления и разрушения костной ткани (рисунок 13).

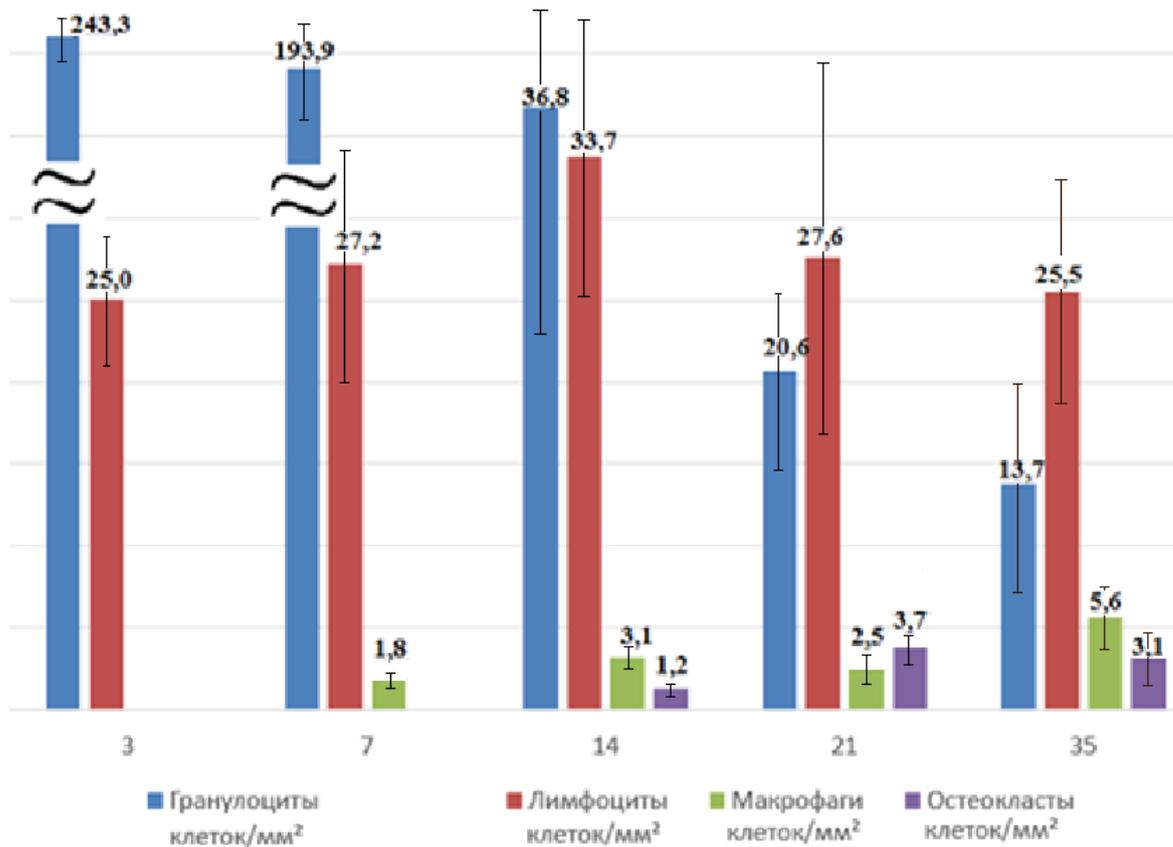


Рисунок 13 — Морфометрия гистологических срезов нижней челюсти крыс

При морфометрическом исследовании препаратов на 3 и 7 сутки развивается экссудативная фаза воспаления, наблюдается выход воспалительных элементов (эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги) в мягкие ткани. Признаки пролиферативной фазы проявляются с 14 суток, увеличения количества лимфоцитов, макрофагов. К 21 суткам при переходе к хроническому воспалительному процессу, в ткани нарастает количество остеокластов, что свидетельствует о начальном этапе резорбции костной ткани.

3.3 Лабораторная оценка системных реакции у лабораторных животных с экспериментальным пародонтитом

На данной модели оценивали не только локальные, но и системные реакции организма при ЭП: картину крови, цитокиновый статус, спленоцитогамму.

Селезенка является важным органом не только иммунной системы, но и кроветворения у крыс. Ее клеточный состав мы оценивали на 21 сутки, в период максимально выраженной локальной тканевой реакции – на 21 сутки (таблица 6).

Таблица 6 — Спленоцитогамма крыс при ЭП (M±m)

Параметры	Контрольная группа	Основная группа (ЭП)	P
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты %	90,5±1,37	92,4±1,73	p=0,05
Лимфобласты %	1,16±0,40	1,05±0,29	p=0,06
Плазмоциты %	2,33±1,96	2,00±1,53	p=0,06
Макрофаги %	1,16±0,40	1,06±0,31	p=0,15
Нейтрофилы %	2,66±1,36	3,28±1,41	p=0,06
Эозинофилы %	2,64±1,21	1,96±1,50	p=0,06
Ретикулярные кл.%	0,66±0,51	0,59±0,47	p=0,07

В селезенке нормальных крыс преобладает лимфоидный росток кроветворения (более 90% клеток). Содержание бластных форм составляло в среднем 1%, гранулоцитов - 5%, прочих - 5%. Спленоцитогамма у животных с ЭП существенно не отличалась от таковой в контрольной группе.

Важным маркером воспалительного процесса является лейкоцитарная реакция крови (таблица 7).

Таблица 7 — Гематологические показатели у животных при моделировании
экспериментального пародонтита

Параметры M±m	Сутки	Контрольная группа	Основная группа (ЭП)	p
1	2	3	4	5
Лейкоциты 10 ⁹ /л	0	6,32 ± 1,04	7,66 ± 1,80	p=0,08
	1	6,15 ± 0,39	9,72± 3,10	p=0,04
	3	6,28 ± 1,23	9,60± 1,49	p=0,01
	7	7,43± 1,56	11,92± 1,13	p=0,05
	10	6,29±1,10	9,85±0,77	p=0,02
	21	6,90±1,45	9,29±0,98	p=0,01
	35	7,01±0,95	7,23±1,51	p=0,09
Нейтрофилы палочкоядерные %; абсол. 10 ⁹ /л	0	1,62±1,06 0,10±0,01	2,92±1,09 0,20±0,01	p=0,14
	1	1,74±1,40 0,10±0,01	3,41±2,01 0,33±0,18	p=0,11
	3	1,52±1,23 0,09±0,01	0,33±0,50 0,03±0,01	p=0,15
	7	1,38±0,94 0,10±0,01	0,33±0,57 0,04±0,01	p=0,08
	10	1,02±1,05 0,06±0,01	0,50±0,20 0,05±0,01	p=0,08
	21	1,49±0,90 0,10±0,01	1,66±1,52 0,15±0,01	p=0,10
	35	1,49±0,90 0,10±0,01	1,01±0,90 0,07±0,01	p=0,09
Нейтрофилы сегментоядерные %; абсол.10 ⁹ /л	0	10,37±4,65 0,65±0,04	14,68±6,37 1,12±0,11	p=0,07
	1	9,93±4,87 0,61±0,01	16,66±4,16 1,61±0,12	p=0,07
	3	11,90±5,23 0,74±0,06	23,41±8,12 2,27±0,18	p=0,04
	7	12,05±3,94 0,89±0,06	23,66±12,34 2,79±0,09	p=0,05

1	2	3	4	5
	10	10,12±3,63 0,63±0,04	18,51±5,65 1,82±0,04	p=0,05
	21	11,89±5,76 0,82±0,08	13,02±6,02 1,20±0,05	p=0,06
	35	12,05±3,94 0,84±0,03	12,66±10,10 0,91±0,15	p=0,13
Эозинофилы %; абсол. 10 ⁹ /л	0	1,65±1,06 0,10±0,01	1,92±1,05 0,14±0,01	p=0,10
	1	1,01±0,23 0,06±0,01	0,66±0,12 0,06±0,01	p=0,07
	3	1,21±0,40 0,07±0,01	1,30±0,57 0,12±0,01	p=0,07
	7	1,67±1,02 0,12±0,01	2,66±2,05 0,31±0,02	p=0,06
	10	1,75±1,69 0,11±0,01	3,50±3,01 0,34±0,02	p=0,05
	21	1,44±0,92 0,09±0,01	1,66±0,90 0,15±0,01	p=0,07
	35	1,01±0,84 0,06±0,01	1,01±0,09 0,07±0,01	p=0,09
Лимфоциты %; абсол. 10 ⁹ /л	0	84,87±5,35 5,36±0,05	76,48±8,32 6,53±0,14	p=0,10
	1	86,31±3,29 5,30±0,01	79,03±2,10 7,68±0,06	p=0,07
	3	84,4±6,89 5,30±0,08	74,66±11,23 7,16±0,16	p=0,08
	7	83,9±9,32 6,23±0,14	73,66±10,01 8,78±0,11	p=0,09
	10	85,29±4,86 5,36±0,05	76,62±10,60 7,54±0,08	p=0,05
	21	83,66±7,40 5,77±0,10	81,66±6,65 7,53±0,06	p=0,10
	35	83,95±6,70 5,88±0,06	81,66±8,50 5,90±0,07	p=0,09
Моноциты %; абсол. 10 ⁹ /л	0	1,50±1,40 0,09±0,01	1,42±1,30 0,12±0,02	p=0,07

1	2	3	4	5
	1	1,01±0,73 0,06±0,01	0,66±0,57 0,06±0,01	p=0,06
	3	0,97±0,72 0,06±0,01	0,33±0,57 0,03±0,01	p=0,06
	7	1,61±1,84 0,11±0,01	0,33±0,57 0,04±0,01	p=0,05
	10	1,82±1,02 0,12±0,01	0,42±0,39 0,04±0,01	p=0,04
	21	1,52±1,30 0,10±0,01	1,65±0,95 0,15±0,01	p=0,08
	35	1,50±1,30 0,09±0,01	0,33±0,01 0,02±0,01	p=0,03
Эритроциты 10 ¹² /л	0	6,29±0,74	7,52±0,20	p=0,07
	1	6,72±1,63	7,74±0,63	p=0,06
	3	7,13±0,54	8,20±0,31	p=0,06
	7	6,32±1,21	6,92±0,96	p=0,07
	10	6,93±0,99	7,01±1,13	p=0,07
	21	7,14±0,41	7,04±0,03	p=0,06
	35	7,21±0,56	6,92±0,96	p=0,07
Гемоглобин г/л	0	122,37±15,97	135,23±8,88	p=0,07
	1	123,33±7,66	129,43±6,74	p=0,06
	3	127,56±9,43	132,98±6,92	p=0,06
	7	130,01±10,12	131,57±6,64	p=0,07
	10	128,49±9,14	129,66±12,92	p=0,07
	21	127,25±5,46	134,24±10,43	p=0,06
	35	129,93±8,68	134,66±6,50	p=0,07

При ЭП выявлено умеренное повышение числа нейтрофильных гранулоцитов на 1-7-е сутки эксперимента, что характерно для острой фазы воспаления. В более поздние сроки (10-35 сутки) отмечена своеобразная умеренная лимфоцитарно-моноцитарная реакция (относительный лимфоцитоз, незначительная моноцитопения), встречающаяся при хроническом воспалении и

отмеченная ранее в исследованиях Базарного В.В. и соавторов [14, 31] как маркер нарушенного ремоделирования костной ткани. Возможно, это является отражением усиленной остеокластической резорбции в альвеолярной части кости.

Картина крови довольно точно соответствует гистологическим данным. Таким образом, в развитии ЭП четко определяются 2 фазы: острая – нейтрофильная реакция и экссудативное воспаление и хроническая – мононуклеарная инфильтрация и появление остеокластов с начинающимися признаками остеокластической резорбции.

Поскольку в патогенезе пародонтита, как известно, важную роль играет состояние иммунореактивности [107, 155, 158], мы определяли в крови крыс уровень ключевых иммунорегуляторных пептидов - цитокинов с про- и противовоспалительной активностью. К первым относят ИЛ-2, γ ИФ ко вторым – ИЛ-4 (таблица 8).

Уровень ИЛ-2 в крови у значительной части животных основной и контрольной групп приближался к нулевым значениям, что соответствует норме. Однако концентрация другого провоспалительного цитокина - γ ИФ повышалась в 2,8 раза на 7 сутки ($p=0,06$) и 4,4 раза ($p=0,05$) на 14 сутки.

Содержание ИЛ-4 в обеих группах существенно не различалось.

Наибольшие изменения при пародонтите выявлены со стороны ИЛ-6 – его уровень увеличивается в 1,7 раз на 7 сутки и в 2,3 раза на 14 сутки.

Унифицированным маркером острой фазы воспаления является СРБ. Так наблюдается увеличение концентрации на 3 сутки эксперимента в 1,8 раз и 7 сутки в 2 раза. К концу эксперимента различий в группах не наблюдается. Данная динамика укладывается в концепцию патогенеза пародонтита, отражая динамику процесса.

Следовательно, развитие пародонтита у крыс характеризовалось динамично изменяющимися показателями системного воспалительного ответа: активация про- и противовоспалительных цитокинов, в частности -увеличение концентрации ИЛ-6 и γ ИФ. Однако следует подчеркнуть, что степень выраженности описанной воспалительной реакции была вполне умеренной.

Таблица 8 — Показатели цитокинов и острофазовых белков у животных при моделировании экспериментального пародонтита M±m

Параметры	Сутки	Контрольная группа	Основная группа (ЭП)	p
ИЛ-4 пг/мл	0	0	0	
	7	0	0,16 ±0,28	p=0,06
	14	0	0	
	21	0,50 ±0,30	0	p=0,07
	35	0,17 ±0,10	0	p=0,06
ИЛ-6 пг/мл	0	53,05 ±12,44	50,87 ±16,23	p=0,06
	7	58,66 ±44,35	100,00 ±45,80	p=0,04
	14	49,33 ±6,10	76,06 ±22,53	p=0,004
	21	41,33 ±13,04	65,33 ±22,04	p=0,05
	35	64,66 ±41,01	46,00 ±9,16	p=0,06
γИФ пг/мл	0	1,35 ±1,28		
	7	1,66 ±1,52	17,66 ±19,47	p=0,05
	14	2,33 ±2,08	22,08 ±16,37	p=0,06
	21	0	16,05 ±8,71	p=0,08
	35	2,67 ±1,97	7,33 ±4,05	p=0,05
СРБ г/мл	0	5,57±0,50	5,42±0,71	p=0,10
	3	5,49±1,21	10,35±4,39	p=0,05
	7	4,17±0,89	8,55±2,30	p=0,03
	35	5,32±0,60	5,39±2,37	p=0,09

Особенностью хронического пародонтита является сочетание воспаления и резорбции костной ткани. Между этими двумя процессами существует патогенетическая связь, реализуемая цитокинами. В литературе описано, что ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, интерфероны усиливают костную резорбцию через стимуляцию образования остеокластов и их ферментативную активность, ведущую к потере костной ткани [141, 176]. Основываясь на этих данных, мы оценивали состояние костного ремоделирования при экспериментальном пародонтите. В качестве маркера остеобластических процессов рассматривали термолабильную фракцию ЩФ, которую некоторые авторы рассматривают аналогом «костной» формы

фермента [51, 77]. О состоянии процессов остеокластической резорбции судили по изменению концентрации гидроксипролина (таблица 9).

Таблица 9 — Маркеры костного ремоделирования в сыворотке крыс при ЭП

Параметры	сутки	Контрольная группа	Основная группа (ЭП)	p
Гидроксипролин нг/мл	3	78,48±15,40	61,70±24,56	p=0,09
	14	76,56±16,90	98,03±29,81	p=0,20
	21	68,98±25,43	109,18±60,86	p=0,10
	35	73,75±19,21	172,77±50,13	p=0,002
«Костная» ЩФ Е/л	3	46,86±14,19	47,22±16,27	p=0,34
	14	49,22±12,03	46,14±11,60	p=0,43
	21	43,45±15,04	32,31±8,76	p=0,01
	35	50,34±18,39	26,02±8,29	p=0,02

Нами отмечено, что по мере развития ЭП происходит увеличение концентрации гидроксипролина в 2,5 раза на 35 сутки (p=0,002). Вероятно, это связано с тем, что в процессе остеокластической резорбции происходит высвобождение гидроксипролина, который входит в состав коллагена костной ткани.

Активность «костной» щелочной фосфатазы, которая, по мнению ряда авторов, отражает активность остеобластов [51, 196], снижается в 2 раза на 21 сутки (p=0,01), полученные значения активности данного фермента указывают на нарушение костного ремоделирования в тканях пародонта, угнетение остеобластической активности.

Характеризуя костное ремоделирование при ЭП можно отметить преобладание остеокластической активности над остеобластической. Это еще раз указывает на адекватность полученной модели заболевания и совпадает с данными морфологического анализа.

Таким образом, использование сочетанного воздействия на ткани пародонта лабораторных животных, включающее механическое повреждение (разрыв

циркулярной связки зуба), бактериальное обсеменение раневой поверхности, нарушения микроциркуляции тканей, позволило выявить достоверные морфологические изменения в тканях пародонта, характерные для пародонтита. Максимальные морфологические проявления воспалительного процесса в тканях пародонта выявлены у животных в период с 21 суток по 35 сутки после операции. Острая фаза воспаления характеризуется лейкоцитарной реакцией крови и повышении острофазовых белков (СРБ) на 3 и 7 сутки. Цитокиновый ответ при этом выражен умеренно, за счет увеличения продукции клетками Th-I - γ ИФ и Th-II – ИЛ6, то есть активация про- и противовоспалительного иммунитета. Под влиянием цитокинового дисбаланса активируются цитолитические процессы в тканях пародонта. При развитии пародонтита с 21 суток отмечаются изменения концентрации маркеров костной резорбции: гидроксипролина и костной ЩФ.

Таким образом, нами получена адекватная модель ЭП на лабораторных животных. На данный способ моделирования экспериментального пародонтита получен патент (Патент РФ №2654598). Данная модель позволила выявить выраженные локальные изменения в тканях пародонта с морфологическими изменениями и их последовательностью, характерными для ХП у человека. При этом системные реакций (лейкоцитарная реакция крови, селезенки, цитокиновый ответ) были менее выраженными.

Глава 4.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

4.1 Исследование ротовой жидкости при хроническом пародонтите

Патогенез ХП большинство авторов связывают с нарушением микробиоты ротовой полости и механизмов местного иммунитета. Поэтому можно полагать, что успехи в развитии концепции патогенеза, диагностики, лечения и профилактики данного заболевания могут быть связаны с исследованиями иммунологии полости рта [4, 6, 12, 43, 58 76, 109, 184]. Как было показано в главе 1, одним из эффективных инструментов для этого является изучение РЖ. Это связано с тем, что по мере прогрессирования пародонтита происходит разрушение мягких тканей, деструкция костной ткани и высвобождение биологически активных веществ, которые могут быть определены в РЖ и затем рассматриваться как кандидаты на роль биомаркеров этого заболевания.

Как было отмечено в обзоре литературы в последние годы получены новые данные о наличии в РЖ маркеров воспалительного процесса – кальпротектина, С-реактивного белка, макрофагального воспалительного белка (MIP-1a) и других [9, 180]. При воспалении тканей пародонта уровень факторов иммунной защиты в РЖ повышается, например, лактоферрина, секреторного иммуноглобулина А [62]. Огромное число исследований посвящено изучению цитокинового статуса, играющему ключевую роль в патогенезе пародонтита, результаты которых отличаются крайней противоречивостью, что затрудняет применение полученных результатов в дальнейших изысканиях и их внедрение в клиническую практику.

Так, одни авторы указывают на значительные изменения концентрации ИЛ при ХП, другие же напротив, говорят о несущественном повышении или же отсутствии различий с пациентами без данной патологии [92, 109].

Учитывая показанные выше разнообразие и неоднозначность изменений лабораторных показателей, прежде всего, – цитокинового статуса РЖ [65, 78,

102], следует признать актуальной одну из задач исследования – оценка особенности секреторного иммунитета полости рта при хроническом пародонтите разной степени тяжести.

Состояние тканей полости рта, их реактивность, определяются сложным комплексом различных факторов, которые могут быть оценены только в контексте интегральных клинических характеристик.

Объективными показателями состояния полости рта являются стоматологические индексы - КПУ, OHS-S, PMA, ПИ определяемые при осмотре пациента врачом. Все они были заметно повышены у пациентов с ХП и коррелировали с тяжестью патологического процесса, что доказывает адекватность отбора пациентов и распределения их по группам (таблица 10).

Таблица 10 — Клиническая характеристика РЖ пациентов с ХП

Показатель	Здоровые	ХП легкой ст./ II стадия	ХП средней ст./ III стадия	ХП тяжелой ст./ IV стадия
КПУ Me (Q1;Q3)	7 (4;12)	15 (11;17) p=0,01	16 (12;18) p=0,005	16 (11,5;21,5) p=0,006
OHS-S Me (Q1;Q3)	0,8 (0,5;1)	1,9 (1,5;2,3) p=0,009	1,9 (1,4;2) p=0,007	2,4 (1,9;2,65) p=0,005
PMA Me (Q1;Q3)	10 (2;15)	29 (28;38,5) p=0,007	45 (40;48) p=0,005	70 (55;75) p=0,01
ПИ Me (Q1;Q3)	0,1 (0;0,3)	1,4 (0,5;1,5)	3,6 (2,1;3,9)	5,3 (4,1;6,9)

Наиболее выраженные изменения отмечаются со стороны PMA и ПИ, что является логичным и соответствует представлениям в стоматологии. PMA количественно отражает интенсивность и распространенность воспалительной реакции мягких тканей, а ПИ указывает на тяжесть заболевания, отражая не только воспаление десны, но и образование карманов и резорбцию альвеолярной кости [50].

Это было подтверждено и результатами физико-химического анализа РЖ (таблица 11).

Таблица 11 — Физико-химическая характеристика РЖ пациентов с ХП

Показатель	Здоровые добровольцы n=15	Пациенты с ХП n=38	p
pH, усл.ед., Me (Q1;Q3)	7,80 (7,5; 7,9)	7,65 (7,5; 7,9)	0,07
Удельный вес, уд ед Me (Q1;Q3)	1010 (1005; 1011)	1009 (1006; 1012)	0,06
Лейкоцитарная эстераза лейко/мкл (Q1;Q3)	10 (0; 15)	18 (15; 60)	0,01
Общий белок, г/л Me (Q1;Q3)	0,50 (0,38; 0,80)	0,91 (0,74; 1,16)	0,004

У пациентов с ХП были увеличены количество лейкоцитов и концентрация белка, наблюдалось снижение величина pH. Все это можно отнести к признакам воспалительного процесса тканей полости рта.

Важную роль в патогенезе ХП играют факторы местного иммунитета. Учитывая, что данному вопросу посвящено огромное количество публикаций [6, 62, 76, 81, 121, 132, 182], мы оценили содержание иммуноактивных факторов в когорте пациентов в целом, не подразделяя их по степени тяжести (таблица 12).

Таблица 12 — Характеристика секреторного иммунитета при ХП

Параметры	Здоровые добровольцы n= 15	Пациенты с ХП n= 30	p
с IgA мг/л Me (Q1;Q3)	85 (24,3; 102,1)	136 (74,1; 177,5)	0,02
Лактоферрин нг/мл Me (Q1;Q3)	3550 (1000; 4900)	5000 (4500; 6900)	0,01

При определении сIgA и ЛФ у пациентов с ХП выявлено повышение концентрации в 1,6 раза ($p=0,02$) и в 1,4 раза ($p=0,01$) соответственно. Эти данные соответствуют общепринятым представлениям о секреторном иммунитете при пародонтите [4, 34, 44, 54, 88].

Существующая парадигма патогенеза ХП основана на переходе от эффективного клеточного иммунитета к нарушенному гуморальному (Th1/Th2) при прогрессировании заболевания. Нами были рассмотрены основные цитокины про- и противовоспалительного ответа (таблица 13).

Таблица 13 — Содержание цитокинов в РЖ пациентов с ХП

Показатель	Здоровые n=33	ХП легкой ст./ II стадия n=53	ХП средней ст./ III стадия n=38	ХП тяжелой ст./ IV стадия n=42
ИЛ-2 пг/мл Me (Q1;Q3)	10 (5,75;16,25)	10 (5,5;15,5) $p=0,06$	18 (10;30) $p=0,01$	18 (6,5;20,5) $p=0,07$
ИЛ-4 пг/мл Me (Q1;Q3)	2,6 (0;5)	40 (12,5;51,5) $p=0,008$	58 (17;72) $p=0,006$	67 (43;71) $p=0,005$
ИЛ-6 пг/мл Me (Q1;Q3)	1,98 (0,50; 1,15)	2,80 (1,82; 3,40) $p=0,07$	5,52 (3,05;6,34) $p=0,01$	7,81 (3,21; 9,40) $p=0,04$
ИЛ-17 пг/мл Me (Q1;Q3)	0,5 (0;3)	1 (0;5,5) $p=0,06$	2 (0;6) $p=0,07$	5,5 (0;9,25) $p=0,04$
ФРЭС пг/мл Me (Q1;Q3)	400 (10;2000)	1900 (1950;2000) $p=0,06$	750 (150;1500) $p=0,07$	1015 (245;2000) $p=0,06$
γ ИФ пг/мл Me (Q1;Q3)	20 (1,75;29)	28 (24;32) $p=0,09$		

В контрольной группе уровни цитокинов соответствовали значениям, которые многие авторы считают нормой [94, 103, 147, 155, 158, 193].

У больных ХП концентрация ИЛ-2 при легкой степени не отличалась от контроля и отмечалась тенденция к повышению при средней и тяжелой степени ХП ($p=0,01$; $p=0,07$).

Более выраженные изменения отмечались со стороны ИЛ-4. У пациентов по мере прогрессирования ХП наблюдалось возрастание концентрации ИЛ-4 в 15,3; 22,3; 25,7 раза при легкой, средней и тяжелой степени соответственно тяжести заболевания ($p \leq 0,01$).

Наше исследование показало последовательное нарастание концентрации ИЛ-6 соответственно тяжести процесса (в 1,4 раз - легкая степень ХП, в 2,7 – средняя и в 3,9 раза – тяжелая степень) в отличии от контрольной группы. По существующим представлениям ИЛ-6 относится к плейотропным, мультифункциональным цитокинам. К его биологическим эффектам относят участие в специфической дифференцировке наивных клеток CD4⁺ Т, тем самым выполняя важную функцию в связывании врожденного и приобретенного иммунного ответа. ИЛ-6 также индуцирует избыточную продукцию ФРЭС, что приводит к усилению ангиогенеза и повышению сосудистой проницаемости, которые являются патологическими особенностями воспалительных поражений, на ряду с другими эффектами оказывает влияние на остеорезорбцию [178, 184, 193]. Описанные эффекты ИЛ-6 имеют особое значение в патогенезе пародонтита и это привлекло наше внимание.

Рассчитанный индекс ИЛ-2/ИЛ-4 у здоровых добровольцев 3,84, у пациентов 0,25, 0,31 и 0,26 соответственно лёгкой, средней и тяжелой стадии ХП, характеризует преобладание Th-2 продуцируемых факторов, то есть активацией «противовоспалительных» иммуноопосредованных механизмов.

В нашем исследовании выявлено, что концентрация γ ИФ имела тенденцию к незначительному увеличению концентрации данного цитокина при прогрессировании заболевания. γ ИФ обладает широким спектром биологических функций, включая модуляцию воспалительного ответа, в первую очередь за счет того, что является ингибитором Th-2 клеток. Есть данные, что γ ИФ влияет на прогрессирование пародонтита на начальных стадия [64]. В связи с этим можно

предположить, что на более поздних стадиях ХП его противовоспалительный потенциал снижается.

У пациентов выявлено существенное повышение концентрации ИЛ-17 при тяжёлом пародонтите (в 11 раз, $p=0,04$). ИЛ-17 стимулирует остеокластогенез, что приводит к активации остеокластической резорбции [57]. Под влиянием Ил-17 макрофаги увеличивают продукцию провоспалительных цитокинов, усиливая воспалительные реакции [84, 177]. Выявленные изменения указывают на дисрегуляцию продукции ИЛ-17 и говорят о потенциальной роли данного цитокина в воспалении десен и последующей деструкции кости.

Важнейшим механизмом воспалительного процесса является нарушение микроциркуляции. В нем участвуют различные провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α , ФРЭС), продуцентами которых являются моноциты, макрофаги, лимфоциты, эндотелиальные клетки. ФРЭС способен инициировать пролиферацию капилляров и увеличивать проницаемость сосудов [198]. Содержание ФРЭС в РЖ при ХП имело тенденцию к повышению (в 4,7 раза при легкой степени, $p=0,08$), что, косвенно указывает на нарушение реактивности эндотелия при воспалительном процессе.

Таким образом, в исследовании получены данные, соответствующие в целом представлениям о том, что развитие ХП сопровождается нарушением локальных иммунных механизмов [78, 71]. Это проявляется дисбалансом продукции цитокинов, прежде всего – активацией продукции ИЛ-4 и ИЛ-6. Можно полагать, что данные цитокины реализуют свои патогенетические (иммуноопосредованная деструкция тканей) и протективные эффекты (стимуляция противомикробного иммунитета) при ХП. Их соотношение определяет, скорость прогрессирования и развитие осложнений заболевания.

Нами был проведен корреляционный анализ взаимосвязи стоматологического пародонтальным индексом Рассела и концентрацией цитокинов в РЖ у пациентов при ХП различной степени (таблица 14). Он показал отсутствие связей между изучаемыми показателями у здоровых. Несколько иная зависимость отмечалась у пациентов с ХП.

Таблица 14 — Сравнительная оценка корреляции уровня цитокинов с ПИ у пациентов

Параметры/	Коэффициент корреляции Спирмена			
	Здоровые	ХП легкой ст./ II стадия	ХП средней ст./ III стадия	ХП тяжелой ст./ IV стадия
ИЛ-2 пг/мл	0,10 p > 0,05	0,03 p > 0,05	0,15 p > 0,05	0,03 p > 0,05
ИЛ-4 пг/мл	0,01 p > 0,05	0,01 p < 0,05	0,20 p > 0,05	0,28 p < 0,05
ИЛ-6 пг/мл	0,26 p > 0,05	0,31 p < 0,05	0,20 p > 0,05	0,28 p < 0,05
ИЛ-17 пг/мл	0,10 p > 0,05	0,41 p < 0,05	0,30 p > 0,05	0,08 p > 0,05
ФРЭС пг/мл	0,19 p > 0,05	0,39 p < 0,05	0,24 p > 0,05	-

Статистически была подтверждена прямая слабая корреляционная связь между концентрацией ИЛ-4 и ПИ средней ($r=0,20$; $p < 0,05$) и тяжелой степени ХП ($r = 0,28$; $p < 0,05$).

Особенно по степени выраженности прямой корреляции выделялись ИЛ-6 (легкая степень $r=0,31$; $p < 0,05$; тяжелая степень $r=0,28$; $p < 0,05$) и ИЛ-17 ($r=0,41$; $p < 0,05$). Также выявлена умеренная прямая зависимость ФРЭС при ХП легкой степени ($r=0,39$; $p < 0,05$).

Отсутствие выраженной корреляции уровня ИЛ-2 с одной стороны и ПИ с другой, вероятно, связано с тем, что данный цитокин не играет существенной роли в патогенезе пародонтита.

Таким образом, нами подтверждено наличие связей между основным стоматологическим индексом ПИ, который указывает на состояние ткани пародонта, и содержанием некоторых цитокинов в РЖ пациентов с ХП при легкой степени поражения.

Усиление продукции провоспалительных цитокинов в ответ на микробные продукты индуцирует каскад реакций, одной из которых является стимуляция активации протеолитических ферментов, в том числе ММП.

ММП являются основными белками, участвующими в ремоделировании внеклеточного матрикса, например, при различных злокачественных опухолях. В литературе последних 5 лет появились упоминания о том, что некоторые из ММП участвуют в патогенезе ХП через реализацию различных механизмов, ведущих к разрушению ткани пародонта. Продуцировать ММП способны нейтрофилы, моноциты, макрофаги, лимфоциты, тучные клетки, фибробласты, остеокласты, эпителиальные клетки [25].

Нами были рассмотрены ММП относящиеся к каллогеназам и матрилизинам, уровень которых зависит от различных стимулов, включая цитокины (таблица 15) [23].

Таблица 15 — 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

Уровень ММП-1 (коллагеназа-1) и ММП-13 (коллагеназа-3) имел тенденцию к снижению в РЖ пациентов с ХП на 25 и 38% соответственно, но эти изменения были статистически не значимыми в сравнении с показателями контрольной группы (p=0,06). Возможно существенных изменений не наблюдается, так как данные ММП действуют на разные субстраты.

Концентрация ММП-7 (матрилизин-1) 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 [16, 138], в том числе – БЭ, который принимает участие в патогенезе заболевания. Одной из функций ММП-7 является активация антибактериальных белков дефензинов, активное участие которых в патогенезе ХП показано в ряде работ [120, 142, 144].

Наиболее существенные различия наблюдались со стороны ММП-8 (коллагеназа-2, нейтрофильная коллагеназа). У пациентов выявлено увеличение в 2,7 раза по сравнению с группой контроля ($p=0,01$). Нейтрофильная коллагеназа, продуцируемая различными клеточными элементами воспалительного очага (нейтрофилы, эпителиоциты, макрофаги, плазмоциты), является ключевым ферментом разрушения экстрацеллюлярного матрикса как различных типов коллагена (I, II, III, V, VII, VIII, X), так и неколлагеновых белков (агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, $\alpha 2$ -макроглобулин, C1q, ангиотензин I, ангиотензин II, фибриноген, брадикинин). Кроме того, он участвует в деминерализации дентина и в дальнейшем при прогрессировании способен вызывать разрушение альвеолярной кости.

Отмечалась тенденция к увеличению ММП-12 (металлоэластаза макрофагов) у больных с ХП в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой ($p=0,01$). Повышенная продукция ММП-12 приводит к альтерации базальной мембраны эпителия, что является важным механизмом запуска воспалительного процесса в тканях, в том числе – пародонта.

Таким образом, заболевания пародонта сопровождаются изменением уровня целого ряда ферментов, относящихся к семейству ММП. Сопоставляя уровень отдельных ММП при ХП с теми субстратами, на которые они воздействуют, можно полагать, что при патологии пародонта в большей степени активирована деградация как коллагеновых, так и не коллагеновых белков.

4.2 Оценка диагностической эффективности лабораторных параметров ротовой жидкости

Полученные лабораторные данные об изменении уровня биомаркеров болезней пародонта в РЖ при ХП служат обоснованием для того, чтобы использовать их в клинической практике.

Современным инструментом для объективной оценки диагностической ценности лабораторных тестов является ROC-анализ. Количественную интерпретацию ROC даёт показатель *AUC* (area under ROC curve, площадь под ROC-кривой) — площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных классификаций. Чем выше показатель *AUC*, тем качественнее классификатор, при этом значение 0,5 и менее демонстрирует непригодность выбранного метода классификации (соответствует случайному). Значение менее 0,5 говорит, что классификатор действует с точностью до наоборот: если результат положительный, то его можно назвать отрицательными и наоборот. Он позволяет определить диагностическую чувствительность (ДЧ) и диагностическую специфичность (ДС) теста, а площадь под ROC-кривой (*AUC*) отражает диагностическую эффективность (ДЭ) (рисунок 14).

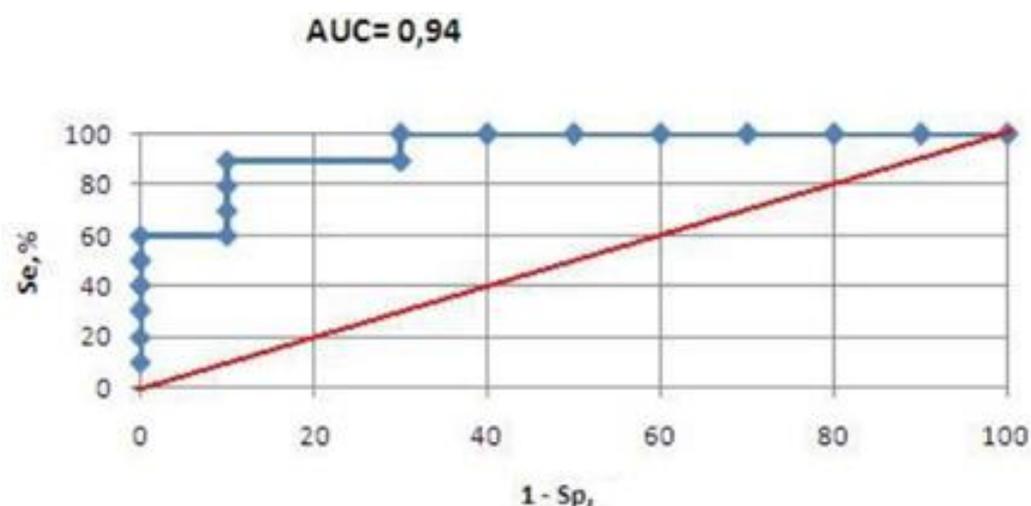


Рисунок 14 — Результаты ROC-анализа содержания ИЛ-4 в РЖ

Данный анализ позволил определить, что наиболее высокую диагностическую эффективность из цитокинов имеет уровень ИЛ-4 в РЖ при ХП: ДЧ 88%, ДС 99%, AUC= 0,95 (таблица 16). Среди ММП диагностической ценностью обладают ММП-7 (ДЧ 92,9%, ДС 75%, AUC= 0,97), ММП-8 (ДЧ 74,4%, ДС 99%, AUC= 0,8), ММП-12 (ДЧ 92,9%, ДС 99%, AUC= 0,94).

Таблица 16 — Диагностическая эффективность биомаркеров в РЖ при ХП

Показатель	Диагностическая чувствительность %	Диагностическая специфичность%	AUC
pH	45,9	61,8	0,59
Удельный вес	42,3	44,2	0,47
Лейкоцитарная эстераза	73,1	81,9	0,78
Общий белок	88,2	75,6	0,91
ИЛ-2	48,5	81,8	0,64
ИЛ-4	88,2	99,0	0,95
ИЛ-6	79,8	85,3	0,83
ИЛ-17	51,4	78,7	0,61
ФРЭС	63,2	63,6	0,57
ММП-1	64,3	98,3	0,75
ММП-7	92,9	75,0	0,97
ММП-8	74,4	99,0	0,80
ММП-12	92,9	99,0	0,94
ММП-13	85,7	99,0	0,85

На основании полученных данных сделано заключение, что наиболее информативными показателями для оценки активности воспалительного процесса тканей полости рта при ХП является увеличение концентрации лейкоцитов (≥ 17 лейк/мкл), общего белка ($\geq 0,80$ г/л), повышение уровня ИЛ-4 (≥ 15 пг/мл), ИЛ-6 ($\geq 3,5$ пг/мл) и активности ММП-7 (≥ 6830 пг/мл), ММП-8 (≥ 7532 пг/мл), ММП-12 (\geq

1504 пг/мл), что можно рассматривать патогенетическим обоснованием для создания новых способов диагностики.

4.3 Цитологическая характеристика буккального эпителия при хроническом пародонтите

Цитологическое исследование буккального эпителия до последнего времени было ограничено так называемым «микроядерным тестом», который считается одним из показателей генотоксического воздействия факторов внешней среды и нестабильности генома при канцерогенезе [5, 36, 161, 165, 181, 163]. В стоматологических исследованиях оценивали бактериальную адгезию на эпителиоцитах, однако большое количество факторов влияет на способность микробов адсорбироваться на клетках, поэтому данный способ имеет низкую диагностическую эффективность и не имеет достаточной доказательной базы.

Нарастание числа клеток с микроядрами и другими маркерами цитогенетических нарушений при ХП ряд авторов связывают не только с активностью воспалительного процесса, но и с другими факторами. К ним относят, в частности, воздействие дентальной рентгенографии на слизистую полости рта [110]. Кроме того, выраженные цитогенетические аномалии могут объясниться при тяжелой степени ХП «накоплением» воздействий неблагоприятных факторов среды [7, 163, 165], сопутствующих прогрессированию заболевания.

В настоящее время по данным литературы накопилось достаточное количество данных о реактивных изменениях буккальной цитограммы при таких заболеваниях как сахарный диабет 2 типа, талассемия и других [35, 79, 80, 166]. В то же время клиническая значимость таких изменений не была установлена. Поэтому мы оценили диагностическую эффективность цитологических аномалий БЭ при ХП.

В буккальных цитограммах в большинстве препаратов у пациентов было зафиксировано отсутствие базальных клеток (в контрольной группе Me (Q) составила 0% (0; 0,2)). Это свидетельствует о том, что пролиферативные процессы при ХП не активируются. В динамике изменений соотношения поверхностных слоев плоского эпителия наблюдалось увеличение числа промежуточных и снижение поверхностных клеток. Это объясняется тем, что при воспалении происходит нарушение дифференцировки клеток по мере нарастания тяжести ХП (рисунок 15).

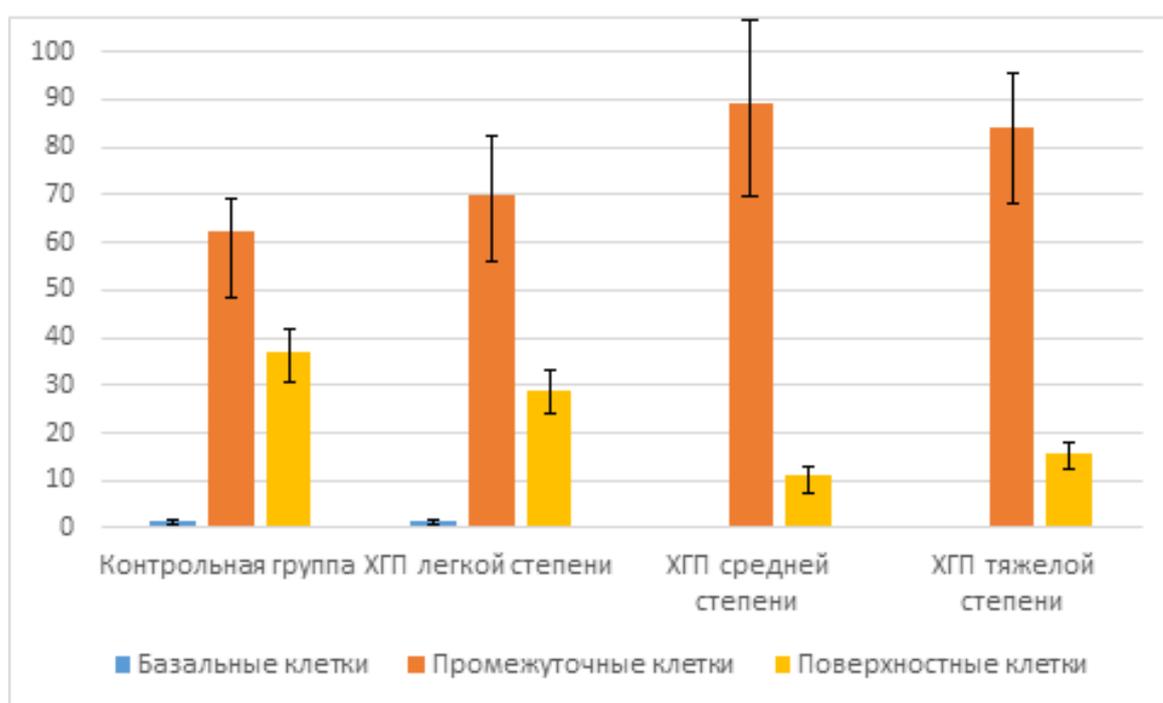


Рисунок 15 — Цитограмма буккального эпителия при хроническом пародонтите

Далее нами в цитограммах проанализированы соотношения клеток с различными аномалиями. Все клеточные изменения были разделены на показатели нарушенной пролиферации, апоптоза и цитогенетические нарушения (таблица 17).

Таблица 17 — Цитологические аномалии буккального эпителия
при хроническом пародонтите

Показатели	Контрольная группа n=107	ХП легкой ст./II стадия n=36	ХП средней ст./III стадия n=38	ХП тяжелой ст./IV стадия n=42
Клетки с микроядрами, Me (Q1;Q3)	0,1 (0; 0,6)	1,6 (0; 3,0) p=0,13	3,4 (0; 4,0) p=0,006	4,4 (0; 5,0) p=0,003
Клетки с протрузиями, Me (Q1;Q3)	0(0; 0,4)	1,2(0;2,2) p=0,09	2,4 (0; 3,1) p=0,006	2,4 (0; 4,2) p=0,01
Цитогенетический индекс	0,1	2,8	5,8	6,8
Двухядерные клетки, Me (Q1;Q3)	1,2 (0,2; 2,2)	1,3(0,8; 1,6) p=0,06	1,6 (1,4; 2,0) p=0,12	1,4 (1,1; 1,7) p=0,08
Клетки с признаками кариолизиса, Me (Q1;Q3)	1,1 (0,9; 1,2)	2,7 (2,3; 3,1) p=0,006	4,2 (3,7; 4,6) p=0,006	6,2 (5,8; 9) p=0,003
Клетки с признаками кариорексиса, Me (Q1;Q3)	0,6 (0,5; 0,8)	1,0(0,95; 1) p=0,01	1,6 (1,5; 1,65) p=0,006	2,6 (2; 5) p=0,003
Клетки с признаками кариопикноза, Me (Q1;Q3)	1,1(0,8; 1,4)	0,9 (0,6; 1,25) p=0,59*	0,9(0,75; 1,05) p=0,499	1,6 (1,6; 1,8) p=0,005
Клетки с апоптозными тельцами, Me (Q1;Q3)	0,2 (0; 0,4)	0,8(0;1,8) p=0,07	2,2 (0; 3,0) p=0,006	2,6 (0,1; 3,1) p=0,003
Индекс апоптоза	3,1	5,7	16,8	53,5
Конденсация хроматина, Me (Q1;Q3)	0,8 (0,7; 0,8)	2,3(2,10; 3,8) p=0,006	3,5 (3,30; 3,75) p=0,006	3,8 (3,6; 4) p=0,003
Клетки с перинуклеарной вакуолью, Me (Q1;Q3)	0,1 (0; 0,2)	0,8 (0,6; 1,05) p=0,003	2,6(2,05; 3,25) p=0,006	2,2 (2,2; 2,6) p=0,003

Примечание: в таблице p – в сравнении с контрольной группой (p<0,05).

Содержание клеток с аномалиями, указывающими на цитогенетические особенности: число клеток с микроядрами и ядерными протрузиями также возрастало по мере прогрессирования заболевания. Так количество последних было в 2,4 раза больше, чем в контрольной группе. Но более выраженным было возрастание числа клеток с микроядрами, в частности, при тяжелой степени пародонтита в 4 раза ($p=0,003$). Это можно объяснить тем, что при воспалении (ХП) за счет иммунного ответа на бактериальное воздействие происходит длительное высвобождение активных форм кислорода, что приводит к окислительному стрессу, окислению нуклеозидов и разрыв цепей ДНК [124].

Рассчитанный цитогенетический индекс отражает степень прогрессирования ХП.

Кариолизис, кариопикноз и кариорексис – последовательные стадии деградации клеточного ядра. Число буккальных эпителиоцитов с данными особенностями возрастало в 2,1; 3,0; 13,4 раза при ХП легкой, средней и тяжелой степени соответственно. Аналогичные по направленности изменения касались и клеток с апоптозными тельцами. Существенное увеличение индекса апоптоза свидетельствует о длительности и тяжести заболевания.

Количество клеток с перенуклеарной вакуолью возрастало при прогрессировании пародонтита, особенно при средней и тяжелой степени, что говорит о нарастающем воздействии цитокинов, которые запускают процесс некроза клеток.

Полученные данные свидетельствуют о накоплении цитогенетических аномалий (микроядра, протрузии ядра) у пациентов с ХП, повышении активности апоптоза и дегенеративно-дистрофических процессов в ядре, характерных для хронического воспаления.

Таким образом, в проведенном исследовании было установлено, что у пациентов с ХП возрастает уровень цитоплазматических и кариологических аномалий. Одни из них являются реактивными, свойственными для воспалительно-репаративных процессов (двуядерные клетки, клетки с цитоплазматической вакуолью). Поскольку они имеют однонаправленные с

активностью заболевания изменения, их можно считать маркерами тяжести ХП. Другие изменения – цитогенетические аномалии (клетки с микроядрами, протрузии) и морфологические признаки апоптоза (конденсированный хроматин, кариорексис, кариопикноз, апоптотические тельца) отражают генотоксические эффекты – факторов внешней среды.

Для объективной оценки диагностической ценности установленных сдвигов теста использовался ROC-анализ, который позволил рассчитать ДС и ДЧ показателей, а также ДЭ, которая выражается величиной площади под ROC кривой – AUC.

Таким образом, наиболее диагностически значимыми при легкой степени ХП является количество клеток с кариопикнозом, при средней и тяжелой степени количество клеток с микроядрами, с кариолизисом и апоптотическими тельцами (Таблица 18).

Таблица 18 — Диагностическая эффективность цитологических аномалий буккального эпителия при хроническом пародонтите

Показатели	AUC при ХП		
	Легкая ст./ II стадия	Средняя ст./ III стадия	Тяжелая ст./ IV стадия
Клетки с микроядрами	0,65	0,76	0,78
Двухядерные клетки	0,51	0,62	0,53
Клетки с протрузией	0,65	0,7	0,71
Кариопикноз	0,70	0,69	0,80
Кариорексис	0,57	0,68	0,70
Кариолизис	0,6	0,75	0,70
Клетки с перинуклеарной вакуолью	0,56	0,62	0,70
Апоптотические тельца	0,64	0,76	0,76
Клетки с конденсирован. хроматином	0,69	0,74	0,71

Учитывая, что диагностика тяжелых форм ХП чаще всего не вызывает проблем в клинической практике, в отличие от начальных проявлений заболевания, нами проанализированы диагностические характеристики изученных параметров при легкой степени ХП.

Следовательно, наиболее чувствительными показателями в диагностике легкой степени ХП стали уровень клеток с двумя ядрами и кариопикнозом, а наиболее специфичными показателями – клетки с микроядрами, протрузиями, апоптозными тельцами (таблица 19).

Таблица 19 — Диагностические характеристики цитологических аномалий при хроническом пародонтите легкой степени тяжести.

Показатели	Критическое значение	ДЧ, %	ДС, %
Клетки с микроядрами	1,2	46,1	91,6
Двухядерные клетки	2,2	92,0	70,5
Клетки с протрузией	0,8	53,8	88,8
Кариопикноз	0,6	92,3	44,4
Кариорексис	3,0	70,7	94,4
Кариолизис	1,8	69,2	69,4
Клетки с перинуклеарной вакуолью	0,4	69,2	38,8
Клетки с апоптотическими тельцами	0,6	53,8	94,4
Клетки с конденсированным хроматином	1,3	86,4	91,2

Такой подход позволил выявить, что наиболее значимым показателем в ранней диагностике легкой степени ХП можно считать уровень клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями ядра: кариопикнозом, кариорексисом и кариолизисом.

ХП относится к числу наиболее распространенных заболеваний, приводящее к снижению качества жизни. Поэтому вопросы его ранней диагностики и своевременного лечения сохраняют свою актуальность.

Для подтверждения патогенетических взаимосвязей между цитологическими параметрами и воспалением пародонта, нами был произведён дискриминантный анализ, задачей которого стояло сформировать прогностическую модель постановки диагноза «хронический пародонтит». В качестве зависимой переменной выступало состояние пародонта пациента: здоровый пародонт, хронический пародонтит легкой степени тяжести (пародонтит ЛС), хронический пародонтит средней степени (пародонтит СС). Независимыми предикторами являлось число клеток разного уровня созревания: базальные, промежуточные и поверхностные, а также аномалии ядер клеток буккального эпителия: протрузии, микроядра, наличие перинуклеарной вакуоли, двуядерные клетки, наличие конденсации хроматина, вакуолизации ядра, кариорексис, кариолизис, кариопикноз и апоптические тельца.

Результаты объективности прогностической модели постановки диагноза на основе цитологического исследования представлены в таблице 20.

Таблица 20 — Матрица классификации

Статус пациента	Доля правильных предсказания	Здоровый p=,5586	Пародонтит ЛС p=,3243	Пародонтит СС p=,1171
Здоровый	100,0000	62,00000	0,00000	0,00000
Пародонтит ЛС	47,2222	15,00000	17,00000	4,00000
Пародонтит СС	69,2308	3,00000	1,00000	9,00000
Всего	79,2793	80,00000	18,00000	13,00000

Построенная нами модель предсказывала верный диагноз в 79,3% случаев, что является показателем ее состоятельности и эффективности в качестве дополнительного метода исследования в диагностике воспалительных заболеваний пародонта. Однако процент совпадения клинического диагноза

«хронический пародонтит легкой степени» и предполагаемого диагноза модели всего лишь 47,2%. Это сопоставимо с данными основных методов исследования в клинической диагностике данного заболевания, так как корректный диагноз пародонтита может быть поставлен только после оценки состояния костной ткани по данным рентгенологического исследования. Поэтому в практике могут иметь применение линейные дискриминантные функции Фишера для здоровых пациентов и пациентов с пародонтитом средней степени тяжести:

$$\varphi(\text{здоровый}) = -1,23972 + 0,65413 * \% \text{микроядра} + 0,45060 * \% \text{перинуклеарная вакуоль} + 0,13530 * \% \text{вакуолизация ядра} - 0,08734 * \% \text{апоптические тельца}$$

Остальные пациенты, в таком случае, имеют пародонтит неопределенной степени тяжести.

$$\varphi(\text{пародонтит СС}) = -8,83003 + 3,44848 * \% \text{микроядра} + 0,77064 * \% \text{перинуклеарная вакуоль} + 0,41663 * \% \text{вакуолизация ядра} - 0,25123 * \% \text{апоптические тельца}$$

Распределение предикторов, по уровню их значимости представлено в таблице 21. Из таблицы следует, что наиболее значимыми показателями буккальной цитогаммы в постановке диагноза ХП являются ядерные аномалии такие как: микроядра, вакуолизация ядра, наличие перинуклеарной вакуоли, конденсации хроматина и апоптических телец. Данные показатели можно считать абсолютными предикторами пародонтита ($p < 0,05$).

Таблица 21 — Многомерные критерии значимости

Показатель	Критерий	Значение	F	Эффект сс	Ошибка сс	p
Свободный член	Уилкса	0,131373	343,8185	2	104	0,000000
Базальные клетки	Уилкса	1,000000		0		
Промежуточные клетки	Уилкса	1,000000		0		
Поверхностные клетки	Уилкса	1,000000		0		
Микроядра	Уилкса	0,778973	14,7545	2	104	0,000002
Протрузии	Уилкса	1,000000		0		
Двухядерные клетки	Уилкса	1,000000		0		
Перинуклеарная вакуоль	Уилкса	0,821729	11,2812	2	104	0,000037
Вакуолизация ядра	Уилкса	0,914110	4,8859	2	104	0,009374
Конденсация хроматина	Уилкса	0,784294	14,3017	2	104	0,000003
Кариопикноз	Уилкса	1,000000		0		
Кариорексис	Уилкса	1,000000		0		
Кариолизис	Уилкса	1,000000		0		
Апоптические тельца	Уилкса	0,131373	3,5099	2	104	0,033489

Полученные данные позволили выявить наиболее значимые показатели буккальной цитограммы в оценке тяжести ХП. Предложенная математически модель отражает закономерности распределения аномалий развития ядре при ХП, формирует верный прогноз в 79,3% случаев. Сформированы дискриминантные функции, позволяющие отнести исследуемый образец к одной из двух совокупностей: здоровый человек/больной с пародонтитом, а также уточнить степень тяжести заболевания.

В данном исследовании установлены реактивные изменения БЭ, которые патогенетически взаимосвязаны с указанными выше иммунологическими сдвигами. На основании полученных данных можно заключить, что подсчет числа клеток с протрузиями, микроядрами и апоптозными тельцами в БЭ может иметь

диагностическое значение при ХП, а число клеток с деструкцией ядра является достаточно чувствительным критерием начальной стадии (легкой степени тяжести) ХП. Стоит отметить, что поскольку цитологические и кариологические особенности буккальных клеток имеют однонаправленные с активностью заболевания изменения, их можно считать показателями тяжести ХП.

Снижение активности пролиферативных процессов в сочетании с повышением уровня клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями ядра легко объяснимы механизмами воспаления пародонтальных тканей [113, 117].

Таким образом, проведенное цитологическое исследование БЭ (буккальная цитограмма) является инструментом для оценки системных и локальных реакций организма при ХП, а буккальные эпителиоциты можно рассматривать в качестве «тест-системы *in vivo*», характеризующей состояние не только слизистой оболочки полости рта, но и пародонтальных тканей. Это позволит в будущем рассматривать буккальную цитограмму одним из методов определения эффективности лечебно-профилактических средств, в частности - в стоматологии. Такой подход является перспективным не только в связи с выявленной достаточной информативностью, но он привлекателен как метод неинвазивной диагностики.

Определив в исследовании наиболее диагностически эффективные параметры, нами была рассчитана прогностическая ценность положительного результата (ПЦ) для следующих критических точек (таблица 22). В отличие от чувствительности (способности диагностического метода давать правильный результат) ПЦ характеризует это вероятность заболевания при положительном (патологическом) результате диагностического исследования. Она зависит не только от самого метода, его чувствительности и специфичности, но и от распространенности заболевания в исследуемой популяции. Учитывая высокую распространенность ХП мы посчитали важным рассчитать и ПЦ.

Таблица 22 — Прогностическая ценность положительного результата теста

Показатель	Критическая точка	ПЦ
pH	0,66	35%
Лейкоциты лейк/мкл	17,0	71%
Общий белок г/л	0,8	50%
Кариопикноз %	1	73%
Кариорексис %	0,7	86%
Кариолизис %	2,8	85%
Микроядра %	0,8	81%
ИЛ-4 пг/мл	15,0	91%
ИЛ-6 пг/мл	3,5	91%
ММП-7 пг/мл	6830,3	82%
ММП-8 пг/мл	7532,0	91%
ММП-12 пг/мл	1504,1	90%

Таким образом, наибольшей прогностической ценностью обладают ИЛ-4, ИЛ-6 и ММП-7,8,12. Однако несмотря на более низкую прогностическую ценность химических и цитологических параметров РЖ и БЭ, на первых этапах обследования использование данных биомаркеров оправдано в связи со скоростью и простотой получения результата.

На основании проведенного исследования биомаркеров в РЖ, оценки состояния пародонтальных тканей и БЭ при ХП можно выделить ряд лабораторных признаков, характеризующих различные фазы воспаления. Например, гистологические признаки участки мукоидного и фибриноидного набухания, снижение pH характеризуют альтерацию тканей; полнокровие сосудов в очаге воспаления и увеличение концентрации ФРЭС указывают на нарушение микроциркуляции; отек в тканях и увеличение числа лейкоцитов в РЖ говорит о развитии фаз экссудации и эмиграции. Пролиферация фибропластических клеток в тканях пародонта, изменения в количестве двуядерных клеток БЭ отражает репаративную фазу. Сопоставляя выраженность лабораторных изменений в динамике воспалительного процесса следует отметить относительно низкую выраженность последней.

Полученные данные дают основание сформулировать патогенетически обоснованный лабораторный мониторинг ХП. В работе было проанализировано 24 лабораторных параметра, которые характеризуются различными прогностическими значениями, был произведен расчет и определены показатели с наибольшей прогностической ценностью.

Основываясь на этих данных показано, что лабораторный мониторинг можно разделить на 3 этапа:

1. Оценка физико-химических параметров РЖ: лейкоциты- эстеразный тест (предсказательная ценность 71%);
2. Цитологическое исследование БЭ (предсказательная ценность 81%);
3. Иммунохимическое исследование (предсказательная ценность ИЛ-4/ИЛ-6 91%, ММП-7 82%, ММП-8 91%, ММП-12 90%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Здоровье полости рта является динамическим состоянием, которое поддерживается активным равновесием между микробиотой полости рта, защитными реакциями слизистой оболочки рта и иммунной системой. Нарушение этого равновесия приводит к развитию различных патологических процессов, в структуре которых преобладают воспалительные заболевания, прежде всего – пародонтоза. По статистическим данным из различных источников пародонтитом поражено от 30 до 95% населения [59, 66, 87, 128]. Поскольку данное заболевание существенно снижает качество жизни и влечет за собой существенные медико-экономические потери, закономерен интерес исследователей к этиологии и патогенезу данной группы болезней. Об этом свидетельствует тот факт, что в одной из наиболее авторитетных медицинских библиографических баз PubMed только за первые три месяца 2019 года размещено 404 публикации по данной проблеме. Однако отсутствие успехов в борьбе с пародонтитом как на локальном уровне, так и на уровне государств с разным уровнем медицинского обслуживания [59, 66, 87, 128, 164] говорит о недостаточности знаний о механизмах управления пародонтальным здоровьем. Базируясь на существующих представлениях о причинах возникновения и механизмах прогрессирования ХП, мы предположили, что прогресс в патофизиологии пародонтита может быть связан с изучением особенностей системных реакций организма и локальных факторов полости рта: ротовой жидкости и буккального эпителия, что определило цель исследования.

Оценка системных реакций, включающая исследование крови и кроветворных органов, требовала создания экспериментальной модели хронического пародонтита на лабораторных животных. В настоящее время описано достаточно большое количество таких моделей (представленных в главе 3), но все они не лишены недостатков. Главным из них является то, что авторы моделировали один или два механизма патогенеза заболевания, что ограничивает возможности их использования не только для поиска новых закономерностей, но

и для апробации новых диагностических и лечебно-профилактических средств и технологий. Поэтому нами была разработана модель хронического пародонтита крыс, основанная на сочетанном воздействии ряда этиологических и патогенетических факторов: бактериальное обсеменение десны пародонтогенными микроорганизмами, механическое повреждение (разрыв циркулярной связки зуба), нарушение микроциркуляции тканей (наложения ортодонтической проволоки). Адекватность модели была подтверждена прежде всего морфологическими данными, аналогичными изменениям в тканях при хроническом пародонтите у человека. В частности, 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 16).

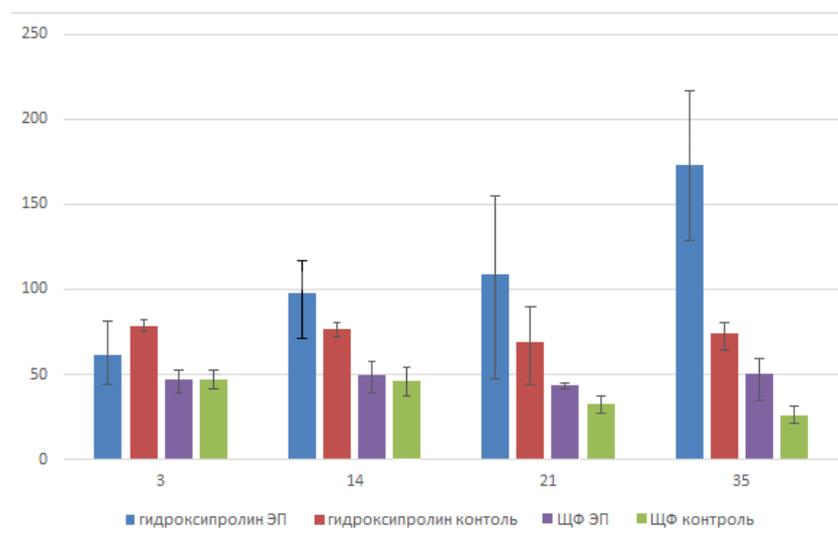


Рисунок 16 — Маркеры костного ремоделирования в сыворотке крыс при ЭП

В динамике формирования пародонтита выраженные локальные изменения в тканях пародонта сопровождались достаточно стереотипной острофазной реакцией у животных – нейтрофильным лейкоцитозом (умеренно выраженным), при этом заметных изменений в кроветворения в селезенке не было обнаружено. Отмечалось повышение концентрации СРБ и цитокинов: ИЛ-6 в 1,7 раза и γ ИФ в 10,5 раз к 7 суткам (рисунок 17).

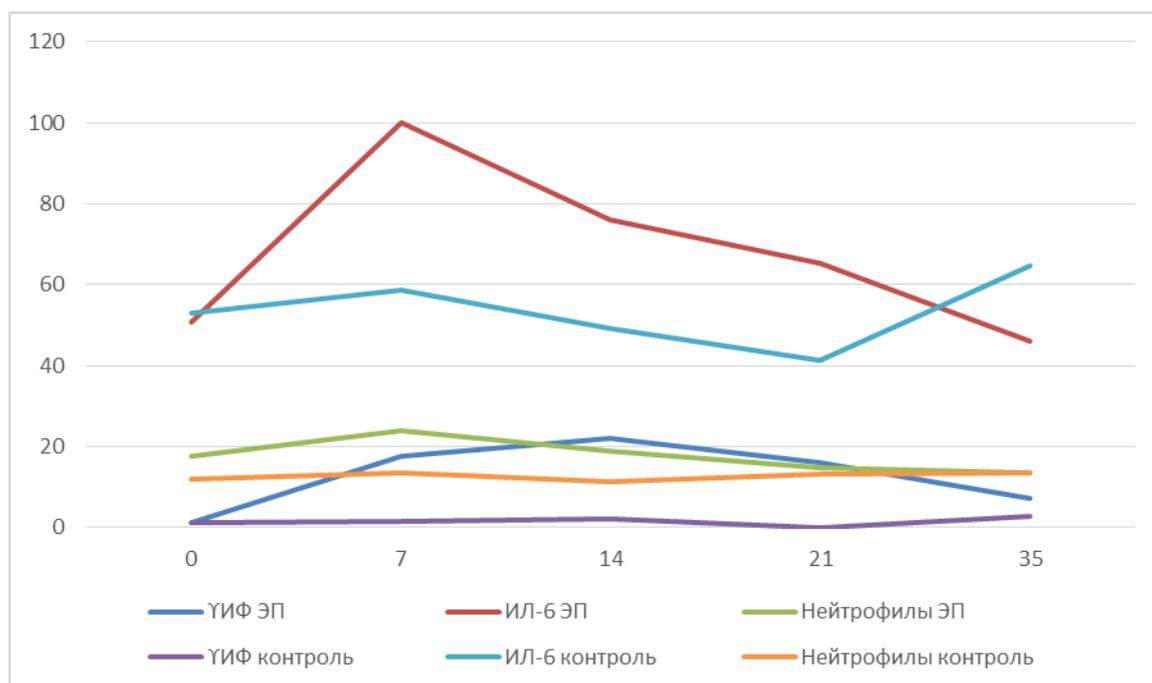


Рисунок 17 — Системная реакция крови при ЭП

Таким образом, авторская модель ЭП позволили выявить у животных типичные морфологические признаки пародонтита, характер и степень выраженности которых менялись в динамике воспалительного процесса. Наряду с этим была установлена умеренно выраженная реакция крови в виде нейтрофильного лейкоцитоза, острофазная реакция с гиперцитокинемией.

Исследования на пациентах были направлены преимущественно на оценку локальных иммунных реакций. Для этого изучали физико-химические и иммунологические параметры РЖ методами сухой химии и иммунохимии. Признаками воспалительного процесса тканей полости рта являются увеличение концентрации белка и количества лейкоцитов в РЖ. Согласно общепринятым

представлениям, одним из звеньев патогенеза воспалительного процесса пародонта является активация мукозального иммунитета. В нашем исследовании это было подтверждено увеличением концентрации сIgA и лактоферрина.

Существующая парадигма патогенеза ХП основана на изменении соотношения продуцируемых Th1/Th2 факторов, то есть предполагает переход от эффективного клеточного иммунитета к нарушенному гуморальному. Нами были рассмотрены основные цитокины про- и противовоспалительного ответа (рисунок 18).

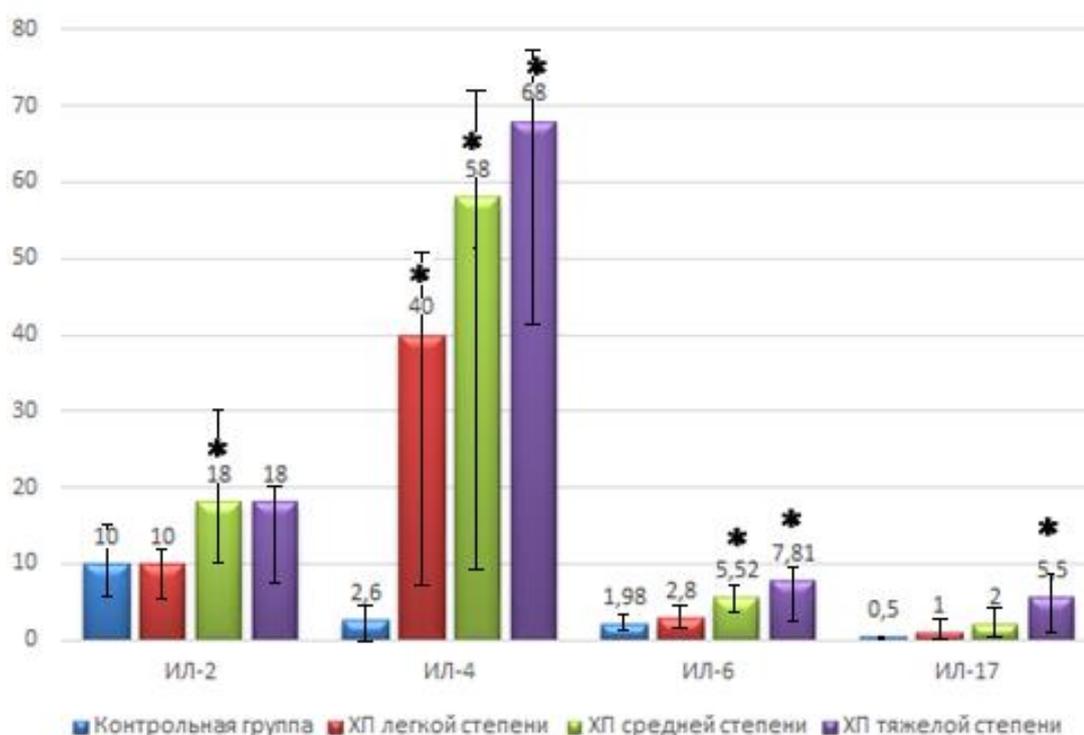


Рисунок 18 — Концентрация цитокинов в РЖ пациентов с ХП

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 уровня про- и противовоспалительных интерлейкинов свидетельствует об уменьшении адаптационных резервов организма и может

повлиять на дальнейшее прогрессирование воспалительного процесса и развитие осложнений заболевания.

Усиленная продукция цитокинов по убедительным данным ряда авторов индуцирует активацию протеолитических ферментов, в том числе и ММП [19, 143, 144]. Наиболее существенное 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 [23, 138]. Таким образом, участие ММП-8 в патогенезе ХП представляется вполне логичным. Кроме того, нами показано, что характер изменения активности данного фермента соответствует активации в клетках буккального эпителия апоптоза. Кроме того, сами эпителиоциты под воздействием цитокинов могут в небольшом количестве секретировать коллагеназу, чем также объясняется повышение ее активности в РЖ.

Выявленное нами повышение концентрации ФРЭС в РЖ, который некоторыми авторами рассматривается как фактор неоангиогенеза и дополнительный маркер эндотелиальной дисфункции [167], в комплексе с морфологическими данными (рисунок 7) подтверждает нарушение микроциркуляции при ХП.

Результаты многочисленных исследований в области патофизиологии ХП не дают развернутого 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. Так же 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. 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 среды, образа 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 [138].

Приведенный в 4 главе дискриминантный анализ и оценка диагностической эффективности параметров БЭ показал, что при легкой степени ХП AUC выше у клеток с кариопикнозом, а при средней и тяжелой степени более показательными аномалиями можно считать количество клеток с микроядрами, с кариолизисом, апоптотическими тельцами и конденсированным хроматином.

На основании анализа буккальных цитогрaмм можно заключить, что к маркерами тяжести ХП следует цитогенетические аномалии (клетки с микроядрами, протрузиями ядра) и морфологические признаки апоптоза (конденсированный хроматин, кариорексис, кариопикноз, апоптотические тельца) (рисунок 19).

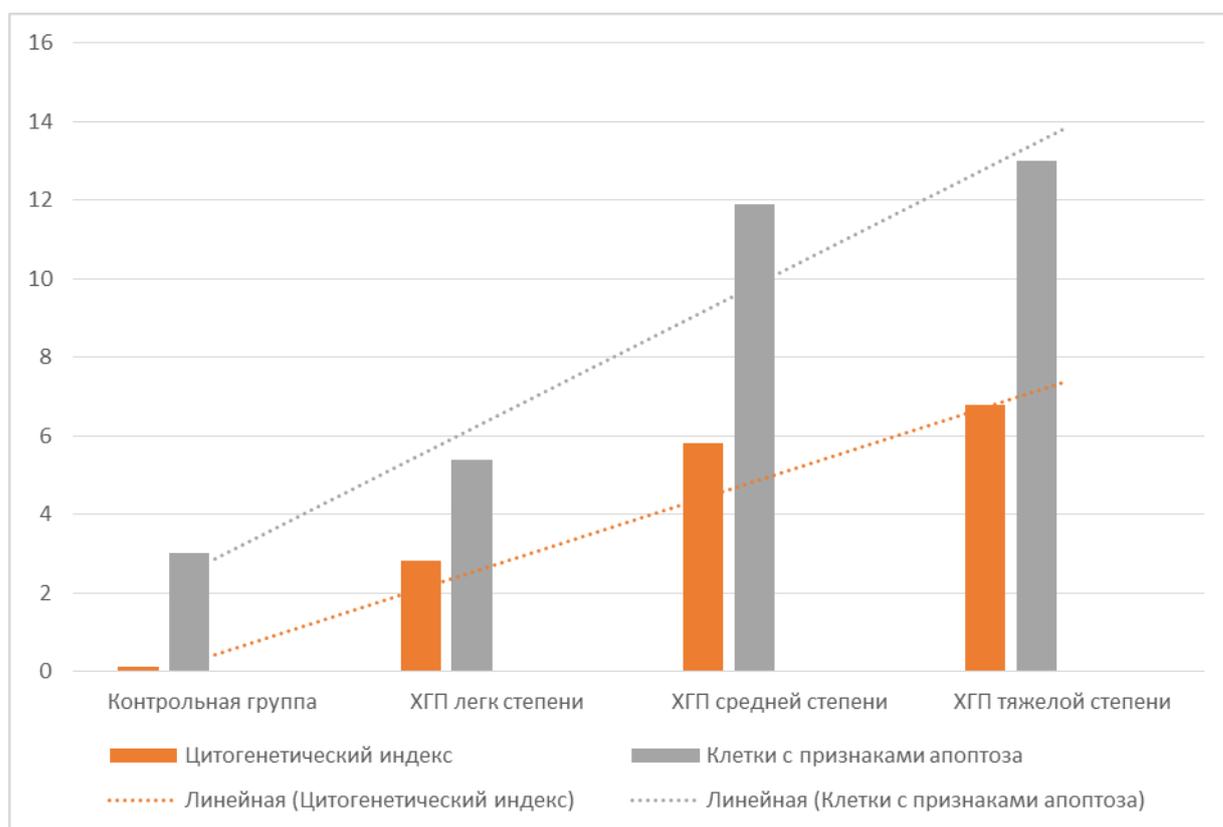


Рисунок 19 — Динамика изменения цитологических индексов буккальной цитограммы при ХП

На основании определения диагностических характеристик изученных цитологических параметров следует подчеркнуть, что если некоторые из них: клетки с цитогенетическими аномалиями и апоптотическими тельцами в БЭ имеют диагностическое значение при ХП, то число клеток с деструкцией ядра является достаточно чувствительным критерием ранних проявлений ХП (легкой степени тяжести). Это имеет существенное значение в связи с тем обстоятельством, что именно данная стадия заболевания наиболее сложна для диагностики вследствие ограниченности четких объективных критериев. Стоит отметить, что поскольку цитогенетические и кариологические особенности буккальных клеток имеют однонаправленные с активностью заболевания изменения, их можно считать показателями тяжести ХП. Следовательно, цитологическое исследование БЭ – буккальная цитограмма может стать неинвазивным инструментом оценки системных и локальных реакций организма при ХП, а также одним из методов определения эффективности лечебно-профилактических средств.

В процессе проведенного исследования нами было изучено 24 лабораторных параметра РЖ и БЭ у 240 человек. На основании оценки их диагностических характеристик были выделены наиболее информативные лабораторные биомаркеры РЖ 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 20). Данная характеристика показывает вероятность заболевания при использовании данного теста.

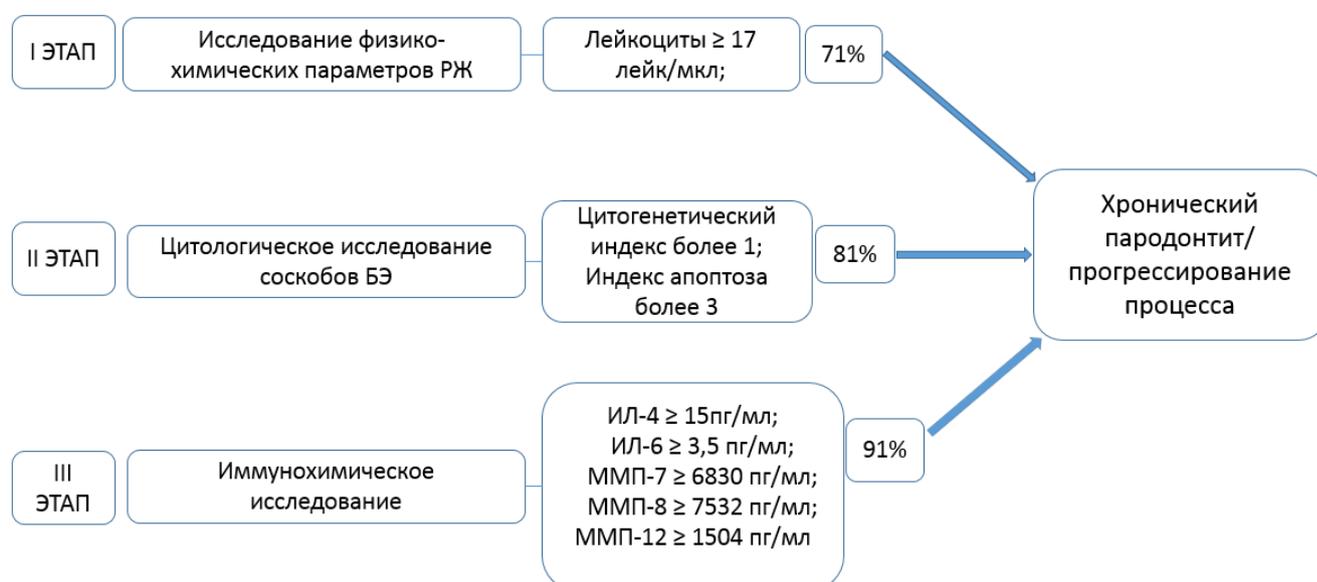


Рисунок 20 — Алгоритм лабораторного мониторинга при ХП

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 [68, 113]. При нарушении механизмов иммунорегуляции, в частности - дисбалансе Th-I/Th-II - продуцируемых цитокинов, что развивает «неконтролируемый» воспалительный ответ, который приводит к прогрессированию заболевания [30, 85, 145].

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 [81, 131, 175], результатом чего является активация синтеза цитокинов, ключевыми среди них является ИЛ-1 β /ФНО- α , которые в свою очередь стимулируют синтез ИЛ-6, ИЛ-4 моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами [22, 52]. Так начинается сложный каскад разнонаправленных цитокиновых реакций.

Изменения уровней ИЛ-1 β /ФНО- α при ХП детально изучено в многочисленных работах [34, 182, 198]. В нашем исследовании акцент сделан на ИЛ-6, 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) [44, 54], а с другой совместно с ИЛ-2 и ИФ γ способствуют сдвигу ремоделирования в сторону остеокластической резорбции. Аналогичными свойствами обладает ИЛ-17. Являясь клеточным регулятором секреторного иммунитета, помимо этого способствует остеокластогенезу [57, 117].

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 [198].

ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 активизируют синтез протеаз макрофагами, нейтрофилами, фибробластами, эндотелием. В частности, 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 [90, 120].

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 подтверждено 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 21.

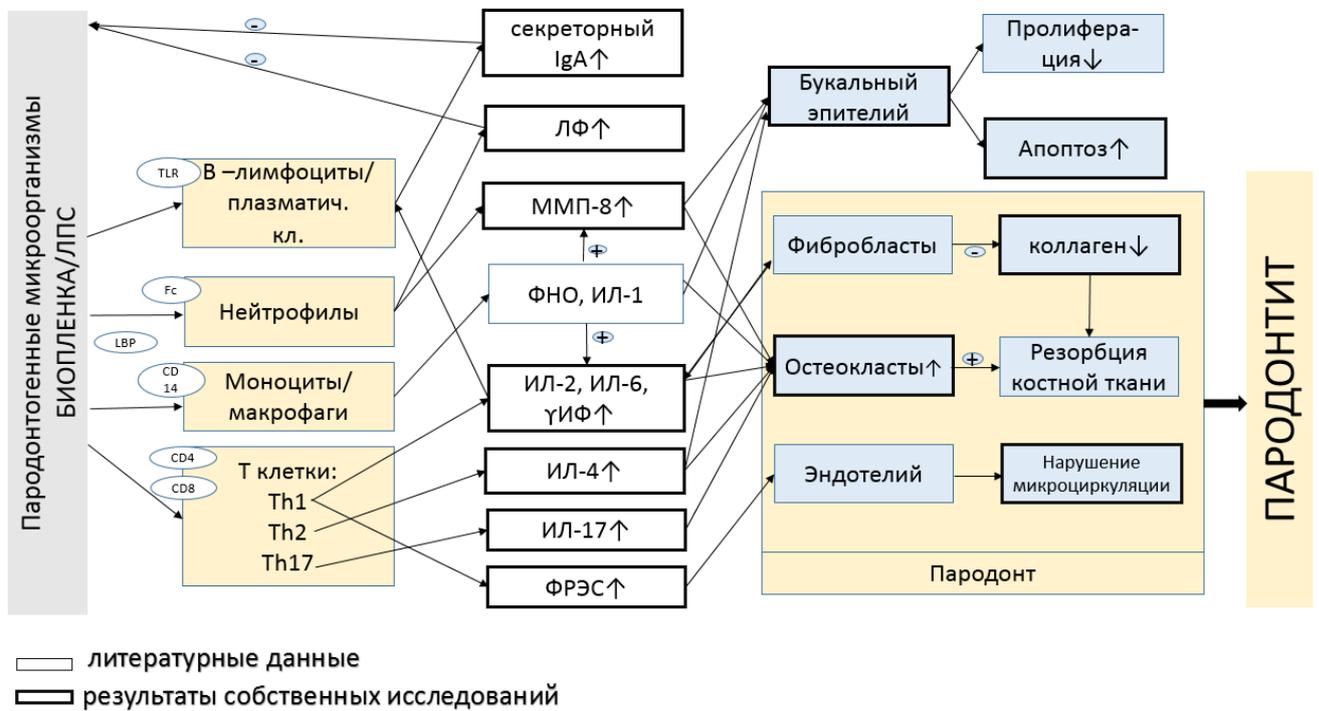


Рисунок 21 — Особенности иммунологической реактивности при ХП

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 отражается 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 ≥ 15 пг/мл и интерлейкина-6 $\geq 3,5$ пг/мл, активность ММП-7 ≥ 6830 пг/мл, ММП-8 ≥ 7532 пг/мл, ММП-12 ≥ 1504 пг/мл диагностируется активность хронического пародонтита).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЭ	– буккальный эпителий
ИЛ	– интерлейкин
γИФ	– интерферон- гамма
КПУ	– сумма кариозных, пломбированных и удаленных зубов у одного пациента
ЛПС	– липополисахарид
ЛФ	– лактоферрин
ЛЭК	– Локальный этический комитет
ММП	– матриксная металлопротеиназа
Нф	– нейтрофилы
ОАК	– общий анализ крови
РЖ	– ротовая жидкость
СРБ	– С реактивный белок
ФРЭС	– фактор роста эндотелия сосудов
ХП	– хронический пародонтит
ЦНИЛ	– Центральная научно-исследовательская лаборатория
ЩФ	– «костная» щелочная фосфатаза
ЭП	– экспериментальный пародонтит
ЯИН	– ядерный индекс нейтрофилов
Ig	– иммуноглобулин
HGB	– гемоглобин
ОНИ-S	– упрощенный индекс гигиены полости рта
PAMP	– патоген-ассоциированные молекулярные структуры
PLT	– тромбоциты
PMA	– папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс
RBC	– эритроциты
WBC	– лейкоциты
TLP	– Toll подобные рецепторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоклицкая Г.Ф. Ведущие местные факторы риска в развитии воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста / Г.Ф. Белоклицкая, К.О. Горголь // Стоматология. Эстетика. Инновации.- 2017.- Т.1.- №2.- С.203-214.
2. Блашкова С.Л. Особенности процессов иммунной регуляции в тканях пародонта у лиц, находящихся на ортодонтическом лечении / С.Л. Блашкова, И.Г. Мустафин, Г.Р. Халиуллина// Пародонтология.- 2016. –Т.21.- №3(80). -С.23-26.
3. Блашкова С.Л. Состояние местного иммунитета при развитии комбинированных эндо-пародонтальных поражений (обзор литературы) /С.Л. Блашкова, Е.В. Крикун// Пародонтология.- 2017.- Т.22.-№4(85).- С.25-28
4. Бутюгин И.А. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом /И.А. Бутюгин, И.И. Долгушин, Г.И. Ронь// Уральский медицинский журнал. -2014.- №5(119).- С. 34-38.
5. Буккальный эпителий как отражение физиологических и патофизиологических процессов /А.Г. Поршин, Н.А. Дурнова, В.Н. Сальникова [и др.]// Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». – 2019.-№1(37).-С. 74-78.
6. Булкина Н.В. Современные аспекты этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта. особенности клинических проявлений рефрактерного пародонтита / Н.В. Булкина, В.М. Моргунова // Фундаментальные исследования.- 2012. -№ 2-2. - С. 415-420.
7. Генотоксические и цитотоксические эффекты в буккальных эпителиоцитах рабочих предприятия по производству черновой меди /М.П. Листьев, Г.Я. Липатов, Т.М. Еловицова [и др.]// Здоровье населения и среда обитания.- 2013.- №9(246). – С. 17-18.
8. Головин И.Ю. Анализ показателей матриксных металлопротеиназ при воспалительных осложнениях в тканях пародонта при ортодонтическом лечении

несъемными аппаратами / И.Ю. Головин, В.Е. Красников, Ю.Ю. Первов // Цитокины и воспаление. – 2017. -№3. – С. 36–38.

9. Голицына А.А. Анализ локальных показателей цитокинового статуса у пациентов с пародонтитом на фоне сахарного диабета II типа / А.А. Голицына, Ю.В. Югай, Е.В. Маркелова // Актуальные научные исследования в современном мире. - 2017. - № 8-3(28). - С. 22-27.

10. Грудянов А. И. Заболевания пародонта. – М.: МИА. – 2009. – С.336.

11. Дмитриева Л.А. Toll-like рецепторы и их роль в развитии пародонтита / Л.А. Дмитриева, К.Г. Гуревич, Л.М. Теблосева // Стоматология для всех. – 2012.- №3.- С.8-10.

12. Заболотный Т.Д. Состояние местного и системного иммунитета у больных с разным течением генерализованного пародонтита / Т.Д. Заболотный, Ю.Л. Бандрицкий, В.Т. Дырык // Стоматология. - 2016. - Т. 95.- № 6. - С. 23-25.

13. Изучение цитогенетической активности хлоргексидина на буккальный эпителий с помощью микроядерного теста на стоматологическом приеме / В.Н. Сальников, Н.А. Дурнова, М.Н. Курчатова [и др.] // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. –2017. –Т 7. –№1. –С. 371–373.

14. Иммунологические особенности ротовой жидкости у пациентов с герпесвирусной инфекцией / В.В. Базарный, В.П. Журавлев [и др.]// Уральский медицинский журнал. – 2013. - №5(110). – С. 5-8.

15. Иорданишвили А.К. Состояние и меры улучшения стоматологической помощи населению южного федерального округа России / А.К. Иорданишвили, А.И. Володин // Вестник российской военно-медицинской академии. – 2018. - №3(63). – С. 57-61.

16. Казеко Л.А. Роль матриксных металлопротеиназ в развитии заболеваний периодонта / Казеко Л.А // Военная медицина. - 2011.- № 1 (18).- С. 109-112.

17. Колмакова Т.С. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей / Т.С. Колмакова, С.Н. Белик, Е.В. Моргуль // - М.: «Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ». -2013. - С.31.

18. Корсаков А.В. Буккальный эпителий как индикатор состояния окружающей среды /А. В. Корсаков, А. В. Яблоков, В. П. Трошин, В. П. Михалев// Известия ран. серия биологическая.- 2015.- №3.- С.331-336.

19. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии /Н.Е. Кушлинский, А.С. Шадрина [и др.]// Альманах клинической медицины. - 2017.- Т. -45. № 4.- С. 266-279.

20. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии / А.С. Шадрина, Я.З. Плиева [и др.]// Альманах клинической медицины. - 2017. - Т. 45. - № 4. - С. 266-279.

21. Когина Э.Н. Цитокиновый профиль ротовой жидкости у пациентов с хроническим апикальным периодонтитом зубов /Э.Н.Когина, Л.П. Герасимова, М.Ф Кабирова, Л.М. Саптарова// Успехи современной науки. -2016.- Т.1.-№6.- С. 24-27.

22. Кузнецова О.А. Диагностические критерии иммунологической реактивности полости рта у больных при обострении хронического генерализованного пародонтита / О.А. Кузнецова, Е.И. Губанова // Психосоматические и интегративные исследования. – 2015. – С. 4-9.

23. Кушлинский Н. Е. Матриксные металлопротеиназы и воспалительные цитокины в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами реставраций зубов и зубных рядов / Н.Е. Кушлинский, Е.А. Соловых, Т.Б. Караогланова О.О. Янушевич // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. - №10. – С. 19-21.

24. Макеева, И.М. Особенности оказания стоматологической помощи иностранным студентам, прибывшим из различных климатогеографических

регионов мира / И.М. Макеева, Ф.Ю. Даурова, Н.В. Пятигорская // Вестн. РАМН.—2013.—№ 3.—С.59–61.

25. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при первичных опухолях костей: клинко-морфологические корреляции /Н.Е. Кушлинский, И.С Черномаз [и др.]// Молекулярная медицина. - 2018. - Т. -16. № 5. -С. 45-50

26. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм / А.С. Шадрина, И.В. Терешкина [и др.]// Патогенез. - 2017. - Т. 15. - № 2. - С. 14-23.

27. Медицинская реабилитация заболеваний пародонта на кисловодском курорте / А.Н. Елизаров, М.Г. Естенкова [и др.]// Кремлевская медицина. Клинический вестник. - 2015. - № 1.- С. 66-70.

28. Минеральный состав смешанной слюны у пациентов с флюорозом зубов / Н.И. Крихели, Е.И. Карамышева [и др.]// Стоматология. – 2017. - №6(96). – С. 26-29.

29. Михальченко, Д.В. Критерии для разработки комплексной программы профилактики заболеваний твердых тканей зубов у студентов вузов / Д.В. Михальченко, А.В. Михальченко, Н.М. Корнеева // Современ. пробл. науки и образования.—2014.—№3.—С. 545.

30. Моделирование сдвигов и корреляционных связей гематологических и иммунологических показателей у больных хроническим генерализованным пародонтитом / Н.М. Агарков С.Н. Гонтарев [и др.]// Стоматологи. -2016. - №6 (95). – С. 12-16.

31. Николаева А.А., Клинико-иммунологическая характеристика и оптимизация терапии постгерпетического ганглионита у пациентов с лицевыми болями / А.А. Николаева, В.П. Журавлев, В.В. Базарный // Head and neck/Голова и шея. Российское издание. – 2016. - №1-2. – С. 10-15.

32. Николаева А.В. Моделирование экспериментального пародонтита у крыс в условиях токсической гипоестрогении / А.В. Николаева // Профессиональные издания – Минск 2015 г.

33. Николаева Е.Н. Значение цитокинов ротовой жидкости и пародонтопатогенной микробиоты в развитии гингивита на фоне академического стресса у студентов медицинского вуза /Е.Н. Николаева, И.П. Балмасова, Е.В. Ипполитов, М.В. Ющук// Алфавит. – 2017 .- Т.1.- №1(298). – С. 31-36.

34. Орехова Л.Ю. Местный иммунитет и особенности клинического течения хронического генерализованного катарального гингивита (ХГКГ), ассоциированного с нейроциркуляторной астенией (НЦА) у юношей призывного возраст / Л.Ю. Орехова, М. Г. Пачкория, Н. А. Яманидзе // Проблемы стоматологии.-2017. –Т.13.- №3.- С. 36-41.

35. Отклонения цитологических и функциональных показателей буккального эпителия у больных с аутоиммунным сахарным диабетом (часть II) /Д.А. Доменюк, Б.Н. Давыдов, М.П. Порфириадис [и др.]// Институт стоматологии. -2017.- №4(77).-С.30-35.

36. Оценка генотоксичных эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма/ А.В. Дерюгина, М.Н. Иващенко, П.С. Игнатъев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018.- Т.63.- №5.- С.290-292.

37. Панахов Н.А. Уровни циркулирующих цитокинов в ранние сроки послеимплантационного периода / Н.А. Панахов, Т.Г. Махмудов// Казанский медицинский журнал. – 2017. – Т. 98. - №6. – С. 938-943.

38. Патент № 2 625 295,С 1/ 2017 г. Способ экспериментального моделирования пародонтита. К.Н. Школьная, В.Г. Атрушкевич, Г.Н. Берченко.

39. Патент № 2433485 С1/ 2011 г. Бюл. № 31 Способ экспериментального моделирования пародонтита. О.О. Янушевич, Н.В. Ярыгин, В.Н. Ярыгин, К.Н. Ярыгин и др.

40. Протеолитическая активности во фракциях неколлагеновых белков, получаемых при диссоциативном экстрагировании костной ткани / К.С. Десятниченко, М.А. Ковинька // Гений ортопедии. – 1997. - №3. – С. 35-37.
41. Ронь Г.И. Экологическая система и иммунитет полости рта / Г.И. Ронь, Л.Н. Балян // Проблемы стоматологии. – 2012. - №2.- С.8-12.
42. Ронь Г.И. Определение местного иммунологического статуса у пациентов с хроническим рецидивирующим афтозным стоматитом / Г.И. Ронь, Н.Д. Чернышева, Т.В. Бушуева, И.И. Сафиуллина // Проблемы стоматологии. - 2009. - №4.- С. 20-21.
43. Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе пародонтита / Л.В. Ганковская, Н.М. Хелминская [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. - № 2. - С. - 100-107.
44. Саркисян Н.Г. Оценка концентрации секреторного и сывороточного иммуноглобулина а при пародонтите / Н.Г. Саркисян, Г.И. Ронь, И.А. Тузанкина // Пародонтология. – 2014.- Т.19.-№2(71). – С. 6-8.
45. Сигнальные молекулы в буккульном эпителии: оптимизация диагностически социально значимых заболеваний /М.А. Пальцев, И.М. Кветной, В.О. Полякова [и др.] // Молекулярная медицина.-2012.-№4.-С. 18-23.
46. Состояния ротовой полости у беременных при различных типах сахарного диабета: клиническая и цитологическая характеристика / Л.Ю. Орехова, А.А. Александрова, Л.А. Александрова, [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т.65.- №6.- С.45-51.
47. Способ получения модели хронического пародонтита у крыс / Н.Г.Саркисян, Г. И. Ронь [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2014.- №3 (117). – С. 54-56.
48. Сычева Л.П Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека / Л.П. Сычева // Медицинская генетика. – 2007.- №11(65). –Т.6.- С.3-11.

49. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека / Л.П. Сычева // Гигиена и санитария.- 2012.- №6.- Т.91.- С. 68-72.
50. Терапевтическая стоматология: национальное руководство / Л. А. Дмитриева Ю.М. Максимовский. – М. : «ГЭОТАР-Медиа», 2015.- С. 125.
51. Трифонова Е.Б. Закономерности костного ремоделирования после чрескостного остеосинтеза при сниженной минеральной плотности костной ткани / Е.Б. Трифонова / Гений ортопедии. – 2011.- №4. С.117-121.
52. Уровень провоспалительных саливарных цитокинов у детей с аутоиммунным сахарным диабетом в различные фазы компенсации эндокринопатии /И.М. Быков, Л.Г. Ивченко, Д.А. Доменюк [и др.]// Кубанский научный медицинский вестник.- 2017.- №24(4).- С. 39-48.
53. Цитогенетические показатели, пролиферация и апоптоз эпителиальных клеток у детей, больных бронхиальной астмой / Л.П. Сычева, М.М. Бяхова, Г.М. Земляная // Пульмонология. – 2008.- №6.- С. 67-70.
54. Шафеев И.Р. Результаты исследования местного иммунитета полости рта у пациентов с несъёмными эстетическими ортопедическими конструкциями и воспалительными заболеваниями пародонта /И.Р. Шафеев, А.И. Булгакова, И.В. Валеев, Г.Ш. Зубаирова// Казанский медицинский журнал. – 2016. –№3.-Т.97. – С. 363-367.
55. Экспериментальное моделирование острого периодонтита у крыс /А. Ю. Туровая А. Х. Каде, Е. А [и др.]// Фундаментальные исследования.- 2010 – № 10. – С. 46-50.
56. Юрченко В.В. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях: монография /В.В. Юрченко, М.А. Модольная, Ф.И. Ингель; под ред. академика РАМН Ю. А. Рахманина, д.б.н. Л. П. Сычевой. – Москва.- изд. Гениус. – 2007.- С.220-267.
57. Abusleme L. IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome / L. Abusleme, N.M. Moutsopoulos // Oral Dis.- 2017.- Vol .23(7).- P.854-865.

58. Agarwal S, Riccelli AE. Role of cytokines in the modulation of neutrophil chemotaxis in localized juvenile periodontitis / S. Agarwal, J.B. Suzuki, A.E. Riccelli // *J. Periodontal Res.* – 1994. – Vol. 29(2).- P. 27-37.
59. Al-Harthi L.S. Periodontitis among adult populations in the Arab World / L.S. Al-Harthi, M.P. Cullinan, J.W. Leichter, W.M. Thomson // *Int Dent J.* – 2013. – Vol. 63(1). – P.7-11.
60. Altered cytological parameters in buccal cells from individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / M. François, W. Leifert [et al.]// *Cytometry.* – 2014.- Aug. – Vol. 85(8).- P. 698-708.
61. Cury PR, Carmo JP, Horewicz V.V. Altered phenotype and function of dendritic cells in individuals with chronic periodontitis / P.R. Cury, J.P. Carmo, V.V. Horewicz // *Arch Oral Biol.*- 2013.-Vol. 58(9).-P.:1208-16.
62. Armitage G.C. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States / G.C. Armitage, P.B. Robertson. // *J. Am. Dent. Assoc.* - 2009. - Vol. 140 - P.36-43.
63. Assessment of C-reactive proteins, cytokines, and plasma protein levels in hypertensive patients with apical periodontitis / N. Rashmi, V. Galhotra, P. Goel, J.P. Rajguru [et al.]// *J Contemp Dent Pract.*- 2017.- Vol.18(6).- P.516-521.
64. Association study between salivary levels of interferon (IFN)-gamma, interleukin (IL)-17, IL-21, and IL-22 with chronic periodontitis / D.M. Isaza-Guzmán, N. Cardona-Vélez, D.E. Gaviria-Correa, M.C. [et al.]// *Arch Oral Biol.* – 2015.- Vol.60(1).- P.91-9.
65. Balaji A. Salivary Interleukin-6 -A pioneering marker for correlating diabetes and chronic periodontitis: A comparative study / A. Balaji, S.C. Chandrasekaran, D. Subramaniam, A.B. Fernz // *Indian J Dent Res.* – 2017. – Vol.28(2). – P.133-137.
66. Balaji S.K. Chronic periodontitis prevalence and the inflammatory burden in a sample population from South India / S.K. Balaji, V. Lavu, S. Rao// *Indian J Dent Res.* – 2018.-Vol.29(2). – P. 254-259.

67. Bale B.F. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis / B.F. Bale, A.L. Doneen, D.J. Vigerust // *Postgrad Med J.* – 2017. – Apr.- Vol. 93(1098).- P. 215-220.
68. Balta M.G. Emerging concepts in the resolution of periodontal inflammation: a role for resolvin E1 / M.G. Balta, B.G. Loos, E.A. Nicu // *Front Immunol.* – 2017. – Dec. – Vol. 14. – P. 8.
69. Bartold P.M. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review / P.M. Bartold, R.I. Marshall, D.R. Haynes // *J. Periodontol.* 2005. – Vol.76(11). – P. 2066–2074.
70. Bedi T. Defensins in periodontal health. *Indian J Dent Res* / T. Bedi, J. Mahendra, N. Ambalavanan // 2015.- Vol. 26(4).- P. 340-344.
71. Berglundh T. Aspects of adaptive host response in periodontitis / T. Berglundh, M. Donati // *J. Clin Periodontol.* – 2005.- Vol.32(6).- P.87-107.
72. Benvindo-Souza M. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions / M. Benvindo-Souza, R.A. Assis, E.A.S. Oliveira, R.E. Borges, L.R.S. Santos // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2017.- Dec.- Vol. 24(36).- P. 27724-27730.
73. Berezniakova A.I. 4 and 6 interleukin's action in the pathogenesis of periodontitis, gingivitis and dental alveolitis / A.I. Berezniakova, V.F. Cheremisina// *Wiad Lek.* – 2017. – Vol. 70(5).-P. 910-912.
74. Bezerra M.M. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats / M.M. Bezerra, V. de Lima, V.B. Alencar // *J. Periodontol.* – 2000. – Vol. 71(6). – P.1009-1014
75. Bhardwaj S.B. Biofilm formation by drug resistant enterococci isolates obtained from chronic periodontitis patients / S.B. Bhardwaj, M. Mehta, S. Sood, J. Sharma // *J Clin Diagn Res.* – 2017.- Jan.- Vol. 11(1). – P. 10.
76. Binderman I. Cytoskeletal disease: a role in the etiology of adult periodontitis / I. Binderman, N. Gadban, A. Yaffe // *Oral Dis.* - 2014. – Vol.20(1). – P. 10-6.

77. JPOS Study Group. Biochemical markers for bone turnover predict risk of vertebral fractures in postmenopausal women over 10 years: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study / J. Tamaki, M. Iki, E. Kadowaki // *Osteoporos Int.* - 2013.- Vol.24(3).- P. 887-97.
78. Bolerázska B. Trends in laboratory diagnostic methods in periodontology / B. Bolerázska, M. Mareková, N. Markovská // *Acta Medica (Hradec Kralove).* – 2016 . – Vol.59(1). – P.3-9.
79. Buccal mucosa exfoliative cell prussian blue stain co-relates with iron overload in β -thalassemia major patients / P.K. Gajaria, U.M. Maheshwari, [et al.]// *Indian J Hematol Blood Transfus.* – 2017.- Dec.- Vol. 33(4). – P. 559-564.
80. Buccal cell micronucleus frequency is significantly elevated in patients with spinocerebellar ataxia type 2. / D.A Cuello-Almarales, L.E. Almaguer-Mederos [et al.]// *Archives of Medical Research.* – 2017. – Vol.48(3). – P. 297-302.
81. Cekici A. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease / A. Cekici, A. Kantarci, H. Hasturk, T.E. // *Van Dyke Periodontol* 2000. – 2014. – Vol. 64(1). – P. 57.
82. Chen C.K. Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study / C.K. Chen, Y.T. Wu, Y.C. Chang // *Alzheimers Res Ther.*- 2017
83. Chen X.T. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis / X.T. Chen, J.Y. Tan, L.H. Lei, L.L. Chen // *Am J Dent.* – 2015. – Vol. 28(1). – P. 9-12.
84. Cheng W.C. The presence, function and regulation of IL-17 and Th17 cells in periodontitis / W.C. Cheng, F.J. Hughes, L.S. Taams // *J Clin Periodontol.* – 2014. – Vol.41(6).- P. 541-9.
85. Chronic inflammation: accelerator of biological aging / B. Fougère, E. Boulanger [et al.]// *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* – 2017. – Vol. 72(9). –P.1218-1225.

86. Complement involvement in periodontitis: molecular mechanisms and rational therapeutic approaches / G. Hajishengallis, T. Maekawa, T. Abe, E [et al.]// *Adv Exp Med Biol.* – 2015. – Vol. 865. – P. 57-74.
87. Gross A.J. Periodontitis: a global disease and the primary care provider's role / A.J. Gross, K.T. Paskett, V.J. Cheever, M.S. Lipsky // *Postgrad Med J.* - 2017. – Vol. 93(1103). – P. 560-565.
88. Combining salivary pathogen and serum antibody levels improves their diagnostic ability in detection of periodontitis / J.M. Liljestrand, U.K. Gursoy, K. Hyvärinen [et.al]// *J Periodontol.* – 2014.- Vol. 85(1).- P.123-31.
89. Crotti T.N. Osteoimmunology: major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss / T.N. Crotti, AASSK. Dharmapatni, E. Alias, D.R. Haynes // *J Immunol Res.* - 2015.
90. Crowley L.C. Analyzing cell death by nuclear staining with hoechst 33342 / L.C. Crowley, B.J. Marfell, N.J. Waterhouse // *Cold Spring Harb Protoc.*- Vol. (9).- 2016.
91. Cyclosporine A - Induced gingival overgrowth and proliferating cell nuclear antigen expression in experimental periodontitis / L.H. Ricardo, R.F. do Prado, Y.R. Carvalho [et al.] // *J. Oral Biol Craniofac Res.*- 2019.-Vol.9(1).- P. 100-108.
92. Cytokine levels in crevicular fluid associated with compliance during periodontal maintenance therapy/ F.O. Costa, S.C. Cortelli [et al.] // *Clin Oral Investig.* - 2018 doi: 10.1007/s00784-018-2770-x.
93. Damgaard C. The complement system and its role in the pathogenesis of periodontitis: current concepts / C. Damgaard, P. Holmstrup, T.E. Van Dyke, C.H. Nielsen // *J. Periodontal Res.* – 2015. – Jun. – Vol.50(3). – P. 83-93.
94. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss / N.M. Moutsopoulos, J. Konkol, M. Sarmadi [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2014.- Vol. 6(229). - P. 229.
95. Denervation effectively aggravates rat experimental periodontitis / X. Yu, Z. Gong, Q. Lin[et al.]// *J. Periodontal Res.*- 2017.- Vol.52(6).- P. 1011-1020.

96. Detection of eight periodontal microorganisms and distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Chinese patients with aggressive periodontitis / X. Feng, L. Zhang, L. Xu [et al.] // *J. Periodontol.* – 2014. - Jan.- Vol. 85(1). - P. 150.

97. Determination of genotoxic effects of hookah smoking by micronucleus and chromosome aberration methods / E. Derici Eker, H. Koyuncu [et al.] // *Med Sci Monit.* – 2016. – Nov. – Vol. 21. P.4490-4494.

98. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis/ A.A. Araújo, Pereira ASBF, Medeiros CACX, [et al.]//*PLoS One.*- 2017.-Vol.28. –P.12.

99. Effect of nonsurgical periodontal therapy on plasma levels of il-17 in chronic periodontitis patients with well controlled type-ii diabetes mellitus-a clinical study / V. Jayakumar, A. Sadasivan, E. Koshi [et al.] // *Dent J (Basel).* – 2018.- Vol.6(2).

100. Eke P.I. Prevalence of periodontitis in adults in the United States 2009 and 2010 / P.I. Eke, B.A. Dye, L. Wei // *J Dent Res.* - 2012. - Vol.91(10). -P.914-920.

101. El Kebir D. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation / D. El Kebir, P. Gjørstrup, J.G. Filep // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – Vol. 109(37). –P. 8.

102. Expression levels of th-2 and th-17 characteristic genes in healthy tissue versus periodontitis / P. Behfarnia, R. Birang [et al.] // *J. Dent (Tehran).* – 2013.- Vol.10(1).- P.23-31.

103. Estimation of plasma levels of tumor necrosis factor-a, interleukin-4 and 6 in patients with chronic periodontitis and type II diabetes mellitus / D. Bakshi, G. Kaur, D. Singh, [et al.] // *J Contemp Dent Pract.* – 2018.- Vol. 19(2). – P. 166-169.

104. Evaluation of micronucleus in exfoliated buccal epithelial cells using liquid-based cytology preparation in petrol station workers / P. Arul, S. Shetty, S. Masilamani, C. // *Indian J. Med Paediatr Oncol.* – 2017. - Vol. 38(3). – P. 273-276.

105. Evaluation of mRNA expression of the transcription factors of Th1 and Th2 subsets (T-bet and GATA-3) in periodontal health and disease - A pilot study in south Indian population / N. Rajesh, K.V. Arun, T.S. Kumar [et al.] // J Indian Soc Periodontol.- 2015.- Vol.19(6)P.-624-647.
106. Fawcett T. ROC graphs: notes and practical considerations for researchers / T. Fawcett // Kluwer Academic Publishers. – 2004.
107. Fine D.H. Lactoferrin: a roadmap to the borderland between caries and periodontal disease / D.H. Fine //J. Dent Res. -2015.- P.76.
108. Gilroy D. New insights into the resolution of inflammation / D. Gilroy, R. De Maeyer // Semin Immunol. – 2015. – Vol. 27(3). – P. 161.
109. Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease / E. Papathanasiou, F. Teles, T. Griffin [et al.]// J Periodontal Res. – 2014.- Vol. 49(1).-P. 55-61.
110. Gómez-Meda B.C. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases /B.C. Gómez-Meda, M.Á. Ramírez-Aguilar, G.M. Zúñiga-González // Journal Periodontal Research.- 2015.- Vol.50(1).-P.28-36.
111. Gooty J.R., Estimation of phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes in chronic and aggressive periodontitis patients with nitroblue tetrazolium test / J.R. Gooty, A.Shashirekha, V.R. Guntakala, R. Palaparthi // J. Indian Soc Periodontol.- 2019.- Vol.-23(4).- P. 316-321.
112. Hajishengallis E. Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults / E. Hajishengallis, G. Hajishengallis // J. Dent Res.- 2014.- Vol. 93(3). – P. 231.
113. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response / G. Hajishengallis // Trends Immunol. - 2014. – Vol. 35(1).- P. 3.

114. Pathology of the Head and Neck / A. Cardesa, P. Slootweg, N. Gale, A. Franchi. – SpringerLink, 2016. –P. 854.

115. Headland S.E., The resolution of inflammation: principles and challenges / S.E.Headland, L.V. Norling // Semin Immunol. – 2015.- Vol. 27(3). – P.149.

116. Henderson R.B. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration / R.B. Henderson, J.A.R Hobbs, M. Mathies, N. Hogg // Blood. – 2003.- Vol. 102(1). – P. 28–35.

117. Host response mechanisms in periodontal diseases / N. Silva, L. Abusleme, D. Bravo [et al.]// J. Appl Oral Sci. – 2015. – May. – Vol. 23(3). – P. 329.

118. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease/ T. Ara, K. Kurata, K. Hirai, T. [et al.] // J Periodontal Res.- 2009. – Vol.44(1). – P.21.

119. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts / L. Kindle, L. Rothe, M. Kriss // J Bone Miner Res. – 2006. – Vol. 21(2).- P.193-206.

120. Human primary epithelial cells acquire an epithelial-mesenchymal-transition phenotype during long-term infection by the oral opportunistic pathogen, porphyromonas gingivalis / J. Lee, J.S. Roberts, K.R. Atanasova, N. Chowdhury [et al.]// Front Cell Infect Microbiol. – 2017.- Vol. 1.- P. 493.

121. Influence of TGF- β ₁ on proliferation and differentiation of HPDLFs in vitro / G-Y. Zhang, Z-H. Yu, X-H. Zhang [et al.]// Shandong Med J. – 2008 .- Vol. 48(21).

122. Impaired neutrophil directional chemotactic accuracy in chronic periodontitis patients / H.M. Roberts, M.R. Ling, R. Insall [et al.]// J. Clin Periodontol. – 2015. – Vol. 42(1). – P. 1–11.

123. Impact of nicotine on the interplay between human periodontal ligament cells and CD4+ T cells / X. Ge, Y.F. Liu, Y. Wong [et al.] // Hum ExpToxicol. – 2016.- Sep.-Vol.35(9). - P.83-90.

124. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases / A.L Zamora-Perez, Y.M. Ortiz-García, B.P. Lazalde-Ramos [et al.] // J Periodontal Res.- 2015.- Vol.50(1).- P. 28-36.

125. Inhibition of 5-lipoxygenase attenuates inflammation and BONEresorption in lipopolysaccharide-induced periodontal disease / D.EM. Lopes, C.L. Jabr, N.N. DeJani [et al.] // J Periodontol. – 2017.

126. Javaid M. A. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases / M.A. Javaid, A.S. Ahmed, R. Durand, S.D. Tran // J Oral Biol Craniofac Res. – 2016. – Vol.6(1). – P.66-75.

127. Ji S. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. Front Cell Infect Microbiol / S. Ji, Y. Choi // 2015. - Sep. – Vol. 3.- P. 5.

128. Joint EU/USA periodontal epidemiology working group. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group / B. Holtfreter, J.M. Albandar, T. Dietrich [et al.] // J Clin Periodontol. – 2015. – Vol.42(5). – P. 407-12.

129. Katagiri T. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation / T. Katagiri, N. Takahashi // Oral Dis. – 2002.- Vol.8(3).- P. 147–159.

130. Khan S. Genotoxic assessment of chlorhexidine mouthwash on exfoliated buccal epithelial cells in chronic gingivitis patients / S. Khan, A.U. Khan, S. Hasan // Journal Indian Society Periodontology. -2016.- Vol.20(6). -P.-584-591.

131. Kulkarni C., Kinane DF. Host response in aggressive periodontitis / C. Kulkarni, D.F. Kinane // Periodontol 2000. – 2014.- Vol.65(1). –P.79-91.

132. Lactoferrin levels in gingival crevicular fluid and saliva of HIV-infected patients with chronic periodontitis / S.M. Ferreira, L.S. Gonçalves [et al.] // J Investig Clin Dent.- 2015.- Vol.6(1). - P.16-24.

133. Local IL-10 level as a predictive factor in generalized aggressive periodontitis treatment response / T. Taiete, M. de Freitas Monteiro, M.Z. Casati, [et al.]// *Scand J Immunol.* – 2019. – Vol. 26.

134. Longitudinal association between periodontitis and development of diabetes / K.J. Joshipura, F.J. Muñoz-Torres, B.A. Dye [et al.]// *Diabetes Res Clin Pract.* – 2018.- Vol. 141. – P. 284-293.

135. Macrophage activating factor: A potential biomarker of periodontal health status / P. Zhang, Y. Fan, Q. Li [et al.]// *Feng Arch Oral Biol.* - 2016. – Oct. – Vol. 70. – P. 94-99.

136. Malathi N. Salivary diagnostics: a brief review / N. Malath., S. Mythili, H.R. Vasanthi // *ISRN Dent.* – 2014. –Vol.29. – P. 158.

137. Mallapragada S. Antimicrobial peptides: The miraculous biological molecules / S. Mallapragada, A. Wadhwa, P. Agrawal // *J Indian Soc Periodontol.* – 2017.- Vol. 21(6). - P.434-438.

138. Matrix metalloproteinase-8 expression in human junctional epithelium / V.J. Uitto, J.I. Salonen, J.D. Firth [et al.]// *J Dent Res.*- 2002.- Vol. 81(4). – P. 241-6.

139. Migliore L. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases / L. Migliore, F. Coppedè, M. Fenech, P. Thomas // *Mutagenesis.* – 2011.- Vol. 26(1). – P.85-92.

140. Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages / J. Van den Bossche, J. Baardman, N.A. Otto, [et al.]// *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 17(3). – P. 84–96.

141. Mizraji G. Porphyromonas gingivalis promotes unrestrained type I interferon production by dysregulating TAM Signaling via MYD88 Degradation / G. Mizraji, M. Nassar, H. H. Segev// *Cell Rep.*- 2017.- Vol.18(2).- P.419-431.

142. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis / A. Letra, G. Ghaneh, M. Zhao [et. all]// *J Endod.*- 2013.- Vol. 39(9). P. 1141-6.

143. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test / P. Mäntylä, M. Stenman, D. Kinane [et. all]// *Journal of Periodontal Research*. – 2006. – Vol. 41(6).- P.503–512.
144. Mucin 4 and matrix metalloproteinase 7 as novel salivary biomarkers for periodontitis / A. Lundmark, G. Johannsen, K. Eriksson [et. all]// *J Clin Periodontol.*- 2017.- Vol. 44(3)/ P. 247-254.
145. Naufel A.O. Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review / A.O. Naufel, M.CF. Aguiar, F.M. Madeira, L.G. Abreu // *Braz Oral Res*. – 2017. - P. 18- 31.
146. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity / Z. Khurshid, M. Naseem, Z. Sheikh [et al.]// *Saudi Pharm J*. – 2016.- Vol. 24(5). – P. 515-524.
147. Oral fluid based biomarkers in periodontal disease: part 1. Saliva / H.S. AlMoharib, A. AlMubarak, R. AlRowis, A. [et al.]// *J Int Oral Health*. – 2014.- Jul. – Vol.6(4).- P. 95-103.
148. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system / H.Y. Dar, Z. Azam, R. Anupam [et al.]// *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2018. – Vol.23. – P. 464-492.
149. Pasupuleti M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system / M. Pasupuleti, A. Schmidtchen, M..Malmsten // *Crit Rev Biotechnol*. – 2012. – Vol. 32(2).- P. 43-71.
150. Preprocedural Anxiety and Pain Perception Following Root Surface Debridement in Chronic Periodontitis Patients / V.K. Naik, A. Balasundaram, D. Appukuttan [et al.]// *J Nat Sci Biol Med*. – 2018.- Vol. 9(1).- P. 82-89.
151. Periopathogenic bacteria in dental plaque of Congolese patients with periodontitis: A pilot study / E. Kalala-Kazadi, J.P. Sekele-Issouradi, J. Bolenge-Ileboso [et al.]// *J Clin Exp Dent*.- 2018.- Vol.-10(3). – P. 232-236.

152. Periodontitis and alzheimer's disease: a possible comorbidity between oral chronic inflammatory condition and neuroinflammation / F.B. Teixeira, M.T. Saito, F.C. Matheus [et al.]// *Front Aging Neurosci.*- 2017.

153. Perretti M. The resolution of inflammation: new mechanisms in pathophysiology open opportunities for pharmacology / M. Perretti // *Semin Immunol.* – 2015. – Vol. 27(3). – P. 145.

154. Prakasam S. Srinivasan M. Evaluation of salivary biomarker profiles following non-surgical management of chronic periodontitis / S. Prakasam, M.Srinivasan // *Oral Dis.*- 2014.- Vol .20(2).- P.171-7.

155. Prakash S. Similar hematological and biochemical parameters among periodontitis and control group subjects / S. Prakash, K. Dhingra, S. Priya // *Eur J. Dent.*- 2012.- Vol.6(3).- P.287-294.

156. Promsudthi A. The role of Toll-like receptor 2 and 4 in gingival tissues of chronic periodontitis subjects with type 2 diabetes / A. Promsudthi, S. Poomsawat, W. Limsricharoen // *Periodontal Res.* – 2014.- Jun.- Vol.49(3) P. 54.

157. Rafter N.A. L-selectin in inflammation, infection and immunity / N.A. Rafter, J. Rivera-Nieves, K. Ley // *Drug Discov Today Ther Strateg.* – 2005.- Vol. 2(3).- P.

158. Rai B. Biomarkers of periodontitis in oral fluids / Rai B., Kharb S., Jain R., Anand S.C. // *J. Oral Sci.*- 2008.- Vol. 50(1). - P.53-56.

159. A rapid, non-invasive tool for periodontitis screening in a medical care setting /M.J.L Verhulst, W.J. Teeuw, S. Bizzarro [et al.] // *BMC Oral Health.* – 2019. – Vol. 19(1).- P.87.

160. Recchiuti A. Proresolving lipid mediators (SPMs) and their actions in regulating miRNA in novel resolution circuits in inflammation / A. Recchiuti, C.N. Serhan // *Front Immunol.* – 2012. – P. 3.

161. Renaud-Vilmer C. Precancerous lesions of the buccal epithelium / C. Renaud-Vilmer, B. Cavelier-Balloy// *Ann Dermatol Venereol.* -2017.- Vol. 144(2).

162. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development / A.L. Alessandri, L.P. Sousa, C.D. Lucas [et al.]// *Pharmacol Ther.*-2013.- Vol.-139(2).- P.189-212.

163. Role of micronucleus in oral exfoliative cytology / R. Shashikala, A.P. Indira, G.S. Manjunath [et al.]// *J Pharm Bioallied Sci.* – 2015. – P. 409-413.

164. Romano F. Prevalence of periodontitis: misclassification, under-recognition or over-diagnosis using partial and full-mouth periodontal examination protocols / F. Romano, S. Perotto, A. Castiglione, M. Aimetti// *Acta Odontol Scand.*-2019.- Vol. 77(3). -P.189-196.

165. Saba R. Buccal epithelium, cigarette smoking, and lung cancer / R. Saba, O. Halytskyy, N. Saleem, I.A Oliff. // *Review of the Literature. J.Oncology.* – 2017.- Vol.93.- P. 347-353.

166. Sahu M. Cytomorphometric analysis of gingival epithelium and buccal mucosa cells in type 2 diabetes mellitus patients / M. Sahu, H. Suryawanshi, S. Nayak, P. Kumar // *Journal Oral and Maxillofacial Pathology.* – 2017. – Vol.21(2). – P. 224-228.

167. Shibuya M. VEGF-VEGFR System as a Target for Suppressing Inflammation and other Diseases / M. Shibuya // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* – 2015.

168. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status / A.C. Araujo-Pires, C.F. Francisconi, C.C. Bigueti, F. [et al.] // *J Appl Oral Sci.* – 2014.- Vol. 22(4). – P. 336-346.

169. Slots J. Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk/ J. Slots, H. Slots // *Periodontology.* -2000.- Vol.55.- P.48–69.

170. Spite M. Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases / M. Spite, J. Clària, C.N. Serhan // *Cell Metab.* – 2014. – Vol. 19(1). – P. 21.

171. Stahl D. Knowledge on Loose Sheets in the Context of fixed Theories. Theodor Leber's Research of Inflammation / D. Stahl // NTM. – 2016. – Vol. 24(3). – P. 279-308.
172. Straub R.H. Evolutionary medicine and bone loss in chronic inflammatory diseases -A theory of inflammation-related osteopenia / R.H. Straub, M. Cutolo, R. Pacifici // Semin Arthritis Rheum. – 2015.- Vol.45(2). – P. 220-8.
173. Study of the participation of MMP-7, EMMPRIN and cyclophilin A in the pathogenesis of periodontal disease / F.J. de Oliveira Nóbrega, de D.P. Oliveira // Arch Oral Biol. - 2016. –Dec. - Vol. 72. – P. 172-178.
174. Study of Porphyromonas gingivalis in periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis / M. Rafiei, F. Kiani, F. Sayehmiri [et al.] // Med J Islam Repub Iran. – 2017. – Sep. – Vol. 12. – P.31.
175. Swaminathan V. Role of salivary epithelial toll-like receptors 2 and 4 in modulating innate immune responses in chronic periodontitis / V. Swaminathan, S. Prakasam, V. Puri, M. Srinivasan // J. Periodontal Res. – 2013. – Dec. – Vol. 48(6).- P. 65.
176. Switched memory B cells promote alveolarbone damage during periodontitis: An adoptive transfer experiment/ Y. Han, Y. Jin, Y. Miao [et al.]// Int.Immunopharmacol.- 2018.- Vol.62.P.147-154.
177. Syndecans in chronic inflammatory andautoimmune diseases: Pathological insights and therapeutic opportunities / S.A. Agere, E.Y. Kim, N. Akhtar, S. [et al.] // J Cell Physiol. – 2018. – Vol. 233(9). – P. 6346-6358.
178. Tanaka T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease /T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto// Cold Spring Harb Perspect Biol.- 2014.- Vol. 6(10). – P. 16295.
179. Tarty S. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells / S. Tarty, O. Takeuchi // Int Rev Immunol. - 2017 .-Mar. – Vol. 36(2). – P. 57-73.

180. Taylor J. Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva / J. Taylor // ISRN Inflamm. – 2014.- doi: 10.1155/2014/593151.

181. The association between micronucleus, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds frequency and the degree of uterine cervical lesions / G. Gashi, V. Mahovlić, [et al.]// J.Biomarkers. – 2018.- Vol. 31.- P.1-9.

182. The effect of scaling and root planning on salivary TNF- α and IL-1 concentrations in patients with chronic periodontitis / M. Eivazi, N. Falahi [et al.]// Open Dent J. – 2017. – P. 573-580.

183. The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions / K.R. Bhattarai, R. Junjappa [et al.]// Autoimmun Rev. – 2018.- Vol.9. - P.1568.

184. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review / M.M. Azuma, R.O. Samuel [et al.] // Int Endod J. – 2014. – Vol.47(7). – P. 615-21.

185. The role of Toll-like receptors in periodontitis / B. Song, Y.L. Zhang, L.J. Chen [et al.]// Oral Dis. – 2017. – Mar. – Vol. 23(2). – P. 168-180.

186. Thomas P. Buccal cytochrome biomarkers and their association with plasma folate, vitamin B12 and homocysteine in Alzheimer's disease / P. Thomas, M. Fenech // J Nutrigenet Nutrigenomics. – 2015. – Vol. 8(2). – P. 57-69.

187. Th17 and Th1 lymphocytes are correlated with chronic periodontitis / X.T. Chen, L.L. Chen [et al.] // Immunol Invest. – 2016. – Vol. 45(3). – P.43-54.

188. Van der Sluijs M. The effect on clinical parameters of periodontal inflammation following non-surgical periodontal therapy with ultrasonics and chemotherapeutic cooling solutions: a systematic review /M. Van der Sluijs, E. Van der Sluijs, F. Van der Weijden, D.E. Slot // J Clin Periodontol. - 2016. - Vol 43(12). - P.1074-85.

189. Van der Velden U. Java project on periodontal diseases: causes of tooth loss in a cohort of untreated individuals / U. van der Velden, A. Amaliya, B.G. Loos, M.F. Timmerman, F.A. van der Weijden, E.G. Winkel // J Clin Periodontol. – 2015.- Vol. 42(9).- P. 824.

190. Vanhamme L. The other myeloperoxidase: Emerging functions / L. Vanhamme, K. Zouaoui Boudjeltia, P. Van Antwerpen, C. Delporte // Arch Biochem Biophys. – 2018. – Vol. 1.- P.1-14.
191. Variations in protein concentration and albumin/globulin ratio of whole unstimulated saliva obtained from healthy people and patients with chronic periodontitis/ B. Cui, Y. Yu, W. Yuan [et al.] // Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2015.- Vol. 33(4).- P. 339-42.
192. Vitkov L. Janus-faced neutrophil extracellular traps in periodontitis / L. Vitkov, D. Hartl, B. Minnich, M. Hannig // Front Immunol. – 2017. – P. 26.
193. Wang Y.Y. Detection and significance of IL-6 and TNF- α in patients with Graves disease and periodontitis / Y.Y. Wang, X.P. Lin. // Shanghai Kou Qiang Yi Xue. -2018.- Vol. 27(1).-P.43-47.
194. Wang Z.X. Effects of T helper 1 cells and T helper 17 cells secreting cytokines on rat models of experimental periodontitis / Z.X. Wang, L. Yang, J.Y. Tan, L.L.Chen // Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. – 2017. – Vol. 52(12). –P. 740-747.
195. Westley S. Recurrent intra-oral herpes simplex 1 infection / S. Westley, R. Seymour, K. Staines // Dent Update. – 2011. - Vol. 38(6). – P. 368-370.
196. Wu F. Clinical limitation of bone-specific alkaline phosphatase assays / F. Wu, B. Orr-Walker, I.R. Reid // Ann Clin Biochem. – 2001. – Vol. 38(5). – P. 572.
197. Yağan A. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats / A. Yağan, S. Kesim, N. Liman // J Periodontol. – 2014.- Vol.85(3).- P. 478-89.
198. Zhu H. Inflammatory cytokine levels in patients with periodontitis and/or coronary heart disease / H. Zhu, X. Lin, P. Zheng, H. Chen // Int J Clin Exp Pathol. – 2015. – Vol.-8(2).- P.2214-20.
199. Zouali M. The emerging roles of B cells as partners and targets in periodontitis / M. Zouali // Autoimmunity. – 2017. – Feb.- Vol. 50(1). - P. 61-70.
200. Żukowski P. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity / P. Żukowski, M. Maciejczyk, D. Waszkiel // Arch Oral Biol. - 2018.-Vol.(92). – P. 8-17.