

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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)

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Цыбиков Намжил Нанзатович

Чита – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА И ЕГО ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ АУТОПЛАЗМОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1 ПРИЧИНЫ И МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПАРОДОНТИТА	
1.1.1. Теории возникновения и развития пародонтита	11
1.1.2. Современные представления развития пародонтита	18
1.1.3. Механизмы резорбции кости при пародонтите	27
1.2 Плазмолифтинг – понятие, клинические и биологические эффекты	31
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
Глава 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
3.1. Клиническая оценка состояния пародонта у лиц, страдающих хроническим пародонтитом	47
3.2. Восстановление показателей врожденного и адаптивного звена иммунной системы у больных хроническим пародонтитом при их коррекции методом плазмолифтинга	49
3.3. Резорбция костной ткани у больных хроническим пародонтитом и ее коррекция методом плазмолифтинга	57
3.4. Дисфункция эндотелия и ее коррекция методом плазмолифтинга	59
3.5. Индуцированный пародонтит у крыс: клиническая, гистологическая, иммунологическая характеристика	62
3.6. Аутоиммунный компонент в патогенезе хронического пародонтита при применении факторного анализа	76
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ	88
Выводы	99
Перспективы дальнейшей разработки темы	100

Список сокращений	101
Список литературы	102

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

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 [4, 30, 45]. Частота встречаемости в Российской Федерации хронических воспалительных заболеваний тканей пародонта у взрослого населения достигает 98% [4]. Хронический пародонтит является наиболее распространенным воспалительным заболеванием во всем мире. Тяжелым пародонтитом страдают более 700 миллионов человек (11% населения) мира, что делает его одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний во всем мире [54].

Помимо важности его как стоматологического заболевания, хронический пародонтит приобрел актуальность, так как показано, что он может развиваться в системное состояние, характеризующееся неразрешенным гипервоспалением, нарушением врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы, дисбактериозом полости рта, кишечника и другими общесистемными изменениями, проявляющиеся в первую очередь развитием аутоиммунных заболеваний [92].

Основная масса исследователей придерживается точки зрения, предполагающей, что причина заболеваний пародонта – бактериальная [66]. Однако, в отличие от многих инфекционных заболеваний, заболевания пародонта, являются инфекциями, опосредованными чрезмерным ростом комменсальных микроорганизмов, а не приобретением экзогенного патогена [29].

Однако идентификация истинных «возбудителей» пародонтита не дала положительных результатов. Имеются данные о том, что специфические микробы

связаны с прогрессирующими формами заболевания; но присутствие этих микроорганизмов у людей без признаков прогрессирования патологического процесса предполагает, что заболевание является результатом иммунного ответа и воспалительных процессов, а не просто присутствием патогенных бактерий [8, 25, 52].

Показано, что на возникновение и развитие пародонтита влияют генетические факторы и/или факторы окружающей среды (курение, системные заболевания) [22, 59, 93], приводящие снижению резистентности тканей пародонта на воздействие повреждающих факторов [42, 110]. Так, известно, что воспалительные реакции и иммунный ответ в целом как количественно, так и качественно могут быть обусловлены генетически [157]. При этом, имеющиеся до сих пор доказательства генетической предрасположенности пародонтита имеют ограниченную прогностическую ценность.

Доказано, что медикаментозное лечение пародонтита остается основным и в настоящее время. Однако используемые препараты, каждый из которых действует на какое-то определенное звено патологического процесса, имеют ряд побочных эффектов и не всегда позволяют достаточно быстро купировать воспалительный процесс в пародонте. Применение аутоплазмы имеет более выраженный терапевтический эффект [46, 68, 131], что свидетельствует о наличии других звеньев патогенеза хронического пародонтита, к сожалению, не расшифрованных до сих пор, и безусловно, представляющих глубокий интерес для патофизиологии.

### **Степень разработанности темы исследования**

Хронический пародонтит клинически характеризуется потерей прикрепления десневой ткани к зубу, углублением пародонтального кармана, деградацией периодонтальной связки и потерей альвеолярной кости [23]. Предполагают, что деструктивный процесс обусловлен наличием поддесневых микробных сообществ и формированием иммуновоспалительного инфильтрата в пародонте [66]. Резистентность или, напротив, предрасположенность к развитию пародонтита, определяется множеством факторов – генетические [59],

эпигенетические [61], экологические (такие как курение, стресс и диета) [79, 116, 135], старение [25, 40] и системные заболевания, такие как диабет [61]. В ответ на инвазию микроорганизмов активируются защитные механизмы, состоящих из нескольких классов клеток, межклеточных мессенджеров, антител и эффекторных молекул, что приводит к развитию воспалительного процесса [8]. 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 [88,99]. Тем не менее, классическое лечение чаще всего мало эффективно, что свидетельствует о недостаточности знаний о механизмах развития данного заболевания.

Показано, что и введение аутоплазмы, и лизата тромбоцитов животным с индуцированным пародонтитом оказывают положительный эффект [2, 95], в основе которого, по мнению большинства ученых, лежит воздействие факторов роста [46, 53]. На наш взгляд – это довольно механистический взгляд на эффективность терапии аутоплазмой, так как в ее состав входит большое количество биологически активных веществ, зачастую обладающих разнонаправленным действием.

**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, остеопонтинина, 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 хроническим пародонтитом вариабельность цитокинов: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-2, IL-4, IL-8, IL-17, остеопонтинина, 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.

**Личное участие автора** состоит в проведении анализа отечественной и зарубежной литературы, посвященной механизмам развития хронического пародонтита, 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, проводилась подготовка основных публикаций по теме диссертации, внедрение результатов диссертации в учебный процесс.

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

1. Маркером воспаления при хроническом пародонтите является увеличение числа микровезикул смешанной слюны, образованные преимущественно макрофагами и моноцитами полости рта и несущие поверхностный маркер CD14+.
2. При хроническом пародонтите отмечаются сдвиги мукозального иммунитета полости рта, проявляющиеся увеличением концентрации цитокинов

IL-1 $\beta$ , IL-10, 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.

**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 плазмолифтинга. 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.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты настоящего исследования о механизмах развития хронического генерализованного пародонтита внедрены в научно-исследовательскую деятельность и учебный процесс кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

**Степень достоверности.** Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом клинического и экспериментального материала с использованием современных методов, сертифицированного оборудования и реактивов, с применением статистической обработки полученных результатов при непосредственном участии автора в получении и анализе данных. На проведение

исследование получено разрешение локального этического комитета при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» (протокол №107 от 27.01.2021).

**Апробация работы.** Основные результаты работы 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-ой 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).

### **Публикации**

Основное содержание, положения диссертационной работы отражены в 8 печатных работах, общим объемом 2,88 п.л., в том числе 5 – в ведущих научных рецензируемых журналах, входящих в список, определенный Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов работ на соискание ученой степени кандидата наук, 2 из которых опубликованы в журналах, входящих в международную базу цитирования SCOPUS.

### **Структура и объем диссертации**

Работа изложена на 122 страницах печатного текста, включает введение, 4 главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение полученных результатов», выводы, список литературы. Диссертация содержит 24 таблицы и 25 рисунков. Список литературы включает 19 отечественных и 142 зарубежных источников.

## Глава 1

# МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА И ЕГО ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ АУТОПЛАЗМОЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

### 1.1. Причины и механизмы развития пародонтита

#### 1.1.1. Теории возникновения и развития пародонтита

Заболевания пародонта – это комплекс инфекционных воспалительных заболеваний полости рта, поражающих пародонтальный аппарат зуба, что сопровождается нарушениями симбиотических отношений между оральной флорой и иммунной системой хозяина, характеризующихся последовательными периодами микробного обострения, за которыми следуют периоды ремиссии, вызывая прогрессирующую деструкцию и потерю зубов [45]. Как правило, заболевания пародонта подразделяются на две группы, а именно: гингивит, острое и обратимое воспаление, ограниченное тканями десны; и более тяжелая, необратимая и деструктивная форма – пародонтит [23]. Клинические проявления пародонтита включают образование глубоких пародонтальных карманов, потерю периодонтальной связки и прикрепления цемента, резорбцию альвеолярной кости [99].

Заболевания пародонта являются серьезным бременем для здоровья полости рта, и, согласно Национальному исследованию здравоохранения, проведенному в Великобритании, им страдают от 20% до 50% взрослого населения во всем мире. Хронический пародонтит, более распространенная форма заболеваний пародонта, поражает почти 5-15% взрослого населения во всем мире [126]. Его тяжесть увеличивается с возрастом, пик заболеваемости приходится на возраст 30-45 лет [117]. Распространенность хронического пародонтита варьируется в зависимости от географических регионов и считается самой высокой в странах Азии (около 15-20%) [30].

Основной микробиом полости рта (комменсалы), включая предполагаемые пародонтопатогены, широко распространены с высокой частотой носительства у взрослых людей во всем мире [28]. Pilot T. [116] в своем обзоре пришел к выводу, что «с точки зрения общественного здравоохранения относительное сходство заболеваний пародонта во всем мире гораздо более поразительно, чем различия». Подсчитано, что более 700 видов бактерий колонизируют полость рта, из которых около 400 видов присутствуют в поддесневых областях. Известно, что основными возбудителями являются три бактериальных микроорганизма, в частности *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas gingivalis* [27].

При этом, доказано, что такие факторы риска как стресс, плохая гигиена полости рта, неадекватные пищевые привычки, употребление алкоголя, курение, генетические факторы также связаны с патогенезом пародонтита [135].

Считается, что воспаление пародонта вызывается и поддерживается микробиотой зубной биопленки (зубного налета). Происхождение этой концепции связано с созданием модели «экспериментального гингивита у человека», проведенными Лое Н. и его сотрудниками в середине 60-х годов. В ретроспективе теории, которые первоначально использовались для обсуждения связи биопленки с заболеванием, рассматривали либо качество биопленки (гипотеза специфического налета), либо количество (гипотеза неспецифического налета) [89].

Гипотеза о специфическом зубном налете утверждает, что качественное изменение микробиоты пародонтального кармана приводит к заболеванию пародонта [88]. Поэтому основной целью лечения будет удаление специфического возбудителя или с помощью нехирургической пародонтальной терапии, или химического средства для контроля зубного налета. Однако, специфичность зубного налета трудно определить, и многие микроорганизмы, являющиеся условно патогенными далеко не всегда способны вызвать развитие воспаления. Эта гипотеза предполагала, что использование антибиотиков против определенных

видов бактерий может вылечить и предотвратить заболевания полости рта. При этом, длительное применение антибиотика вызвало развитие резистентности к нему, а прекращение лечения приводило к регрессу микробиологического сообщества, появлению нового и формированию антибиотикорезистентности [104]. Кроме того, предполагаемые «специфические патогены» являются частью местной микрофлоры и, в отличие от чужеродных патогенов, не могут быть элиминированы из полости рта. Этот подход доминировал в микробиологии пародонта в течение нескольких десятилетий. В качестве метода лечения были предложены антибиотики. Позднее была выдвинута «гипотеза экологических бляшек» вместе с расширенным списком потенциальных пародонтопатогенов [105], предполагающая, что ключевым фактором патологического процесса в пародонте является экологический сдвиг в сторону дисбактериоза – бактерии полости рта при отсутствии гигиены колонизируют десневую щель, образуя зубной налет. Воспаление возникает при снижении местной резистентности и удаление зубного налета приводит к выздоровлению. Теория показала, что количество бляшек определяет патогенность без различия уровней вирулентности, поэтому бактериофилактика и лечение были сосредоточены на способах предотвращения возникновения дисбактериоза [105].

Предположение о том, что определенные триггеры инициируют дисбактериоз и заболевание, вызывает сомнение из-за отсутствия четкой связи любого предполагаемого патогена с инициированием заболевания у людей. Анализ микробиома образцов зубного налета, взятых со здоровых участков, локусов с гингивитом и ранним пародонтитом, показал, что бактерии, связанные с инициацией заболевания являются комменсалами, а «предполагаемые патогены или патобионты», которые инициировали заболевание являются незначительными компонентами биопленки на ранней стадии [51]. Сдвиг к дисбиотической микрофлоре, по-видимому, в значительной степени является функцией избыточного и стойкого воспаления с образованием карманов, которые изменяют среду роста бактерий. Такое представление было впервые внедрено в начале 1990-

х годов как гипотеза экологического налета [91]. В этой гипотезе Филип Д. Марш доказывает, что поддесневая среда оказывает избирательное давление, изменяя специфический микробный состав и вызывает болезнь. Он связал сдвиг в микробном составе с изменениями экологии, появлением новых питательных веществ и кофакторов роста, ацидозом и снижением окислительно-восстановительного потенциала, что позволяет строгим анаэробам размножаться в биопленке. Получается, что бактериальный рост диктуется окружающей средой. Такая цепочка событий приводит к заболеванию, а взаимная зависимость между хозяином и бактериями играет важную роль в причинно-следственной связи [91]. Пародонтит можно предотвратить не только путем непосредственного ингибирования пародонтопатогенов, но и путем воздействия на факторы, вызывающие рост патогенной микрофлоры: нормализацией уровня рН, использованием противомикробных и противовоспалительных препаратов, восстановлением окислительно-восстановительного баланса, упреждением колонизации и т.д.

Развитие описанных теорий привело к появлению гипотезы полимикробного и дисбиозного происхождения пародонтита, подчеркивающую взаимодействие между полимикробным сообществом и нерегулируемым воспалительным ответом [85].

Предполагалось, что бактерии, экспрессируя соответствующие адгезины и рецепторы, смогут обеспечить сборку гетеротипического сообщества, отдельные члены которого будут физиологически совместимы или, по крайней мере, неантагонистичны. Комбинированная активность таких факторов будет противостоять врожденному и адаптивному иммунному ответу хозяина и, как следствие, способствовать воспалению тканей. Чтобы нарушить иммунную защиту макроорганизма и повысить патогенность всей группы, микроорганизмы могут вступать в двустороннюю связь с обитателями сообщества, в частности, с дополнительными патогенами. Так, способность *P. gingivalis* оказывать

воздействие на все сообщество, склоняет чашу весов к дисбиозу, который является краеугольным патогеном [64].

Существует интегрированная гипотеза кариеса зубов и заболеваний пародонта, основанная на экологических принципах. В основе гипотезы лежит динамическая стабильность микробиоты полости рта, при которой внутренние (преимущественно слюна и жидкость десневой борозды) и бактериальные факторы сохраняют экологическую устойчивость, что сопровождается клиническим здоровьем. Однако потеря внутренних факторов устойчивости и/или длительные изменения в доступности микробных метаболических субстратов могут сместить экологический баланс микробиоты либо на сахаролитическую (ацидогенную), либо на протеолитическую (алкариногенную) стадию, в зависимости от этиологического фактора. Следовательно, для поддержания и восстановления динамической стабильности микробиоты полости рта необходимо контролировать факторы, вызывающие заболевание, такие как слюноотделение и поступление питательных веществ для бактерий в полость рта. Исходя из сказанного, избыточное потребление ферментируемых углеводов может способствовать воспалению тканей пародонта из-за гипергликемии.

Интегральная гипотеза подчеркивает, что как кариес зубов, так и заболевания пародонта возникают на стадии динамической стабильности в ответ на дисбаланс питания микробиоты. Таким образом, заболевания пародонта могут относиться к воспалительным заболеваниям, вызванным сахаром, подобно диабету, ожирению и сердечно-сосудистым заболеваниям [106].

Однако, микробиологические исследования микрофлоры полости рта у больных пародонтитами, проведенные во всем мире, показали высокую распространенность предполагаемых пародонтальных патогенов без прямой связи с распространенностью заболеваний пародонта [26]. Сходство пародонтальной микробиоты среди населения в разных географических точках поразительно. Грамотрицательные анаэробы и подвижные бактерии преобладают в десневых и пародонтальных карманах и могут считаться нормальными комменсалами.

Пропорции и нагрузка различных родов или видов могут различаться между популяциями, а также между особями внутри популяции и местами (например, в глубоких карманах) в пределах одного и того же рта, но общая картина основной микрофлоры полости рта (микробиома), по-видимому, является одинаковой. Хотя дисбактериоз действительно может возникнуть [85], это является недостаточным фактором для объяснения эпидемиологических особенностей пародонтита. Возможно определенные микроорганизмы оказывают более сильное влияние на прогрессирование заболевания, но точная роль бактерий и иных предполагаемых патогенов в пародонтите до сих пор остается неясной [47].

Другие исследователи, в большей мере, сосредоточились на изучении влияния генетических факторов и/или факторов окружающей среды (курение, системные заболевания) на развитие пародонтита, для получения логического объяснения наличия более «восприимчивых» к пародонтиту лиц [22, 121]. Фокус исследований при этом изменился: роль микробиоты в механизмах развития заболевания становится незначительной, а основным механизмом, приводящем к хроническому воспалению пародонта считается изменение резистентности тканей пародонта на воздействие повреждающих факторов [110]. Предполагалось, что старение влияет на здоровье полости рта, так как сопровождается угасанием всех функций организма, в том числе и иммунной системы [25]. В это же время другие ученые утверждали, что воспалительные реакции и иммунный ответ в целом как количественно, так и качественно могут быть обусловлены генетически [157]. Следовательно, гингивит и пародонтит можно объяснить полиморфизмом генов. Следует признать, что имеющиеся до сих пор доказательства имеют ограниченную прогностическую ценность и не учитывают очевидную универсальную закономерность, наблюдаемую в эпидемиологических исследованиях.

Socransky S.S. (1984) на основе длительного мониторинга уровней пародонтального прикрепления к альвеолярной кости у больных пародонтитом и на экспериментальных моделях у животных выяснил, что заболевание пародонта прогрессирует в виде повторяющихся острых эпизодов, а не прогрессируют

медленно и непрерывно до начала лечения или потери зубов (гипотеза «продолжающегося заболевания»). Авторы обнаружили, что темпы потери прикрепления в этом случае были выше, чем те, которые соответствуют гипотезе непрерывного заболевания, или менее выраженные, которые ожидалось на основании оценок предшествующих темпов потери. Учитывая эти наблюдения была описана модель деструктивного заболевания пародонта, при которой вспышки активности происходят в течение коротких периодов времени в отдельных участках. Эти всплески появляются случайным образом в пародонте по всей полости рта. На одних участках может наблюдаться кратковременный активный всплеск деструктивного пародонтита (который может длиться от нескольких дней до нескольких месяцев) перед переходом в период ремиссии. Другие участки, будут свободны от деструктивных заболеваний пародонта на протяжении всей жизни человека. Участки, демонстрирующие деструктивную периодонтальную активность, могут не проявлять никакой дальнейшей активности или могут подвергаться одному или нескольким вспышкам активности в более поздние периоды времени. Таким образом, в жизни пациента могут быть относительно короткие периоды, когда во многих участках пародонта происходит разрушение пародонта, за которым следуют периоды продолжительной ремиссии [94, 104].

В дальнейшем Manji F. и Nagelkerke N. [Manji F, Nagelkerke N., 1989] рассмотрели и теоретически объяснили, что рецидивы и ремиссии заболевания могут возникать как прямое следствие накопления случайных событий.

Теория Manji F. и Nagelkerke N. построена на представлении о пародонтите как о процессе, вовлекающем ткани, аккумулирующие фактически случайный шум воспалительных провокаций и факторов, способствующих выздоровлению, внутри биопленки, контактирующей с тканями, что в течение длительного времени приводит к распаду тканей и утрате прикрепления. Теория предсказывает возникновение вспышек и ремиссий в течении пародонтита [90].

### 1.1.2. Современные представления развития пародонтита

Микробиом полости рта отличается от микробиома других частей тела, таких как кожа, кишечник и влагалище [71]. Оральный микробиом включает в себя очень разнообразную микробную популяцию, включающую более 700 видов [48]. Зубная биопленка имеет свой собственный микробиом, характеризующийся стрептококками и актиномицетами, прикрепляющимися к поверхности зубов [48]. Зубная биопленка находится в динамическом состоянии и саморегулируется за счет постоянной конкуренции между микроорганизмами за пространство, экологические условия и питание. Поскольку стрептококки и другие представители типа Firmicutes (*Granulicatella*, *Gemella*, *Veillonella*) обладают способностью разлагать гликопротеины, составляют основной микробиом зубного налета [85]. Микросреда вдоль десневой борозды отличается от других участков поверхности зуба, для которой основным источником питания является жидкость десневой борозды (GCF), количество которой коррелирует со степенью воспаления. Таким образом, представляется, что основным источником питания микробиоты в этой нише являются белки, а основной метаболический путь является протеолитическим, отдавая предпочтение протеолитическим, а не сахаролитическим микроорганизмам. Кроме того, GCF, который представляет собой экссудат сыворотки, также содержит ряд факторов, поддерживающих рост, таких как витамины (витамин К или менадион), гормоны (эстроген) и специфические сывороточные белки/пептиды (гемин), все из которых способствуют развитию грамотрицательных анаэробов [44].

Воспаление десны может привести к углублению десневого кармана в результате отека, что способствует увеличению потока GCF, влияя на тип микроорганизмов, способных колонизировать пространство [5]. Точно так же снижение окислительно-восстановительного потенциала благоприятствует анаэробам. В отличие от наддесневого зубного налета адгезия микроорганизмов не играет решающей роли в десневом кармане, а подвижные бактерии (виды *Treponema*, *Campylobacter*, *Selenomonas*) способны закрепляться путем

механической ретенции [132]. GCF содержит гуморальные защитные факторы (антитела, комплемент, антимикробные пептиды), а также воспалительные клетки, такие как нейтрофилы и моноциты. Бактерии могут избежать фагоцитоза, продуцируя капсулы (*P. gingivalis*) или лейкотоксины (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), или просто будучи протеолитическими, расщепляя большинство белков, включая гуморальные антимикробные факторы, такие как иммуноглобулины (IgG), компоненты системы комплемента, дефензины [41].

Бактерии, несомненно, являются основной причиной гингивита и пародонтита, но именно реакция организма пациента на эти бактерии определяет, трансформируется ли гингивит в пародонтит [152]. Накапливаются убедительные доказательства того, что именно неконтролируемые воспалительные и иммунные реакции хозяина в значительной степени вызывают разрушение тканей [85].

Считается, что патологический иммунный ответ хозяина против местных дисбиотических микробов начинается с контакта иммунной системы организма с патогенными микроорганизмами и сопровождается активацией как врожденного, так и адаптивного звена, что сопровождается повышенным образованием IL-1, IL-6 и TNF $\alpha$  [113]. При этом, бактериальная биопленка, прикрепленная к поверхности зуба, делает невозможным эффективное уничтожение инфекционных микроорганизмов иммунной системой [63]. Соединительный эпителий является первой структурой пародонта, столкнувшейся с бактериальной проблемой [145]. Бактерии способны проникать через эпителий в соединительную ткань десны, где они, повреждая ткань, вызывают развитие воспаления. Эпителиальные клетки слизистой оболочки, фибробласты десны и МНФ обнаруживают бактериальные PAMPы, которые связываясь с Toll-подобными рецепторами (TLR4/2), вызывают активацию провоспалительных факторов транскрипции, таких как ядерный фактор каппа В (NF $\kappa$ B) и белок-активатор 1 (AP-1) [63], которые индуцируют синтез и высвобождение медиаторов, запускающих воспалительную реакцию. Точно так же фибробласты десны и эпителиоциты увеличивают местный синтез и активность матриксных металлопротеиназ (ММП) [148].

Поражение пародонта начинается как острое воспаление, характеризующееся увеличением количества нейтрофилов, мигрирующих в десневую щель и обладающих биосинтетической способностью *de novo* для хемокинов и цитокинов с провоспалительными, противовоспалительными и иммунорегуляторными свойствами. ПМЯЛ индуцируют рекрутирование интерлейкин-17-продуцирующих CD4-позитивных Т-хелперов 17 в места инфекции или воспаления [154]. Кроме того, они способствуют пролиферации и трансформации В-лимфоцитов, в секретирующие антитела плазматические клетки. Активированные нейтрофилы экспрессируют связанный с мембраной рецептор-активатор лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL), ключевой остеокластогенный цитокин и, таким образом, способны индуцировать остеокластическую резорбцию кости [67].

Макрофаги являются важным источником провоспалительных и потенциально деструктивных для тканей молекул, таких как IL-1, ФНО- $\alpha$ , ММП и простагландин E<sub>2</sub> [42]. Показана прямая корреляция макрофагальной инфильтрации с тяжестью заболевания пародонта [60], что в значительной степени способствовало усилению деградации коллагенового матрикса в соединительной ткани пародонта [159]. Причем макрофаги могут подвергаться как классической (M1), так и альтернативной (M2) активации. Макрофаги M1 индуцируются микробными агентами (например, LPS) или цитокинами Th1-лимфоцитов и демонстрируют высокую фагоцитарную способность и повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов, костимулирующих и противомикробных молекул. Напротив, макрофаги M2 индуцируются цитокинами Th2-лимфоцитов и секретируют высокие уровни IL-10 и трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1), что позволяет им обладать иммунорегуляторными свойствами и способствовать пролиферации клеток и регенерации тканей [67]. В моделях воспаления пародонта макрофаги обладают свойствами как M1, так и M2. Однако макрофаги M1 демонстрируют преобладание над макрофагами M2, что позволяет

предположить, что макрофаги M1, вероятно, представляют собой подмножество, связанное с пародонтитом [125].

Когда воспалительная реакция становится хронической, лимфоциты адаптивной иммунной системы проникают в ткани пародонта, высвобождая воспалительные и иммунорегуляторные медиаторы [67]. Для активации лимфоцитов необходимы два типа сигналов: сигнал, индуцируемый самим антигенным рецептором при распознавании родственного ему антигена, и костимулирующий сигнал от профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК) [76].

При гингивите преобладающими АПК являются CD14 + и CD83 + дендритные клетки. В то время как при пародонтите преобладающими АПК являются CD19 + и CD83 + В-лимфоциты [42].

В ряде исследований показано, что В- и Т-лимфоциты являются основными клеточными источниками активатора κВ-лиганда рецептора ядерного фактора (RANKL) при воспалении пародонта. RANKL представляет собой цитокин из семейства TNF, который может связываться с мембраной или секретироваться ею и стимулирует дифференцировку остеокластов, слияние клеток, их активацию, что приводит к резорбции кости [102]. Остеобласты и стромальные клетки костного мозга преимущественно экспрессируют RANKL, связанный с мембраной, что индуцирует остеокластогенез через клеточный контакт с предшественниками остеокластов. Точно так же активированные Т-клетки продуцируют, как мембраносвязанные, так и растворимые формы RANKL. Растворимый RANKL может индуцировать остеокластогенез независимо от прямого контакта между инфильтрирующими лимфоцитами и предшественниками остеокластов на поверхности кости. Однако Т-хелперы 17 типа, активируют остеокласты также путем прямого межклеточного контакта [142]. Остеопротегерин (OPG) представляет собой растворимый белок, обладающий способностью блокировать биологические функции RANKL путем конкурентного ингибирования. При пародонтите увеличение RANKL/OPG способствует рекрутированию

предшественников остеокластов, их слиянию и последующей активации, что приводит к резорбции кости [60].

С другой стороны, Th1-лимфоциты играют фундаментальную роль в возникновении и прогрессировании пародонтита за счет повышения уровня IFN- $\gamma$  [69]. Исследования показали, что у мышей с дефицитом IFN- $\gamma$  обнаруживались низкие уровни воспалительных цитокинов и хемокинов, а также количества лейкоцитов GR1+, F4/80+, CD4+ и CD8+ в пораженном пародонте. Кроме того, у этих мышей также было обнаружено снижение уровней миелопероксидазы и индуцибельной синтазы оксида азота. IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  являются цитокинами, секретируемыми Th1-лимфоцитами. TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  стимулируют эндотелиальные клетки и увеличивают рекрутирование иммуннокомпетентных клеток, повышают продукцию хемокинов в большинстве типов клеток, участвуют в активации нейтрофилов и стимулируют секрецию и тканевую активацию MMPs. Хотя ни IL-1 $\beta$ , ни TNF- $\alpha$  напрямую не участвуют в стимуляции резорбции кости, они косвенно способствуют разрушению кости, стимулируя устойчивое воспаление ткани пародонта [60]. Th2-лимфоциты являются основным клеточным источником IL-4, что способствует секреции IgE плазматическими клетками и альтернативной активации макрофагов по независимому от IFN- $\gamma$  пути. Эти эффекторские функции Th2-лимфоцитов негативно регулируют воспалительный и Th1-лимфоцитарный ответы, так что поляризация иммунного ответа Th2-типа при пародонтите может представлять собой поврежденный адаптивный иммунный ответ [31]. Наконец, RANKL также может секретироваться Th17-лимфоцитами, которые в сотрудничестве с воспалительными цитокинами, полученными из Th1-лимфоцитов, способны изменять костный метаболизм, способствуя резорбции кости [154].

Остеопонтин (OPN) представляет собой секреторный гликозилированный белок внеклеточного матрикса, обладающий биологической активностью. Доказано, что он секретируется преостеобластами и макрофагами [112]. Ряд исследований показал, что OPN способствует адгезии остеокластов и улучшает

активность остеокластов в отношении остеоцитов. Несколько исследований подтвердили, что OPN взаимодействует с интегрином  $\alpha\nu\beta5$  для регуляции активности остеокластов и побуждает TRAP разрушать костный матрикс [112]. При нокаутировании гена OPN, получено значительное снижение числа остеокластов [148].

Обычно считается, что OPN способствует минерализации костей посредством образования остеопонтин-цементной линии [137].

Тем не менее, Huang W. И соавторы сообщили, что OPN ингибирует пролиферацию и дифференцировку остеобластов *in vitro*, и что сверхэкспрессия OPN ингибирует отложение минералов в костной ткани [111]. Эти же результаты подтвердила группа ученых из Китая, что OPN ингибирует пролиферацию и дифференцировку остеобластов и способствует пролиферации и дифференцировке остеокластов, что вызывает резорбцию кости [112]. Таким образом, повышенная экспрессия OPN может ингибировать костеобразование.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) составляют группу из более чем 25 секретируемых или связанных с клеточной поверхностью кальций-зависимых цинксодержащих эндопептидаз, участвующих в протеолизе белков и рецепторов внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс влияет на межклеточную адгезию и функциональную активность клеток ткани активности и изменяется с возрастом [147]. ММП присутствуют у разных видов животных и человека, имеют разные субстраты, но обладают сходными микроструктурными особенностями [86]. ММП влияют на синтез [86], ремоделирование и деградацию внеклеточного матрикса и перичеллюлярных субстратов, включая протеиназы, факторы свертывания крови, хемотаксические вещества, латентные факторы роста, рецепторы клеточных мембран и межклеточные молекулы адгезии [133], что позволяет им активно и динамично участвовать как в физиологических, так и патологических процессах в различных тканях [56].

ММП секретируются во внеклеточный матрикс в виде неактивных проферментов или зимогенов, которые активируются посредством сложных

биохимических процессов, ответственных за протеолиз определенных частей внеклеточного матрикса в зависимости от подтипа. MMPs могут быть активированы протеазами, физико-химическими процессами, такими как ацидоз, нагревание, и контролируются ингибиторами металлопротеиназ (TIMPs) [86]. Некоторые из них могут активироваться внутриклеточно [82].

TIMPs действуют путем замещения ионов цинка или хелатирования кальция на активном конце, или взаимодействия с зимогенами перед активацией, или путем покрытия целевого субстрата [96].

ММП классифицируются в соответствии с их предполагаемой субстратной специфичностью, структурой и биофункциональностью на пять основных классов: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины и ММП мембранного типа.

Коллагеназы разрушают некоторые белки внеклеточного матрикса, но в основном они расщепляют коллаген типа I, II, III, VII, X, желатин, энтактин, агрекан, тенасцин. В эту группу входят ММП-1, -8, -13 с аналогичным действием, тогда как ММП-18 относится к этой группе с ограниченным действием против коллагена I типа.

Желатиназы расщепляют желатин, коллаген I, IV, V, VII, X, XI типов, а также эластин, фибронектин, ламинин, агрекан, витронектин. И MMP-2, и MMP-9 входят в эту группу и работают с предыдущими субстратами, но MMP-9 работает еще с декорином, плазминогеном и проФНО- $\alpha$ .

Стромелизины имеют сходную структуру доменов с коллагеназами, но они не расщепляют интерстициальный коллаген. ММП-3 и 10, воздействуя на коллагены типов III, IV, V, IX, X, XI, протеогликаны, ламинин, фибронектин, желатин, агрекан, эластин, фибрин/фибриноген, витронектин, в то время как MMPs-3 обладает расширенным действием на перлекан, декорин, proIL-1 $\beta$ c, плазминоген, экадгерин,  $\alpha$ 2Ma, proTNF- $\alpha$  и MMPs-11 существуют в этой группе без признанного субстрата.

Матрилизины воздействуют в основном на фибриноген, фибронектин, коллаген IV типа, желатин и ламинин. И MMP-7, и MMP-26, как члены

матрилизинов, обладают этим общим действием, но ММР-7 имеет более расширенный спектр действия на коллаген типа I, III, V, IX, X, XI, тенасцин, протеогликаны, про- $\alpha$ - дефенсин, витронектин, проФНО- $\alpha$ , эластин, плазминоген, Е-кадгерин и декорин.

ММП мембранного типа обычно оказывают расщепляющее действие на желатин и фибронектин с переменным действием на ламинин, перлекан, фактор XII, тенасцин, агрекан, нидоген, энтактин, агрекан, фибрин, витронектин, проФНО-АТ, трансглутаминазу, типы I, II, III коллагены, основной белок протеогликана хряща и  $\alpha$ 2Ma.

Субстрат некоторых ММР еще не определен, а именно ММР-21 (хенорус) и ММР-23 (трансмембранный тип II).

ММП играют важную роль в регуляции и патогенезе заболеваний пародонта [147]. В таблице 1 обобщены ММР, которые, способствуют поражению десен и пародонта, а также заживлению ран, функции и связанным с ними заболеваниями.

Таблица 1 - ММPS при поражениях пародонта с изменениями из работы [146].

Тип ММП	Синоним ММП	Субстрат ММП	Происхождение	Физиологическая роль
<b>ММП-1</b>	Коллагеназа 1/ интерстициальная коллагеназа/коллагеназа фибробластов	Коллаген I, II, III, VII, VIII, X, XI, желатин, фибронектин, агрекан, энтактин, тенасцин, овостатин, казеин	Фибробласты Кератиноциты Эндотелиальные клетки Макрофаги Остеобласты Хондроциты Тромбоциты	Заживление ран, реэпителизация Пролиферация клеток Миграция кератиноцитов
<b>ММП-2</b>	Желатиназа А/коллагеназа IV типа 72 кДа	Коллаген, эластин, эндотелин, фактор роста фибробластов, ММР-9, ММР-13, плазминоген и TGF- $\beta$	Кардиомиоциты Фибробласты Миофибробласты	Неоваскуляризация Ангиогенез Стимулирование/ ингибирование воспаления
<b>ММП-8</b>	Коллагеназа 2/коллагеназа нейтрофилов	Коллаген I, II, III, фибронектин, агрекан, овостатин	Хондроциты Эндотелиальные клетки Макрофаги	Обновление тканей пародонта, противовоспалительное действие, заживление ран

			Гладкомышечные клетки	
<b>ММП-9</b>	Желатиназа В/коллагеназа IV типа 92 кДа	Желатин, коллаген типа V, ламинин, фибронектин	Нейтрофилы Эозинофилы Эпителиальные клетки	Заживление ран, имплантация эмбриона, неоваскуляризация, функция иммунных клеток, ремоделирование тканей
<b>ММП-12</b>	Эластаза макрофагов	Эластин, Ламинин, Фибронектин, Витронектин, Коллаген IV типа	Эндотелиальные клетки Нейтрофилы Фибробласты Т-клетки Миоциты Макрофаги	Разрушают компонент внеклеточного матрикса
<b>ММП-13</b>	Коллагеназа 3	Коллаген I, II, III, IV, IX, X, XIV, фибронектин, ламинин, желатин, агрекан, плазминоген, остеонектин	Эпителиальная и нервная клетка Соединительная ткань (хрящ и кость)	Остеокластическая активация, противо- воспалительное действие

Хотя роль ММР в развитии, физиологии и патологии очевидна, их точный механизм действия до конца не выяснен.

### 1.1.3. Механизмы резорбции кости при пародонтите

Кость представляет собой удивительно динамичную и активную ткань, которая постоянно обновляется в ответ на механические, пищевые и гормональные воздействия. У здорового взрослого человека существует баланс между сопряженными процессами резорбции кости остеокластами и формирования кости остеобластами [69]. В физиологических условиях эти процессы регулируются системными гормонами и местными факторами и управляются остеоцитами и клетками костной выстилки, которые точно регулируют уровни кальция в интерстициальной жидкости и плазме [107].

Цикл ремоделирования кости происходит постоянно, так как остеокласты постоянно удаляют зрелую кость, при этом новая кость одновременно формируется

osteoblastами [137]. Этот процесс состоит из четырех отдельных фаз – активации, резорбции, реверсии и формирования.

«Активация» является инициирующим событием, которое преобразует покоящуюся поверхность кости в поверхность ремоделирования [34]. Процесс включает в себя рекрутирование моноклеарных предшественников остеокластов на поверхность кости, их дифференцировку и слияние в функциональные остеокласты. Неминерализованный остеоид, покрывающий минерализованный костный матрикс, должен быть растворен до того, как остеокласты смогут прикрепиться к минерализованному матриксу и инициировать резорбцию. Протеазы остеобластов ответственны за растворение этого остеоида. После этого активированные остеокласты прикрепляются к костному матриксу, их цитоскелет реорганизуется – они приобретают поляризованную морфологию и образуют зону уплотнения, чтобы изолировать место резорбции и сформировать гофрированные края, которые секретируют протеазные ферменты [34].

Отличительным признаком резорбирующей поверхности является появление фестончатой зоны, называемой резорбционной лакуной Хошипа [34]. Фаза резорбции длится около 8-10 дней, предположительно, в течение жизни остеокласта [141].

После того, как большая часть минерального и органического матрикса растворится, наступает фаза «обращения», продолжающаяся 7–14 дней, знаменующая переход от разрушения к восстановлению. После заполнения одной лакуны резорбции остеокласт может перемещаться по поверхности кости и возобновлять резорбцию или подвергаться апоптозу [141].

Формирование новой кости, двухстадийный процесс, с отложения остеоида. Первоначальный органический матрикс, состоящий в основном (90%) из коллагена 1 типа и различных других компонентов, впоследствии минерализуется в течение примерно 20 дней [58].

Неколлагеновые белки костного матрикса играют ключевую роль в минерализации матрикса, клеточной адгезии и регуляции клеточной активности во

время сопряжения образования и резорбции. Так, остеокальцин, может действовать как хемоаттрактант и необходим для дифференцировки остеокластов. Костный сиалопротеин, высокоспецифичный костный белок, обладает высоким потенциалом связывания кальция, тем самым ингибируя отложение минералов. Кроме того, он способствует адгезии остеокластов к молекулам костного матрикса через ключевую пептидную последовательность аргинин-глицин-аспарагиновая кислота и может регулировать образование остеокластов. Остеопонтин и остеоонектин также важны для активности остеогенных клеток.

Кальмодулин, цитоплазматический кальций-связывающий белок, сконцентрированный в цитоплазме остеокластов, регулирует эффекты внутриклеточного кальция и АТФ-зависимый транспорт протонов. По мере резорбции увеличение цитоплазматического кальция в конечном итоге деактивирует остеокласты [69]. Катепсины В, Е, К, S и L – эти цистеиновые протеазы секретируются остеокластами для деградации нативного коллагена при рН менее 4,5 [58]. После этого металлопротеиназы матрикса (ММП), такие как желатиназа А (ММП-2), стромелизин (ММП-3) и коллагеназа (ММП-1), продолжают процесс деградации матрикса. Таким образом, антагонисты кальмодулина и ингибиторы ММП могут блокировать резорбцию путем ингибирования закисления резорбтивного компартмента [127].

При болезненных состояниях нарушение гомеостатического баланса, необходимого для функционального обновления костной ткани, приводит к деструктивным остеолитическим процессам. При воспалительном заболевании пародонта в процессы резорбции и ремоделирования кости вовлечены как микробные, так и факторы хозяина [128]. Локальное образование остеокластов и их стимуляция необходимы для потери альвеолярной кости. Было показано, что множество медиаторов, таких как IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, ФНО- $\alpha$ , ФНО-бета, ТФР- $\beta$ , кинины и тромбин, могут стимулировать резорбцию кости. Резорбция кости также напрямую регулируется локально ионизированным кальцием, образующимся в результате резорбции остеокластов. Эндотелиальные клетки через

медиаторы, включая оксид азота и эндотелин также играют роль в развитии остеопороза [69].

Показано, что IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  увеличивают связывание нейтрофилов и моноцитов/макрофагов с эндотелиальными клетками, стимулируют продукцию PGE 2 и высвобождение лизосомальных ферментов, а также стимулируют резорбцию костей. Предварительные данные также указывают на присутствие интерферона-  $\alpha$  в GCF, который может играть защитную роль при заболеваниях пародонта из-за его способности ингибировать резорбционную активность IL- 1 $\beta$  [113].

Десневые фибробласты гетерогенны в том смысле, что они продуцируют OPG в ответ на LPS и IL-1, что указывает на их защитную роль в подавлении образования остеокластов; однако они также могут усиливать хронические воспалительные процессы за счет продукции IL-6 и IFN. Пародонтопатогенные бактерии *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis* обладают уникальными механизмами индукции RANKL в остеобластах и фибробластах десны. При стимуляции LPS и IL-1 остеобласты и фибробласты периодонтальной связки экспрессируют RANKL. Экспрессия RANKL и OPG также может быть связана с функцией амелогенина и регуляцией образования одонтокластов [69]. Недавно было показано, что RANKL активируется, тогда как OPG подавляется при пародонтите по сравнению со здоровьем пародонта, что приводит к повышенному соотношению RANKL/OPG.

CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки присутствуют в поражениях пародонта, а также клетки памяти и активированные Т-лимфоциты, и различные субпопуляции Т-клеток, по-видимому, участвуют либо в усилении, либо в подавлении RANKL-опосредованной резорбции пародонтальной кости. Кроме того, могут присутствовать Т-лимфоциты Th1- и Th2-типа и ассоциированные с ними цитокины с поляризацией в сторону профиля Th1 [63]. Было высказано предположение, что клетки Th1-типа способствуют потере костной массы, поскольку RANK-L, по-видимому, преимущественно экспрессируется на клетках

Th1-типа, в то время как регуляторные T-клетки подавляют потерю костной массы, опосредованную T-хелперами 1 типа. Продукция провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF- $\alpha$  активируется T-клетками Th1-типа. Они могут косвенно индуцировать резорбцию кости путем стимуляции предшественников остеокластов и последующей активации остеокластов за счет продукции RANK-L остеобластами [42]. Активированные T-клетки также могут посредством продукции и экспрессии OPG напрямую способствовать дифференцировке остеокластов. Эти прямые и непрямые способы участия T-клеток в резорбции периодонтальной кости, по-видимому, зависят от степени рекрутирования T-клеток Th1-типа в воспаленных тканях [80]. Хорошо известно, что контроль этого сдвига опосредуется балансом между так называемыми Th1 и Th2 субпопуляциями T-клеток, при этом хронический периодонтит опосредуется Th2-клетками. Совсем недавно T-регуляторные (Treg) и Th17-клетки были продемонстрированы в тканях пародонта, что указывает на роль этих медиаторов в иммунорегуляции заболевания [129]. Однако также было показано, что Th17 и IL-17 играют как защитную, так и деструктивную роль в резорбции периодонтальной кости [145].

Бактериальные факторы вирулентности сами по себе способны потенцировать резорбцию кости [109]. Так, ЛПС различных пародонтопатогенов, ДНК CPg и капсулярный полисахарид бактерий способствуют дифференцировке остеокластов из клеток костного мозга. Моноциты, стимулированные PAMPs, демонстрируют повышенную дифференцировку в остеокласты.

Недавние разработки в области биологических процессов и медиаторов дифференцировки и активности остеокластов расширили знания о процессах резорбции и подготовили почву для новых диагностических и терапевтических методов лечения (в частности плазмолифтинг) ситуаций локализованной потери костной массы, наблюдаемой при заболеваниях пародонта. Тем не менее, многое еще предстоит понять о сложных механизмах, посредством которых осуществляется резорбция кости при пародонтите.

## 1.2. Плазмолифтинг – понятие, клинические и биологические эффекты

Основной целью нехирургического лечения пародонтита является не только достижение длительного контроля над воспалительным процессом, а и восстановление тканей пародонта, обусловленное сформированным *de novo* соединительнотканым прикреплением, в том числе, за счет образования функционального цемента с встраиванием коллагеновых волокон в ту часть поверхности корня, на которой отсутствует периодонтальная связка [149].

Knighton D.R. и соавторы в 1986 г. показали эффективность тромбоцитарной массы для лечения труднозаживающих кожных язв [43], что легло в основу лечения плазмой, содержащей тромбоциты (PRP).

Плазмолифтинг в стоматологии применяется с конца 1990-х годов [153]. Первые клинические данные о его использовании представил Marx R.E. с соавторами [123], которые использовали плазму, содержащую тромбоциты при введении костного трансплантата в реконструированную нижнюю челюсть пациента после удаления опухоли. Авторы указали, что добавление PRP значительно ускорило процесс образования новой кости. Аналогичные результаты наблюдались впоследствии и другими авторами, которые использовали комбинацию PRP с костным аллотрансплантатом для регенерации внутрикостных дефектов [83].

Содержание тромбоцитов в PRP в 3-4 раза выше их числа по сравнению с их уровнем в кровотоке. Так, количество тромбоцитов в полученной плазме может превышать 2 000 000 в 1 мкл, в то время как нормальная концентрация тромбоцитов в крови составляет от 150 000 до 350 000 в 1 мкл [153].

Белые кровяные тельца оказывают защитное действие на организм человека путем:

- участия в распознавании патогенов [50],
- снижая адгезию патогенных пародонтальных бактерий [114],

- выделения белков, способных подавлять активность бактерий и грибов [153],
- производя активные формы кислорода (АФК) участвуют в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности [58],
- привлекая лейкоциты к месту повреждения и модулируя их функции [2],
- обеспечивая быстрое заживление и регенерацию, выделяя факторы роста (фактор роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ) и инсулиноподобный фактор роста (IGF-I)) [46],
- способствуя неоангиогенезу [68].

Последнее было продемонстрировано при патологическом и опухолевом ангиогенезе [24].

Общепринято, что тромбоциты оказывают проангиогенное и стимулирующее действие на ангиогенез [38]. Показано, что введение высоких концентраций PGF и других тромбоцитарных цитокинов, может индуцировать ангиогенез, поскольку фактор-1а, полученный из стромальных клеток, связывается с рецепторами CXCR4 на эндотелиальных клетках-предшественниках, стимулирует их деление. Vir S.C. и др. (2011) показали, что PRP усиливает ишемическую неоваскуляризацию, предположительно, за счет стимуляции васкулогенеза и артериогенеза. В их модели *in vitro* пролиферация эндотелиальных клеток и образование капиллярных трубок индуцировались большими количествами различных PDG, где VEGF был основным ангиогенным стимулирующим фактором. Другим важным и существенным фактором в восстановлении путей ангиогенеза является синергизм между несколькими PGF. Так, Richardson T.P. и др. (2001) продемонстрировали, что синергетическая активность ангиогенных факторов тромбоцитарного фактора роста-bb (PDGF-BB) и VEGF приводит к быстрому образованию зрелой сосудистой сети по сравнению с активностью отдельных факторов роста. Комбинированная активность этих факторов была недавно подтверждена в исследовании, посвященном усилению

коллатерального кровообращения в хронически гипоперфузированном мозге у мышей [32]. Однако, есть указание, что чрезмерная концентрация тромбоцитов может ингибировать ангиогенный процесс [74]. Факторы роста тромбоцитов, влияющие на ангиогенез можно разделить на две группы (табл. 2) и от их баланса и будут зависеть сроки восстановления пародонта [38].

Таблица 2 - Тромбоцитарные про- и антиангиогенетические факторы роста

<b>Проангиогенетический</b>	<b>Антиангиогенетический</b>
VEGF	ТФР-β1
PDGF	ПАИ
ТФР-β1	TSP
ЭФР	Ангиостатин
серотонин	Эндостатин
СДФ-1	ПФ4
Ангиопоэтин -1, -2	CXCL4L
ММП-1,-2	ТИМПС
Ил-8	

Описывая биологическую активность тромбоцитов, чаще говорят о БАВ α-гранул, из-за присутствия в них факторов свертывания крови, большого количества PDGF и регуляторов ангиогенеза. Кроме этого в них содержатся фактор тромбоцитов 4 (PF4), основной белок протромбоцитов, Р-селектин (активатор интегрина) и хемокин RANTES. Общие функции этих специфических компонентов гранул тромбоцитов заключаются в рекрутировании и активации других иммунных клеток или индукции воспаления эндотелиальных клеток [36].

Компоненты плотных гранул, такие как АДФ, серотонин, полифосфаты, гистамин и адреналин, в большей степени являются модификаторами активации тромбоцитов и образования тромбов. Многие из этих элементов обладают эффектом модификации иммунного ответа. Так, АДФ тромбоцитов распознается рецептором P2Y<sub>12</sub>ADP на дендритных клетках (ДК), усиливая антигенный эндоцитоз [73]. Более того, аденозинтрифосфат (АТФ) тромбоцитов передает сигнал через T-клеточный рецептор P2X<sub>7</sub>, что приводит к увеличению дифференцировки T-хелперов CD4 в провоспалительные T-хелперы 17 (Th17).

Другие компоненты плотных гранул тромбоцитов (например, глутамат и серотонин) индуцируют миграцию Т-клеток и усиливают дифференцировку моноцитов в ДК соответственно (рис.1).

При активации тромбоциты изменяют форму и образуют псевдоножки, что способствует их агрегации. Впоследствии они высвобождают свои внутриклеточные  $\alpha$ - и плотные гранулы [124].

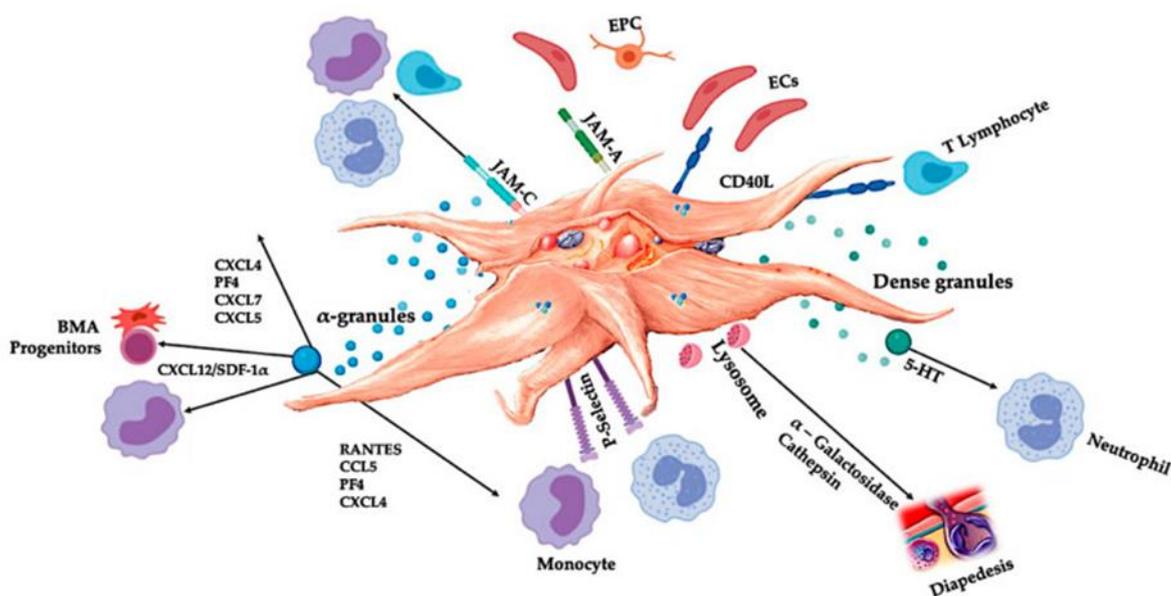


Рисунок 1. Эффекты БАВ тромбоцитов [121]

Взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами, эндотелиальными клетками и внеклеточным матриксом зависит от интегринов (в частности, интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  необходим для образования стабильных комплексов путем связывания с рецепторами антигена макрофага-1 (Mac-1) на нейтрофилах через фибриноген [20] и селектинов [122]. При воспалении тромбоциты экспрессируют P-селектин, а нейтрофилы – L-селектин. При активации тромбоцитов P-селектин может связываться со своим лигандом PSGL-1, присутствующим на нейтрофилах и моноцитах [158]. Кроме того, связывание PSGL-1 инициирует внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий к активации нейтрофилов посредством нейтрофильных интегринов Mac-1 и антигена-1, ассоциированного с функцией

лимфоцитов (LFA-1). Активированный Mac-1 связывается с GPIb или GPIIb/IIIa на тромбоцитах через фибриноген, что, в свою очередь, стабилизирует межклеточное взаимодействие нейтрофилов и тромбоцитов [155]. Кроме того, активированный LFA-1 может связываться с молекулой межклеточной адгезии тромбоцитов-2, дополнительно стабилизируя комплекс нейтрофилов и тромбоцитов, способствуя длительному прикреплению к клеткам [20].

TLR-4 на тромбоцитах стимулирует взаимодействия белых кровяных пластинок с нейтрофилами [150], которые регулируют окислительный взрыв лейкоцитов, модулируя высвобождение АФК и МПО. Кроме того, взаимодействие тромбоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов с дегрануляцией последних, приводит к образованию внеклеточных ловушек (NET).

Факторы роста тромбоцитов, фактор фон Виллебранда, фибронектин, высвобождаемые тромбоцитами, а также фибрин, образованный при формировании тромбоцитарной пробки и тромба регулируют биологическую активность, включая пролиферацию, адгезию, миграцию и клеточную дифференцировку в первую очередь мезенхимальных клеток в костной и соединительной ткани [144] (рис.2).

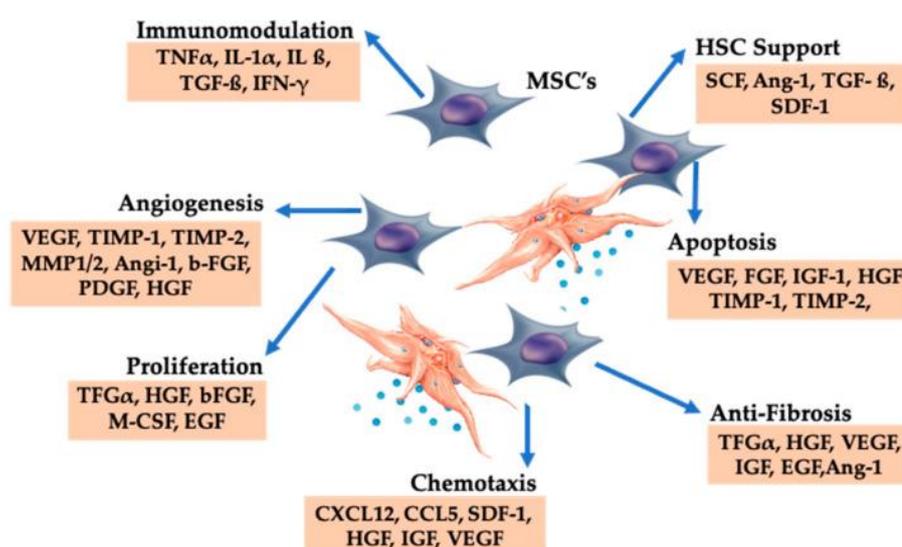


Рисунок 2. Функциональная активность биологически активных веществ тромбоцитов [37]

В совокупности результаты ясно указывают на различные роли тромбоцитов во врожденной и адаптивном иммунном ответе.

Еще одними компонентами богатой тромбоцитами плазмы являются лейкоциты [122].

Лейкоциты влияют на внутреннюю биологию хронических поражений тканей благодаря своим иммунным механизмам и механизмам защиты хозяина. Таким образом, биопрепараты PRP, содержащие лейкоциты, могут существенно способствовать иммуномодуляции, восстановлению и регенерации тканей.

### Нейтрофилы

Полиморфноядерные лейкоциты участвуют в создании плотные барьеры против вторжения патогенов в сочетании с антимикробными белками, присутствующими в тромбоцитах [143]. Важно отметить, что в нескольких моделях были обнаружены дополнительные функции нейтрофилов, что подчеркивает их роль в ангиогенезе и восстановлении тканей [115]. Однако нейтрофилы также могут индуцировать патогенные эффекты: нарушение соотношения коллагена III и I типов, усиление фиброза, снижение прочности сухожилий [161], высвобождение ими воспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ, способствующих провоспалительным и катаболическим эффектам при воздействии на ткани [103].

### Лимфоциты

В PRP Т- и В-лимфоциты более концентрированы, чем любые другие лейкоциты. Они играют важную роль в клеточно-опосредованном цитотоксическом адаптивном иммунитете [35]. Кроме того, цитокины Т-лимфоцитов (IFN- $\gamma$  и IL-4) усиливают поляризацию макрофагов [81]. Вейратер и др. (2014) продемонстрировали, что обычные Т-лимфоциты косвенно способствуют заживлению тканей на мышинной модели, модулируя дифференцировку моноцитов и макрофагов.

Белые кровяные тельца также модулируют опосредованные В-лимфоцитами адаптивные ответы на микробные патогены. Точно установлено, что CD40L на активированных CD4 Т-клетках запускает CD40 В-клеток, обеспечивая второй сигнал, необходимый для Т-зависимой активации В-лимфоцитов, последующего переключения изотипа, дифференцировки и пролиферации В-клеток [136].

#### Моноциты

Могут функционировать либо как эффекторные клетки, либо как предшественники макрофагов (МФ) [98]. Во время перехода моноцитов к МФ продуцируются определенные фенотипы МФ [57]. В последнее десятилетие была разработана модель, описывающая сложный механизм активации МФ как поляризацию в сторону двух противоположных состояний: МФ фенотип 1 (МФ1, классическая активация) и МФ фенотип 2 (МФ2, альтернативная активация) [159]. МФ1 характеризуется секрецией воспалительных цитокинов (IFN- $\gamma$ ) и продукцией оксида азота, что приводит к эффективному механизму уничтожения патогенов. Фенотип МФ1 также продуцирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов (FGF). Фенотип МФ2 состоит из противовоспалительных клеток с высокой способностью к фагоцитозу. МФ2 продуцирует компоненты внеклеточного матрикса, ангиогенные и хемотаксические факторы и IL-10. В дополнение к защите от патогенов МФ2 может ослаблять воспалительную реакцию и способствовать восстановлению тканей. Примечательно, что МФ2 подразделяется *in vitro* на МФ2а, МФ2b и МФ2 в зависимости от стимула [57]. Трансляция этих подтипов *in vivo* затруднена, поскольку ткани могут содержать смешанные популяции МФs. Интересно, что провоспалительный МФ1 может переключаться на МФ2, способствующий восстановлению, на основе локальной передачи сигналов из окружающей среды и уровней IL-4. Исходя из этих данных, разумно предположить, что препараты PRP, содержащие высокую концентрацию моноцитов и МФ, вероятно, способствуют лучшему восстановлению тканей благодаря их противовоспалительному восстановлению тканей и возможностям передачи клеточных сигналов.

После активации тромбоцитов моноциты могут мигрировать в поврежденные ткани, где они адгезируют и секретируют провоспалительные молекулы, которые могут изменять хемотаксис и модифицировать протеолитические свойства. Кроме того, тромбоциты могут модулировать эффекторные функции моноцитов, индуцируя активацию моноцитарного NF- $\kappa$ B [78], важного медиатора воспалительного ответа, а также активации и дифференцировки иммунных клеток. Тромбоциты дополнительно способствуют эндогенному окислительному взрыву в моноцитах, чтобы ускорить разрушение фагоцитированных патогенов, а высвобождение МПО опосредовано прямыми взаимодействиями тромбоцитов-моноцитов CD40L-*Mac-1* [122]. Интересно, что полученные из тромбоцитов хемокины PF4, RANTES, IL-1 $\beta$  и CXCL-12 предотвращают спонтанный апоптоз моноцитов, но способствуют их дифференцировке в макрофаги [50].

#### Дендритные клетки

Тромбоциты рекрутируют дендритные клетки [138], способными соединять врожденную и адаптивную иммунные системы, дифференцирующиеся после высвобождения тромбоцитарных факторов роста PRP [118].

Во время адаптивного иммунного ответа тромбоциты стимулируют ответ моноцитов и макрофагов с созреванием ДК и НК-клеток, что приводит к специфическим ответам Т- и В-лимфоцитов.

При исследовании противовоспалительного эффекта введения аутологичной плазмы показано снижение числа лимфоцитов периферической крови на фоне терапии пародонтита [143]. Установлено, что регенерация тканей осуществляется за счет стимуляции фибробластов и остеобластов, а также ангиогенеза [95]. При этом, результаты исследования Кобаяши с соавторами продемонстрировали, что плазмолифтинг способствует миграции и пролиферации фибробластов, но не влияет на дифференцировку остеобластов [53].

Инъекции PRP моделируют функциональную активность хондроцитов [119]. Джаи и др. использовали в исследовании фотостарения *in vitro* мышечные

дермальные фибробласты, обработанные PRP и без него, для выяснения механизмов противодействия PGF в этой модели. Группа PRP продемонстрировала прямое влияние на внеклеточный матрикс, увеличение количества коллагена I типа и снижение синтеза металлопротеиназы, что свидетельствует о том, что PRP может противодействовать старению клеток, в том числе при дегенеративных нарушениях MSK [120].

В другом исследовании PRP использовали в стареющих стволовых клетках костного мозга, полученных от старых мышей. Было установлено, что PRP способен восстанавливать некоторые функции стволовых клеток после старения, такие как пролиферация клеток и образование колоний, при этом восстанавливая маркеры, связанные со старением клеток.

Таким образом, в воспалительной реакции и деструкции тканей пародонта принимают участие и врожденные, и адаптивные системы иммунитета. При этом, при хроническом пародонтите наблюдается и дисбаланс различных звеньев иммунной системы, и дисрегуляция механизмов воспаления, и регенерации.

Безусловно, для выздоровления необходимо достижения баланса во всех защитных системах организма, а для этого необходима коррекция БАВ в очаге воспаления. Показано, что аутологичная богатая тромбоцитами плазма является наиболее доступной с точки зрения получения биологически активных веществ физиологическим путем. При этом, риск сенсбилизации, передачи болезни или генетического вмешательства отсутствует. Поэтому, PRP-терапию можно считать безопасной, без риска инфицирования, отторжения, с длительным эффектом и без известных побочных эффектов [124].

Однако существует ряд вопросов, которые еще предстоит изучить, и на которые необходимо получить ответы:

- бактериальная инвазия тканей является ли инициатором или следствием заболевания?
- какое звено иммунной системы изменяется в большей степени при хроническом пародонтите?

- какие морфологические и иммунологические изменения тканей пародонта происходят при лечении хронического пародонтита PRP в эксперименте?

## ГЛАВА 2

### 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.).

#### **2.1. Изучение клинических, морфологических и 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  $200,0 \pm 31,5$  г. Животные находились в условиях 12-часового цикла свет-темнота при  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  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.

Были сформированы четыре группы по 10 особей в каждой: одна контрольная группа и три опытные.

В первую опытную группу были включены животные с экспериментальным пародонтитом, не получающие терапии. Вторую группу составили крысы с экспериментальным пародонтитом, получающие инъекции плазмы (всего 3 инъекции, через 3 суток каждая). Для инъекций плазмы предварительно у животных был 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 группы, второй и третьей опытных групп была также забрана кровь, а в пародонт были 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 новокаином в течении 7 дней [18].

Оценка состояния пародонта на предмет воспаления проводилась в баллах:

0 – здоровая десна;

1 балл – воспаление легкой степени тяжести, сопровождающееся небольшим отеком, незначительным изменением цвета и отсутствием кровотечения при зондировании;

2 балла – воспаление средней степени тяжести, проявляющееся отеком, шелушением и покраснением, а также наличием кровоточивости при зондировании;

3 балла – воспаление тяжелой степени тяжести с наличием выраженного покраснения, язв и отека пародонта, а также сильного кровотечения при зондировании.

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 течении 4 недель, заливали их в парафин и делали срезы на уровне резцов обеих челюстей, окрашивали гематоксилин-эозином и иммуногистохимически стрептавидин-биотин-пероксидазным методом [8] с использованием кроличьих моноклональных антител (SP7) (abcam, 16669, Кембридж, Великобритания) к CD 3+, CD 20+, CD 68+, S100 в разведении 1:100.

Оценка гистологической картины воспалительного процесса в пародонте также осуществлялась в баллах:

Оценка	Степень поражения
0 баллов	Отсутствуют признаки воспаления
1 балл	Отмечается лишь незначительная гиперплазия десневого эпителия и воспалительная клеточная инфильтрация.
2 балла	Присутствует легкая гиперплазия десневого эпителия, отек, воспалительная клеточная инфильтрация, небольшое нарушение пародонтальной связки.
3 балла	Регистрируются эрозии и изъязвления десневого эпителия, умеренная инфильтрация тканей пародонта воспалительными клетками.
4 балла	Наблюдаются эрозии и изъязвления десневого эпителия, сильная воспалительная реакция.

При морфологическом исследовании гомогенатов тканей пародонта определяли размер эндотелиоцитов (в микронах).

Концентрацию 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.

## **2.2. Изучение клинических, морфологических и иммунологических показателей у больных с хроническим пародонтитом**

Исследование проводилось с февраля 2021 года по февраль 2022 на базе ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (г.Чита).

Под наблюдением находилось 60 пациентов с диагнозом «хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести» с отсутствующей тяжелой соматической патологией, в возрасте 35 лет (32,5; 40,0).

В группу сравнения были включены 20 человек в возрасте 38 (34,3; 44,0) лет с отсутствием воспалительных заболеваний в полости рта, сопоставимые с основной группой по полу, возрасту, национальной принадлежности, наличию вредных привычек ( $p=0,261$ ) (разрешение Локального этического комитета при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России № 107 от 27.01.2021). Длительность заболевания составляла 5,2 (4,2; 6,2) лет. Всем больным проводилась местная противовоспалительная терапия и санация пародонтальных карманов, коррекция окклюзионных контактов, кюретаж.

20 случайно выбранным пациентам проводили инъекции аутоплазмы. Для проведения плазмолифтинга получали аутоплазму больного, обогащенную тромбоцитами. Забор крови осуществляли в специализированные пробирки Plasmolifting™, кровь центрифугировали при 1300 об./мин в течение 10 мин. Супернатант вводили инсулиновой иглой в область зубодесневых сосочков по 0,1-0,2 мл, в область переходной складки по 0,3-0,5 мл. Процедура каждому пациенту 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.

**2.2.1. 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 C., 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. В результате рентгенологического обследования признаков деструкции костной ткани у лиц контрольной группы выявлено не было. На

рентгенограммах пациентов, страдающих хроническим пародонтитом, определялась неравномерная резорбция межальвеолярных перегородок до 1/2 длины корня зуба с образованием костных карманов, нарушение целостности кортикальной пластинки. Измерения рентгенологической плотности костной ткани проводились в единицах Г. Хаунсфилда (НУ).

**2.2.2. 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 затем, 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 [12]. Осадок, содержащий микровезикулы, перемешивали и окрашивали комбинацией моноклональных антител. Пробы для проведения изотипического контроля готовили, используя антитела типа IgG<sub>1</sub>. 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).

**2.2.3. Определение биологически активных веществ в ротовой жидкости.**

Концентрацию матриксных металлопротеиназ (ММР) MMP-2, MMP-9, миелопероксидазы (МРО), кальпротектина (MRP<sub>g8/14</sub>), липокалин-2 (NGAL), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), остеопонтина, цистатин С в ротовой жидкости определяли, используя наборы для мультиплексного анализа Human Vascular Inflammation Panel 1 (Biolegend, США) с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Ротовую жидкость для проведения анализа не разводили.

Уровень эндотелина-1 в ротовой жидкости проводили ИФА методом с использованием набора Endotelin (1-21) фирмы «Biomedica» (Австрия).

#### **2.2.4. Статистическая обработка полученных данных**

Статистическая обработка данных проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа Крускал-Уолисса. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го процентилей). Достоверность различий между группами (p) оценивали при помощи попарных сравнений Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера. Статистически достоверными считались данные при количественной характеристике случайностей (p-значение) не более 0,05. Корреляционный анализ проведен по методу Спирмена. Однако, корреляционный анализ не может отразить в полной мере всю картину перекрестных взаимосвязей, поэтому нами был также применён метод многофакторного анализа. Для создания математической модели использовался биномиальный регрессионный анализ (логистическая регрессия).

## Глава 3

### СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. Клиническая оценка состояния пародонта у лиц, страдающих хроническим пародонтитом

Частота встречаемости воспалительных заболеваний пародонта на амбулаторно-поликлиническом приеме составила более 75%, из них распространенность хронического пародонтита – 63,2 %. Он с одинаковой частотой встречался у лиц обоего пола и различного социального положения, однако его распространенность увеличивалась с возрастом.

Длительность заболевания составила 5,2 (4,2; 6,2) лет.

Пациенты, включенные в исследование, предъявляли жалобы, характерные для хронического пародонтита: в большинстве случаев отмечалось появление крови на зубной щетке во время чистки зубов (78,5%), болевые ощущения при ежедневных гигиенических процедурах в полости рта (57,3%). Одна пятая часть пациентов не имела жалоб.

Оценка гигиенического состояния полости рта осуществлялась с помощью индекса ИГР-У. Выявлено, что пациенты основной группы уделяют гигиене полости рта недостаточное внимание – величина индекса при первичном осмотре составила 3,02 (2,86; 3,30) баллов, против 0,38 (0,15; 0,51) балла в группе сравнения. После проведения терапии индекс снижался, однако не достиг контрольных значений и составил 1,40 (0,90; 1,90) баллов.

Результаты исследования состояния тканей пародонта обследуемых представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Показатели исследования состояния полости рта у больных основной группы, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Группа контроля N=20	Больные пародонтитом N=30	
		Первичный прием	После проведения плазмолифтинга
Индекс кровоточивости	0,00 (0,00; 0,00)	2,30 (2,10; 2,80) P1=0,00001	0,68 (0,62; 0,73) P1=0,0001 P2=0,0001
Папиллярно- маргинально- альвеолярный индекс (РМА)	0,00 (0,00; 0,00)	40,6 (30,85; 50,00) P1=0,00001	12,89 (10,21; 13,99) P1=0,00001 P2=0,0001
Рецессия десны, мм	0,00 (0,00; 0,00)	1,39 (1,26; 1,53) P1=0,00001	0,75 (0,63; 0,88) P1=0,00001 P2=0,361
Пародонтальный индекс	0,00 (0,00; 0,00)	3,50 (1,98; 3,85) P1=0,00001	2,42 (2,30; 2,50) P1=0,00001 P2=0,0001
Глубина пародонтального кармана, мм	2,00 (2,00; 3,00)	6,10 (4,40; 6,60) P1=0,00001	3,7 (3,2; 4,2) P1=0,002 P2=0,0001

*Примечание:* P1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, P2 – по сравнению с группой больных, получающих плазмлифтинг.

Объективный осмотр пациентов с хроническим пародонтитом выявил наличие гиперемии и отечности десны, присутствие пародонтальных карманов и кровоточивости при зондировании, а также нахождение мягкого зубного налета и минерализованных зубных отложений. Подвижность зубов у всех включенных в исследование была в пределах физиологической нормы. У лиц основной группы рентгенологически определялись резорбция межальвеолярных перегородок до 1/3. После проведенного лечения плазмолифтингом наблюдалось заметное купирование активности воспалительного процесса, что выразилось в уменьшении

РМА, индекса кровоточивости, рецессии десны, глубины пародонтального кармана.

### **3.2. Восстановление показателей врожденного и адаптивного звена иммунной системы у больных хроническим пародонтитом при их коррекции методом плазмолифтинга**

Полость рта представляет собой входные ворота для широкого спектра микроорганизмов. Колонизация и инфицирование слизистой оболочки зависят не только от адгезивных свойств бактерий, но и от симбиотических отношений с хозяином, зависящих от состояния иммунной системы организма. Нарушение баланса сопровождается развитием воспаления. Манифестация и прогрессирование хронического пародонтита определяются характером иммунного ответа на повреждение, влияющего в свою очередь, на сосудистые, клеточные и восстановительные реакции тканей пародонта.

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 MV у пациентов с хроническим пародонтитом возрастало более чем в 11 раз (табл. 4). Наблюдался не только количественный сдвиг MV, но и качественный – так, у здоровых лиц число MV, образованные всеми белыми кровяными тельцами составляли 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 (табл. 4). На фоне терапии снижается число микровезикул. Однако при стандартной терапии хронического пародонтита их количество уменьшается лишь на 26% ( $p=0,01$ ), а при лечении плазмолифтингом – на 85% ( $p=0,000001$ ) [11, 12].

Таблица 4 - Качественные и количественные характеристики микровезикул ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
Общее количество микровезикул в 1 мкл ротовой жидкости	1309 (981; 1683)	15240 (13017; 18611) P1=0,00001	11300 (7153; 13017) P1=0,00001 P2=0,01	2302 (1915; 3061) P1=0,0001 P2=0,0000001 P3=0,000001	X <sup>2</sup> =64,93 p<0,001
Число лейкоцитарных микровезикул (несущие CD45+) в 1 мкл	387 (331; 424)	6271 (6001; 6599) P1=0,00001	5698 (3420; 7027) P1=0,00001 P2=0,384	1256 (999; 1553) P1=0,00001 P2=0,00001 P3=0,00001	X <sup>2</sup> =63,93 p<0,001
Общее число микровезикул, имеющих маркер CD14 в 1 мкл	371 (353; 384)	4174 (2261; 4545) P1=0,00001	1324 (1110; 2049) P1=0,0001 P2=0,006	388 (383; 517) P1=0,45 P2=0,0001 P3=0,01	X <sup>2</sup> =61,43 p<0,001
Общее число микровезикул, имеющих маркер CD11b в 1 мкл	95 (77; 132)	2287 (2088; 2553) P1=0,0001	3098 (2065; 3532) P1=0,0001 P2=0,167	156 (133; 256) P1=0,001 P2=0,0001 P3=0,00001	X <sup>2</sup> =61,57 p<0,001
Общее число микровезикул, имеющих маркер CD66b в 1 мкл	267 (215; 302)	4211 (2942; 4873) P1=0,00000 1	2568 (1897; 3176) P1=0,00001 P2=0,005	299 (251; 384) P1=0,426 P2=0,000001 P3=0,000001	X <sup>2</sup> =59,64 p<0,001

Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
Число микровезикул CD11bCD66b в 1 мкл	20 (18; 28)	1115 (1081; 1162) P1=0,00001	1432 (1272; 1644) P1=0,00001 P2=0,012	38 (38; 52) P1=0,002 P2=0,00001 P3=0,00001	X <sup>2</sup> =61,97 p<0,001

*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 плазмлифтинг.

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. Как нами установлено, концентрация всех изучаемых показателей возрастала в обследуемых группах. Максимальный рост наблюдался со стороны IL 1 $\beta$ . Причем значимых отличий в группе лиц, леченных стандартной терапией не найдено, что свидетельствует о продолжающемся воспалительном процессе. При применении плазмолифтинга уровень цитокинов не приходит к контрольным показателям, однако наблюдается их значительное снижение по сравнению с результатами, полученными в группе больных, получающих стандартную терапию (табл 5).

Таблица 5 - Уровень цитокинов врожденного звена иммунной системы в ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
IL 1 $\beta$ , пг/мл	7,02 (4,61; 9,00)	282,0 (219,00; 358,00) P1=0,00001	426,20 (362,00; 513,00) P1=0,00001 P2=1,0	54,57 (32,30; 77,30) P1=0,003 P2=0,0000001 P3=0,000001	X <sup>2</sup> =67,53 p<0,001
TNF $\alpha$ , пг/мл	1,14 (1,00; 3,80)	28,01 (16,81; 54,80) P1=0,00001	20,14 (15,10; 27,12) P1=0,00001 P2=0,384	9,11 (7,11; 12,90) P1=0,00001 P2=0,004 P3=0,00001	X <sup>2</sup> =59,94 p<0,001
IL 10, пг/мл	2,08 (1,25; 2,99)	10,90 (5,70; 16,90) P1=0,00001	8,71 (7,00; 13,60) P1=0,0001 P2=0,093	3,52 (3,52; 7,00) P1=0,001 P2=0,0001 P3=0,0001	X <sup>2</sup> =50,33 p<0,001

*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 плазмалифтинг.

В качестве индикаторов агрессии клеток врожденного звена иммунной системы нами были выбраны матриксные металлопротеиназы 2 и 9, миелопероксидаза, кальпротектин, липокаина 2. Нами наблюдался их значимый рост у больных пародонтитом, не приходящий на фоне терапии к статусу контрольной группы. 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 ( $p=0,00001$ ) (табл. 6).

Таблица 6 - Концентрация факторов агрессии клеток врожденного звена иммунной системы в ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
MRP8/14, пг/мл	15,92 (9,05; 19,00)	62,40 (49,00; 102,04) P1=0,00001	50,76 (34,62; 67,90) P1=0,00001 P2=0,097	37,40 (29,03; 40,43) P1=0,0001 P2=0,0000001 P3=0,107	X <sup>2</sup> =53,67 p<0,001
NGAL, пг/мл	1,90 (1,45; 2,35)	7,91 (7,41; 8,35) P1=0,00001	5,51 (5,08; 5,95) P1=0,00001 P2=0,384	4,81 (4,35; 5,15) P1=0,00001 P2=0,001 P3=0,003	X <sup>2</sup> =66,41 p<0,001
MMP-2, пг/мл	11,00 (5,54; 14,39)	58,01 (54,90; 60,80) P1=0,00001	51,41 (47,40; 54,10) P1=0,0001 P2=0,01	11,92 (10,21; 15,20) P1=0,001 P2=0,0001 P3=0,026	X <sup>2</sup> =63,42 p<0,001
Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
MMP-9, пг/мл	0,17 (0,11; 0,22)	4,20 (3,45; 4,65) P1=0,0001	2,59 (2,05; 2,96) P1=0,0001 P2=0,001	1,91 (0,96; 2,42) P1=0,0001 P2=0,0001	X <sup>2</sup> =60,59 p<0,001

				P3=0,72	
МРО, нг/мг	28,42	58,20	56,60	49,00	X <sup>2</sup> =57,06
белка	(18,00; 33,00)	(57,20; 60,71)	(52,80; 58,00) P1=0,0001 P2=0,043	(45,30; 54,10) P1=0,0001 P2=0,001 P3=0,008	p<0,001
		P1=0,0001			

*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 плазмлифтинг.

Повышение активности слюнной МРО у больных с хроническим пародонтитом говорит об адаптивной перестройке в прооксидантной системе антимикробной защиты полости рта и ускорении реакций, приводящих к накоплению в ротовой жидкости гипохлорит-аниона. Кальпротектин, в свою очередь, связываясь с Toll-рецептором 4, RAGE, EMMPRIN, усиливает миграцию нейтрофилов [156], участвует в моделировании воспалительного процесса [39]. Липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой, также является хемоаттрактантом полиморфноядерных лейкоцитов, способствуя их созреванию, адгезии и экстравазации, а также их фагоцитарной способности [77]. Рост концентраций и MRPg8/14, и NGAL свидетельствует о повышенной миграции PMNs и интенсификации воспаления пародонта. MMP разрушают соединительнотканые структуры, образуя при этом неоантигены [121].

На фоне активации различных протеаз наблюдалось снижение концентрации цистатина С (рис. 3).

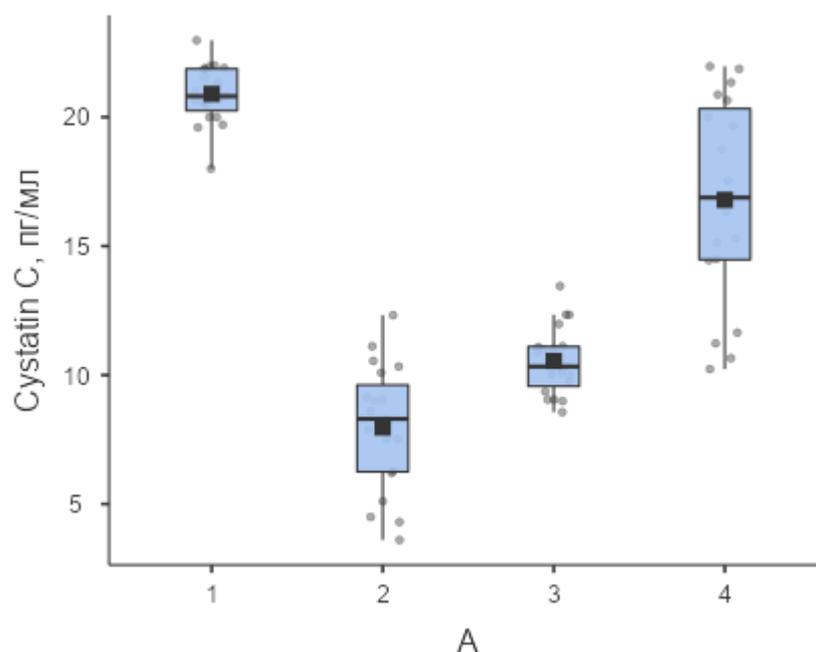


Рисунок 3. Содержание цистатина С в ротовой жидкости больных хроническим пародонтитом

*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 плазмолифтингом.

Вслед за активацией врожденной иммунной системы развивается ответ ее адаптивного звена, сопровождающийся изменением концентраций интерлейкинов. Наиболее выражено изменили свой уровень интерлейкин 2 и 17 (табл. 7).

Таблица 7 - Уровень цитокинов адаптивного звена иммунной системы в ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
IL 2, пг/мл	0,00 (0,00; 0,00)	35,90	20,52 (18,00; 25,13)	7,37 (4,39; 10,13)	$\chi^2=63,19$ $p<0,001$

		(22,20; 46,70) P1=0,00001	P1=0,00001 P2=0,015	P1=0,0001 P2=0,0000001 P3=0,000001	
IL 4, пг/мл	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00) P1=0,505	1,20 (0,00; 3,48) P1=0,009 P2=1,25	0,00 (0,00; 1,61) P1=0,03 P2=0,479 P3=0,704	X <sup>2</sup> =13,07 P=0,004
IL 8, пг/мл	1,55 (0,98; 2,11)	6,08 (5,00; 8,14) P1=0,00001	6,18 (5,05; 7,86) P1=0,0001 P2=1,0	3,01 (1,96; 4,00) P1=0,003 P2=0,0001 P3=0,0001	X <sup>2</sup> =50,95 p<0,001
IL 17, пг/мл	3,58 (1,44; 5,03)	20,20 (12,90; 38,81) P1=0,00001	18,81 (17,00; 23,90) P1=0,0001 P2=1,0	7,45 (6,56; 8,90) P1=0,0001 P2=0,0001 P3=0,0001	X <sup>2</sup> =60,66 p<0,001

*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 плазмлифтинг.

Основная функция IL-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. IL-17 является маркером функционирования Т-хелперов 17 типа, осуществляющих контроль аутоантигенов. Рост содержания IL-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 [12].

### 3.3. Резорбция костной ткани у больных хроническим пародонтитом и ее коррекция методом плазмолифтинга

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 (рис. 4).

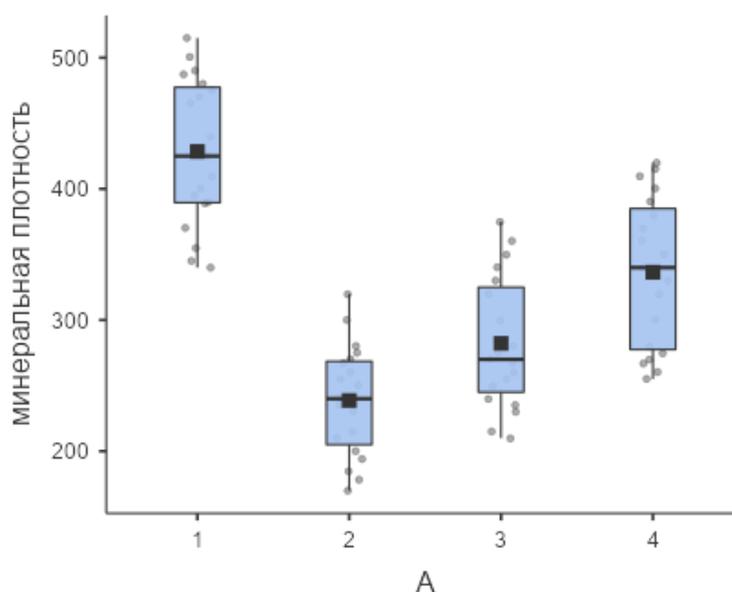


Рисунок 4. Изменение минеральной плотности костной ткани в единицах Хаунсфилда у больных хроническим пародонтитом при различных видах терапии

*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 плазмолифтингом.

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

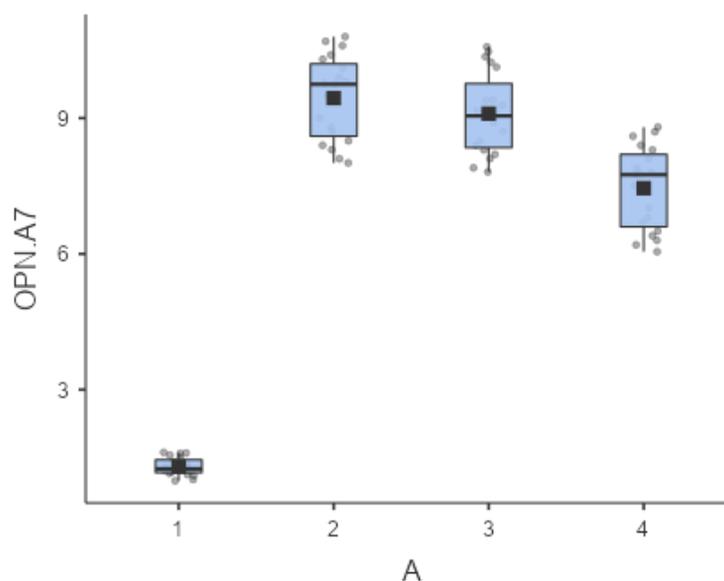


Рисунок 5. Уровень остеопонтина ротовой жидкости в пг/мл у пациентов с хроническим пародонтитом при различных видах терапии

*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 плазмолифтингом.

Нормальный обмен костной ткани зависит от организованного баланса между резорбцией кости остеокластами и формированием костной структуры остеобластами, необходимым для поддержания минерального гомеостаза [160]. Процесс контролируется множеством медиаторов, такими как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-11, ИЛ-17, ФНО- $\alpha$ , ФНО- $\beta$ , ТФР- $\beta$ , кинины, тромбин, остеопонтин, кальпротектином (CLP) и др. [56].

В нашем исследовании наблюдается превалирование уровней провоспалительных цитокинов по сравнению с противовоспалительными. Так, концентрация ИЛ-4 вообще не изменилась, и уровень ИЛ-10 вырос в 5 раз (табл.7), в то время как содержание ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-2 более чем в 30 раз (табл. 5). Показатели ИЛ-

17 также увеличился более, чем в 5 раз (табл. 7), что свидетельствует об активации Т хелперов 17 типа, активации аутоиммунных процессов и хронизации воспаления, а также об стимулировании остеокластогенеза.

Повышение уровня остеопонтинина в ротовой жидкости у больных хроническим пародонтитом можно объяснить с одной стороны, его вымыванием из пораженных тканей, а с другой – усилением его выработки иммунокомпетентными клетками, вовлеченными в воспалительный процесс.

При этом стандартная терапия не восстанавливает минеральную плотность костной ткани ( $p=0,075$ ) и не влияет на уровень остеопонтинина ( $p=0,675$ ). Применение плазмолифтинга приводит как к снижению содержания остеопонтинина ( $p=0,00001$ ), так и частичному восстановлению минеральной плотности костной ткани ( $p=0,027$ ).

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), продуцирующих 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 rareфикации [17].

### **3.4. Дисфункция эндотелия и ее коррекция методом плазмолифтинга**

Хронический пародонтит – это остеоиммунное заболевание полости рта, поражающее пародонтальный аппарат зуба, обусловленный нарушением симбиотических отношений между оральной флорой и иммунной системой хозяина [48]. Рекрутированные в очаг воспаления лейкоциты, вызывают развитие вторичной альтерации и модулируют функциональную активность

эндотелиоцитов [55]. Увеличение васкуляризации с неоангиогенезом в здоровых тканях дает преимущество в элиминации патогенов. Однако, при хроническом пародонтите аномальная васкуляризация, вероятно, усугубит воспаление пародонта, так как будет способствовать трансмиграции большего количества иммунокомпетентных клеток, притоку медиаторов воспаления и цитокинов.

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 раз. На фоне терапии плазмолифтингом уровень изучаемых веществ снижается, но превышал значения контроля в 25,2 и 6,4 раз, соответственно [14]. Эндотелин-1 синтезируется в основном эндотелиоцитами в ответ на повреждающие стимулы и сразу секретируется во внешнюю среду [3]. Эндотелин-1 классически считается мощным сосудосуживающим пептидом. Однако, в дополнение к его воздействию на гладкомышечные клетки сосудов, эта субстанция все чаще признается провоспалительным цитокином. Он вызывает агрегацию тромбоцитов и участвует в повышенной экспрессии молекул адгезии лейкоцитов, синтезе медиаторов воспаления, механизмах, способствующих сосудистой дисфункции [3, 19]. 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 % ( $p=0,04$ ) (табл. 8).

Таблица 8 - Уровень растворимых форм молекул межклеточной адгезии и эндотелина-1 у больных хроническим пародонтитом, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели	Группа контроля n=20	Больные пародонтитом			Тест Крускал-Уоллиса
		до лечения n=40	стандартная терапия n=20	лечение плазмолифтингом n=20	
ICAM-1, пг/мл	0,99	17,9	10,3	6,34	$X^2=58,46$

	(0,48; 1,27)	(15,00; 22,74) P1=0,00001	(6,93; 15,00) P1=0,00001 P2=0,002	(2,79; 10,43) P1=0,0001 P2=0,001 P3=0,05	p<0,001
VCAM-1, пг/мл	0,30 (0,21; 0,39)	11,50 (9,27; 16,31) P1=0,00001	6,66 (4,86; 8,43) P1=0,00001 P2=0,0001	7,56 (5,69; 9,27) P1=0,00001 P2=0,001 P3=0,762	X <sup>2</sup> =55,40 p<0,001
Эндоотелин-1, пг/мл	30,60 (18,00; 40,10)	51,50 (48,00; 59,10) P1=0,00001	45,21 (42,90; 49,80) P1=0,0001 P2=0,008	27,50 (10,21; 41,40) P1=0,711 P2=0,0001 P3=0,001	X <sup>2</sup> =52,54 p<0,001

*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 плазмалифтинг.

Гомеостатическая динамика полости рта постоянно меняется в зависимости от состава микрофлоры. Пероральному распространению патогенов препятствует иммунная система, которая наряду с уничтожением патогенных микроорганизмов, отвечает за восстановление поврежденных тканей. Альтерация тканей и сосудистые изменения выходят на первый план как определяющие факторы в фокусе отношений хозяин-патоген. Мы получили, что даже при достижении клинической ремиссии в тканях пародонта продолжается активный воспалительный процесс. Это подтверждается наличием корреляционных взаимосвязей. Так, папиллярно- маргинально-альвеолярный индекс имеет высокую положительную корреляцию с растворимой формой ICAM-1 ( $r=0,764$ ), VCAM-1 ( $r=0,825$ ) и эндотелином 1 ( $r=0,729$ ) [15].

Аутоплазма содержит большое количество активированных тромбоцитов, которые адгезируя к обнаженному коллагену поврежденного сосуда улучшают его

барьерную функцию, снижают тромбогенность и усиливают рост гладкомышечных клеток, окружающих эндотелий [151]. Все это приводит к нормализации функции эндотелиоцитов и проявляется снижением уровня и молекул адгезии, и эндотелина-1.

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 плазмолифтинга приводит к снижению уровней биологически активных молекул, уменьшению бактериальной нагрузки способствует клинической ремиссии патологического процесса, что может быть перспективным для дальнейших исследований в парадонтологии. На основании выше изложенного можно сделать заключение, что применение плазмолифтинга при хроническом пародонтите является патогенетически обоснованным методом терапии.

### **3.5. Индуцированный пародонтит у крыс: клиническая, гистологическая, иммунологическая характеристика**

Обследование лиц, страдающих хроническим пародонтитом, выявило нарушения в работе врожденного, и адаптивного звеньев иммунной системы. Назначение плазмолифтинга корректировало местный и общий иммунитет пациентов. Для изучения тонких механизмов развития хронического пародонтита нами был индуцирован пародонтит у экспериментальных животных.

В тканях пародонта контрольной группы животных отсутствовали и клинические и гистологические изменения (рис. 6).

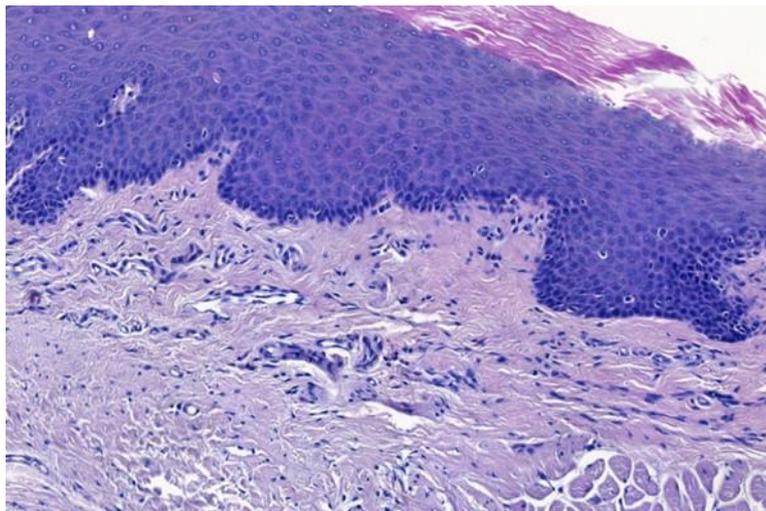


Рисунок 6. Здоровая ткань пародонта. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение 400. Фото автора.

В первые сутки индуцированного пародонтита ткани полости рта экспериментальных групп имели здоровый вид, гладкую консистенцию и светлорозовый цвет. Свободный край десны имел четкий, повторяющий цементно-эмалевое соединение соседних зубов, контур, а прикрепленная десна была прочно соединена с подлежащими структурами (рис. 7).

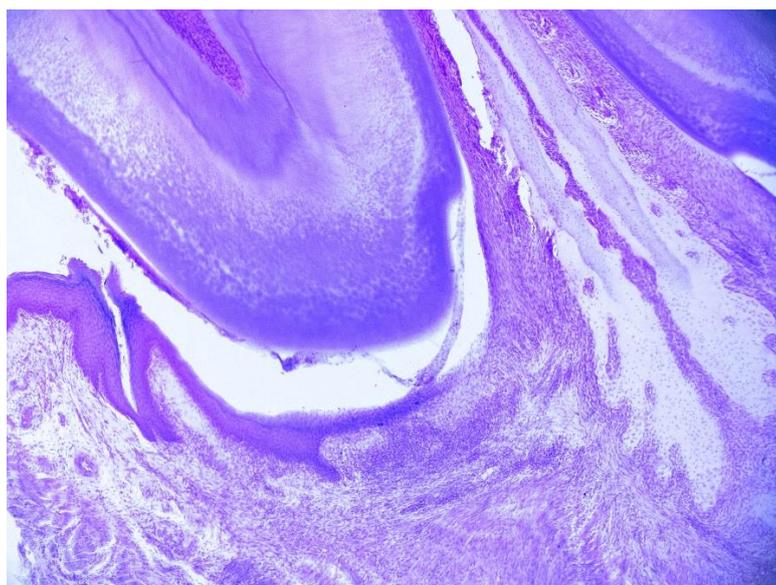


Рисунок 7. Пародонт на первые сутки эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; увеличение X400. Фото автора.

На десятые сутки в месте хронической механической травмы пародонт приобрел цианотичный оттенок, со значительным отеком в месте повреждения. Свободный край десны при этом приобрел неровные очертания, между зубами появились остатки пищи.

Гистологическая картина соответствовала клинической – отмечалось наличие пародонтального кармана, выраженная инфильтрация тканей лейкоцитами, макрофагами, фибробластами, утолщение слоя эпителия десны, разрушение периодонта (рис. 8-9) и резорбция костных балок альвеол (рис. 10-11).

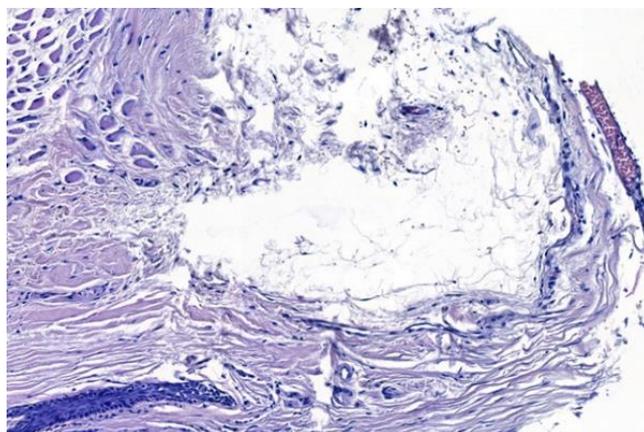


Рисунок 8. Ткань пародонта в зоне повреждения. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение 400. Фото автора.

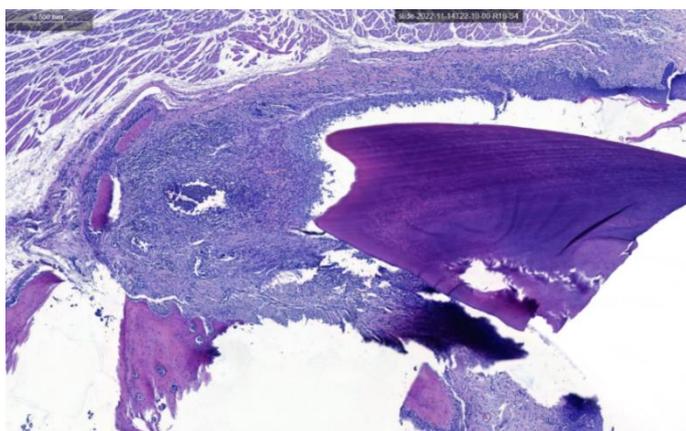


Рисунок 9. Пародонт на десятые сутки эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; увеличение X400.

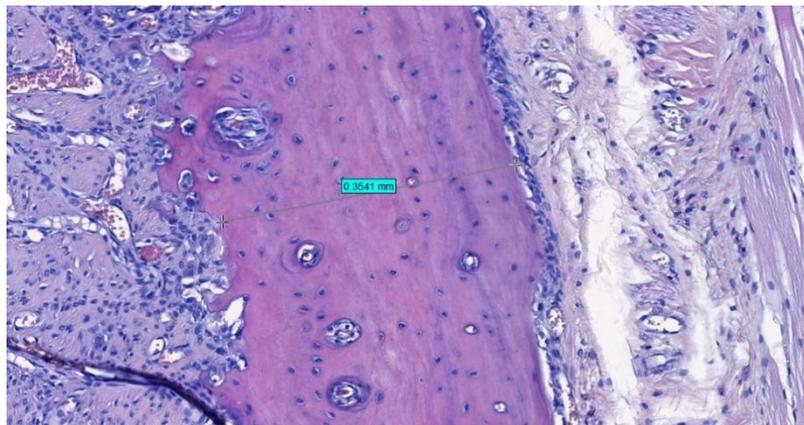


Рисунок 10. Костная балка интактного животного. Окраска гематоксилин-эозином; увеличение X400.

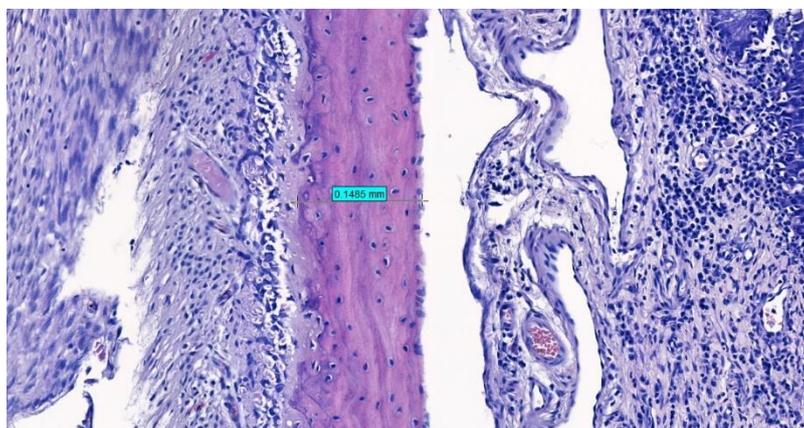


Рисунок 11. Костная балка животного с индуцированным пародонтитом на 10 день эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; увеличение X400.

Применение процедуры плазмолифтинга, а также стандартной терапии проявлялось уменьшением фибриновых наложений, санацией пародонтального кармана, формированием вторичного пародонтального прикрепления. Отмечалось ограничение зоны инфильтрации. Однако терапевтический эффект плазмолифтинга был более выраженным (табл. 9)

Таблица 9 - Оценка воспалительного процесса у крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии, (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/группы	Клиническая оценка воспалительного процесса, баллы	Подвижность зубов, баллы	Гистологическая оценка воспалительного процесса, баллы
Контрольная группа	0±0	0±0	0±0
Первая опытная группа	2,89±0,61 p1=0,016	1,82±0,20 p1=0,016	2,95±0,22 p1=0,015
Вторая опытная группа до начала терапии	2,90±0,57 p1=0,016	1,82±0,21 p1=0,016	2,97±0,20 p1=0,016
Вторая опытная группа через 10 дней от начала терапии	0,19±0,13 p1=0,011 p3=0,005	0,79±0,52 p1=0,011 p3=0,005	1,05±0,32 p1=0,01 p3=0,005
Показатели/группы	Клиническая оценка воспалительного процесса, баллы	Подвижность зубов, баллы	Гистологическая оценка воспалительного процесса, баллы
Третья опытная группа до начала терапии	2,87±0,67 p1=0,016	1,85±0,23 p1=0,016	2,31±0,21 p1=0,016
Третья опытная группа через 10 дней от начала терапии	1,88±0,22 p1=0,012 p2=0,003 p3=0,016	1,51±0,17 p1=0,013 p2= 0,008 p3=0,076	1,46±0,23 p1=0,011 p2=0,084 p3=0,007
Тест Крускал-Уоллиса	$X^2=40,1, p<0,001$	$X^2=37,1, p<0,001$	$X^2=40,7, p<0,001$

*Примечание:* p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, p2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, p3 – по сравнению с началом и окончанием терапии.

При изучении размеров эндотелиоцитов обнаружено их увеличение у животных с индуцированным пародонтитом. Причем в большей степени размеры эндотелиоцитов увеличились в капиллярах ( $p=0,002$ ) и венах ( $p=0,004$ ) с превалированием периметра клетки (табл. 10). Увеличение объема эндотелиоцита в зоне воспалительного процесса можно объяснить развитием его отека на фоне снижения притока кислорода и снижения биологического окисления [7], а также увеличением в зоне воспаления уровня гистамина. Нарушения микроциркуляции в зоне повреждения необходимы для ограничения очага воспаления [10].

При назначении терапии мы наблюдали уменьшение размеров эндотелиоцитов, с ярко выраженным эффектом при применении плазмолифтинга. Это свидетельствует о выраженном противовоспалительном эффекте введения тромбоцитарной плазмы в поврежденный пародонт.

Таблица 10 - Морфологические параметры эндотелия экспериментальных животных, Ме (25; 75)

Показатели/группы	Длина эндотелиоцита артериолы, микрон	Поперечный размер эндотелиоцита артериолы, микрон	Длина эндотелиоцита капилляра, микрон	Поперечный размер эндотелиоцита капилляра, микрон	Длина эндотелиоцита вены, микрон	Поперечный размер эндотелиоцита вены, микрон
Контрольная	0,86 (0,78; 1,01)	0,28 (0,24;0,34)	0,61 (0,52;0,73)	0,26 (0,22;0,29)	0,75 (0,61;0,84)	0,32 (0,26;0,33)
1-ая опытная группа до начала терапии	5,76 (4,90; 7,20) P1=0,0001	3,78 (3,44; 4,66) P1=0,0001	7,32 (5,95; 8,16) P1=0,0001	3,75 (3,33; 4,01) P1=0,0001	8,12 (6,62; 8,88) P1=0,0001	4,39 (3,32; 4,75) P1=0,0001
1-ая опытная группа через 10 дней от начала эксперимента	5,8 (4,81; 7,35) P1=0,0001	3,99 (3,34; 4,88) P1=0,0001	7,5 (5,63; 8,59) P1=0,0001	3,88 (3,56; 4,78) P1=0,0001	8,01 (6,52; 8,69) P1=0,0001	4,48 (3,47; 4,94) P1=0,0001
2-ая опытная группа через 10 дней от начала терапии	0,96 (0,7; 1,21) p1=0,01 p2=0,001	1,21 (0,86; 1,32) P1=0,0001p2=0,001	0,87 (0,67; 1,01) p1=0,042 p2=0,001	1,00 (0,94; 1,10) P1=0,0001p2=0,001	0,83 (0,69; 0,95) p1=1,0 p2=0,001	0,32 (0,24; 0,37) p1=1,0 p2=0,001
3-я опытная группа через 10 дней от начала терапии	5,06 (4,49; 5,68) P1=0,0001p2=0,32 p3=0,001	2,67 (2,00; 3,37) P1=0,0001p2=0,002 p3=0,001	5,34 (4,63; 6,44) P1=0,0001p2=0,001 p3=0,001	2,41 (2,10; 2,97) P1=0,0001p2=0,007 p3=0,001	4,21 (3,27; 4,98) P1=0,0001p2=0,001 p3=0,001	3,01 (2,47; 3,38) P1=0,0001p2=0,373 p3=0,001
Тест Крускал-Уоллиса	$X^2=70,0$ , $p<0,001$	$X^2=67,4$ , $p<0,001$	$X^2=68,5$ , $p<0,001$	$X^2=63,1$ , $p<0,001$	$X^2=62,0$ , $p<0,001$	$X^2=67,3$ , $p<0,001$

*Примечание:* p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, p2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, не получающих терапию, p3 – по сравнению с животными, получающих терапию плазмолифтингом.

При изучении динамики иммунокомпетентных клеток выявлено, что число макрофагов (рис. 12-14) и В-лимфоцитов (рис. 15-17) увеличилось одинаково в 8,5 раз ( $p=0,000001$ ). В то время, как количество Т-лимфоцитов (рис. 18-20) возросло лишь в 5,5 раз ( $p=0,000001$ ) (табл. 11).



Рисунок 12. Пародонт интактных животных. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 68+ позитивных клеток; увеличение X400.

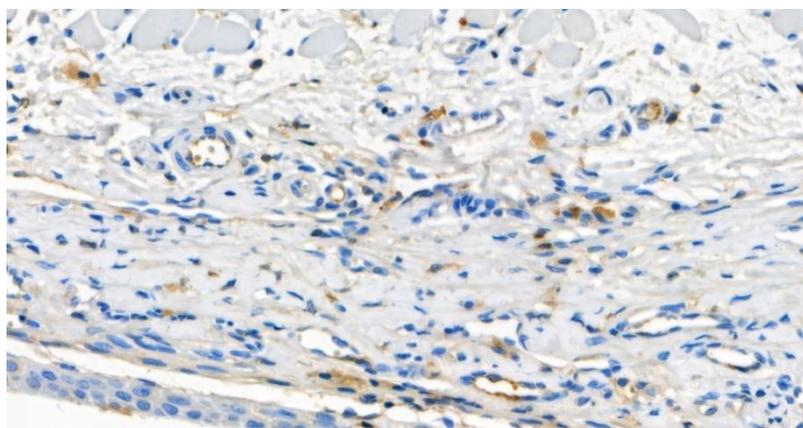


Рисунок 13. Пародонт экспериментальных животных на 10 сутки эксперимента. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 68+ позитивных клеток; увеличение X400.

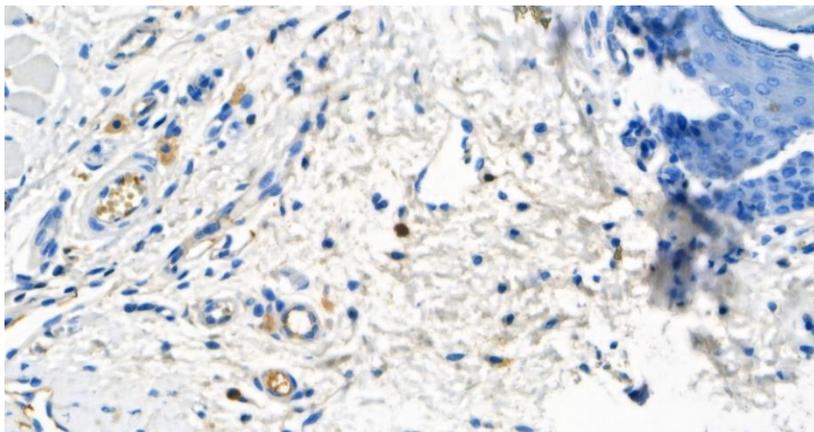


Рисунок 14. Пародонт экспериментальных животных на 10 сутки введения аутоплазмы. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 68+ позитивных клеток; увеличение X400.

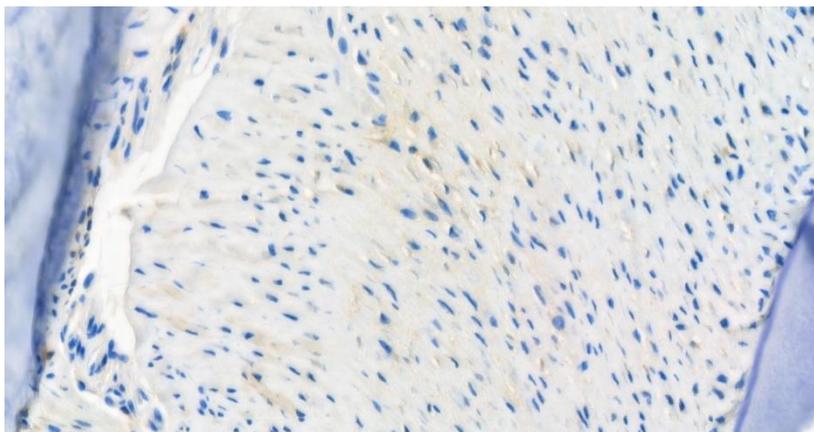


Рисунок 15. Пародонт intactных животных. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 20+ позитивных клеток; увеличение X400.

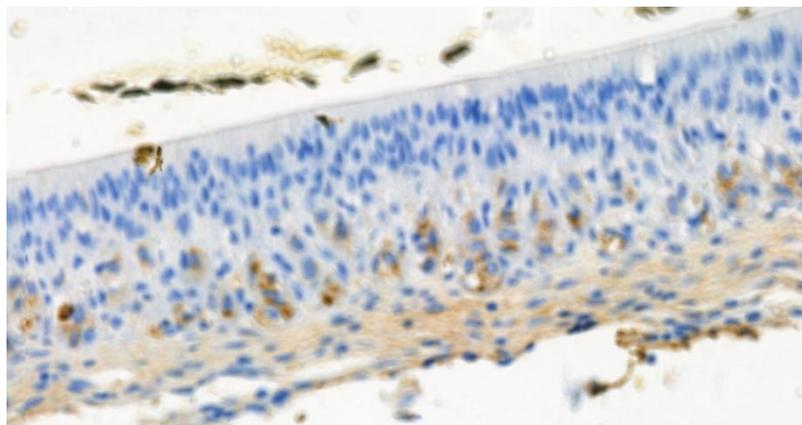


Рисунок 16. Пародонт экспериментальных животных на 10 сутки эксперимента. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 20+ позитивных клеток; увеличение X400.

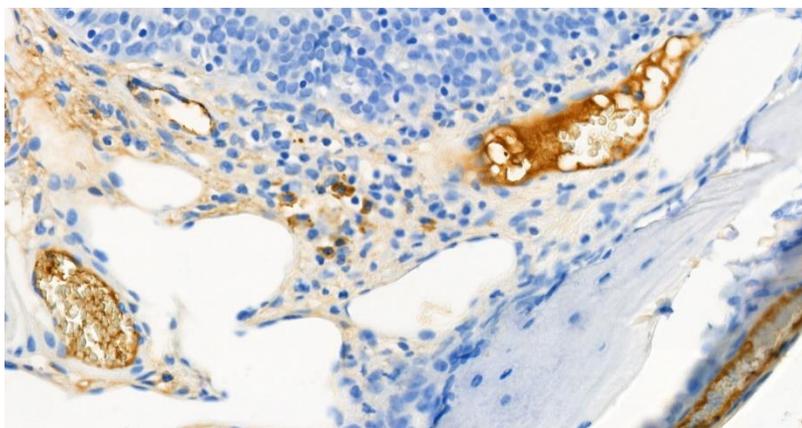


Рисунок 17. Пародонт экспериментальных животных на 10 сутки введения аутоплазмы. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 20+ позитивных клеток; увеличение X400.

Это свидетельствует о вовлеченности в патологический процесс всех звеньев иммунной системы с преобладанием гуморального звена. Применение плазмолифтинга сопровождается уменьшением числа иммунокомпетентных клеток в тканях, в большей степени со стороны Т-лимфоцитов (рис. 18-20).

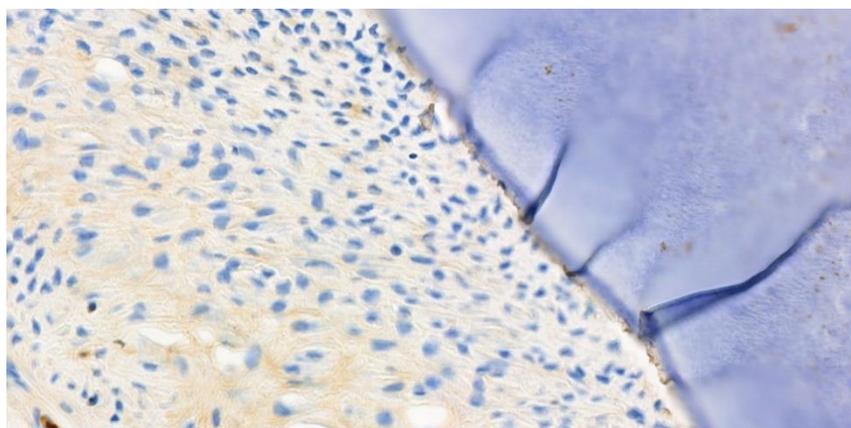


Рисунок 18. Пародонт интактных животных. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 3+ позитивных клеток; увеличение X400.

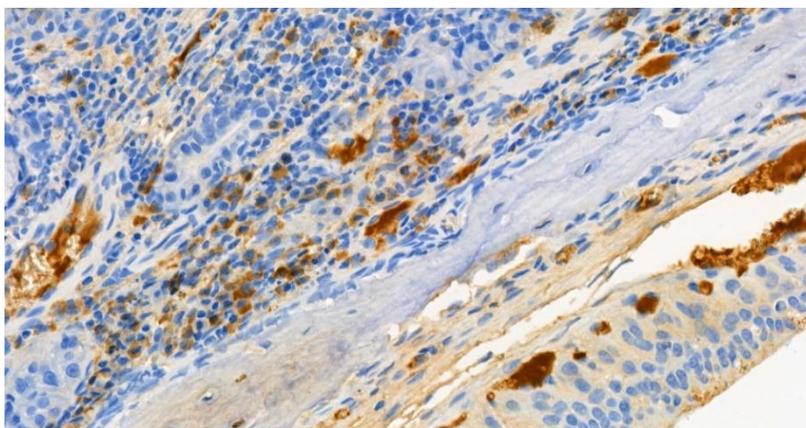


Рисунок 19. Пародонт экспериментальных животных на 10 сутки эксперимента. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 3+ позитивных клеток; увеличение X400.

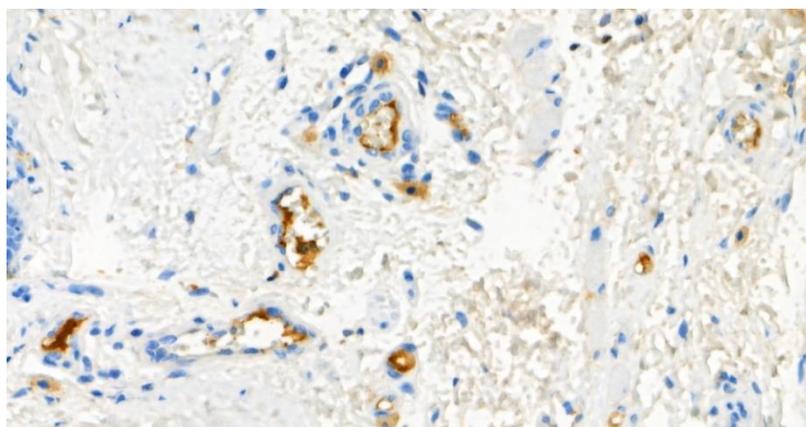


Рисунок 20. Пародонт экспериментальных животных на 10 сутки введения аутоплазмы. Окраска стрептавидин-биотин-пероксидазным методом CD 3+ позитивных клеток; увеличение X400.

Таблица 11 - Иммуногистохимические параметры пародонта экспериментальных животных, Ме (25; 75)

Показатели/группы	CD 3+, % от общего числа лимфоцитов в поле зрения	CD 20+, % от общего числа лимфоцитов в поле зрения	CD 68+, % от общего числа мононуклеаров в поле зрения
Контрольная группа	6,0 (4,8; 8,0)	4,0 (3,0; 6,3)	5,5 (4,0; 7,0)
Первая опытная группа до начала терапии	33,5 (27,5; 41,5) P1=0,0001	34,5 (28,8; 45,0) P1=0,0001	47,0 (35,8; 57,5) P1=0,0001
Первая опытная группа через 10 дней от начала эксперимента	35,4 (27,1; 43,9) P1=0,0001	36,5 (27,1; 47,5) P1=0,0001	49,9 (33,6; 58,7) P1=0,0001
Вторая опытная группа через 10 дней от начала терапии	9,5 (8,0; 11,3) P1=0,0001 P3=0,00001	12,0 (7,7; 13,3)	12,0 (9,8; 12,3)
Третья опытная группа через 10 дней от начала терапии	16,5 (13,0; 20,0)	17,0 (13,0; 20,0)	17,5 (14,8; 23,0)
Тест Крускал-Уоллиса	$X^2=68,4$ , $p<0,001$	$X^2=68,3$ , $p<0,001$	$X^2=63,6$ , $p<0,001$

*Примечание:* p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, p2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, p3 – по сравнению с началом и окончанием терапии.

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 [19]. 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 $\beta$  [20].

Для оценки изменения системной воспалительной реакции нами проводилась оценка уровней про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови (табл. 13) и гомогенатах ткани (табл. 14).

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.

Таблица 13 - Оценка уровней цитокинов в сыворотке крови у крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии, Ме (25; 75)

Показатели/ группы	IL 1 $\beta$ , пг/мл	IL 6, пг/мл	IL 10, пг/мл	IL 17 $\alpha$ , пг/мл	TNF $\alpha$ , пг/мл	IFN $\gamma$ , пг/мл
Контрольная группа	23,8 (22,8;24,7)	191,0 (167,0;204, 4)	37,8 (34,9 39,1)	25,2 (21,3;35,9)	11,9 (11,2;12,5)	11,1 (10,3;11,6)
Первая опытная группа	1460,0 (1005,0;34 88,1) P1=0,0001	2208,1 (1451,1;28 51,1) P1=0,0001	2010,0 (806,0; 4492,0) P1=0,0001	1205,1 (898,1; 1883,2) P1=0,0001	1948,2 (1733,0; 2677,1) P1=0,0001	1862,4 (1589,6; 2310,6) P1=0,0001
Первая опытная группа через 10 дней от начала эксперимент а	1399,0 (986,3;348 8,1) P1=0,0001 P3=0,9	2111,1 (1352,1;29 81,1) P1=0,0001 P3=0,89	1987,0 (815,01 3297,0) P1=0,0001 P3=0,88	1186,1 (908,1; 2133,4) P1=0,0001 P3=0,9	1762,6 (1234,0; 2985,1) P1=0,0001 P3=0,8	1635,4 (1432,6; 2516,7) P1=0,0001 P3=0,8
Вторая опытная группа через 10 дней от начала терапии	57,3 (38,8;67,2) P1=0,0001 P3=0,0001	244,0 (225,0; 250,0) P1=0,0001 P3=0,0001	40,7 (39,4;50,9) P1=0,01 P3=0,0001	49,2 (43,6;51,4) P1=0,0001 P3=0,0001	41,8 (29,9;51,0) P1=0,0001 P3=0,0001	38,9 (26,3;50,8) P1=0,0001 P3=0,0001
Третья опытная группа через 10 дней от	223,0 (169,0; 307,0) P1=0,0001	257,0 (242,0; 279,0) P1=0,0001	115,0 (99,0; 157,0) P1=0,014	202,0 (179,0; 230,0) P1=0,0001	173 (104,0; 237,0) P1=0,0001	137,0 (73,7; 182,0) P1=0,0001

начала терапии	P2=0,0001 P3=0,001	P2=0,064 P3=0,002	P2=0,0001 P3=0,02	P2=0,0001 P3=0,003	P2=0,0001 P3=0,001	P2=0,0001 P3=0,001
Тест Крускал- Уоллиса	X <sup>2</sup> =72,3 p<0,001	X <sup>2</sup> =68,2, p<0,001	X <sup>2</sup> =68,4 p<0,001	X <sup>2</sup> =72,0 p<0,001	X <sup>2</sup> =74,0 p<0,001	X <sup>2</sup> =72,0 p<0,001

*Примечание:* p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, p2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, p3 – по сравнению с началом и окончанием терапии.

Таблица 14 - Оценка уровней цитокинов в гомогенатах ткани крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии, Ме (25; 75)

Показатели/ группы	IL 1 β, пг/мл	IL 6, пг/мл	IL 10, пг/мл	IL 17α, пг/мл	TNFα, пг/мл	IFN γ, пг/мл
Контрольная группа	22,4 (21,2;23,7)	207,0 (199,0;214,0)	38,0 (34,9 40,2)	41,4 (36,8;46,0)	11,7 (11,0;12,1)	10,6 (8,62;11,6)
Первая опытная группа до начала терапии	9870,0 (5710,0;15 800,0) P1=0,0001	7920,1 (5230,0; 11610,0) P1=0,0001	12670,0 (7770,0; 34400,0) P1=0,0001	3110,0 (2430,0; 4170,0) P1=0,0001	5600,0 (4930,0; 6020,0) P1=0,0001	2080,0 (1480,0; 6020,0) P1=0,0001
Первая опытная группа через 10 дней от начала эксперимент а	10090,0 (5891,0;14 832,0) P1=0,0001 P3=0,9	8090,1 (5671,0;12038 ,1) P1=0,0001 P3=0,89	13000,0 (8190,1 29976,0) P1=0,0001 P3=0,88	3120,1 (2514,1; 4356,0) P1=0,0001 P3=0,9	5680,2 (5092,2; 6212,2) P1=0,0001 P3=0,8	2100,3 (1345,3; 7103,3) P1=0,0001 P3=0,8
Вторая опытная группа через 10 дней от начала терапии	67,0 (52,4;96,0) P1=0,0001 P3=0,0001	239,0 (232,0; 257,0) P1=0,0001 P3=0,0001	40,5 (38,5;46,7) P1=0,04 P3=0,0001	49,8 (47,2;52,4) P1=0,0001 P3=0,0001	46,3 (34,6;62,8) P1=0,0001 P3=0,0001	32,3 (24,7;49,3) P1=0,0001 P3=0,0001
Третья опытная группа через 10 дней от начала терапии	215,0 (154,0; 342,0) P1=0,0001 P2=0,0001 P3=0,001	261,0 (251,0; 409,0) P1=0,0001 P2=0,064 P3=0,005	156,0 (107,0; 153,0) P1=0,037 P2=0,0001 P3=0,02	202,0 (182,0; 237,0) P1=0,0001 P2=0,0001 P3=0,003	174,0 (92,1; 257,0) P1=0,0001 P2=0,0001 P3=0,001	130,0 (77,9; 145,0) P1=0,0001 P2=0,0001 P3=0,001
Тест Крускал- Уоллиса	X <sup>2</sup> =73,7 p<0,001	X <sup>2</sup> =65,8 p<0,001	X <sup>2</sup> =68,2 p<0,001	X <sup>2</sup> =68,7 p<0,001	X <sup>2</sup> =71,6 p<0,001	X <sup>2</sup> =69,9 p<0,001

*Примечание:* p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, p2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, p3 – по сравнению с началом и окончанием терапии.

Содержание IL-6 также в большей степени возросло в сыворотке крови – в 11,6 раз ( $p=0,0001$ ) 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 наблюдается снижение концентрации изучаемых веществ одновременно и в сыворотке крови и гомогенатах тканей. Однако ни один вид терапии не сопровождается достижением статуса интактных животных, что свидетельствует о наличии не разрешившегося воспалительного процесса [6, 13, 16].

### **3.6. Аутоиммунный компонент в патогенезе хронического пародонтита при применении факторного анализа**

Патогенез хронического пародонтита до конца не изучен. Ученые с одной стороны не могут остановиться на этиологическом факторе заболевания: дисбиоз, генетическая предрасположенность, старость, или накопление случайных событий, с другой – не могут обосновать первичность и вторичность полученных изменений в патогенезе.

При проведении корреляционного анализа показателей животных с индуцированным хроническим пародонтитом, нами обнаружены корреляционные взаимоотношения разной силы (от сильной, до слабой) между изучаемыми цитокинами у животных с индуцированным пародонтитом, как в сыворотке крови, так и гомогенатах тканей (табл. 15), что не удивительно. Известно, что с одной

стороны, цитокины синтезируются одними и теми же клетками, а с другой стороны – они влияют на выработку друг друга.

Все параметры воспаления (и клинические, и морфологические, и биохимические) также имели корреляционные взаимосвязи различной силы с изучаемыми биологически активными веществами, что подтверждает вовлеченность иммунной системы в воспалительный процесс.

Однако, так как картину перекрестных взаимосвязей корреляционный анализ не может отразить в полной мере, нами был применён метод многофакторного анализа. Для создания математической модели использовался биноминальный регрессионный анализ (логистическая регрессия), предметом прогнозирования которой, являлось развитие аутоиммунного процесса. Исследуемая выборка составила 40 экспериментальных животных, у 30 из которых был индуцирован хронический пародонтит, другие 10 крыс составили контрольную группу.

Таблица 15 – Корреляционные взаимоотношения между содержанием цитокинов в крови и гомогенатах тканей

	IL1b крови	IL 6 крови	IL 10 крови	IL 17a крови	TNFa крови	IFNg крови	IL 1b тканей	IL 6 тканей	IL 10 тканей	IL 17a ткани	TNFa ткани	IFNg ткани
IL 1b крови		0.643 ***	0.549 ***	0.486 ***	0.599 ***	0.744 ***	0.801 ***	0.359**	0.639 ***	0.314*	0.679 ***	0.446 ***
IL 6 крови	0.643 ***		0.635 ***	0.583 ***	0.681 ***	0.795 ***	0.653 ***	0.311 *	0.585 ***	0.508 ***	0.726 ***	0.437 ***
IL 10 крови	0.549 ***	0.635 ***		0.500 ***	0.681 ***	0.689 ***	0.594 ***	0.498 ***	0.301 *			0.427 ***
IL 17a крови	0.486 ***		0.596 ***		0.805 ***	0.805 ***	0.432 ***	0.683 ***		0.663 ***		0.594 ***
TNFa крови	0.599 ***	0.681 ***	0.681 ***	0.805 ***		0.822 ***	0.584 ***	0.617 ***	0.603 ***	0.782 ***	0.911 ***	0.525 ***
IFNg крови	0.744 ***	0.795 ***	0.689 ***	0.805 ***	0.822 ***		0.653 ***		0.548 ***	0.542 ***	0.790 ***	0.519 ***
	IL 1b крови	IL 6 крови	IL 10 крови	IL 17a крови	TNFa крови	IFNg крови	IL 1b тканей	IL 6 тканей	IL 10 тканей	IL 17a ткани	TNFa ткани	IFNg ткани
IL 1b тканей	0.801 ***	0.653 ***	0.594 ***	0.432 ***	0.584 ***	0.653 ***		0.266 *	0.567***		0.648***	0.342 **
IL 6 тканей	0.359**	0.311 *	0.498 ***	0.683 ***	0.617 ***	0.649 ***	0.266*			0.560***	0.567***	0.507 ***
IL 10 тканей	0.639 ***	0.585 ***	0.301 *		0.603 ***	0.548 ***	0.567***			0.378**	0.688***	0.369 **

IL 17a ткани	0.314* ***	0.508 ***	0.500 ***	0.663 ***	0.782 ***	0.542 ***		0.560 ***	0.378**		0.685***	0.511***
TNFa ткани	0.679 ***	0.726 ***	0.339**		0.911 ***	0.790 ***	0.648***	0.567***		0.685***		0.593***
IFNg ткани	0.446 ***	0.437 ***	0.427 ***	0.594 ***		0.525 ***	0.342 **	0.507 ***	0.369 **	0.511***	0.593***	

Примечание: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

В модели вероятности развития пародонтита в качестве переменных факторов использовались: морфологические и гистологические маркеры воспаления, уровни интерлейкинов в сыворотке крови и гомогенатах тканей, концентрация эндотелина, иммуногистохимические маркеры Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов. В результате пошаговой регрессии было подобран оптимальный набор независимых предикторов, сочетание которых объясняет 70% всей выборки ( $R^2=0,695$ ) (табл. 16).

Таблица 16 - Показатели соответствия модели вероятности развития пародонтита

Модель	Девиантность	AIC	$R^2_{McF}$
1	23.3	29.3	0.695

В качестве прогностических коэффициентов были отобраны такие переменные как: CD20 и CD 68.

Первый ( $\beta=-0,389$ ;  $p=0,024$ ) и второй ( $\beta=-0,54$ ;  $p=0,017$ ) предикторы имели высокий бета коэффициент и уровень значимости, поэтому подлежат дальнейшему использованию в построении математической модели (табл. 17).

Таблица 17 - Коэффициенты модели

Предиктор	Вес	SE	Z	p	Отношение шансов
Константа	12,942	4,707	2,75	=0,006	417301,607
Число лимфоцитов, несущих маркер CD 20 в 1 поле зрения среза ткани.	-0,389	0,173	-2,25	=0,024	0,678
Число мононуклеаров, несущих маркер CD 68 в 1 поле зрения среза ткани.	-0,54	0,227	-2,38	=0,017	0,374

Далее, нами из полученных данных было построено уравнение множественной регрессии (Формула №1)

$$A = 12,942 + (-0,389 * CD20) + (-0,54 * CD68)$$

Формула №1. Уравнение множественной линейной регрессии аутоиммунного компонента в патогенезе и индуцированного хронического пародонтита у крыс.

A – аутоиммунный компонент; CD20 – Число лимфоцитов, несущих маркер CD 20 в 1 поле зрения среза ткани пародонта; CD68 – число мононуклеаров, несущих маркер CD 68 в 1 поле зрения среза ткани пародонта.

Для подсчета вероятности развития аутоиммунного процесса использовалось уравнение логит-преобразования, результатом которого и будет являться значение, располагающееся в интервале от 0 до 1 (Формула №2).

$$P = \frac{1}{1 + e^A}$$

Формула №2

Логит-преобразование

P - вероятность того, что разовьётся аутоиммунный компонент; e - основание натуральных логарифмов 2,7; A – уравнение множественной линейной регрессии.

После создания формулы нами была произведена проверка эффективности модели и найдено пороговое значение вероятности.

Значение отсечки является числом, расположенным в месте перекреста максимального числа истинно положительных (90%) и истинно отрицательных значений (85%). (Таб №18) Для данной модели оно составило 0,41. (Рис. 21). Следовательно, если значение P будет больше значения отсечки, то можно сказать, что у животного с индуцированными хроническим пародонтитом разовьётся аутоиммунный компонент воспалительного процесса

Таблица 18 - Классификационная таблица

Наблюдаемый	Предсказанный		% Правильных
	Есть аутоиммунный компонент	Отсутствует аутоиммунный компонент	
Есть аутоиммунный компонент	36	4	90
Отсутствует аутоиммунный компонент	3	17	85,0

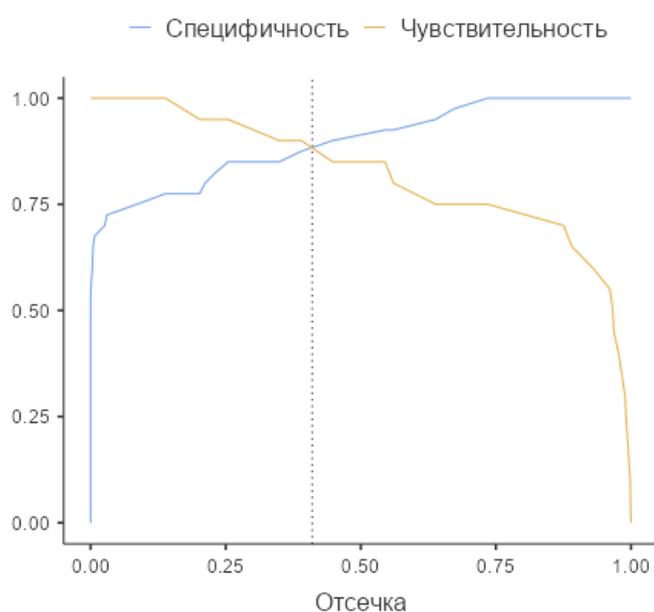


Рисунок 21. График отсечки

При рассмотрении графика и результатов ROC-анализа, видно, что численный показатель площади под кривой ( $AUC=0,969$ ) занимает практически 97%, от общей площади истинно положительных и истинно отрицательных значений можно сказать, что построенная модель имеет высокий уровень прогнозирования. (табл. 19), (рис. 22).

Таблица 19 - Прогностические меры развития аутоиммунного процесса

Точность	Специфичность	Чувствительность	AUC
0,883	0,9	0,850	0,969

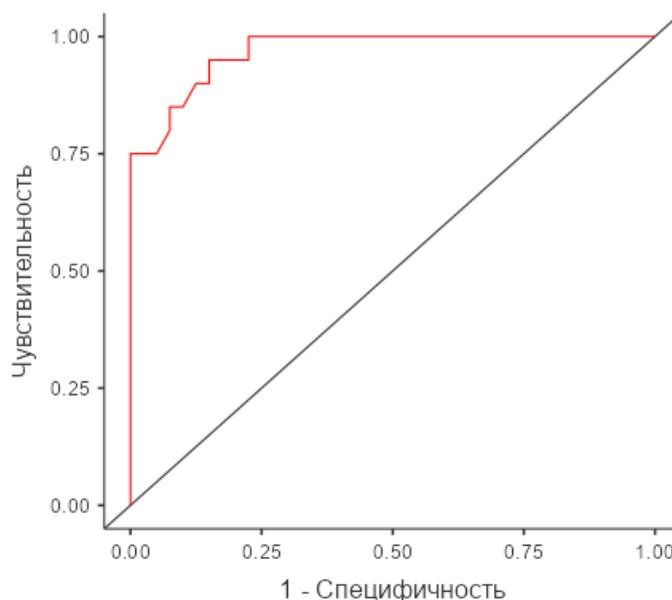


Рисунок 22. ROC-кривая прогнозирования аутоиммунного компонента

Построенная нами модель аутоиммунного компонента в патогенезе хронического воспаления у экспериментальных животных подтверждает общеизвестные механизмы участия и врожденного звена иммунной системы и В-лимфоцитов в формировании иммунного ответа против собственных тканей [3, 9].

На следующем этапе нашей работы мы провели корреляционный анализ, между изучаемыми показателями у лиц, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом (данные стоматологического осмотра, уровни БАВ слюны обследуемых: кальпротектина, нейтрофильной желатиназы, металлопротеиназ 2 и 9, остеопонтина, миелопероксидазы, ICAM-1, VCAM-1, цистатиона, эндотелиина, количественные и качественные характеристики микровезикул, содержание интерлейкинов IL1b, IL2, IL4, IL8, IL10, IL17, TNFa.

Уровни интерлейкинов, также как и у животных имели корреляционные взаимоотношения разной силы друг с другом. Однако, кроме этого наблюдались взаимосвязи с клиническими проявлениями хронического генерализованного пародонтита (табл. 20).

Таблица 20 - Корреляционные взаимоотношения некоторых цитокинов и клинических проявлений хронического генерализованного пародонтита

	Индекс кровотоковости	PMA	Рецессия десны	Минеральная плотность	Глубина пародонтального кармана
IL1b	0.604 ***	0.723 ***	0.759 ***	-0.273*	0.632 ***
IL2		0.566 ***	0.750 ***		
IL4		0.758 ***	0.785 ***		
IL8	0.874 ***	0.873 ***	0.835 ***	-0.295 *	
IL10					0.731 ***
IL17		0.687 ***			0.591 ***
TNFa		0.807 ***	0.752 ***		

Примечание: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Маркеры воспаления также коррелировали с клинической картиной повреждения пародонта, что свидетельствует о вовлеченности всех изучаемых показателей в патогенез изучаемого патологического процесса.

Для выделения факторов, ответственных за аутоиммунный компонент у лиц, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом нами в качестве переменных данных использовались клинические маркеры воспаления, интерлейкины 1b, 2, 4, 8, 10, 17, TNFa, численная и фенотипическая характеристика микровезикул, концентрация кальпротектина, нейтрофильной желатиназы, миелопероксидаз 2 и 9, миелопероксидазы, молекул адгезии, цистатина С.

В результате пошаговой регрессии было подобран оптимальный набор независимых предикторов, сочетание которых объясняет 60% всей выборки ( $R^2=0,592$ ) (Табл. 21).

Таблица 21 - Показатели соответствия модели

Модель	Девиантность	AIC	$R^2_{McF}$
1	29.6	35.6	0.592

В качестве прогностических коэффициентов были отобраны такие переменные, как уровень интерлейкина 17 и эндотелина 1 и использовались в построении математической модели (табл. 22).

Таблица 22 – Коэффициенты математической модели

Предиктор	Вес	SE	Z	p	Отношение шансов
Константа	-4,61	1,51	-3,07	0,002	0,00988
Интерлейкин 17, пг/мл	0,56	0,28	2,01	0,045	1,74814
Эндотелин, пг/мл	0,0044	0,0015	2,98	0,003	1,004337

Далее, нами из полученных данных было построено уравнение множественной регрессии (Формула №3)

$$A = -4,61 + (0,56 * \text{ИЛ17}) + (0,0044 * \text{эндотелина 1})$$

Формула №3. Уравнение множественной линейной регрессии

аутоиммунного компонента в патогенезе и индуцированного хронического пародонтита у крыс.

A – аутоиммунный компонент; ИЛ17 – концентрация ИЛ17 в пг/мл;  
Эндотелин – уровень эндотелина 1 в пг/мл.

Для подсчета вероятности развития аутоиммунного процесса использовалось уравнение логит-преобразования, результатом которого и будет являться значение, располагающееся в интервале от 0 до 1. (Формула №4)

$$P = \frac{1}{1 + e^A}$$

Формула №4

Логит-преобразование

P - вероятность того, что разовьётся аутоиммунный компонент; e - основание натуральных логарифмов 2,7; A – уравнение множественной линейной регрессии.

После создания формулы нами была произведена проверка эффективности модели и найдено пороговое значение вероятности.

Значение отсечки является числом, расположенным в месте перекреста максимального числа истинно положительных (89,5%) и истинно отрицательных значений (86,8%), (табл. 23). Для данной модели оно составило 0,75. (Рис 23). Следовательно, если значение Р будет больше значения отсечки, то можно сказать, что у животного с индуцированных хроническим пародонтитом разовьется аутоиммунный компонент воспалительного процесса

Таблица 23 - Классификационная таблица

Наблюдаемый	Предсказанный		% Правильных
	Есть аутоиммунный компонент	Отсутствует аутоиммунный компонент	
Есть аутоиммунный компонент	36	4	90
Отсутствует аутоиммунный компонент	3	17	85,0

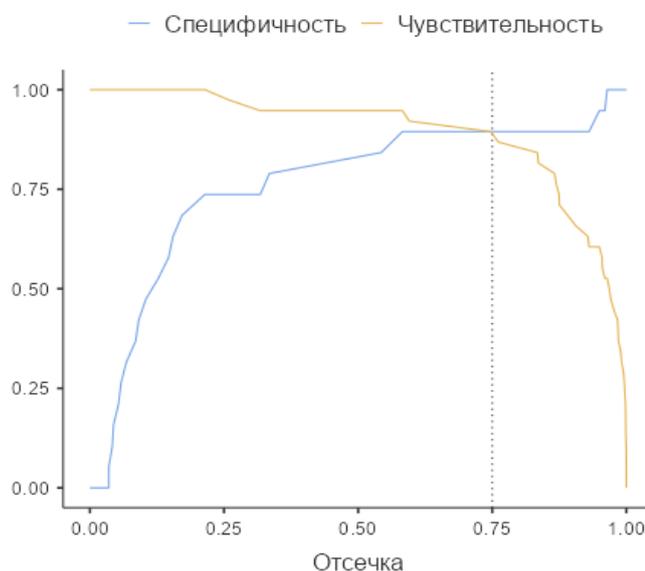


Рисунок 23. График отсечки

При рассмотрении графика и результатов ROC-анализа, видно, что численный показатель площади под кривой (AUC=0,946) занимает практически 95%, от общей площади истинно положительных и истинно отрицательных

значений можно сказать, что построенная модель имеет высокий уровень прогнозирования. (табл. 24), (рис. 24).

Таблица 24 - Прогностические меры появления аутоиммунного компонента

Точность	Специфичность	Чувствительность	AUC
0,877	0,895	0,868	0,946

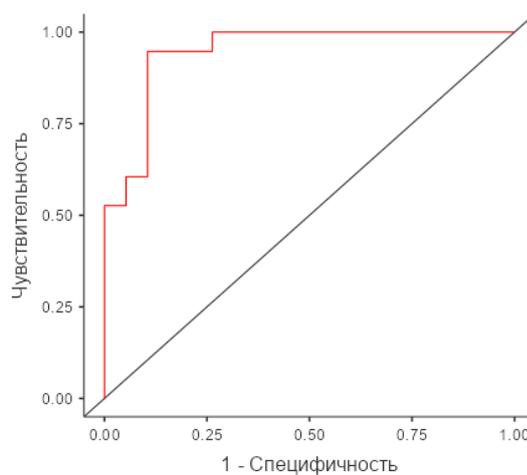


Рисунок 24. ROC-кривая роли интерлейкина 17 в патогенезе аутоиммунного компонента

Построенная нами модель в патогенезе хронического генерализованного пародонтита подтверждает роль интерлейкина 17 в патогенезе аутоиммунного компонента. Включение в модель уровня эндотелина 1 свидетельствует о вкладе развивающейся в процессе хронизации пародонтита дисфункции эндотелия в механизм признания иммунной системой измененных структур тканей пародонта антигенами.

Таким образом, сформированная нами высококачественная прогностическая модель, направленная на выявление на ранних этапах заболевания аутоиммунного компонента, позволит провести коррекцию терапии, в частности, путем применения плазмолифтинга.

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Ткани полости рта постоянно подвергаются различным видам повреждений – механическим (при приеме пищи), микробиологическим (при проникновении патогенных бактерий, грибов, вирусов). В здоровых тканях полости рта существует баланс между симбиотическими бактериями и клетками врожденного иммунитета, в первую очередь, нейтрофилами. Когда этот баланс нарушается, развивается воспалительный процесс [45]. При недостаточном количестве нейтрофилов, снижается сдерживающий эффект иммунной системы ротовой полости. Однако, если ответ нейтрофилов будет чрезмерным, это также (за счет увеличения вторичной альтерации) приведет к воспалительному процессу в пародонте, проявляющемуся развитием хронического воспалительного заболевания – пародонтита, сопровождающемуся разрушением опорных тканей зуба, пародонта, альвеолярной кости, и, как следствие этого, потерей зубов [135].

В ходе развития хронического генерализованного пародонтита, циркулирующие нейтрофилы быстро мобилизуются в очаг инфекции или воспаления путем трансмиграции [55]. Процесс начинается с экспрессии рецепторов адгезии (E- и P-селектинов) эндотелиальными клетками. Затем нейтрофилы проактивированные хемокинами полиморфноядерные лейкоциты, прочно адгезируются к эндотелиоцитам [140] и мигрируют в зону повреждения для борьбы с флогогеном. Показано, что число полиморфноядерных лейкоцитов возрастает в ротовой жидкости при развитии заболевания [80]. Число микровезикул, обеспечивающих информационные потоки в тканях, является показателем активности клеток. Общее число MV у больных с хроническим генерализованным пародонтитом в нашем исследовании возрастало более чем в 11 раз ( $p=0,000001$ ), причем, в большей степени, за счет MV лейкоцитарного происхождения. Так, у здоровых лиц MV, образованные всеми белыми кровяными тельцами составляли 29,5%, у лиц с воспалением пародонта – 41,15%, при этом более трети из них имели CD-маркеры нейтрофилов. При этом, 56% из них имели

фенотип CD11b, что свидетельствует о формировании прочной адгезии нейтрофилов с эндотелиоцитами. Нами обнаружена сильная положительная связь между общим числом микровезикул и величиной пародонтального индекса ( $r=0,675$ ), глубиной пародонтального кармана ( $r=0,763$ ), индексом кровоточивости ( $r=0,704$ ); количеством нейтрофильных микровезикул и показателями здоровья пародонта –  $r=0,816$ ,  $r=0,837$ ,  $r=0,776$  соответственно. Объективные показатели состояния полости рта исследуемой группы имели также сильную положительную связь с факторами агрессии полиморфноядерных лейкоцитов. Так, например, содержание металлопротеиназы 2 соотносилось с глубиной пародонтального кармана как  $r=0,754$ , индексом кровоточивости -  $r=0,811$ , РМА -  $r=0,675$ ; показатель МРО с теми же параметрами как  $r=0,721$ ,  $r=0,689$ ,  $r=0,799$  соответственно; концентрация кальпротектина –  $r=0,654$ ,  $r=0,743$ ,  $r=0,901$  соответственно.

Нейтрофилы являются наиболее распространенными лейкоцитами в пародонтальных карманах, десневой щели и воспаленных тканях пародонта. В здоровых тканях пародонта нейтрофилы в основном находятся в соединительном эпителии и десневой жидкости и необходимы для поддержания симбиоза между бактериальным сообществом и макроорганизмом [65].

Fuchs A.L. и др. в 2016 году обнаружили три подгруппы нейтрофилов полости рта: покоящиеся/наивные циркуляторные, паравоспалительные нейтрофилы и провоспалительные нейтрофилы [57]. Они сообщили, что паравоспалительные нейтрофилы являются основным подмножеством в здоровой полости рта, а провоспалительные нейтрофилы – у пациентов с пародонтитом. По сравнению с паравоспалительными нейтрофилами провоспалительные полиморфноядерные лейкоциты демонстрируют повышенный уровень фагоцитоза, дегрануляции, продукции активных форм кислорода и образования внеклеточных ловушек. Нейтрофилы при пародонтите также имеют более высокую цитокиновую реактивность [84]. Повышение активности лейкоцитов полости рта физиологически оправдано, так как бактерии используют различные механизмы ускользания от иммунного ответа (ингибирование рекрутирования, избегание

фагоцитоза, противодействие эффектам системы комплимента, нейтрализация IG A и сопротивление продуктам дегрануляции нейтрофилов, в том числе и активным формам кислорода). Подводя итог, можно предположить следующую патогенетическую роль нейтрофилов в патогенезе хронического пародонтита. Реакцией организма на повреждение является активация врожденного звена иммунной системы, где одним из основных защитников является нейтрофил. В ходе развития воспалительного процесса происходит увеличение числа нейтрофилов и интенсивности их миграции в десневую щель. Высвобождение ими протеолитических и коллагенолитических ферментов, а также АФК в тканях пародонта приводит к потере волокон маргинальной периодонтальной связки, апикальной миграции соединительного эпителия, что способствует апикальному распространению бактериальной биопленки вдоль поверхности корня и еще большему воспалению.

Полиморфноядерные лейкоциты посредством образования микровезикул, несущих с одной стороны факторы агрессии, направленные на элиминацию патогена, с другой – хемокины, индуцирующие рекрутирование клеток и врожденного и адаптивного звена иммунитета вызывают увеличение вторичной альтерации, пролонгацию воспаления и модулируют функциональную активность эндотелиоцитов [55]. Физиологическая функция эндотелия сосудов заключается в динамическом секретировании тромботических субстанций, антикоагулянтов и факторов фибринолиза, вазоактивных веществ, факторов роста и т.д., а также хемоаттрактантов лейкоцитов, молекул адгезии воспалительных клеток, цитокинов и активных форм кислорода [1].

Считается, что заболевание пародонта начинается с инвазии оральных бактерий в ткань десны. Пептидогликаны бактерий в биопленках ротовой полости, липотейхоевая кислота, липополисахариды проникают в более глубокие ткани за счет ряда деструктивных протеаз как микробного происхождения, так и клеток ротовой полости, разрушающих эпителиальную поверхность и периодонтальную связку. Эти ферменты способствуют углублению зубного кармана и повреждению

эндотелия субэпителиальной сосудистой сети [152]. Так, например, *Porphyromonas gingivalis* связываясь с эндотелиоцитами увеличивает экспрессию генов различных хемокинов (например, CXCL8, CCL2), молекул адгезии (CD54, CD62E, PECAM-1), ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, активирует калликреин-кининовую систему [140].

Увеличение васкуляризации с неоангиогенезом в здоровых тканях дает преимущество в элиминации патогенов. Однако при хроническом пародонтите аномальная васкуляризация, вероятно, усугубит воспаление пародонта, так как будет способствовать трансмиграции большего количества иммунокомпетентных клеток, притоку медиаторов воспаления и цитокинов.

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

Молекулы клеточной адгезии (CAM) представляют собой белки клеточной поверхности, участвующие в связывании клеток друг с другом, с эндотелиальными клетками или с внеклеточным матриксом. VCAM-1 (CD106) – преимущественно экспрессируется на мембране эндотелиальных клеток. Однако, при тяжелом или хроническом воспалении он также может экспрессироваться на поверхности других клеток, включая тканевые макрофаги, дендритные клетки, фибробласты костного мозга, миоциты, ооциты, клетки Купфера, клетки Сертоли и раковые клетки [Sharma R., 2017].

Растворимая молекула межклеточной адгезии-1 (sICAM-1) представляет собой циркулирующую форму ICAM-1, которая конститутивно экспрессируется или индуцируется на клеточной поверхности различных тканей. Она служит контррецептором для антигена, ассоциированного с функцией лимфоцитов (LFA-1). Взаимодействие между ICAM-1, присутствующими на эндотелиальных клетках, способствует адгезии лейкоцитов и миграции их через эндотелий, в то время как его растворимая форма блокирует данный процесс [97]. Предполагают два механизма образования растворимых форм молекул адгезии – протеолитическое

отщепление молекулы [130], характеризующее экспрессию ICAM-1 на клетках и транскрипция матричной РНК, кодирующей их образование [101].

Нами выявлено увеличение концентрации растворимой формы VCAM-1 в ротовой жидкости в 38,3 раза, а ICAM-1 – в 18,1 раз. На фоне терапии плазмолифтингом уровень изучаемых веществ снижается, но превышал значения контроля в 25,2 и 6,4 раз, соответственно. Высокие уровни растворимых форм молекул адгезии свидетельствуют об активно текущем процессе воспаления, несмотря на клинически достижимое состояние ремиссии.

На следующем этапе работы мы оценивали уровень развившейся дисфункции эндотелия по концентрации эндотелина-1. Он синтезируется в основном эндотелиоцитами в ответ на повреждающие стимулы и сразу секретируется во внешнюю среду [3]. Эндотелин-1 классически считается мощным сосудосуживающим пептидом. Однако, в дополнение к его воздействию на гладкомышечные клетки сосудов, эта субстанция все чаще признается провоспалительным цитокином. Он вызывает агрегацию тромбоцитов и участвует в повышенной экспрессии молекул адгезии лейкоцитов, синтезе медиаторов воспаления, механизмах, способствующих сосудистой дисфункции [1]. 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 % ( $p=0,04$ ).

Мы получили, что папиллярно- маргинально-альвеолярный индекс имел высокую положительную корреляцию с растворимой формой ICAM-1 ( $r=0,764$ ), VCAM-1 ( $r=0,825$ ) и эндотелином 1 ( $r=0,729$ ).

В ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом наблюдался рост концентраций интерлейкинов, за исключением IL-4. Максимальный рост уровней цитокинов отмечен со стороны IL-1 $\beta$  – более чем в 40 раз ( $p=0,000001$ ), IL-2 – более чем в 30 раз ( $p=0,00001$ ), минимальный – у IL-8. Его содержание возросло в 3,9 раз ( $p=0,00002$ ). При этом уровень остеопонтина возрастал в 7,5 раз ( $p=0,0002$ ) Наблюдался рост кальпротектина в 3,9 раз

( $p=0,00005$ ), металлопротеиназ 2 (в 24,7 раз ( $p=0,0000001$ )) и 9 (в 5,3 раза ( $p=0,0002$ )) и снижение концентрации цистатина С практически в 3 раза ( $p=0,00001$ ).

Зубодесневая борозда защищает подлежащую альвеолярную кость от микробов, обитающих в зубном налете [23] путем непрерывного транспорта жидкости и лейкоцитов в нее. Хроническая патологическая стимуляция биопленкой зубного налета тканей пародонта приводит к чрезмерной продукции медиаторов воспаления лейкоцитами, дендритными и эпителиальными клетками, фибробластами, в частности интерлейкинов, протеаз, матриксных металлопротеиназ, кальпротектина и др. Большинство этих цитокинов оказывают катаболическое действие на сбалансированные процессы ремоделирования тканей [49].

Потеря костной массы, обусловленная воспалительной реакцией, зависит от двух факторов: количества растворимого медиатора и его расположения относительно кости – концентрация медиаторов воспаления в тканях пародонта должна быть достаточно высокой, чтобы активировать механизмы резорбции кости. Кроме этого, эти медиаторы должны находиться вблизи альвеолярной кости для стимуляции резорбции. Накопление достаточных концентраций медиаторов воспаления, зависит от синтеза и секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, ФНО-  $\alpha$ , кинины, тромбин и хемокины, изменяющих уровень экспрессии RANKL на поверхности остеобластов. Основным продуцентом RANKL являются Т хелперы 17 типа. Однако важно не увеличение экспрессии RANKL, а соотношением RANKL и остеопротегерина (OPG), растворимого рецептора-ловушки для RANKL [108]. Превалирование экспрессии RANKL по сравнению с OPG, приводит к тому, что свободный RANKL связывается с рецепторами на преостеокластах, способствуя остеокластогенезу и последующей резорбции кости [69].

Напротив, экспрессия противовоспалительных цитокинов, таких как IL-4, IL-10 и IL-13, снижает резорбцию кости [56].

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 ( $p=0,0001$ ), в то время как содержание IL-1 $\beta$  и IL-2 более чем в 30 раз ( $p=0,0001$ ). Показатели IL-17 также увеличился более, чем в 5 раз ( $p=0,0001$ ), что свидетельствует об активации Т хелперов 17 типа, активации аутоиммунных процессов и хронизации воспаления, а также об стимулировании остеокластогенеза.

В результате коллагеновые волокна периодонтальной связки необратимо отслаиваются от поверхности корня, что приводит к расширению пародонтального кармана и облегчает дальнейшее апикальное расширение поддесневых биопленок. Воспалительный инфильтрат распространяется вглубь пародонта, вызывая провоспалительные паракринные сигнальные эффекты, нарушающие регуляцию процессов костного ремоделирования, опосредованное остеокластами-osteoblastами.

Так, кальпротектин усиливает продукцию фагоцитами TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, способствует экспрессии MMP2, MMP3, MMP9 и MMP13, активирует на полиморфноядерных лейкоцитах и моноцитах CD11b/CD18, что повышает адгезивную активность клеток, способствует дифференцировке остеокластов [62].

Кроме этого, в условиях воспаления макрофаги приобретают общие черты с остеокластами [141], превращаясь в так называемых «предшественников покоящихся остеокластов с остановленным клеточным циклом». Клетки экспрессируют с высоким уровнем RANKL, низким – CD115 (M-CSF -1, рецептор M-CSF) и очень низким – маркеры моноцитов/макрофагов F4/80/Emr1 и CD11b, имеют низкую фагоцитарную активность и имеют маркеры остеокластов (карбоангидразу II, MMP-9, тартрат-резистентную кислую фосфатазу) и рецептор трансферрина.

В нашем исследовании уровень CLP слюны у больных хроническим пародонтитом увеличился практически в 4 раза ( $p=0,0001$ ). Возрос уровень металлопротеиназ 2 и 9, которые также вносят свой вклад в деструкцию костной

ткани, разрушая денатурированный коллаген. Повышенную ферментативную активность поврежденных тканей модулируют цистатион С, являющийся ингибитором протеаз. Поэтому, зарегистрированное нами, снижение его концентрации является свидетельством включения адаптивных механизмов, ограничивающих вторичную альтерацию. Однако, высокий уровень металлопротеиназ 2 и 9 указывает на недостаточность этих механизмов.

Повышение уровня остеопонтинина в ротовой жидкости можно объяснить с одной стороны, его вымыванием из пораженных тканей, а с другой – усилением его выработки иммунокомпетентными клетками, вовлеченными в воспалительный процесс.

Таким образом, можно предположить следующий механизм потери костной ткани у больных хроническим пародонтитом: неразрешающееся воспаление пародонта характеризуется провоспалительной петлей, поддерживаемой нейтрофилами и воспалительными моноцитами/макрофагами. Резидентные макрофаги и классические дендритные клетки действуют как профессиональные антигенпрезентирующие клетки, инициирующие воспаление как при попадании бактериальных антигенов в ткани, так и запуске аутоиммунных процессов. Цитокины, в первую очередь, макрофагального происхождения, в том числе и металлопротеиназы, активируют Т хелперы (Th17 и Th1), продуцирующих 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 редификации.

Сосудистые, клеточные, восстановительные реакции тканей пародонта на повреждение зависят в первую очередь от характера иммунного ответа на повреждение [8]. Оценить характер иммунного ответа позволяет уровень цитокинов, число иммунокомпетентных клеток в тканях. Поэтому на следующем этапе нашей работы нами была получена модель индуцированного пародонтита у крыс. Показатели биологически активных веществ в сыворотке крови и

гомогенатах тканей у интактных животных совпадали. При развитии патологического процесса уровень изучаемых веществ значимо рос, причем в тканях он превышал значения сыворотки крови:  $\text{TNF}\alpha$  – в 163 ( $p=0,0001$ ) и 479 ( $p=0,0001$ ) раз,  $\text{IFN}\gamma$  – в 167 ( $p=0,0001$ ) и 200 раз ( $p=0,0001$ ),  $\text{IL}\ 1\beta$  – в 61 ( $p=0,0001$ ) и 440 раз ( $p=0,0001$ ),  $\text{IL}\ 10$  – в 53 ( $p=0,00001$ ) и 330 ( $p=0,0001$ ),  $\text{IL}\ 17\alpha$  – в 47 ( $p=0,0001$ ) и 75 раз ( $p=0,001$ ) соответственно. Содержание  $\text{IL}\ 6$  также в большей степени возросло в сыворотке крови – в 11,6 раз ( $p=0,0001$ ) 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. При изучении динамики иммунокомпетентных клеток выявлено, что число макрофагов и В-лимфоцитов увеличилось одинаково в 8,5 раз ( $p=0,000001$ ). В то время, как количество Т-лимфоцитов возросло лишь в 5,5 раз ( $p=0,000001$ ). Это свидетельствует о вовлеченности в патологический процесс всех звеньев иммунной системы с преобладанием гуморального звена.

Показано, что активированные Т-хелперы ( $\text{Th}1$ ,  $\text{Th}2$  и  $\text{Th}17$ ) могут продуцировать различные провоспалительные цитокины, такие как  $\text{IL}-1\beta$ ,  $\text{IL}-25$  и  $\text{IL}-17\alpha$ , которые влияя на дендритные клетки, нейтрофилы и В-лимфоциты, повышают их функцию.  $\text{IL}\ 17\alpha$ , ответственен не только за активацию аутоиммунных процессов, но и за резорбцию костной ткани [19]. 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 $\beta$  [42].

Потеря альвеолярной кости является отличительной чертой прогрессирования пародонтита и ее предотвращение является ключевой клинической проблемой в лечении заболеваний пародонта.

Так как хронический воспалительный процесс, его агрессивное течение обусловлены извращенной иммунологической реакцией необходимым компонентом в составе комплексного пародонтологического лечения многие авторы называют коррекцию местного и общего иммунитета у больных хроническим пародонтитом [10]. Основная цель нехирургического лечения его состоит не только в достижении длительного контроля над воспалительным процессом, а и восстановление тканей пародонта, за счет формирования нового соединительнотканного прикрепления [2].

Knighton D.R. и соавторы в 1986 г. показали эффективность тромбоцитарной массы для лечения труднозаживающих кожных язв [43]. Это легло в основу лечения плазмой, содержащей тромбоциты (PRP).

Hudgens J.L. с соавторами в 2016 году продемонстрировали, что в богатой тромбоцитами плазме из 34 проанализированных ими белков, играющих роль в процессе воспаления, 26 имели значительно более высокий уровень, включая CCL2, CCL20, CXCL5, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL10, PDGF-AA и TNF $\alpha$  [119]. Luo S. с соавторами (2017) убедительно продемонстрировали, что введение в зону воспаления тромбоцитов, уменьшает воспалительный процесс [134]. Известно, что число тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме может превышать 3 000 000 в 1 мкл, при этом их количество в периферической крови составляет в среднем 550 тысяч в 1 мкл [149]. Белые кровяные тельца в системном воспалительном процессе выступают как посредники между сосудистой системой, гемостазом и иммунной системой, снижая его степень выраженности.

Однако, кроме тромбоцитов, плазма содержит и лейкоциты, и огромное количество биологически активных веществ, в том числе и факторов роста,

регулирующих пролиферацию, адгезию, миграцию и клеточную дифференцировку некоторых клеток пародонта [46].

Выяснение механизмов, ответственных за восстановление иммунного ответа при проведении плазмолифтинга у больных, страдающих хроническим пародонтитом, относится к первоочередной задаче, так как позволит профилировать и раннее развитие атеросклероза, и ревматоидного артрита, и других патологических процессов, имеющих сходное с пародонтитом основное звено патогенеза.

На фоне проводимой терапии у экспериментальных животных наблюдалось снижение концентрации изучаемых веществ одновременно и в сыворотке крови и гомогенатах тканей. Однако ни один вид терапии не сопровождался достижением цифр интактных животных, что свидетельствует о наличии не разрешившегося воспалительного процесса. Более выраженное снижение уровней цитокинов отмечено при лечении экспериментальных животных методом плазмолифтинга (рис. 25).

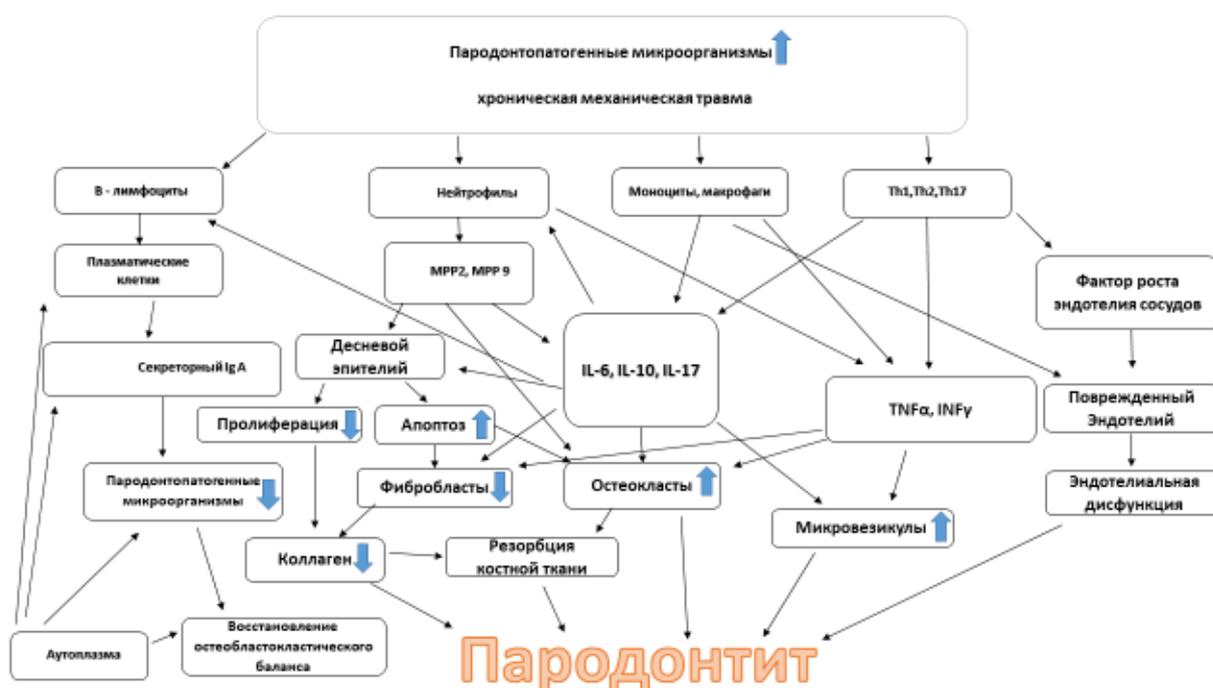


Рис. Схема патогенеза хронического пародонтита и коррекция его звеньев аутоплазмой [14,15].

## 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 выраженное 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 остеопонтана в ротовой жидкости. Стандартная терапия не восстанавливает минеральную плотность костной ткани и не влияет на уровень остеопонтана. Применение плазмолифтинга приводит к снижению содержания остеопонтана и частичному восстановлению минеральной плотности костной ткани.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Требуется проведение дополнительных исследований взаимодействия аутоплазмы с другими биологически активными иммунными веществами, а также патогенетический и терапевтический потенциал их комбинации. Выявить и обосновать механизмы ведущего звена патогенеза хронического пародонтита, с целью изучения влияния БАВ на активность остеобластокластического баланса в пародонтальных тканях и дальнейших перспектив развития пародонтологического лечения стоматологических больных.

### Список сокращений

АФК	Активные формы кислорода
БАВ	Биологически активные вещества
ДК	Дендритные клетки
МНФ	Мононуклеарные фагоциты
МПО	Миелопероксидаза
МФ	Макрофаги
ММП	Матриксные металлопротеиназы
M1	Классически активированные макрофаги
M2	Альтернативно активированные макрофаги
NET	Нейтрофильные внеклеточные ловушки
ПМЯЛ	Нейтрофилы
APC	Профессиональные антигенпрезентирующие клетки
IL	Интерлейкины
IFN- $\gamma$	Интерферон- $\gamma$
MV	Микровезикулы
PDGF	Фактор роста тромбоцитов
TGF- $\beta$	Трансформирующий фактор роста
IGF-I	Инсулиноподобный фактор роста
PRP	Аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами
GCF	Жидкость десневой борозды
Th	T хелперы
TIMPs	Ингибиторы металлопротеиназ
TNF	Фактор некроза опухоли
RANKL	Связанный с мембраной рецептор-активатор лиганда ядерного фактора каппа-B
TGF- $\beta$ 1	Трансформирующий фактор роста бета 1
RANKL	Активатор кВ-лиганда рецептора ядерного фактора
OPG	Остеопротегерин
OPN	Остеопонтин
PRP	Лечение плазмой, содержащей тромбоциты; плазмолифтинг
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов
FGF	Фактор роста фибробластов

## Список литературы

1. Дорофиев Н.Н. Роль сосудистого эндотелия в организме и универсальные механизмы изменения его активности (обзор литературы) / Н.Н. Дорофиев. – DOI 10.12737/article\_5b1a0351210298.18315210 // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2018. – № 68. – С. 107-116.
2. Изучение влияния богатой тромбоцитами аутоплазмы на иммунный статус полости рта пациентов с несъемными зубными протезами / Ю.С. Шишкова, О.И. Филимонова, А.С. Емелина [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 577-579.
3. Кибалина И.В. Роль эндотелина-1 и аутоантител к нему в патогенезе атопического дерматита: исследование случай-контроль / И.В. Кибалина, Н.Н. Цыбиков. – DOI 10.25208/vdv478 // Вестник дерматологии и венерологии. – 2021. – Т. 97, № 1. – С. 34-40.
4. Микляев С.В. Оценка обращаемости пациентов за пародонтологической помощью. / С.В. Микляев, Сущенко А.В., Козлов А.Д., Полторацкая И.П. / Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2021. – Т. 20. № 3. С. 165-169.
5. Микробиологический пейзаж пародонтального кармана при воспалительных заболеваниях в тканях пародонта / С.В. Микляев, О.М. Леонова, А.В. Сущенко [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2021. – Т. 25, № 4. – С. 332-338.
6. Морфологические и иммунологические изменения тканей при экспериментальном пародонтите у крыс / А.А. Фёфелов, Ц.Б. Баясхаланова, П.П. Терешков [и др.] // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2023. – № 1. – С. 74-81. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/> (дата обращения: 20.03.2024).
7. Морфологические изменения эндотелиоцитов полости рта у крыс с индуцированным пародонтитом / А.А. Фёфелов, 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. Показатели врожденного и адаптивного иммунитета при хроническом генерализованном пародонтите у больных пожилого и старческого возраста / И.С. Пинелис, Ю.И. Пинелис, М.С. Малежик, И.Д. Ушницкий. – DOI 10.25789/УМЖ.2020.69.15 // Якутский медицинский журнал. – 2020. – № 1 (69). – С. 63-67.
9. Профиль цитокинов и аутоантител к ним в сыворотке крови и назальном секрете у больных хроническими риносинуситами / Н.Н. Цыбиков, Е.В. Егорова, Е.В. Фефелова [и др.] // Забайкальский медицинский вестник: электронное научное издание. – 2017. – № 4. – С. 137-145. – URL: <http://zabmedvestnik.ru/> (дата обращения: 10.03.2024).
10. Румянцев В.А. Модуляция иммунного ответа в пародонтологии и имплантологии: потенциал противовоспалительной, антибактериальной терапии и перспективные лекарственные формы. Обзор литературы / В.А. Румянцев, Д.Р. Авакова, А.В. Блинова. – DOI 10.33925/1683-3759-2019-24-4-372-377 // Пародонтология. – 2019. – Т. 24, № 4. – С. 372-377.
11. Федоренко Е.В. Определение микровезикул в ротовой жидкости, собранной с помощью системы "SALIVETTE", у пациентов с хроническим пародонтитом и гингивитом / Е.В. Федоренко, А.А. Фефелов // Медицина завтрашнего дня: материалы XVIII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, 23-26 апреля 2019 г., г. Чита / ответственный за выпуск Д.М. Серкин. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2019. – С. 287-288. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.
12. Фефелов А.А. Микровезикулы и факторы агрессии нейтрофилов в патогенезе хронического пародонтита / А.А. Фефелов, Н.Н. Цыбиков, Е.В.

- Фефелова // Казанский медицинский журнал. – 2023. – Т. 104, № 4. – С. 516-522.
13. Фефелов А.А. 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.
14. Фефелов А.А. 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.
15. Фефелов А.А. Роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе хронических форм пародонтита / А.А. Фефелов // Актуальные проблемы патофизиологии: научно-практическая конференция с международным участием, г. Чита, 28 окт. 2020 г. / под общей редакцией Н.В. Ларевой. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2020. – С. 112-115. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана.
16. Фефелов А.А. Терапевтический потенциал плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита // Теория и практика современной стоматологии: сборник научных трудов Региональной научно-практической конференции врачей стоматологов и челюстно-лицевых хирургов, г. Чита, 18-19 мая 2023 г. / под редакцией И.С. Пинелиса. – Чита: РИЦ ЧГМА, 2023. – С. 249-256.
17. Фефелов А.А. Цитокины и факторы врожденного звена иммунной системы в механизмах резорбции костной ткани у больных хроническим пародонтитом / А.А. Фефелов, Н.Н. Цыбиков, Е.В. Фефелова // International Journal of Medicine and Psychology. – 2023. – Т. 6, № 4. – С. 81-89.

18. Эффективность адаптогенов при экспериментальном пародонтите на фоне гипергомоцистеинемии / Е.М. Кривошеева, Е.В. Фефелова, А.В. Сепп [и др.] // Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 3 (73). – С. 221-225.
19. Юпатов Е.Ю. Современное понимание функции и дисфункции эндотелия сосудов. Обзор литературы / Е.Ю. Юпатов, Т.Е. Курманбаев, Ю.Л. Тимошкова // РМЖ. – 2022. – № 3. – С. 20-23.
20. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2 / T.G. Diacovo, A.R. de Fougères, D.F. Bainton, T.A. Springer. – DOI 10.1172/JCI117442 // J Clin Invest. – 1994. – Vol. 94 (3). – P. 1243-1251.
21. A Method to Isolate, Purify, and Characterize Human Periodontal Ligament Stem Cells / K. Mrozik, S. Gronthos, S. Shi, P.M. Bartold. – DOI 10.1007/978-1-4939-6685-1\_24 // Methods Mol Biol. – 2017. – Vol. 1537. – P. 413-427.
22. A Multimodal Deep Learning Approach to Predicting Systemic Diseases from Oral Conditions / D. Zhao, M. Homayounfar, Z. Zhen [et al.]. – DOI 10.3390/diagnostics12123192 // Diagnostics (Basel). – 2022. – Vol. 12 (12). – P. 3192.
23. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification / J. Caton, G. Armitage, T. Berglundh [et al.]. – DOI 10.1002/JPER.18-0157 // J Periodontol. – 2018. – Vol. 89, suppl. 1. – P. S1–S8.
24. A Novel PHD2/VHL-mediated Regulation of YAP1 Contributes to VEGF Expression and Angiogenesis / N. Bora-Singhal, B. Saha, D. Mohankumar [et al.]. – DOI 10.1158/2767-9764.crc-21-0084 // Cancer Res Commun. – 2022. – Vol. 2 (7). – P. 624-638.
25. Age and Periodontal Health - Immunological View / J.L. Ebersole, D.A. Dawson, P. Emecen Huja [et al.]. – DOI 10.1007/s40496-018-0202-2 // Curr Oral Health Rep. – 2018. – Vol. 5 (4). – P. 229-241.

26. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Filifactor alocis* as Associated with Periodontal Attachment Loss in a Cohort of Ghanaian Adolescents / Z. Razzoqi, C. Höglund Åberg, F. Kwamin [et al.]. – DOI 10.3390/microorganisms10122511 // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10 (12). – P. 2511.
27. Analysis of the Gut Microbiota: An Emerging Source of Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer / F. Zhang, M. Ferrero, N. Dong [et al.]. – DOI 10.3390/cancers13112514 // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13 (11). – P. 2514.
28. Analysis of the Oral Microbiome in a Patient with Cardiofaciocutaneous Syndrome and Severe Periodontal Disease: Impact of Systemic Antibiotic Therapy / C. Muñoz Navarro, M. Del Carmen Sánchez Beltrán, C. Arriagada Vargas [et al.]. – DOI 10.3390/antibiotics11121754 // *Antibiotics (Basel)*. – 2022. – Vol. 11 (12). – P. 1754.
29. Antimicrobial Effects of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin: A Scoping Review. / CL. Jeyaraman, N. Jeyaraman. – DOI 10.7759/cureus.51360 // *Cureus*. – 2023. – Vol. 15(12). – P.e51360.
30. *Baelum V. Epidemiology of Periodontal Diseases* / V. Baelum, R. López // *Oral Epidemiology* / eds. M.A. Peres, J.L.F. Antunes, R.G. Watt. – DOI 10.1007/978-3-030-50123-5\_4. – Springer, 2021. – P. 57-78. – ISBN 978-3-030-50122-8.
31. Balaji S. An emphasis of T-cell subsets as regulators of periodontal health and disease / S. Balaji, P.K. Cholan, D.J. Victor // *J Clin Transl Res*. – 2021. – Vol. 7 (5). – P. 648-656.
32. Balanced single-vector co-delivery of VEGF/PDGF-BB improves functional collateralization in chronic cerebral ischemia / A. Marushima, M. Nieminen, I. Kremenetskaia [et al.]. – DOI 10.1177/0271678X18818298 // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2020. – Vol. 40 (2). – P. 404-419.
33. Bancroft J.D. *Theory and Practice of Histological Techniques* / J.D. Bancroft, M. Gamble // *Immunohistochemical techniques*. – Amsterdam: The Netherlands, 2008. – P. 433-472.

34. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell / Z. Bar-Shavit. – DOI 10.1002/jcb.21553 // Journal of Cellular Biochemistry. – 2007. – Vol. 102 (5). – P. 1130-1139.
35. Bio-modulators in platelet-rich plasma: a comparison of the amounts in products from healthy donors and patients produced with three different techniques / G. Ubezio, M. Ghio, P. Contini. – DOI 10.2450/2012.0128-12 // Blood Transfus. – 2014. – Vol. 12, suppl. 1. – P. s214- s220.
36. Blair P. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates / P. Blair, R. Flaumenhaft. – DOI 10.1016/j.blre.2009.04.001 // Blood Rev. – 2009. – Vol. 23 (4). – P. 177-189.
37. Bone Marrow Aspirate Concentrate: Its Uses in Osteoarthritis / G.B. Kim, M.S. Seo, W.T. Park, G.W. Lee. – DOI 10.3390/ijms21093224 // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 (9). – P. 3224.
38. Brill A. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis / A. Brill, H. Elinav, D. Varon. – DOI 10.1016/j.cardiores.2004.04.012 // Cardiovasc Res. – 2004. – Vol. 63 (2). – P. 226-235.
39. Calprotectin (S100A8/S100A9) detects inflammatory activity in rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab therapy. / Gernert, M., Schmalzing, M., Tony, HP. et al. – DOI 10.1186/s13075-022-02887-7 // Arthritis Res Ther. – 2022. – Vol. 24. – P. 200.
40. Cellular senescence with SASP in periodontal ligament cells triggers inflammation in aging periodontal tissue / K. Ikegami, M. Yamashita, M. Suzuki [et al.]. – DOI 10.18632/aging.204569 // Aging (Albany NY). – 2023. – Vol. 15 (5). – P. 1279-1305.
41. Characteristics of proteolytic microorganisms and their effects on proteolysis in total mixed ration silages of soybean curd residue / W. Hao, P. Tian, M. Zheng [et al.]. – DOI 10.5713/ajas.18.0933 // Asian-Australas J Anim Sci. – 2020. – Vol. 33 (1). – P. 100-110.

42. Clark D. Cellular Mechanisms of Inflammation and Periodontal Disease / D. Clark, A. Radaic, Y. Kapila. – DOI 10.3389/fdmed.2022.844865 // Front Dent Med. – 2022. – Vol. 3. – P. 844865.
43. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF) / D.R. Knighton, K.F. Ciresi, V.D. Fiegel [et al.]. – DOI 10.1097/00000658-198609000-00011 // Ann Surg. – 1986. – Vol. 204 (3). – P. 322-330.
44. Comparative evaluation of microbial profiles of oral samples obtained at different collection time points and using different methods. / M. Omori, N. Kato-Kogoe, S. Sakaguchi et al. – DOI 10.1007/s00784-020-03592-y // Clin Oral Invest – 2021. – Vol. 25. – P. 2779–2789.
45. Comprehensive Analyses of the Bacterial Population in Non-Healing Claw Lesions of Dairy Cattle / K. Hori, T. Taniguchi, T. Elpita [et al.]. – DOI 10.3390/ani12243584 // Animals (Basel). – 2022. – Vol. 12 (24). – P. 3584.
46. Crisci A. Second Generation Platelet Concentrates - L-PRF (Fibrin Rich in Platelets and Leukocytes) and Its Derivatives (A-PRF, I-PRF)-: Morphological Characteristics to be Used in Modern Regenerative Surgery. Experimental Research. / A. Crisci, C.A. Minniti, A. Conte, M. Crisci, F. Cardillo – DOI 10.33696/haematology.1.014 // J Clin Haematol. – 2020. – Vol. 1. (3)– P. 90-102.
47. Dahlen G. The secretion of cytokines by peripheral blood mononuclear cells of patients with periodontitis and healthy controls when exposed to H<sub>2</sub>S. / A. Basic, G. Serino, Å. Leonhardt, G. Dahlén, G. Bylund, – DOI 10.1080/20002297.2021.1957368 // J. Journal of Oral Microbiology. – 2021. – Vol. 13 (1). – P. 1957368.
48. Deo P.N. Oral microbiome research – A Beginner's glossary/ P.N. Deo, R. Deshmukh. – DOI 10.4103/jomfp.jomfp\_455\_21 // J Oral Maxillofac Pathol. – 2022. – Vol. 26. – P. 87-92.
49. Differential immune responses of 3D gingival and periodontal connective tissue equivalents to microbial colonization / H. Makkar, S. Atkuru, Y.L. Tang [et al.]. –

- DOI 10.1177/20417314221111650 // J Tissue Eng. – 2022. – Vol. 13. – P. 20417314221111650. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35923175/> (date of the application: 28.01.2023).
50. Disruption of Monocyte and Macrophage Homeostasis in Periodontitis / A. Almubarak, K.K.K Tanagala, P.N. Papapanou [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2020.00330 // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 330.
51. Distinct Oral Neutrophil Subsets Define Health and Periodontal Disease States / N. Fine, S. Hassanpour, A. Borenstein [et al.]. – DOI 10.1177/0022034516645564 // J Dent Res. – 2016. – Vol. 95 (8). – P. 931-918.
52. Dysregulation of Stress-Induced Translational Control by Porphyromonas gingivalis in Host Cells / A.A. Knowles, S.G. Campbell, N.A. Cross, P. Stafford. – DOI 10.3390/microorganisms11030606 // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11 (3). – P. 606.
53. Effects of platelet-rich fibrin on human gingival and periodontal ligament fibroblast proliferation from chronic periodontitis versus periodontally healthy subjects / A. Goel, L.J. Windsor, R.L. Gregory, S.B. Blanchard, Y. Hamada– DOI 10.1002/cre2.370 // Clin Exp Dent Res. – 2021. – Vol. 7 (4). – P. 436-442.
54. Eke P.I. Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA / P.I. Eke, W.S. Borgnakke, R.J. Genco. – DOI 10.1111/prd.12323 // Periodontol 2000. – 2020. – Vol. 82 (1). – P. 257-267.
55. Endothelial Dysfunction and Neutrophil Degranulation as Central Events in Sepsis Physiopathology / M. Martín-Fernández, A. Tamayo-Velasco, R. Aller [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22126272 // Int J MolSci. – 2021. – Vol. 22 (12). – P. 6272.
56. Extracellular matrix degradation by host matrix metalloproteinases in restorative dentistry and endodontics: An overview / V.P. Anshida, R.A. Kumari, C.S. Murthy, A. Samuel. – DOI 10.4103/jomfp.JOMFP\_34\_20 // J Oral Maxillofac Pathol. – 2020. – Vol. 24 (2). – P. 352-360.
57. Fuchs A.L. Primary Human M2 Macrophage Subtypes Are Distinguishable by Aqueous Metabolite Profiles. / A.L. Fuchs, S.M. Costello, S.M. Schiller, B.P.

- Tripet, V. Copié – DOI 10.3390/ijms25042407// Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25 – P. 2407.
58. Garant P.R. Oral Cells and Tissues / P.R. Garant. – Quintessence Publishing Co, 2003. – 400 p. – ISBN 978-0-86715-429-0; 9780867154290.
59. Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. / N. Mullins, A.J. Forstner, K.S. O’Connell [et al.]. – DOI 10.1038/s41588-021-00857-4// Nat Genet. – 2021. – Vol. 53. – P. 817–829.
60. Gingival crevicular fluid levels of cytokine, chemokine, and growth factors in patients with periodontitis or gingivitis and periodontally healthy subjects: a cross-sectional multiplex study / H. Gündoğar, K. Üstün, S.Z. Şenyurt [et al.]. – DOI 10.5114/ceji.2021.110289 // Cent Eur J Immunol. – 2021. – Vol. 46 (4). – P. 474-480.
61. Gomaa N. Social Epigenomics: Conceptualizations and Considerations for Oral Health / N. Gomaa. – DOI 10.1177/00220345221110196 // J Dent Res. – 2022. – Vol. 101 (11). – P. 1299-1306.
62. Gonzalez L.L. Role of S100 proteins in health and disease / L.L. Gonzalez, K. Garrie, M.D. Turner. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2020.118677 // Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. – 2020. – Vol. 1 867 (6). – P. 118677. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32057918/> (date of the application: 18.01.2023).
63. Gu Y. Toll-Like Receptor Signaling and Immune Regulatory Lymphocytes in Periodontal Disease / Y. Gu, X. Han. – DOI 10.3390/ijms21093329 // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 (9). – P. 3329.
64. Hajishengallis G. Oral polymicrobial communities: Assembly, function, and impact on diseases / G. Hajishengallis, R. LaMont, H. KOO. – DOI 10.1016/j.chom.2023.02.009/Cell Host and Microbe. – 2023. – Vol. 31 (4). – P. pp. 528-538.

65. Hajishengallis G. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy / G. Hajishengallis, T. Chavakis, J.D. Lambris. – DOI 10.1111/prd.12331 // *Periodontol 2000*. – 2020. – Vol. 84 (1). – P. 14-34.
66. Hajishengallis G. Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host / G. Hajishengallis, R.J. Lamont. – DOI 10.1111/prd.12371 // *Periodontol 2000*. – 2021. – Vol. 86 (1). – P. 210-230.
67. Hajishengallis G. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later / G. Hajishengallis, J.M. Korostoff. – DOI 10.1111/prd.12181 // *Periodontol 2000*. – 2017. – Vol. 75 (1). – P. 116-151.
68. Gharpinde M.R. A Comprehensive Review of Platelet-Rich Plasma and Its Emerging Role in Accelerating Bone Healing / M.R. Gharpinde, A. Pundkar, S. Shrivastava – DOI 10.7759/cureus.54122 // *Cureus*. – 2024. – Vol. 16 (2). – P. e54122.
69. Hosseini M. Platelet-Rich Plasma in Regenerative Medicine: Possible Applications in Management of Burns and Post-Burn Scars: A Review. / M. Hosseini, M. Nouri, M. Zarrabi, M. Fatemi, A. Shpichka, P. Timashev, M. Hassan, M. Vosough. – DOI 10.22074/cellj.2023.558213.1093 // *Cell Journal (Yakhteh)*. – 2023. – Vol. 25 (5). – P. 281-290.
70. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? / B.T. Rosier, M. De Jager, E. Zaura, B.P. Krom. – DOI 10.3389/fcimb.2014.00092 // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2014. – Vol. 4. – P. 92.
71. HMPDACC: a Human Microbiome Project Multi-omic data resource / H.H. Creasy, V. Felix, J. Aluvathingal [et al.]. – DOI 10.1093/nar/gkaa996 // *Nucleic Acids Res*. – 2021. – Vol. 49 (D1). – P. D734-D742.
72. Huang Z. The Interrelationship Between Diabetes, IL-17 and Bone Loss / Z. Huang, X. Pei, D.T. Graves. – DOI 10.1007/s11914-020-00559-6 // *Curr Osteoporos Rep*. – 2020. – Vol. 18 (1). – P. 23-31.

73. Iberg C.A. Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells / C.A. Iberg, D. Hawiger. – DOI 10.4049/jimmunol.1901121 // *J Immunol.* – 2020. – Vol. 204 (4). – P. 733-744.
74. Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells / I. Giusti, A. Rughetti, S. D'Ascenzo. – DOI 10.1111/j.1537-2995.2008.02033.x // *Transfusion.* – 2009. – Vol. 49 (4). – P. 771-778.
75. Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis / D. Chen, T-X. Tang, H. Deng [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2021.747324 // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 747324.
76. Immune system disorders: Hypersensitivity and autoimmunity / J.L. Muñoz-Carrillo, F.P. Castro-García, F. Chávez-Rubalcaba [et al.] // *Immunoregulatory Aspects of Immunotherapy* / Editor S.S. Athari. – DOI 10.5772/intechopen.75794. – London: InTechOpen, 2018. – P. 1-30. – ISBN 978-1-78923-509-8.
77. Increase in serum and salivary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels with increased periodontal inflammation / A. Tan, N. Gürbüz, F.İ. Özbacı [et al.]. – DOI 10.1590/1678-7757-2020-0276 // *J Appl Oral Sci.* – 2020. – Vol. 28. – P. e20200276.
78. Induction of NF- $\kappa$ B inflammatory pathway in monocytes by microparticles from patients with systemic lupus erythematosus / K. Álvarez, J. Villar-Vesga, B. Ortiz-Reyes [et al.]. – DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e05815 // *Heliyon.* – 2020. – Vol. 6 (12). – P. e05815.
79. Influence of Smoking on Periodontal and Implant Therapy: A Narrative Review / M. Madi, S. Smith, S. Alshehri [et al.]. – DOI 10.3390/ijerph20075368 // *Int J Environ Res Public Health.* – 2023. – Vol. 20 (7). – P. 5368.
80. Interactions Between Neutrophils and Periodontal Pathogens in Late-Onset Periodontitis / Q. Jiang, Y. Zhao, Y. Shui [et al.]. – DOI

- 10.3389/fcimb.2021.627328 // Front Cell Infect Microbiol. – 2021. – Vol. 11. – P. 627328.
81. Italiani P. Profiling the Course of Resolving vs. Persistent Inflammation in Human Monocytes: The Role of IL-1 Family Molecules / P. Italiani, E. Mosca, G. Della Camera [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01426 // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 1426.
82. Jain A. T cells instruct myeloid cells to produce inflammasome-independent IL-1 $\beta$  and cause autoimmunity / A. Jain, R.A. Irizarry-Caro, M.M. McDaniel [et al.]. – DOI 10.1038/s41590-019-0559-y // Nat Immunol. – 2020. – Vol. 21 (1). – P. 65-74.
83. Jethwa J. Does a combination of platelet-rich plasma and decalcified freeze-dried bone allograft offer advantages over decalcified freeze-dried bone allograft alone when using pocket depth and clinical attachment level as markers for periodontal healing? A literature review / J. Jethwa, R.S. Ireland, D. Chan. – DOI 10.1111/jicd.12397 // J Invest Clin Dent. – 2019. – Vol. 10 (2). – P. e12397.
84. Lakschevitz F.S. Oral neutrophil transcriptome changes result in a pro-survival phenotype in periodontal diseases / F.S. Lakschevitz, G.M. Aboodi, M. Glogauer. – DOI 10.1371/journal.pone.0068983 // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (7). – P. e68983.
85. Lamont R.J. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions / R.J. Lamont, H. Koo, G. Hajishengallis. – DOI 10.1038/s41579-018-0089-x // Nat Rev Microbiol. – 2018. – Vol. 16 (12). – P. 745-759.
86. Laronha H. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases / H. Laronha, J. Caldeira. – DOI 10.3390/cells9051076 // Cells. – 2020. – Vol. 9 (5). – P. 1076.
87. Leukocyte Adhesion Deficiency-1 with Oral Manifestations – A Rare Case Report / S. Sethumanjusha, S. Yalamanchili, R. Naik [et al.]. – DOI 10.4103/jiaomr.jiaomr\_336\_21 // Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology. – 2022. – Vol. 34 (3). – P. 369-371.

88. Loesche W.J. Chemotherapy of dental plaque infections // *Oral Sci Rev.* – 1976. – Vol. 9. – P. 65-107.
89. Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Kaciroti N. The nonsurgical treatment of patients with periodontal disease: results after 6.4 years // *Gen Dent.* 2005 Jul-Aug;53(4):298-306; quiz 307
90. Manji F. A stochastic model for periodontal breakdown / F. Manji, N. Nagelkerke. – DOI 10.1111/j.1600-0765.1989.tb01793.x // *J Periodontal Res.* – 1989. – Vol. 24 (4). – P. 279-281.
91. Marsh P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease / P.D. Marsh. – DOI 10.1177/08959374940080022001 // *Adv Dent Res.* – 1994. – Vol. 8. – P. 263-271.
92. Martínez-García M. Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview / M. Martínez-García, E. Hernández-Lemus. – DOI 10.3389/fphys.2021 // *Front Physiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 709438.
93. Meyle J. Resektive Periimplantitistherapie: Parodontologie: die Zeitschrift für die Praxis (Berlin, Germany), 2020, Vol 31, Issue 3, p287 – ISSN 0937-1532.
94. Microbial complexes in subgingival plaque / S.S. Socransky, A.D. Haffajee, M.A. Cugini [et al.] // *J Clin Periodontol.* – 1998. – Vol. 25. – P. 134-144.
95. Mlachkova A. Application of PRP (platelet-rich plasma) in surgical periodontal therapy: overview / A. Mlachkova, V. Dosseva-Panova, C. Popova. – DOI 10.1080/13102818.2021.1878932 // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* – 2021. – Vol. 35. – P. 586-592.
96. MMPs and TIMPs Expression Levels in the Periodontal Ligament during Orthodontic Tooth Movement: A Systematic Review of In Vitro and In Vivo Studies / C. Behm, M. Nemeč, F. Weissinger [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22136967 // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22 (13). – P. 6967.
97. Molecular and temporal control of restimulation-induced cell death (RICD) in T lymphocytes / K.P. Lee, B. Epstein, C.M. Lake [et al.]. – DOI 10.3389/fceld.2023.1281137 // *Front Cell Death.* – 2023. – Vol. 2. – P. 1281137.

98. Monocyte/Macrophage Lineage Cells From Fetal Erythromyeloid Progenitors Orchestrate Bone Remodeling and Repair / Y. Yahara, X. Ma, L. Gracia, B.A. Alman A. – DOI 10.3389/fcell.2021.622035 // Front. Cell Dev. Biol. – 2021. – Vol. 9. – P. 622035.
99. Motta A.T.S.D. Orthodontic treatment in the presence of aggressive periodontitis / A.T.S.D. Motta. – DOI 10.1590/2177-6709.26.6.e21bbo6 // Dental Press J Orthod. – 2021. – Vol. 26 (6). – P. e21bbo6.
100. M.TOR. Signaling in the Regulation of CD4+ T Cell Subsets in Periodontal Diseases / Q. Jiang, X. Huang, W. Yu [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2022.827461 // Front Immunol. – 2022. – Vol. 13. – P. 827461.
101. Müller N. The Role of Intercellular Adhesion Molecule-1 in the Pathogenesis of Psychiatric Disorders / N. Müller. – DOI 10.3389/fphar.2019.01251 // Front Pharmacol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1251.
102. Namangkalakul W. Augmented effect of fibroblast growth factor 18 in bone morphogenetic protein 2-induced calvarial bone healing by activation of CCL2/CCR2 axis on M2 macrophage polarization / W. Namangkalakul, S. Nagai, C. Jin. – DOI 10.1177/20417314231187960 // Journal of Tissue Engineering. – 2023. – Vol. 14 .
103. Neutrophil metalloproteinase driven spleen damage hampers infection control of trypanosomiasis / H.T.T. Pham, S. Magez, B. Choi [et al.]. – DOI 10.1038/s41467-023-41089-w // Nat Commun. – 2023. – Vol. 14. – P. 5418
104. New concepts of destructive periodontal disease / S.S. Socransky, A.D. Haffajee, J.M. Goodson, J. Lindhe. – DOI 10.1111/j.1600-051x.1984.tb01305.x // J Clin Periodontol. – 1984. – Vol. 11 (1). – P. 21-32.
105. New putative periodontopathogens and periodontal health-associated species: A systematic review and meta-analysis. / A. Antezack, D. Etchecopar-Etchart, B. La Scola [et al.]. – DOI 10.1111/jre.13173 // J Periodont Res. – 2023. – Vol. 58. – P.:893-906.

106. Nyvad B. Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases / B. Nyvad, N. Takahashi. – DOI 10.1080/20002297.2019.1710953 // J Oral Microbiol. – 2020. – Vol. 12 (1). – P. 1710953.
107. Oates T.W. Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators / T.W. Oates, D.L. Cochran // Current Opinion in Periodontology. – 1996. – Vol. 3. – P. 34-44.
108. Okamoto H. Okamoto model for necrosis and its expansions, CD38-cyclic ADP-ribose signal system for intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and Reg (Regenerating gene protein)-Reg receptor system for cell regeneration / H. Okamoto, S. Takasawa. – DOI 10.2183/pjab.97.022 // Proceedings of the Japan Acade. – 2021. – Vol. 97. – P. 8. – URL: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/97/8/97\\_PJA9708B-01/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/97/8/97_PJA9708B-01/_article/-char/ja/) (date of the application: 18.01.2023)
109. Oliveira T.C. The Crossroads between Infection and Bone Loss / T.C. Oliveira, M.S. Gomes, A.C. Gomes. – DOI 10.3390/microorganisms8111765 // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8 (11). – P. 1765.
110. Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases / M. Bertolini, R.C. Costa, V.A.R. Barão [et al.]. – DOI 10.3390/microorganisms10122413 // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10 (12). – P. 2413.
111. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases / S.H. Wiebe, M. Hafezi, H.S. Sandhu [et al.] // Oral Diseases. – 1996. – Vol. 2 (2). – P. 167-180.
112. Osteopontin promotes age-related adipose tissue remodeling through senescence-associated macrophage dysfunction / D. Sawaki, Y. Zhang, A. Mohamadi [et al.]. – DOI 10.1172/jci.insight.145811 // JCI Insight. – 2023. – Vol. 8 (8). – P. e145811.
113. Pan W. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis / W. Pan, Q. Wang, Q. Chen. – DOI 10.1038/s41368-019-0064-z // Int J Oral Sci. – 2019. – Vol. 11 (3). – P. 30.

114. Pham T.A.V. Comparison of Antimicrobial Activity against *Porphyromonas gingivalis* between Advanced Platelet-Rich Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin / T.A.V. Pham – DOI 10.1155/2023/9194868 // Hindawi International Journal of Biomaterials. – 2023. – Vol. 2023. – P. 7329103.
115. Phillipson M. The Healing Power of Neutrophils / M. Phillipson, P. Kubes. – DOI 10.1016/j.it.2019.05.001 // Trends Immunol. – 2019. – Vol. 40 (7). – P. 635-647.
116. Pilot T. The periodontal disease problem. A comparison between industrialised and developing countries // Int Dent J. – 1998. – Vol. 48, № 3, suppl. 1. – P. 221-232.
117. Plasma elaidic acid level is associated with periodontal health in American adults: A cross-sectional study / H. Jiabin, C. Zhu, Y. Jing [et al.]. – DOI 10.3389/fnut.2022.1034841 // Front Nutr. – 2022. – Vol. 9. – P. 1034841.
118. Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases / Y. Ye, B. Gauger, M. Mohty, F. Malard. – DOI 10.1002/cti2.1139 // Clin Transl Immunology. – 2020. – Vol. 9 (5). – P. e1139.
119. Platelet rich plasma: hope or hype? / R. Yaman, T.N. Kinard – DOI 10.21037/aob-21-57 // Ann Blood. – 2022. – Vol. 7. – P. 6.
120. Platelet-Rich Plasma (PRP) in Dermatology: Cellular and Molecular Mechanisms of Action / D. Vladulescu, L.G. Scurtu, A.A. Simionescu [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines12010007 // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – P. 7.
121. Platelet-rich plasma and regenerative dentistry / J. Xu, L. Gou, P. Zhang [et al.]. – DOI 10.1111/adj.12754 // Aust Dent J. – 2020. – Vol. 65 (2). – P. 131-142.
122. Platelet-Rich Plasma Promotes the Proliferation of Human Keratinocytes via a Progression of the Cell Cycle. A Role of Prolidase / M. Misiura, T. Guszczyn, I. Oscilowska [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22020936 // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22 (2). – P. 936.
123. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts / R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt [et al.]. – DOI 10.1016/s1079-2104 (98)90029-4 // Oral

- Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. – 1998. – Vol. 85 (6). – P. 638-646.
124. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020 / P. Everts, K. Onishi, P. Jayaram [et al.]. – DOI 10.3390/ijms21207794 // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 (20). – P. 7794.
125. Polarized Macrophages in Periodontitis: Characteristics, Function, and Molecular Signaling / X. Sun, J. Gao, X. Meng [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2021.763334 // Front Immunol. – 2021. – Vol. 12. – P. 763334.
126. Prevalence of periodontitis based on retrospective radiographic evaluation at dental hospital in Eastern Province of Saudi Arabia: A retrospective study / A. Tabassum, M. Madi, A. Alabdulaziz. – DOI 10.1016/j.sdentj.2022.11.006 // Saudi Dent J. – 2022. – Vol. 34 (8). – P. 788-794.
127. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo / S. Bord, A. Horner, R.M. Hembry [et al.]. – DOI 10.1016/8756-3282(96)00106-8 // Bone. – 1996. – Vol. 19 (1). – P. 35-40.
128. Proof-of-Principle Study Suggesting Potential Anti-Inflammatory Activity of Butyrate and Propionate in Periodontal Cells / A.F.P. Santos, L.C.C. Cervantes [et al.]. – DOI 10.3390/ijms231911006 // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23 (19). – P. 11006.
129. Protective Actions in Apical Periodontitis: The Regenerative Bioactivities Led by Mesenchymal Stem Cells / P. Lyu, Y. Song, R. Bi [et al.]. – DOI 10.3390/biom12121737 // Biomolecules. – 2022. – Vol. 12 (12). – P. 1737.
130. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase / B. Champagne, P. Tremblay, A. Cantin, I. St. Pierre // J Immunol. – 1998. – Vol. 161. – P. 6398.
131. PRP and PRF–Subgroups and Divisions When Used in Dentistry / P. Pietruszka, I. Chruścicka, I. Duś-Ilnicka, A. Paradowska-Stolarz. – DOI 10.3390/jpm11100944 // J. Pers. Med. – 2021. – Vol. 11. – P. 944.

132. Radaic A. The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions / A. Radaic, Y.L. Kapila. – DOI 10.1016/j.csbj.2021.02.010 // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2021. – Vol. 19. – P. 1335-1360.
133. Raeeszadeh-Sarmazdeh M. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics / M. Raeeszadeh-Sarmazdeh, L.D. Do, B.G. Hritz. – DOI 10.3390/cells9051313 // *Cells.* – 2020. – Vol. 9 (5). – P. 1313.
134. Regulatory Effects of Curcumin on Platelets: An Update and Future Directions / Y. Hussain, Abdullah, F. Khan [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines10123180 // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10 (12). – P. 3180.
135. Risk factors in periodontology: a conceptual framework / P. Bouchard, M.C. Carra, A. Boillot [et al.]. – DOI 10.1111/jcpe.12650 // *J Clin Periodontol.* – 2017. – Vol. 44. – P. 125-131.
136. Role of CD40 (L)-TRAF signaling in inflammation and resolution-a double-edged sword / L. Strohm, H. Ubbens, T. Münzel [et al.]. – DOI 10.3389/fphar.2022.995061 // *Front Pharmacol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 995061.
137. Role of Galectin-10 (Gal-10) in nasal epithelium inflammation and remodeling of children with seasonal allergic rhinitis (SAR) / O.M. Manna, S. La Grutta, V. Malizia [et al.]. – DOI 10.1183/13993003.congress-2023.PA4754 // *European Respiratory Journal.* – 2023. – Vol. 62. – P. PA4754
138. Rosales C. Neutrophil Activation by Antibody Receptors / C. Rosales, E. Uribe-Querol // *Neutrophils.* – 2019. – Vol. 6. – URL: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80666> (date of the application: ).
139. S100A8/A9 is not essential for the development of inflammation and joint pathology in interleukin-1 receptor antagonist knockout mice / I. Di Ceglie, P.L.E.M. van Lent, E.J.W. Geven [et al.]. – DOI 10.1186/s13075-021-02602-y // *Arthritis Res Ther.* – 2021. – Vol. 23. – P. 216
140. Slomiany B.L. Proinflammatory Signaling Cascades of Periodontopathic Oral Pathogen *Porphyromonasgingivalis* / B.L. Slomiany, A. Slomiany. – DOI

- 10.4236/jbm.2018.65009 // Journal of Biosciences and Medicines. – 2018. – Vol. 6. – P. 63-88.
141. Specific inflammatory osteoclast precursors induced during chronic inflammation give rise to highly active osteoclasts associated with inflammatory bone loss / Y. Meiorow, M. Jovanovic, Y. Zur [et al.]. – DOI 10.1038/s41413-022-00206-z // Bone Res. – 2022. – Vol. 10 (1). – P. 36. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41413-022-00206-z> (date of the application: 23.03.2023).
142. Takegahara N. RANKL biology / N. Takegahara, H. Kim, Y. Choi. – DOI 10.1016/j.bone.2022.116353 // Bone. – 2022. – Vol. 159. – P. 116353.
143. The anti-inflammatory effect of the platelet-rich plasma in the periodontal pocket / L.A. Abdul Ameer, Z.J. Raheem, S.S. Abdulrazaq [et al.]. – DOI 10.4103/ejd.ejd\_49\_18 // Eur J Dent. – 2018. – Vol. 12. – P. 528-531.
144. The application of injectable platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic scoping review of In vitro and In vivo studies / N. Farshidfar, D. Jafarpour, P. Firoozi [et al.]. – DOI 10.1016/j.jdsr.2022.02.003 // Jpn Dent Sci Rev. – 2022. – Vol. 58. – P. 89-123.
145. The global prevalence of apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis / C.S. Tiburcio-Machado, C. Michelon, F.B. Zanatta [et al.]. – DOI 10.1111/iej.13467 // Int. Endod. J. – 2021. – Vol. 54. – P. 712-735.
146. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes / I. Luchian, A. Goriuc, D. Sandu, M. Covasa. – DOI 10.3390/ijms23031806 // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23 (3). – P. 1806.
147. The Role of Matrix Metalloproteinases in Periodontal Disease / V. Checchi, T. Maravic, P. Bellini [et al.]. – DOI 10.3390/ijerph17144923 // Int J Environ Res Public Health. – 2020. – Vol. 17 (14). – P. 4923.
148. The Role of Osteopontin in Tumor Progression Through Tumor-Associated Macrophages / T. Yuying, Z. Lei, Y. Yong-Guang, L. Wentao. – DOI

- 10.3389/fonc.2022.953283 // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 739-749.
149. Tissue engineering in periodontics A demystifying review / S. Sachdevaa, H. Salujab, A. Mania [et al.]. – DOI 10.3233/JCB-200028 // *Journal of Cellular Biotechnology*. – 2021. – Vol. 7. – P. 19-23.
150. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity / T. Duan, Y. Du, C. Xing [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2022.812774 // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 812774.
151. Transforming Endothelium with Platelet-Rich Plasma in Engineered Microvessels / R.J. Nagao, R. Marcu, Y. Wang [et al.]. – DOI 10.1002/advs.201901725 // *AdvSci (Weinh)*. – 2019. – Vol. 6 (24). – P. 1901725.
152. Van Gils J.M. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases / J.M. van Gils, J.J. Zwaginga, P.L. Hordijk. – DOI 10.1189/jlb.0708400 // *J Leukoc Biol.* – 2009. – Vol. 85 (2). – P. 195-204.
153. Varshney S. Antimicrobial effects of various platelet rich concentrates-vibes from in-vitro studies-a systematic review / S. Varshney, A. Dwivedi, V. Pandey. – DOI 10.1016/j.jobcr.2019.06.013 // *J Oral Biol Craniofac Res.* – 2019. – Vol. 9 (4). – P. 299-305.
154. Wankhede A.N. Interleukin-17 levels in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis and chronic periodontitis patients / A.N. Wankhede, P.V. Dhadse. – DOI 10.4103/jisp.jisp\_47\_21 // *J Indian Soc Periodontol.* – 2022. – Vol. 26 (6). – P. 552-556.
155. Weber C. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIbbeta3 and stimulated by platelet-activating factor / C. Weber, T.A. Springer. – DOI 10.1172/JCI119742 // *J Clin Invest.* – 1997. – Vol. 100 (8). – P. 2085-2093.

156. Wei L. Role of Calprotectin as a Biomarker in Periodontal Disease / L. Wei, M. Liu, H. Xiong. – DOI 10.1155/2019/3515026 // *Mediators Inflamm.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 3515026.
157. What Is the Heritability of Periodontitis? / L. Nibali, J. Bayliss-Chapman, S.A. Almofareh [et al.]. – DOI 10.1177/0022034519842510 // *A Systematic Review. J Dent Res.* – 2019. – Vol. 98 (6). – P. 632-641.
158. Yang J. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction / J. Yang, B.C. Furie, B. Furie // *Thromb Haemost.* – 1999. – Vol. 81 (1). – P. 1-7.
159. Yin L. Macrophages in periodontitis: A dynamic shift between tissue destruction and repair / L. Yin, X. Li, J. Hou. – DOI 10.1016/j.jdsr.2022.10.002 // *Jpn Dent Sci Rev.* – 2022. – Vol. 58. – P. 336-347.
160. Yu B. Osteoporosis and periodontal diseases - An update on their association and mechanistic links / B. Yu, C-Y. Wang. – DOI 10.1111/prd.12422// *Periodontol 2000.* – 2022. – Vol. 89 (1). – P. 99-113.
161. Zhou Y. Clinical Efficacy of Intra-Articular Injection with P-PRP Versus that of L-PRP in Treating Knee Cartilage Lesion: A Randomized Controlled Trial / Y. Zhou, H. Li, S. Cao [et al.]. – DOI 10.1111/os.13643 // *Orthop Surg.* – 2023. – Vol. 15 (3). – P. 740-749.