

*На правах рукописи*



Фефелов Александр Александрович

**НЕКОТОРЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ  
ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА И ИХ КОРРЕКЦИЯ АУТОПЛАЗМОЙ  
(экспериментальное исследование)**

3.3.3 Патологическая физиология  
(медицинские науки)

**Автореферат**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Чита – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Цыбиков Намжил Нанзатович**

**Официальные оппоненты:**

**Шилов Сергей Николаевич** – доктор медицинских наук, доцент.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии, г. Новосибирск

**Ушницкий Иннокентий Дмитриевич** – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова» Министерства науки и высшего образования РФ, заведующий кафедрой терапевтической, хирургической ортопедической стоматологии и стоматологии детского возраста, г. Якутск

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Хабаровск

Защита диссертации состоится «19» июня 2024 года в \_\_<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России: <http://chitgma.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.077.01

доктор медицинских наук, доцент

Наталья Анатольевна Мироманова



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Заболевания пародонта – это комплекс инфекционных воспалительных заболеваний полости рта, поражающих пародонтальный аппарат зуба и сопровождающихся развитием дисбиоза, изменением активности иммунной системы, что в результате приводит к прогрессирующей деструкции тканей пародонта и потере зубов (V. Baelum, R. López, 2021). Частота встречаемости в Российской Федерации хронических воспалительных заболеваний тканей пародонта у взрослого населения достигает 98% (С.В. Микляев, 2018; М. Баймуратова, 2023). Хронический пародонтит является наиболее распространенным воспалительным заболеванием во всем мире (А.А. Субанова, 2015; О.А. Гуляева, 2018). Тяжелым пародонтитом страдают более 700 миллионов человек (11% населения мира), что делает его одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний (P.I. Eke, W.S. Borgnakke, 2021).

Хронический пародонтит приобрел актуальность в связи с тем, что он рассматривается не только как стоматологическое заболевание, но и как системное состояние, характеризующееся неразрешенным гипервоспалением, нарушением врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы, дисбактериозом полости рта и кишечника, другими общесистемными изменениями с развитием аутоиммунных процессов (M. Martínez-García, 2021).

Показано, что на возникновение и развитие пародонтита влияют генетические факторы и/или факторы окружающей среды (курение, системные заболевания) (S. Offenbacher, K. Divaris, 2016), приводящие снижению резистентности тканей пародонта на воздействие повреждающих факторов (M. Bertolini, R.C. Costa, 2022). Так, известно, что воспалительные реакции и иммунный ответ могут быть генетически детерминированы (L. Nibali et al., 2019). При этом имеющиеся доказательства генетической предрасположенности пародонтита представляют ограниченную прогностическую ценность (Е.А. Тихомирова, 2022).

Доказано, что медикаментозное лечение остается основным направлением терапии пародонтита (Успенская О.А., 2017; Хайдарова Н.Б., 2020). Однако используемые препараты, каждый из которых оказывает действие на отдельное звено патологического процесса, не всегда позволяют эффективно купировать воспалительный процесс в пародонте (С.В. Микляев, 2018). Применение аутоплазмы имеет более выраженный терапевтический эффект (P. Pietruszka, 2021), что свидетельствует о наличии иных звеньев патогенеза хронического пародонтита, к сожалению, не расшифрованных до сих пор, и, безусловно, представляющих интерес для патофизиологии.

**Степень разработанности темы исследования.** Хронический пародонтит характеризуется потерей прикрепления десневой ткани к зубу, углублением пародонтального кармана, деградацией периодонтальной связки и потерей альвеолярной кости. Предполагают, что деструктивный процесс обусловлен наличием поддесневых микробных сообществ и формированием иммуновоспалительного инфильтрата в пародонте (G. Hajishengallis, R.J. Lamont,

2021). Резистентность или, напротив, предрасположенность к развитию пародонтита, определяется множеством факторов – генетических, эпигенетических, экологических, старением и наличием системных заболеваний, таких как сахарный диабет (N. Goma, 2022). В ответ на инвазию микроорганизмов активируются защитные механизмы, состоящие из нескольких классов клеток, межклеточных мессенджеров, антител и эффекторных молекул, что приводит к развитию воспалительного процесса (И.С. Пинелис, Ю.И. Пинелис, 2020). Однако, несмотря на все эффекторные механизмы, организм не в состоянии полностью уничтожить возбудителей пародонтита, что приводит к самоподдерживающемуся патологическому процессу. Лечение хронического генерализованного пародонтита заключается в устранении инфекции из поддесневого кармана и предотвращении повторного инфицирования (А.Т. Motta, 2021). Тем не менее, классическое лечение чаще всего мало эффективно, что свидетельствует о недостаточности знаний о механизмах развития данного заболевания.

**Цель исследования:** исследовать механизмы нарушения основных звеньев иммунитета в развитии хронического пародонтита и его патогенетическую коррекцию аутоплазмой в эксперименте и клинике.

**Задачи исследования:**

1. В эксперименте оценить степень воспаления пародонта и костной ткани у крыс с индуцированным пародонтитом, фенотип иммунокомпетентных клеток (CD 3+, CD 20+, CD 68+), размеры эндотелиоцитов и их динамику до и после лечения аутоплазмой.
2. В сыворотке крови и тканях пародонта крыс изучить динамику цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  на фоне проведения инъекций аутоплазмы.
3. Оценить у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом качественные и количественные параметры микровезикул ротовой жидкости (CD45+, CD 11b+, CD 66b+, CD45+CD66b+, CD14+CD66b+, CD11b+CD66b+) при стандартной терапии и инъекциях аутоплазмы.
4. Исследовать уровень цитокинов в ротовой жидкости: IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-2, IL-4, IL-8, IL-17, TNF $\alpha$ , а также кальпротектина, липокалина-2, остеопонтина, цистатина С, металлопротеиназы 2 и 9, миелопероксидазы и их влияние на степень минерализации костной ткани и функцию эндотелия (ICAM-1, VCAM-1, эндотелин-1) у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при стандартной терапии и инъекциях аутоплазмы.

**Научная новизна**

Впервые показано, что в смешанной слюне человека в норме и патологии выявляются микровезикулы: CD45+, CD11b, CD 66b, CD45+CD66b, CD14+CD66b, CD11bCD66b. Установлено, что при развитии хронического генерализованного пародонтита количество микровезикул в ротовой жидкости возрастает и снижается в случае успешной терапии.

Впервые продемонстрирована в эксперименте и у больных вариабельность цитокинов: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-2, 4, 8, 17, остеопонтина, цистатина С и факторов агрессии: кальпротектина, липокалина-2, металлопротеиназы 2 и 9,

миелопероксидазы в динамике развития патологического процесса и их сдвиги при патогенетической терапии методом плазмолифтинга.

Впервые в эксперименте на крысах иммуногистохимическим методом представлена динамика содержания в тканях субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Показано, что у животных с индуцированным пародонтитом наблюдается максимальный рост числа макрофагов и В-лимфоцитов в поврежденных тканях.

Впервые показано, что высокая концентрация IL-17 свидетельствует об аутоиммунном компоненте в патогенезе хронического генерализованного пародонтита.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования расширяют существующие представления о роли лейкоцитарных и тромбоцитарных микровезикул, цитокинов, остеопонтинина, цистатина С, кальпротектина, липокалина-2, металлопротеиназы 2 и 9, миелопероксидазы смешанной слюны в патогенезе хронического генерализованного пародонтита.

Теоретическое значение работы состоит в выявлении аутоиммунного компонента патогенеза хронического генерализованного пародонтита. Разработана математическая модель прогнозирования аутоиммунного компонента в развитии хронических заболеваний тканей пародонта, основанная на увеличении уровня эндотелина-1 и концентрации IL-17 в ротовой жидкости.

Полученные результаты могут быть полезными для понимания механизмов возникновения и развития хронического генерализованного пародонтита и использоваться для патогенетического обоснования применения богатой тромбоцитами плазмы в комплексной терапии заболевания.

**Методология и методы исследования.** Проведено комплексное исследование 40 пациентов с диагнозом «хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести». В эксперимент *in vivo* включено 40 животных, у 30 из которых был индуцирован хронический пародонтит, 10 из них проводилась стандартная терапия, 10 – применен метод инъекций аутоплазмы. В работе применялись клинические и лабораторные (морфологические, гистологические, биохимические, иммунологические, гистохимические) и статистические методы исследований. Для исследования использовались цельная кровь и ее сыворотка/плазма, гомогенаты тканей пародонта экспериментальных животных.

**Личное участие автора** состоит в проведении анализа отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, составлении протокола исследования, проведении экспериментов *in vivo*, подборе пациентов. Автором осуществлены статистическая обработка результатов и их интерпретация, выполнен научный анализ полученных данных, сформированы научные положения и выводы, подготовлены публикации по теме диссертации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Маркером воспаления при хроническом пародонтите является увеличение числа микровезикул смешанной слюны, образованных преимущественно

макрофагами и моноцитами полости рта и несущих поверхностный маркер CD14+.

2. При хроническом пародонтите отмечаются сдвиги мукозального иммунитета полости рта, проявляющиеся увеличением концентрации цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-10 и IL-2, IL-4, IL-8, IL-17, TNF $\alpha$ , а также факторов агрессии (липокалина-2, металлопротеиназы 2 и 9, миелопероксидазы), определяющие степень воспаления и минерализации костной ткани. Экспериментом при индуцированном пародонтите на крысах данные закономерности подтверждаются. Увеличение уровня IL-17 в ротовой жидкости свидетельствует об аутоиммунном механизме заболевания.
3. Использование инъекций аутоплазмы в эксперименте и клинике сопровождается снижением воспалительной реакции, уменьшением концентрации цитокинов и факторов агрессии в ротовой жидкости, частичным восстановлением минеральной плотности костной ткани и сокращением сроков лечения.

**Степень достоверности и апробация работы.** Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом клинического и экспериментального материала с использованием современных методов, сертифицированных реактивов и оборудования, с применением статистической обработки полученных результатов при непосредственном участии автора в получении и анализе данных. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 107 от 27.01.2021).

Результаты исследования представлены на XVIII Межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2019); Краевой научно-практической конференции стоматологов и челюстно-лицевых хирургов «Актуальные вопросы стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (Чита, 2020); Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Чита, 2020); Научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (Чита, 2021); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (Чита, 2022); I ежегодной Научной сессии ФГБОУ ВО ЧГМА (Чита, 2022); Региональной научно-практической конференции врачей стоматологов и челюстно-лицевых хирургов «Теория и практика современной стоматологии» (Чита, 2023).

**Внедрение результатов исследования.** Результаты настоящего исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность и учебный процесс на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

**Публикации.** Материалы диссертационной работы отражены в 8 печатных работах, из них пять опубликовано в ведущих научных рецензируемых журналах, входящих в список, определенный ВАК Минобрнауки России для публикации результатов работ на соискание ученой степени кандидата наук, в

том числе две – в журналах, индексируемых в международных базах цитирования Scopus.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 19 отечественных и 142 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 24 таблицами и 25 рисунками.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Лабораторные исследования выполнялись на базе НИИ Молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (и.о. ректора д.м.н., профессор Н.В. Ларёва), ООО «Лаборатория Гемотест» (г. Москва). Набор клинического материала осуществлялся на базе ГАУЗ «Краевая стоматологическая поликлиника» г. Читы (главный врач к.м.н. Попова И.Н.).

*Изучение клинических, морфологических, иммунологических показателей в модели индуцированного пародонтита у крыс.* Экспериментальный пародонтит вызывали у самцов крыс породы Wistar в возрасте 18–20 недель и начальной средней массой 200,0±31,5 г. Животные находились в условиях 12-часового цикла «свет-темнота» при 23±3°C и имели свободный доступ к пище и воде. Эксперимент проводился в соответствии с национальными рекомендациями для ухода и использования лабораторных животных, одобренных Комитетом по этике животных.

Сформировано четыре группы по 10 особей в каждой: одна контрольная группа и три опытные. В первую опытную группу включены животные с экспериментальным пародонтитом, не получающие терапии; вторую – крысы с экспериментальным пародонтитом, получающие инъекции плазмы (3 инъекции через 3 суток каждая). Для инъекций плазмы предварительно у животных проведен забор крови из подключичной вены в количестве 1 мл, с последующим центрифугированием 10 минут при 1500 об/мин и забором плазмы, содержащей тромбоциты). Третья группа – животные с индуцированным пародонтитом, леченные адгезивными стоматологическими пленками с активными действующими компонентами «Метронидазол» и «Хлоргексидин» (курс процедур составил 10 дней).

У животных контрольной, второй и третьей опытных групп забрана кровь, а в пародонт сделаны инъекции физиологического раствора с использованием той же техники и дозировки, что и у субъектов второй опытной группы для исключения влияния стресса, вызванного во время забора крови или процедуры введения инъекций.

Пародонтит моделировали путем отслойки десны концом копьевидного скальпеля (№ 11) в сочетании с инъекциями 10% раствора этилового спирта с 0,25% раствором новокаина в течение 7 дней. Ткани экспериментальных животных после фиксации в 4% формальдегиде (рН 7,5) декальцинировали в 0,5 М растворе ЭДТА-Na (рН 7,5–8,0) в течение 4 недель, заливали их в парафин и делали срезы на уровне резцов обеих челюстей, окрашивали гематоксилин-

езином. Для иммуногистохимического анализа применялся стрептавидин-биотин-пероксидазный метод с использованием кроличьих моноклональных антител (SP7) (abcam, 16669, Кембридж, Великобритания) к CD 3+, CD 20+, CD 68+ в разведении 1:100.

Концентрации цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-17 $\alpha$ , IL-10, IL-6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) определяли в сыворотке крови и гомогенатах тканей пародонта с помощью системы мультиплексного анализа «Rat Inflammation Panel» соответствующих аналитов для крыс компании «Biolegend» (США). Уровень цитокинов исследовался дважды: в начале эксперимента и на 10-е сутки.

***Изучение клинических, морфологических, бактериологических и иммунологических показателей у больных с хроническим пародонтитом.*** Исследование проводилось с февраля 2021 г. по февраль 2022 г. на базе ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России. Под наблюдением находилось 40 пациентов с диагнозом «хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести» с отсутствующей тяжелой соматической патологией, в возрасте 35 (32,50; 40,0) лет. В группу сравнения включены 20 человек в возрасте 38 (34,30; 44,0) лет с отсутствием воспалительных заболеваний в полости рта, сопоставимые с основной группой по полу, возрасту, национальной принадлежности, наличию вредных привычек. Длительность заболевания составляла 5,2 (4,2; 6,2) лет. Всем больным проводилась местная противовоспалительная терапия и санация пародонтальных карманов, коррекция окклюзионных контактов, кюретаж. Инъекции аутоплазмы проводились 20 случайно выбранным пациентам.

Для проведения инъекции аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, осуществляли забор крови в специализированные пробирки Plasmolifting™, центрифугировали при 1300 об./мин в течение 10 мин. Супернатант вводили инсулиновой иглой в область зубодесневых сосочков 0,1–0,2 мл, в область переходной складки – 0,3–0,5 мл. Каждому пациенту процедура проводилась 5 раз: первое посещение – инъекции проведены в двух сегментах верхней челюсти (в 1-м и 2-м); второе – через 3 дня на нижней челюсти (в 3-м и 4-м); третье – через 7 дней; четвертое – через 30 дней и пятое – через 6 месяцев инъекции проводили во всех четырех сегментах.

***Оценка состояния тканей пародонта*** осуществлялась с помощью стандартного набора индексов: индекс кровоточивости Мюллеманна (в модификации Коуэлла, 1975); Massler M., Schour I. (РМА, 1947, в модификации Parma С., 1960); пародонтальный индекс (РJ) Рассела (1956), степень гигиены полости рта ИГР-У (ОНИ-S, Green, Vermillion, 1964). Всем пациентам была проведена конусно-лучевая компьютерная томография. Измерения рентгенологической плотности костной ткани проводились в единицах Г. Хаунсфилда (НУ).

***Определение количества и происхождения микровезикул.*** Забор ротовой жидкости обследуемых проводили натошак с 8 до 9 часов утра в контейнеры "Salivette"(Германия). Обследуемый в течение трех минут пережевывал тампон из контейнера, который, возвратив в контейнер, центрифугировали 5 минут при



3000 об/мин. Далее отбирали супернатант и вновь центрифугировали при 22000 об/мин уже в течение 45 минут. Осадок, содержащий микровезикулы, перемешивали и окрашивали комбинацией моноклональных антител. Пробы для проведения изотипического контроля готовили, используя антитела типа IgG1. Количественный и качественный анализ микровезикул (общее число микровезикул, и везикул, несущих антигены лейкоцитов (CD 45+), моноцитов (CD 14+), нейтрофилов (CD 11b+) и молекулы активации (CD 66b+)) проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

**Определение биологически активных веществ в ротовой жидкости.** Концентрацию матриксных металлопротеиназ (MMP) MMP-2, MMP-9, миелопероксидазы (MPO), кальпротектина (MRP<sub>g8/14</sub>), липокаина 2 (NGAL), молекул адгезии, остеопонтина, цистатина определяли, используя наборы для мультиплексного анализа Human Vascular Inflammation Panel 1 (Biolegend, США). Ротовую жидкость для проведения анализа не разводили. Определение показателей осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Уровень эндотелина-1 проводили ИФА методом с использованием набора Endotelin (1-21) фирмы «Biomedica» (Австрия).

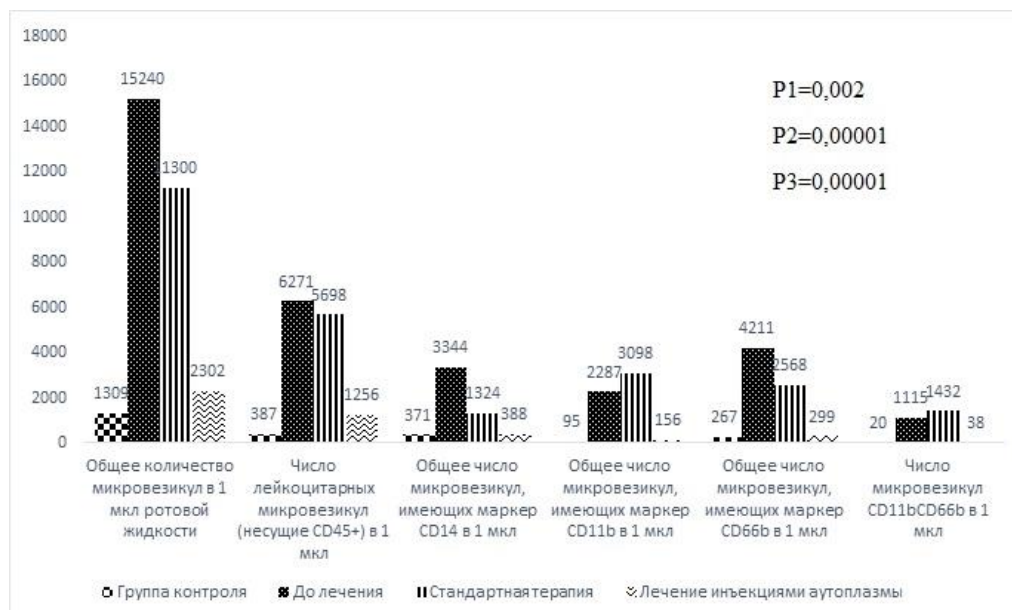
**Статистическая обработка полученных данных** проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа Крускал-Уоллиса. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентилей). Достоверность различий между группами (p) оценивали при помощи попарных сравнений Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера. Статистически достоверными считались данные при количественной характеристике случайностей (p) не более 0,05. Корреляционный анализ проведен по методу Спирмена. Для оценки перекрестных взаимосвязей изученных показателей применён метод многофакторного анализа. Для создания математической модели использовался биномиальный регрессионный анализ (логистическая регрессия).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Восстановление показателей врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы у больных хроническим пародонтитом при применении инъекций аутоплазмы**

Анализ функционирования врожденного звена иммунной системы осуществлялся по изменению качественного и количественного состава микровезикул, несущих антигены лейкоцитов (CD 45+), моноцитов (CD 14+), нейтрофилов (CD 11b+) и молекул активации (CD 66b+). Общее число микровезикул (MV) у пациентов с хроническим пародонтитом возрастало более чем в 11 раз. Наблюдался не только количественный сдвиг MV, но и качественный. Так, у здоровых лиц число MV, образованных всеми белыми кровяными тельцами, составляло 29,5%, у лиц с воспалением пародонта – 41,15%, при этом основная масса несла маркер CD14, более трети из них имели происхождение из нейтрофилов. Наблюдался рост числа MV, имеющих маркер активации. На фоне терапии число микровезикул снижалось. Однако, при

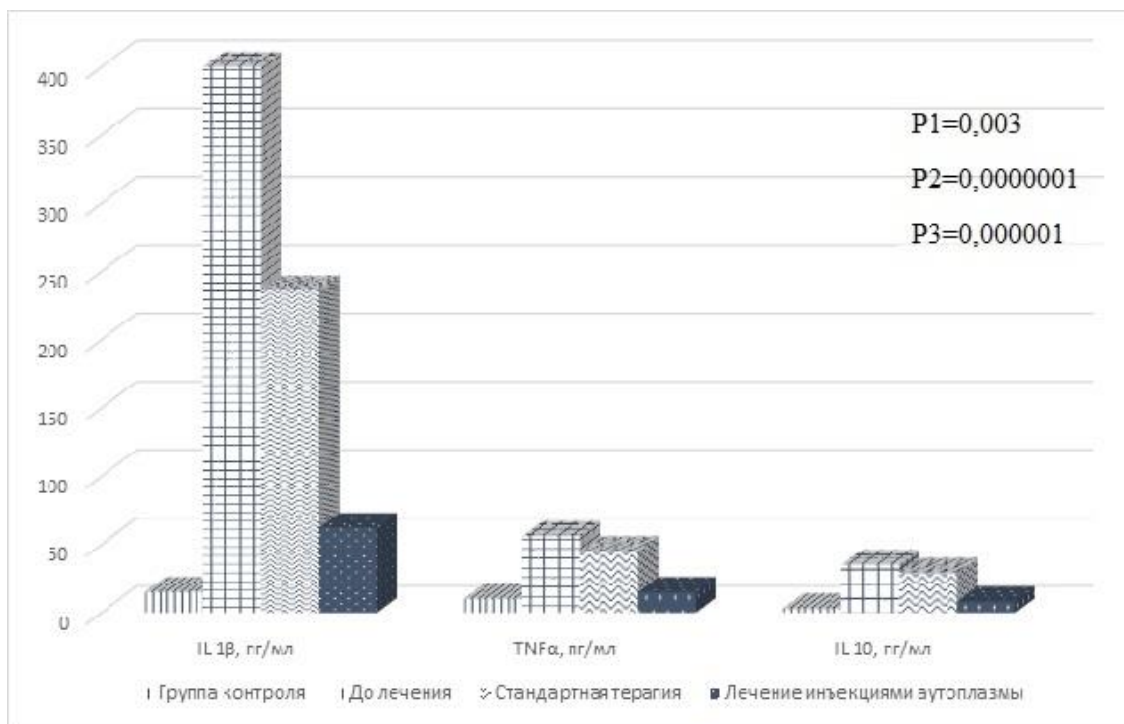
стандартной терапии хронического пародонтита их количество уменьшается лишь на 26% ( $p=0,01$ ), а при лечении инъекциями аутоплазмы – на 85% ( $p=0,000001$ ) (Рисунок 1).



Примечание: P1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, P2 – по сравнению с группой больных, получающих стандартную терапию, P3 – по сравнению с группой больных, получающих инъекции аутоплазмы.

Рисунок 1 – Качественные и количественные характеристики микровезикул ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Кроме динамики микровезикул, врожденное звено иммунной системы характеризуется мозаикой факторов агрессии и цитокинов. В наше исследование были включены следующие пептидные регуляторы межклеточных взаимоотношений: это IL-1 $\beta$ , IL-10 и TNF $\alpha$ . Причем, если IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в большей степени индуцируют процесс воспаления, то IL-10 снижает продукцию цитокинов, в том числе и хемокинов, уменьшает экспрессию костимуляторов и молекул МНС II класса [Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., 2023]. Нами установлено, что концентрация всех изучаемых показателей возрастала в обследуемых группах. Максимальный рост наблюдался со стороны IL-1 $\beta$ . При этом значимых отличий в группе лиц, леченных стандартной терапией, не найдено, что свидетельствует о продолжающемся воспалительном процессе. При применении инъекций аутоплазмы уровень цитокинов не приходит к контрольным показателям, однако наблюдается их значительное снижение по сравнению с результатами, полученными среди больных, получающих стандартную терапию (Рисунок 2).



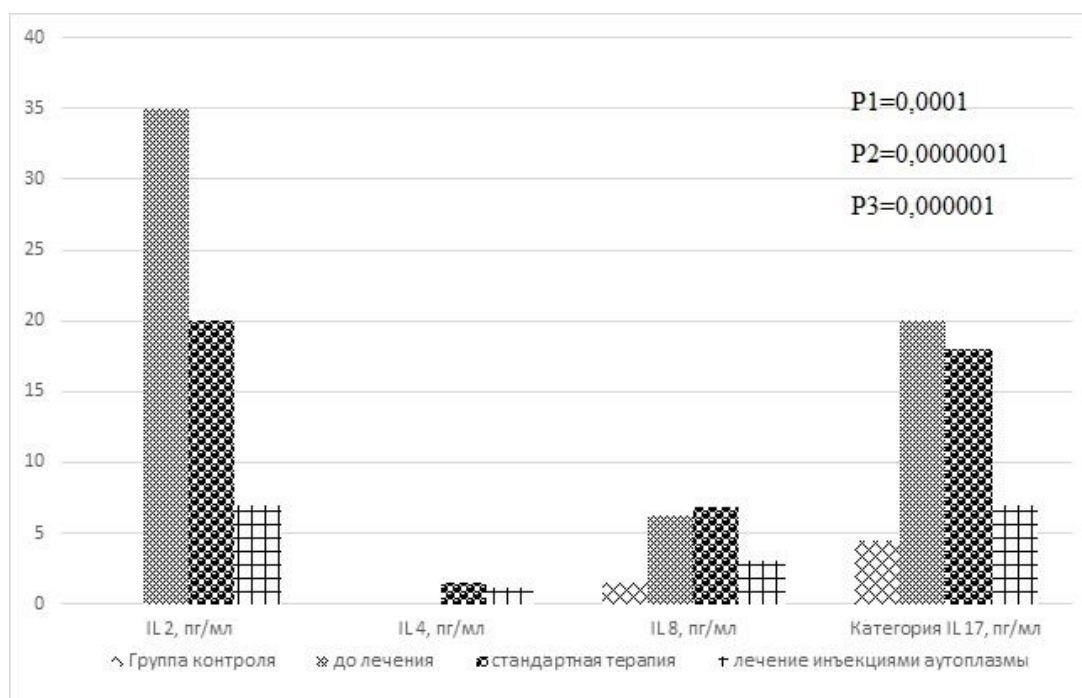
Примечание: P1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, P2 – по сравнению с группой больных, получающих стандартную терапию, P3 – по сравнению с группой больных, получающих инъекции аутоплазмы.

Рисунок 2 – Уровень цитокинов врожденного звена иммунной системы в ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

В качестве индикаторов агрессии клеток врожденного звена иммунной системы нами выбраны матриксные металлопротеиназы 2 и 9, миелопероксидаза, кальпротектин, липокаин 2. Нами наблюдался их значимый рост у больных пародонтитом, не приходящий к статусу контрольной группы на фоне терапии. Наблюдалось минимальное увеличение концентрации миелопероксидазы. Уровень этого фермента в ротовой жидкости у пациентов с хроническим пародонтитом возрастал в 2,1 раза. Практически в 24,8 раза возрастал уровень металлопротеиназы 2 ( $p=0,00001$ ).

Основная функция ИЛ-2 заключается в стимуляции и пролиферации Т-лимфоцитов, поэтому рост его концентрации в ротовой жидкости в 36 раз ( $p=0,0000001$ ) у больных хроническим пародонтитом, с одной стороны, свидетельствует о вовлеченности адаптивного звена иммунной системы, а с другой – о выраженной пролиферации Т-лимфоцитов.

ИЛ-17 – маркер функционирования Т-хелперов 17 типа, осуществляющих контроль аутоантигенов. Рост содержания ИЛ 17 в ротовой жидкости свидетельствует об активации аутоиммунных процессов в полости рта у больных хроническим пародонтитом. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о вовлеченности всех звеньев иммунной системы в патогенез хронического пародонтита (Рисунок 3).



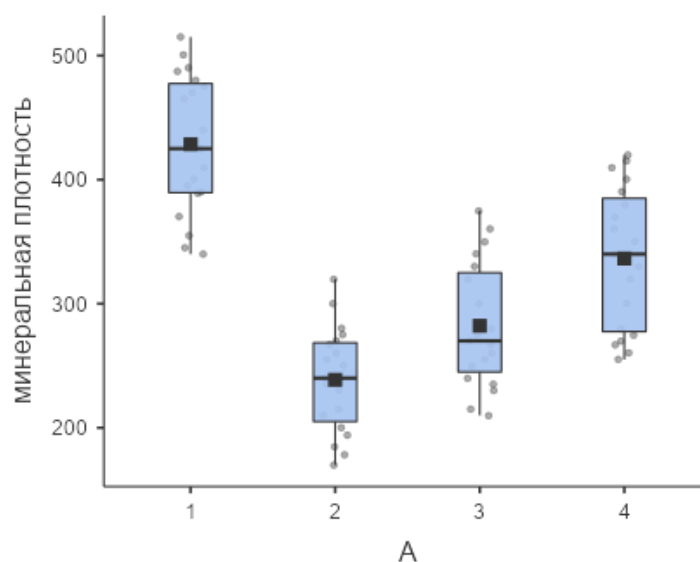
Примечание: P1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, P2 – по сравнению с группой больных, получающих стандартную терапию, P3 – по сравнению с группой больных, получающих инъекции аутоплазмы.

Рисунок 3 – Уровень цитокинов адаптивного звена иммунной системы в ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Me (25-й; 75-й))

### **Резорбция костной ткани у больных хроническим пародонтитом и ее коррекция методом инъекции аутоплазмы**

Потеря альвеолярной кости является отличительной чертой прогрессирования пародонтита. Показано, что резорбция костной ткани опосредована иммунной и воспалительной реакцией хозяина на повреждение. Однако механизмы, с помощью которых локальный иммунный ответ нарушает гомеостатический баланс образования и резорбции кости в пользу потери костной массы, не известен.

Нами зафиксирована резорбция межальвеолярных перегородок до 1/3 и снижение единиц Хаунсфилда в 1,8 раз ( $p=0,00001$ ) у лиц, страдающих хроническим пародонтитом по сравнению с показателями здоровых добровольцев (Рисунок 4).



Примечание. 1 группа – здоровые добровольцы; 2 группа – лица, страдающие хроническим пародонтитом, не получающие терапии; 3 группа – лица, страдающие хроническим пародонтитом, после стандартной терапии; 4 группа – лица, страдающие хроническим пародонтитом, после лечения инъекциями аутоплазмы.

Рисунок 4 – Изменение минеральной плотности костной ткани в единицах Хаунсфилда у больных хроническим пародонтитом при различных видах терапии

Резорбция костной ткани сопровождалась ростом остеопонтина. Его уровень увеличивался в группе лиц с нелеченым хроническим пародонтитом в 7,5 раз ( $p=0,0002$ ).

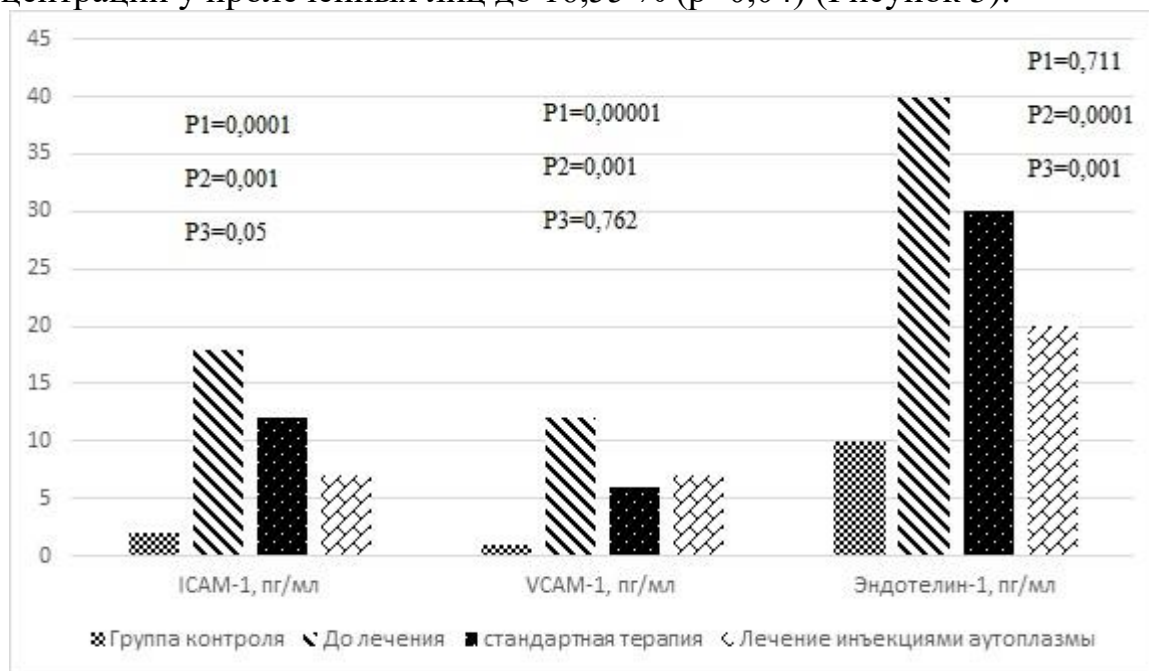
В нашем исследовании наблюдалось превалирование уровней провоспалительных цитокинов по сравнению с противовоспалительными. Так, концентрация IL-4 вообще не изменилась, и уровень IL-10 вырос в 5 раз, в то время как содержание IL-1 $\beta$  и IL-2 – более чем в 30 раз. Показатель IL-17 также увеличился более, чем в 5 раз, что свидетельствует об активации Т хелперов 17 типа, активации аутоиммунных процессов и хронизации воспаления, а также о стимулировании остеокластогенеза.

Таким образом, можно предположить следующий механизм потери костной ткани у больных хроническим пародонтитом: не разрешающееся воспаление пародонта характеризуется провоспалительной петлей, поддерживаемой иммунокомпетентными клетками. Цитокины, в первую очередь, макрофагального происхождения, в том числе и металлопротеиназы, активируют Т хелперы (Th17 и Th1), продуцирующие IL-8, IL-17 и RANKL. Это, в свою очередь, способствует рекрутированию нейтрофилов и усилению вторичной альтерации, а также дифференцировке и активации остеокластов через MCSF-RANKL, приводящей к нарушению сбалансированности костного гомеостаза и развитию rarefакции.

#### **Дисфункция эндотелия и ее коррекция методом инъекций аутоплазмы**

Для подтверждения вовлеченности эндотелия сосудов в патологический процесс определялся уровень растворимых молекул адгезии и эндотелина-1.

Нами выявлено увеличение концентрации растворимой формы VCAM-1 в ротовой жидкости в 38,3 раза, а ICAM-1 – в 18,1 раза. На фоне терапии инъекциями аутоплазмы уровень изучаемых веществ снижается, но превышал значения контроля в 25,2 и 6,4 раза, соответственно. Эндотелин-1 синтезируется в основном эндотелиоцитами в ответ на повреждающие стимулы и сразу секретируется во внешнюю среду. Нами обнаружен рост содержания эндотелина в ротовой жидкости у больных пародонтитом на 40,7% ( $p=0,003$ ), снижение его концентрации у пролеченных лиц до 16,55 % ( $p=0,04$ ) (Рисунок 5).



Примечание: P1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, P2 – по сравнению с группой больных, получающих стандартную терапию, P3 – по сравнению с группой больных, получающих инъекции аутоплазмы.

Рисунок 5 – Уровень растворимых форм молекул межклеточной адгезии и эндотелина-1 у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Таким образом, у лиц, страдающих хроническим пародонтитом, наблюдается повышение уровней цитокинов, факторов агрессии, растворимых форм молекул адгезии и эндотелина-1, что отображает текущий воспалительный процесс в тканях пародонта. При этом течение хронического пародонтита сопровождается развитием дисфункции эндотелия, проявляющейся в повышении концентрации эндотелина-1. Использование метода инъекций аутоплазмы приводит к снижению уровней биологически активных молекул, уменьшению бактериальной нагрузки, способствуя клинической ремиссии патологического процесса, что может быть перспективным для дальнейших исследований в парадонтологии.

#### **Индукцированный пародонтит у крыс: клиническая, гистологическая, иммунологическая характеристика**

Обследование лиц, страдающих хроническим пародонтитом, выявило нарушения в работе и врожденного, и адаптивного звеньев иммунной системы.

Назначение инъекций аутоплазмы корректировало местный и общий иммунитет пациентов. Для изучения тонких механизмов развития хронического пародонтита нами был индуцирован пародонтит у экспериментальных животных (Рисунки 6, 7).

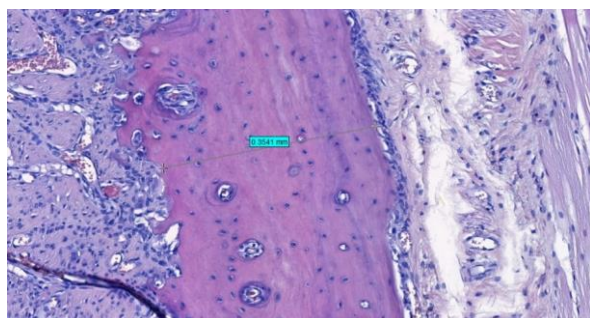


Рисунок 6 – Костная балка интактного животного. Окраска гематоксилин-эозином; увеличение x 400

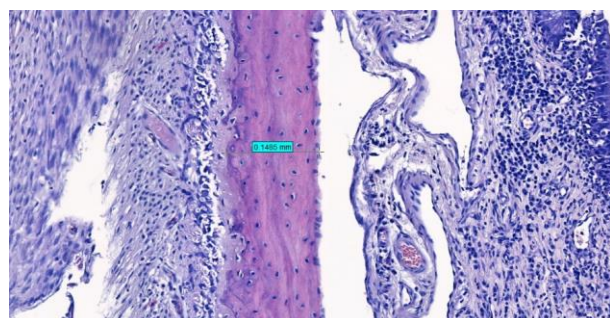


Рисунок 7 – Костная балка животного с индуцированным пародонтитом на 10 день эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; увеличение x 400

Применение процедуры инъекции аутоплазмы, а также стандартной терапии проявлялось уменьшением фибриновых наложений, санацией пародонтального кармана, формированием вторичного пародонтального прикрепления; отмечалось ограничение зоны инфильтрации. При этом, терапевтический эффект аутоплазмы был более выраженным.

Показано, что активированные Т-хелперы (Th1, Th2 и Th17) могут продуцировать различные провоспалительные цитокины, такие как IL-1 $\beta$ , IL-25 и IL-17 $\alpha$ , которые, влияя на дендритные клетки, нейтрофилы и В-лимфоциты, повышают их функцию. IL-17 $\alpha$  ответственен не только за активацию аутоиммунных процессов, но и за резорбцию костной ткани. В-лимфоциты с одной стороны продуцируют антитела для распознавания бактериальных компонентов, с другой – синтез аутоантител к коллагену, фибронектину и ламинину, что способствует локальной деструкции пародонта. Кроме этого, считается что В-лимфоциты, у пациентов с заболеваниями пародонта могут способствовать хроническому системному воспалению за счет секреции ими IL-8 и IL-1 $\beta$ .

Показатели биологически активных веществ в сыворотке крови и гомогенатах тканей у интактных животных совпадают. При развитии патологического процесса уровень изучаемых веществ значительно растет, причем в тканях он превышает значения сыворотки крови. Так, максимальный рост как в сыворотке крови, так и тканях зафиксирован со стороны TNF $\alpha$  – в 163 (p=0,0001) и 479 (p=0,0001) раз, IFN  $\gamma$  – в 167 (p=0,0001) и 200 раз (p=0,0001), IL 1 $\beta$  – в 61

( $p=0,0001$ ) и 440 раз ( $p=0,0001$ ), IL 10 – в 53 ( $p=0,00001$ ) и 330 ( $p=0,0001$ ), IL 17 $\alpha$  – в 47 ( $p=0,0001$ ) и 75 раз ( $p=0,001$ ) соответственно (Рисунок 8).



Примечание:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля,  $p_2$  – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих инъекции аутоплазмы,  $p_3$  – по сравнению с началом и окончанием терапии

Рисунок 8 – Оценка уровней цитокинов в сыворотке крови у крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии, Ме (25; 75)

Содержание IL-6 в большей степени возросло в сыворотке крови – в 11,6 раза ( $p=0,0001$ ) и в 40 раз – в тканях крыс с индуцированным пародонтитом ( $p=0,0001$ ). Полученные данные свидетельствуют о превалировании местных признаков воспаления над системными у крыс с индуцированным пародонтитом. Однако высокие показатели цитокинов в кровотоке являются не просто свидетелями типового патологического процесса, а мощными стимуляторами иммунного ответа, факторами, вызывающими повреждение эндотелия, индукторами коагуляционных каскадов, активаторами апоптоза и т.д., что в результате может привести к полиорганному поражению.

На фоне проводимой терапии наблюдалось снижение концентрации изучаемых веществ одновременно и в сыворотке крови и гомогенатах тканей. При этом, ни один вид терапии не сопровождался достижением статуса интактных животных, что свидетельствует о наличии не разрешившегося воспалительного процесса.

Рисунок 9 отражает выявленные нами механизмы нарушения иммунитета в патогенезе хронического пародонтита и их коррекцию аутоплазмой.





Рисунок 9 – Механизмы нарушения иммунитета в патогенезе хронического пародонтита и их коррекция аутоплазмой

## ВЫВОДЫ

1. У крыс с индуцированным пародонтитом регистрируется резкое увеличение концентрации цитокинов  $INF\gamma$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $IL-17$ ,  $TNF\alpha$ , преимущественно в тканях пародонта, возрастание размера эндотелиоцитов и увеличение числа клеток, несущих  $CD3+$ ,  $CD20+$ ,  $CD68+$  маркеры.

2. Введение аутоплазмы экспериментальным животным способствует снижению концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови и гомогенатах тканей, восстановлению числа иммунокомпетентных клеток, уменьшению размеров эндотелиоцитов.

3. Хронический генерализованный пародонтит у пациентов сопровождается повышением в ротовой жидкости концентрации про- и противовоспалительных цитокинов (с максимальным увеличением  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ), эндотелина-1, металлопротеиназы 2 и снижением концентрации цистатина С. Лечение приводит к уменьшению воспаления тканей пародонта, более выраженному при включении в схему терапии метода плазмолифтинга.

4. Количество микровезикул в ротовой жидкости у пациентов при хроническом пародонтите возрастает более чем в 11 раз за счет образования их  $CD14+$  позитивными клетками. Терапия пародонтита сопровождается снижением числа микровезикул, с более выраженным эффектом при применении плазмолифтинга.

5. Резорбция костной ткани у больных с хроническим генерализованным пародонтитом сопровождается увеличением концентрации остеопонтинина в ротовой жидкости. Стандартная терапия не восстанавливает минеральную плотность костной ткани и не влияет на уровень остеопонтинина. Применение плазмолифтинга приводит к снижению содержания остеопонтинина и частичному восстановлению минеральной плотности костной ткани.

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**  
**Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных**  
**ВАК Минобрнауки Росс**

1. Фефелов А.А. Микровезикулы и факторы агрессии нейтрофилов в патогенезе хронического пародонтита / Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В. - DOI 10.17816/КМЖ109459 // Казанский медицинский журнал. – 2023. – Т. 104, № 4. – С. 516-522.
2. Морфологические и иммунологические изменения тканей при экспериментальном пародонтите у крыс / Фефелов А.А., Баясхаланова Ц.Б., Терешков П.П., Фефелова Е.В., Цыбиков Н.Н. – DOI 10.52485/19986173\_2023\_1\_74 // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2023. – № 1. – С. 74-81. URL: <http://zabmedvestnik.ru/arhiv-nomerov/nomer-1-za-2023-god-opublikovan-04-04-2023/morfologicheskie-i-immunologicheskie-izmeneniya-tkanej-pri-eksperimentalnom-parodontite-u-krys> (дата обращения: 20.03.2024)
3. Фефелов А.А. Системные и локальные иммунологические эффекты плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита у крыс / Фефелов А.А., Цыбиков Н. Н., Терешков П.П., Фефелова Е.В. - DOI 10.25557/0031-2991.2023.03.68-75 // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67, № 3. – С. 68-75.
4. Фефелов А.А. Цитокины и факторы врожденного звена иммунной системы в механизмах резорбции костной ткани у больных хроническим пародонтитом / Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В. // International Journal of Medicine and Psychology / Международный журнал медицины и психологии. – 2023. – Т. 6, № 4. – С. 81-89.
5. Функциональная активность эндотелия полости рта у лиц, страдающих хроническим пародонтитом, при лечении методом плазмолифтинга / Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Шолохов Л.Ф., Фефелова Е.В. - DOI 10.29413/ABS.2023-8.3.17 // Acta biomedica scientifica. – 2023. – Vol. 8. № 3. – С. 154-160.

**Прочие публикации:**

6. Оценка эффективности плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита / А.А. Фефелов, Н.Н. Цыбиков, Е.В. Фефелова // Актуальные проблемы патофизиологии: международная научно-практическая конференция: сборник научных статей, г. Чита, 11 ноября 2022 г. / под редакцией Н.В. Ларевой. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2022. – С. 152–157. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-49-1.
7. Морфологические изменения эндотелиоцитов полости рта у крыс с индуцированным пародонтитом / А.А. Фефелов, Ц.Б. Баясхаланова, Н.Н. Цыбиков, Е.В. Фефелова // I ежегодная Научная сессия ФГБОУ ВО ЧГМА: сборник научных трудов, 15 декабря 2022 г., г. Чита / под редакцией Н.В. Ларевой. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2022. – С. 32-35. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-51-4.
8. Патогенетическая роль маркеров сосудистого воспаления в развитии хронического пародонтита / А.А. Фефелов // Актуальные проблемы

патофизиологии: сборник научных статей научно-практической конференции, г. Чита, 3 ноября 2021 г. / под редакцией Н.В. Ларевой. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2021. – С. 81-84. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-37-8.

### Список сокращений

БАВ	Биологически активные вещества
МПО	Миелопероксидаза
МФ	Макрофаги
ММП	Матриксные металлопротеиназы
MV	Микровезикулы
ПМЯЛ	Нейтрофилы
IL	Интерлейкины
IFN- $\gamma$	Интерферон- $\gamma$
PRP	Аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами
Th	Т хелперы
TIMPs	Ингибиторы металлопротеиназ
TNF	Фактор некроза опухоли
TGF- $\beta$ 1	Трансформирующий фактор роста бета 1
PRP	Лечение плазмой, содержащей тромбоциты; плазмолифтинг
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов
FGF	Фактор роста фибробластов

Подписано в печать 16.04.2024. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman

Формат 60x84 1/16. Авт. л. 1,0 Тираж 100. Заказ № /2024.

Отпечатано в редакционно-издательском центре ЧГМА 672000, Чита, ул.

Горького, 39а.