

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ BCL-2, KI-67, P-53 ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ДЕСНЫ У БОЛЬНЫХ БЫСТРОПРОГРЕССИРУЮЩИМ ПАРОДОНТИТОМ

THE USE OF INDICATORS OF MOLECULAR MARKERS BCL-2, KI-67, P53 TO ASSESS THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF GINGIVAL EPITHELIAL CELLS IN PATIENTS WITH RAPIDLY PROGRESSIVE PERIODONTITIS

**S. Akimova
Yu. Osipova
A. Efremova
K. Frolova**

Summary. Relevance and goals. To date, the incidence of inflammatory—destructive periodontal diseases is characterized by steady growth. Rapidly progressive periodontitis, as a disease that occurs at a young age (17–35 years) and characterized by an extremely severe course and an unfavorable prognosis, occupies a special place among inflammatory periodontal diseases. However, at present there is no unified understanding of the etiology and pathogenesis mechanisms of this group of diseases, which largely determines the failure of the treatment. The purpose of the study was to determine the nature of the disturbances in the processes of cell renewal in the epithelium of the gingival mucosa in patients with rapidly progressive periodontitis (RPP).

Materials and methods. To solve the tasks, 70 patients were examined, 20 of whom have a healthy periodontium, 25 patients with a confirmed diagnosis of RPP; the comparison group consisted of 25 patients with chronic periodontitis. All patients underwent a standard periodontal examination and determination of ki-67 and bcl-2 proliferation indicators and apoptosis by the immunohistochemical method.

Results. According to the results of the study, it was found that patients with rapidly progressive periodontitis have pronounced disturbances in the balanced course of proliferation processes and apoptotic death of gum mucosa epithelial cells. The nature of the disorders is expressed in a decrease in the ki-67 and bcl-2 indices and an increase in the apoptosis index, which indicates a sharp inhibition of the proliferation of epithelial cells against the background of the activation of their apoptotic death

Conclusions. Violation of the maintenance of cellular hemostasis of periodontal tissues is an important link in the pathogenesis of rapidly progressive periodontitis. Actively proceeding apoptotic process with a marked decrease in the proliferative potential of

Акимова Светлана Анатольевна

Аспирант, Саратовский государственный
медицинский университет им. В. И. Разумовского
svetlana.akimova1987@yandex.ru

Осипова Юлия Львовна

Д.м.н., доцент, Саратовский государственный
медицинский университет им. В. И. Разумовского
osipova-sgtmu@mail.ru

Ефремова Анастасия Владимировна

Ассистент, Пензенский Государственный
Университет
nastasya.efremova.87@list.ru

Фролова Кристина Евгеньевна

Старший преподаватель, Пензенский
Государственный Университет
kristina.frolova.1983@mail.ru

Аннотация. Актуальность и цели. На сегодняшний день частота встречаемости воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта характеризуется неуклонным ростом. Быстро прогрессирующий пародонтит, как заболевание, возникающее в молодом возрасте (17–35 лет) и характеризующееся крайне тяжелым течением и неблагоприятным прогнозом, занимает особое место среди воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП). Однако, единых представлений об этиологии и механизмах патогенеза данной группы заболеваний на настоящий момент не существует, что во многом определяет безуспешность проводимого лечения. Цель исследования состояла в определении характера нарушений процессов клеточного обновления в эпителии слизистой оболочки десны у больных быстро прогрессирующим пародонтитом (БПП).

Материалы и методы. Для решения поставленных задач обследовано 70 пациентов, 20 из которых имеют здоровый пародонт, 25 пациентов с подтвержденным диагнозом БПП; группу сравнения составили 25 больных с хроническим пародонтитом. Всем пациентам проведено стандартное обследование пародонта и определение показателей пролиферации ki-67 и bcl-2, и p-53 иммуногистохимическим методом.

Результаты. По результатам исследования установлено, что у больных быстро прогрессирующим пародонтитом имеются выраженные нарушения сбалансированного течения процессов пролиферации и апоптотической гибели эпителиоцитов слизистой оболочки десны. Характер нарушений выражается в снижении индексов ki-67 и bcl-2 и возрастании индекса апоптоза, что свидетельствует о резком угнетении пролиферации эпителиоцитов на фоне активации их апоптотической гибели

Выводы. Нарушение поддержания клеточного гомеостаза тканей пародонта является важным звеном патогенеза быстро прогрессирующего пародонти-

epithelial cells indicates inhibition of reparative processes in tissues, which, of course, contributes to the progression of inflammatory and destructive processes in periodontal tissues, aggravation of the clinical manifestations of the disease.

Keywords: periodontitis; rapidly progressive periodontitis; inflammatory periodontal diseases; proliferation; ki-67; bcl-2; p53; apoptosis.

Введение

Быстро прогрессирующий пародонтит у лиц молодого возраста имеет тенденцию к прогрессирующему росту. Агрессивность течения этой формы воспалительных заболеваний пародонта в молодом возрасте (17–35 лет) способствует нарушению функции жевания, быстрой утрате зубов, снижению качества жизни [1,2,3,4]. Хронический пародонтит и быстро прогрессирующий пародонтит относят к группе воспалительных заболеваний пародонта. В возникновении хронического пародонтита первостепенное значение имеют микроорганизмы зубной бляшки в сочетании с действием общих и местных факторов риска [5]. В то время как в патогенезе БПП ключевое значение имеет изменение иммунологической реактивности организма, как на местном, так и на организменном уровнях, при наличии специфического микробного агента и генетической предрасположенности. В силу сложности взаимодействия этих факторов, в настоящее время не существует единой концепции патогенеза быстро прогрессирующего пародонтита, что в значительной степени затрудняет диагностику и обуславливает неэффективность проводимого лечения [4, 6,7].

В настоящее время наиболее изученными факторами регуляции клеточного цикла являются протеины ki-67, bcl-2 и проапоптотический белок p-53. Таким образом, определение индексов ki-67, bcl-2 и апоптоза с применением иммуногистохимических методов исследования позволяет более полно охарактеризовать изменение клеточного гомеостаза при изучаемых заболеваниях [6,7, 8]. В настоящее время нарушения пролиферации, лежащие в основе воспалительно-деструктивного процесса при БПП изучены недостаточно. Определение молекулярных маркеров ki-67, bcl-2, p-53 эпителиоцитов десны в условиях агрессивного воспаления позволит изучить особенности патогенетических процессов данного заболевания, оптимизировать подходы к его диагностике и лечению [6,7, 8,9].

Цель: определить иммуногистохимическим методом маркеры клеточного обновления эпителиоцитов десны

та. Активно протекающий апоптотический процесс при выраженном снижении пролиферативного потенциала эпителиоцитов указывает на угнетение репаративных процессов в тканях, что, безусловно, способствует прогрессированию воспалительно-деструктивных процессов в тканях пародонта, усугублению клинических проявлений заболевания.

Ключевые слова: пародонтит; быстро прогрессирующий пародонтит; воспалительные заболевания пародонта; пролиферация; ki-67; bcl-2; p-53, апоптоз.

ki-67, bcl-2, и проапоптотический белок p-53 у больных быстро прогрессирующим пародонтитом.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели обследовано 70 человек. Основную группу составили 25 пациентов, страдающих быстро прогрессирующим пародонтитом, 20 практически здоровых человек с интактным пародонтом (контрольная группа) и 25 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (группа сравнения).

Критерии включения: лица обоих полов в возрасте от 18 до 45 лет. Критерии исключения: тяжелые соматические заболевания (сахарный диабет, патологии печени и почек, иммунодефицитные состояния, онкологические заболевания), беременность, период лактации, наркотическая зависимость, отказ пациента от участия в исследовании. Все пациенты получили подробную информацию о целях и сути исследования и дали свое согласие на участие в исследовании. Участники исследования были обследованы по стандартной схеме, формулировка диагнозов проводилась на основе классификации заболеваний пародонта от 1983 года с учетом изменений принятых 2001 году, когда агрессивные формы пародонтита были выделены в отдельную нозологическую группу [9,10]. Всем пациентам было проведено комплексное обследование, включающее клиническую оценку состояния тканей пародонта с определением индексов оценки гигиенического состояния полости рта (Green J.C., Vermillion J.R., 1964) и выраженности воспалительных процессов в тканях пародонта (Muhlemann, в модификации (Cowell R. et al., 1975), Flesar T.J. (1980), PMA (Parma, 1960), PI (Russel A.L., 1956)) и рентгенологическое обследование зубочелюстной системы (КТ, ОПТГ).

Материалом для иммуногистохимического и морфологического исследования послужили биоптаты маргинальной части десны взятые в процессе проведения SRP, удаления зубов с III степенью подвижности. Забор материала контрольной группы производили при удалении зубов без признаков воспаления десны по ортодонтическим показаниям.

Материал был фиксирован в 10% растворе формалина в течение 24 часов, после чего его обработка проводилась по стандартной схеме. Для проведения обзорной микроскопии депарафинизированные осветленные в ксилоле срезы толщиной 5–7 мкм были окрашены гематоксилин-эозином. Для индикации апоптозных ядер материал был приготовлен по методике Мозера (1995 год). При проведении иммуногистохимических реакций были использованы моноклональные мышиные антитела к белку ki-67 (MB-1, Ventana) и bcl-2 ((124) M. Cell, разведение 1:200). Исследование проводилось с использованием аппарата Ventana BenchMark XT и системы детекции Optiview DAB IHC Detection Kit. Изображения 10–12 полей зрения, выбранных случайным образом при микроскопии каждого из срезов, фиксировались при помощи цифровой фотокамеры MIRAXDESK (ZEISS), встроенной в тубус микроскопа Leica DM 1000, при увеличении в 100 и 400 раз и передавались на компьютер. Количество экспрессирующих ядер генов ki-67 и bcl-2 пересчитывалось на 1мм² с применением комплекса морфометрических программ «Видеотест-Морфология 4.0».

Для оценки пролиферативной активности клеток был применен индекс ki-67, который рассчитывается по формуле: $I_{ki-67} = X / X_1 \times 100\%$. Где X_1 — количество иммунопозитивных ядер к ki-67, X — общее количество всех подсчитанных ядер. Аналогичная методика была использована при подсчете индекса bcl-2: $I_{bcl-2} = N / N_1 \times 100\%$, где N — количество иммунопозитивных клеток к bcl-2, N_1 — общее количество всех подсчитанных ядер. Гибель клеток в форме апоптоза оценивали с применением индекса апоптоза, который рассчитывался по следующей формуле: $I_{apt} (\%) = Z / Z_1 \times 100\%$, где Z — число ядер в состоянии апоптоза (положительная экспрессия p53), Z_1 — общее число ядер. Количество экспрессирующих клеток подсчитывали в 30 полях зрения и при указанном увеличении цифровые данные пересчитывали на 1 мм² с помощью пакета прикладных морфометрических программ «Видеотест-Морфология 4.0».

Результаты исследования и их обсуждение

Участники исследования, принадлежащие к контрольной группе, не предъявляли жалоб на состояние тканей пародонта. При клинко-рентгенологическом обследовании не было выявлено признаков воспаления десны, что подтверждается нулевыми значениями индексов РМА, PI. Среднее значение ОНI-s составило 1,02 ± 0,23, что соответствует хорошему уровню гигиены среди представителей группы контроля.

Результаты иммуногистохимического исследования здоровой десны указывают на невысокий уровень ак-

тивности пролиферативных процессов, о чем свидетельствуют значения I ki-67 (11,02±0,68%), I bcl-2 (3,31±0,17%), и также на низкую интенсивность апоптоза (0,54 ± 0,05%). В данном случае низкий уровень пролиферации уравновешивается низким уровнем активности апоптоза.

Пациенты с хроническим пародонтитом предъявляли жалобы на неприятный запах изо рта, дискомфорт в области десен, кровоточивость при чистке зубов и при приеме твердой пищи, подвижность зубов. При клиническом обследовании наблюдались отек и гиперемия десневых сосочков, маргинальной и альвеолярной десны, кровоточивость при зондировании, подвижность зубов II — III степени. Глубина пародонтальных карманов достигала 7мм. Среднее значение РМА 62,83 ± 2,15%, PI составил 4,31 ± 0,34. У всех больных наблюдается плохой уровень гигиены при среднем значении ОНI-s 3,64 ± 0,86.

В случае хронического пародонтита пролиферативная активность эпителиоцитов десны возрастает, что является свидетельством того, что регенераторный потенциал клеток эпителия десны находится на высоком уровне, а уровень активности запрограммированной гибели клеток остается умеренным, при этом I ki-67 составляет 21,03 ± 0,28%, I bcl-2 5,42 ± 0,06% и I apt 0,62 ± 0,05%.

Пациенты с быстро прогрессирующим пародонтитом предъявляли жалобы на гнилостный запах изо рта, кровоточивость десен при приеме твердой пищи и чистке зубов, изменение положения и выраженную подвижность зубов, гноетечение. Из анамнеза также выявлено, что заболевание носит непрерывно рецидивирующий характер с обострениями чаще 1 раза в 3 месяца. Глубина пародонтального кармана достигала 9 мм. Значения индекса РМА составили 79 ± 3,17%, PI 6,74 ± 0,81. При определении индекса ОНI-s в группе лиц, страдающих БПП был выявлен плохой уровень гигиены полости, (3,84 ± 0,93), что не демонстрирует статистически значимых различий с группой сравнения.

В группе лиц, страдающих быстро прогрессирующим пародонтитом, мы наблюдали срыв механизмов адаптации тканей пародонта, который выражался в угнетении пролиферативной активности эпителиоцитов десны при значении I ki-67 равно 2,04 ± 0,46%, I bcl-2 2,12 ± 0,57%, на фоне увеличения индекса апоптоза в 3 раза (1,58 ± 0,27%). Установлена обратная корреляционная зависимость между значениями индекса ОНI-S и индексом пролиферации ki-67 ($r = -0,42$), однако, эта связь при БПП является слабой ($p < 0,05$). В то время как, при хроническом пародонтите обратная корреляционная зависимость индекса гигиены ОНI-S и индексом пролиферации ki-67 представляется более значимой ($r = -0,77$), ($p < 0,05$). Также выявлена прямая корреляционная зависимость значений индекса гигиены полости рта ОНI-S

и индекса апоптоза как в случае с БПП, так и при хроническом пародонтите, однако, статистическая сила данной взаимосвязи при БПП ($r=0,45$) слабее по сравнению с хроническим пародонтитом ($r=0,88$), при ($p < 0,05$). Таким образом можно заключить, что при БПП индексная оценка гигиенического статуса полости рта не демонстрирует выраженной корреляции со степенью тяжести воспалительных явлений в пародонте, в то время как при хроническом пародонтите наблюдается прямая зависимость между уровнем гигиены полости рта и тяжестью воспаления в пародонте. Из чего можно заключить, что в патогенезе быстро прогрессирующего пародонтита помимо микробного агента принимают участие и многие другие факторы, изучение которых представляет собой одну из важнейших задач современной пародонтологии.

Также выявлены прямая корреляционная зависимость индекса воспаления пародонта PI с индексом апоптоза ($r=0,678$) и обратная с индексом пролиферации ki-67 ($r= -0,425$) при быстро прогрессирующем пародонтите

($p < 0,05$). Снижение пролиферативного потенциала эпителиоцитов десны на фоне активно протекающего апоптотического процесса. способствует подавлению репарации и трофики тканей пародонта, способствует активному прогрессированию деструктивных процессов.

Выводы

При морфологическом исследовании биоптатов маргинальной десны пациентов с быстро прогрессирующим пародонтитом выявляются признаки тяжелого воспалительного процесса с очагами некроза и глубоким нарушением структуры ткани.

В результате проведенных исследований выявлено, что при агрессивных формах пародонтита наблюдается

прогрессирующее отставание пролиферации эпителиоцитов от их апоптотической гибели. Наблюдающееся ослабление пролиферации клеток и активация апоптоза имеет резко выраженный характер, что способствует усугублению воспалительно-дистрофических явлений в тканях пародонта, нарастанию неблагоприятных клинических проявлений заболевания и как следствие быстрой утрате зубов. При повреждении ДНК значительной части клеток в силу угнетения адаптационных механизмов, нарушения трофики тканей, создаются условия, в которых репарация безуспешна или происходит полное, или частично ее торможение, что неминуемо приводит клетки к апоптотической гибели [9,11,12].

В то время как на начальных этапах развития ВЗП в тканях наблюдается компенсаторная активация пролиферации на фоне неизменного уровня апоптоза, что характеризует высокий регенераторный потенциал тканей. Однако с нарастанием интенсивности воспалительных явлений происходит ослабление пролиферативной активности клеток эпителия десны при интенсификации процесса их апоптотической гибели. В случае быстро прогрессирующего пародонтита, как наиболее тяжелого состояния, наблюдается срыв адаптационных механизмов в тканях пародонта, что подтверждается низкими значениями Iki-67, Ibc1-2 при высоких значениях индекса апоптоза. Результаты иммуногистохимических и морфологических исследований десны при сопоставлении подтверждают клинико-лабораторные показатели состояния тканей пародонта у больных с пародонтитом.

Патогенез воспалительных заболеваний пародонта представляет собой систему сложных взаимодействий воспалительных, циркуляторных и иммунологических реакций, механизм и характер которых изучен недостаточно. Также вопросы взаимодействия и взаимовлияния иммунологической реактивности организма и процессов клеточного обновления остаются открытыми и требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукиных, Л. М. Хронический генерализованный пародонтит. Часть I. Современный взгляд на этиологию и патогенез / Л. М. Лукиных, Н. В. Круглова // Современные технологии в медицине. — 2011. — № 1. — С. 123–125.
2. Lu R. F., Feng X. H., Xu L., Meng H. X. Clinical and putative periodontal pathogen's features of different sites with probing depth reduction after non-sergical periodontal treatment of patients with aggressive periodontitis// Beijing da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. — 2015, № 47 (1), pp. 13–18.
3. Леонова Е. В. Агрессивный пародонтит: характеристика, клиника, диагностика, алгоритмы лечения. Клиническое наблюдение / Е. В. Леонова // 000 «Меди издательство». — 2018 — № 1 (78) — С. 34–36.
4. Атрушкевич В. Г. Генетически обусловленное нарушение минерального обмена как фактор риска развития хронического генерализованного пародонтита с агрессивным течением / В. Г. Атрушкевич, А. В. Поляков, А. И. Зиновьева [и др.] // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI Веке». — 2012. — № 14(5). — С. 28–29.
5. Дзампаева Ж. В. Особенности этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта. Кубанский научный медицинский вестник. 2017. — № 24(5). — С. 103–110.

6. Osipova Yu.L., Akimova S. A. Indicators of cell renewal and gum apoptosis in patients with rapidly progressive periodontitis. // Morphology.—2018.—Т. 153.— № 3.— pp. 209.
7. Булкина Н.В., Осипова Ю. Л. Клинические и иммуноморфологические особенности течения хронического генерализованного пародонтита на фоне гастроэзофагеальной рефлюксной болезни // Фундаментальные исследования.—2012.— № 5—1.— С. 213—216.
8. Hendler A. Involvement of autoimmunity in the pathogenesis of aggressive periodontitis / A. Hendler, T. K. Mulli, F. J. Hughes [et al.] // Journal of Dental Research.— 2010.— № 89(12).— pp. 1389—1394.
9. Viera A. R. Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis / A. R. Viera, J. M. Albandar // Periodontol 2000.— 2014.— № 65(1).— pp. 92—106.
10. Федорова Н. Е. Различная регуляция митохондриального апоптоза и экспрессии гена bcl-2 в покоящихся и делящихся фибробластах человека, зараженных цитомегаловирусом / Н. Е. Федорова, Т. М. Соколова, М. Г. Миджидова, Л. Л. Куц // Цитология — 2010.— № 52 (2).— С. 168—176.
11. Григорович Э. Ш. Гистологические и иммуногистохимические критерии хронического воспаления пародонта в период ремиссии // Уральский медицинский журнал — 2010. № 66 (1) — С. 39—42.
12. Цепов, Л. М., Николаев А. И. Диагностика и лечение заболеваний пародонта. М.: МЕДпресс-информ, 2004. С. 200

© Акимова Светлана Анатольевна (svetlana.akimova1987@yandex.ru), Осипова Юлия Львовна (osipova-sgmu@mail.ru),
Ефремова Анастасия Владимировна (nastasya.efremova.87@list.ru), Фролова Кристина Евгеньевна (kristina.frolova.1983@mail.ru).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Саратов