

ADVANCES OF SCIENCE

Proceedings of articles the international scientific conference Czech
Republic, Karlovy Vary – Ukraine, Kyiv, 6 April 2018

Czech Republic, Karlovy Vary – Ukraine, Kyiv, 2018

UDC 001
BBK 72
D717

Scientific editors:

Katjuhin Lev Nikolaevich, Doctor of Biological, a leading researcher at the Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry named I.M.Sechenov Academy of Sciences

Salov Igor' Arkad'evich, Doctor of Medical, Head of the Department of Obstetrics and Gynecology, Saratov State Medical University named V.I.Razumovskij

Danilova Irina Sergeevna, Ph.D., Associate Professor of Tomsk State Pedagogical University named L.N.Tolstoj Burina Natal'ja Sergeevna, Ph.D., Associate Professor of Nizhny Novgorod State named University N.I. Lobachevskij

D717

ADVANCES OF SCIENCE: Proceedings of articles the international scientific conference.

Czech Republic, Karlovy Vary – Ukraine, Kyiv, 6 April 2018 [Electronic resource] / Editors prof. L.N. Katjuhin, I.A. Salov, I.S. Danilova, N.S. Burina. – Electron. txt. d. (1 файл 3 MB). – Czech Republic, Karlovy Vary: Skleněný Můstek – Ukraine, Kyiv: MCNIP, 2018.

– ISBN 978-80-7534-078-8.

Proceedings includes materials of the international scientific conference « ADVANCES OF SCIENCE», held in Czech Republic, Karlovy Vary-Ukraine, Kyiv, 6 April 2018. The main objective of the conference - the development community of scholars and practitioners in various fields of science. Conference was attended by scientists and experts from Azerbaijan, Russia, Ukraine. At the conference held e-Conference "Prospects for the development of Medicine and Pharmacy 2018". International scientific conference was supported by the publishing house of the International Centre of research projects.

ISBN 978-80-7534-078-8 (Skleněný Můstek, Karlovy Vary, Czech Republic)

Articles are published in author's edition. Editorial opinion may not coincide with the views of the authors

Reproduction of any materials collection is carried out to resolve the editorial board

© Skleněný Můstek, 2018

ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МАРКЕРІВ АПОПТОЗУ ТА ЗАПАЛЕННЯ В ТКАНИНАХ ПАРОДОНТУ ХВОРИХ НА ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ ПАРОДОНТИТ ТЕЗИ

САМОЙЛЕНКО А.В., ГОРШКОВА А.Є.

vldmrtkrv@gmail.com

*доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри терапевтичної
стоматології*

асистент кафедри терапевтичної стоматології

*Державний заклад «Дніпропетровська медична академія Міністерство
Охорони Здоров'я України»*

м.Дніпро, Україна

Висока поширеність запальних захворювань пародонту (до 90%) з тенденцією до щорічного збільшення даного показника у всіх вікових групах населення диктує необхідність активного пошуку і впровадження нових методів діагностики і лікування цих захворювань.

Запальні захворювання пародонту характеризуються місцевою та загальною відповіддю на інфекцію за участю декількох видів грамнегативних анаеробних мікроорганізмів, які тісно пов'язані з деструкцією навколорубних тканин. Патогенність бактерій відносно тканин пародонту підтверджена багатьма дослідженнями. Доказано, що розвиток генералізованого пародонтиту частіше асоціюється с персистенцією в тканинах пародонту наступних представників мікрофлори: *Aggregatibacter* (раніше *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*. Важливим фактором вірулентності грамнегативних анаеробних мікроорганізмів є ліпосахарідний ендотоксин, який знаходиться на зовнішній мембрані бактерій та стимулює в людських мононуклеарах периферичної крові запрограмовану загибель – апоптоз [5, 8, 14,15]. Індукція

апоптозу в клітинах хазяїна являє собою значну подію у патогенезі захворювань пародонту.

Механізми, що відповідають за пошкодження тканин ясен, вивчені ще досить поверхнево [4, 6, 10] і можуть складатися у різних пропорціях, як з імунних місцевих реакцій, так і з прямих цитопатичних ефектів патогенних бактерій. На підставі дослідження прямої дії бактерій в культурах клітин було висловлено припущення, що апоптоз може відігравати важливу роль в патогенезі прогресування пародонтиту. Тим не менш, природа молекулярних механізмів, які беруть участь у цьому процесі, залишається досі невідомою.

Запрограмована загибель клітин або апоптоз є нормальним фізіологічним процесом, який сприяє збереженню тканинного гомеостазу. Його модулюють різні подразники, в тому числі гормони, цитокіни, фактори росту, бактеріальні або вірусні агенти та імунні реакції [1,3,5]. Дослідження зарубіжних авторів [11,12,13,14,15] показали, що апоптоз по суті опосередкований родиною протеаз, так званих каспаз, які можуть бути розподілені на дві групи – ініціаторні та ефекторні каспази. Ініціаторним каспазам, таким як каспаза-8 або -9, надають роль активаторів підпорядкованих ефекторних каспаз, таких як каспаза-3, -6, -7 [12]. Каспаза-3 вважається ферментом-виконавцем, оскільки вона може бути активована іншими активними каспазами і має відповідну каталітичну специфічність. Надійна ознака індукції апоптозу є виявлення клітин, які експресують активну форму каспази-3 [7, 14,15].

Серед інших чинників апоптотичної активності можна відокремити продукти трьох генів, які кодують білки p53, p21 та Bcl-2, що відіграють фундаментальну роль в регуляції апоптозу [9]. Bcl-2 є членом родини антиапоптотичних протеїнів, які можуть запобігти або зменшити ризик загибелі клітин, що індукована різними стимулами [12]. Внутрішній шлях смерті ініціюється виходом мітохондріального цитохрому C, і саме цей процес на початку гальмується антиапоптотичним білком Bcl-2. Навпаки p53 – білковий продукт пухлинного гена-супресору, експресія якого індукує апоптоз. Цей білок впливає на динаміку клітинного оновлення через індукцію апоптозу у термінальній

стадії диференціювання клітин, в тому числі і клітин запального інфільтрату [13]. p21 – важливий інгібітор клітинного циклу, експресія якого є однією з основних мішеней трансактиваційної дії онкопротеїну p53. p21 блокує комплекси різних циклінів з необхідними кіназами, ключовими ферментами поділу клітин.

Всі ці дані показують, що механізми апоптозу повинні відігравати важливу роль при елімінації та оновленні клітин пародонту. Але незважаючи на з'ясування сигналізації каскадів апоптозу, їхні зв'язки з клінічними проявами під час запалення пародонту майже повністю невідомі.

Метою даного дослідження стало визначення імуногістохімічних показників експресії маркерів апоптозу p53, p21, Bcl-2, каспази-3 в тканинах маргінального пародонту у хворих з хронічним та прогресуючим перебігом генералізованого пародонтиту порівняно з контрольною групою здорових випробовуваних.

Матеріали та методи дослідження.

В дослідженні приймали участь 86 пацієнтів (36 чоловіків та 50 жінок) віком від 27 до 45 років, які проходили лікування в КЗ «Обласна стоматологічна поліклініка» м. Дніпропетровська протягом 2010-2017 рр. 71 пацієнт мав діагноз генералізований пародонтит (ГП), 15 пацієнтів з інтактним пародонтом складала контрольну групу. За клініко-морфологічними особливостями перебігу ГП всі зразки основної групи були поділені на 2 підгрупи – пародонтити з хронічним та прогресуючим перебігом (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика клінічних даних пацієнтів

Характеристика клінічних даних пацієнтів	Кількість випадків (n=86)	Відсотки (%)
Стать		
Чоловіки	36	41,9%
Жінки	50	58,1%
Основна група:		
Хронічний перебіг ГП	35	40,7%
Прогресуючий перебіг ГП	36	41,9%
Контрольна група (інтактний пародонт)	15	17,4%

Для морфологічного дослідження використовували біоптати слизової оболонки ясен об'ємом 2-2,5мм. Забір біопсійного матеріалу здійснювався під час стоматологічних маніпуляцій (видалення зубного каменю, кюретажу) з ін'єкційним знеболенням 4% р-ром Ubistesin forte після інформованої згоди пацієнта. Біоптати ясен фіксували у 4% розчині нейтрального формаліну протягом доби і заливали у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації та регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів (зрізи були розміщені в цитратному буфері з рН 6.0 і підігрівалися в автоклаві при температурі +121°C 8 хвилин) та пригнічували активність ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню протягом 20 хвилин. Далі проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C протягом 30 хвилин. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до p21, p53, Bcl-2, каспаза-3, COX-2 (LabVision). Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркеру з використанням у якості розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (DakoCytomation). Для ідентифікації реакції використовували надчутливу систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision), з нанесенням в якості хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення специфічних структур. Для відокремлення неспецифічних тканинних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини.

Використовуючи алгоритм Şule Vulut із співавт. (2006) рівні інтрануклеарної експресії маркерів p21 (у запальному інфільтраті), p53 та Bcl-2 (в епітелії маргінального пародонту) були розбиті на 4 градації від 0 до 3+: (0) = не має забарвлення; (1+) = забарвлених клітин до 10%, (2+) = кількість забарвлених клітин варіює в діапазоні від 10 до 30% та градація (3+), де забарвлених клітин більше 30% відповідно. Цитоплазматичну експресію маркеру каспаза-3 оцінювали за бінарною шкалою: (0) = забарвлених клітин <30% запального

інфільтрату; (1+) = відповідно забарвлення >30% [13]. Згідно рекомендаціям Marshall R.I. із співавт. (2003) цитоплазматичну експресію маркеру COX-2 оцінювали за трьома градаціями забарвлених клітин: (1+) – слабкий інфільтрат, (2+) – помірний інфільтрат, (3+) – виражений запальний інфільтрат з позитивною міткою [10].

Оцінка була виконана в десяти випадково обраних полях мікроскопу під збільшенням ($\times 400$). Розрахунки показників проводили на сто відповідних клітин. Дані морфометричних та імуногістохімічних досліджень зазнавали статистичної обробки з використанням непараметричних коефіцієнтів за допомогою IBM PC сумісного комп'ютера "Pentium 4" в програмі SPSS Statistica 17.0.

Результати дослідження та їх обговорення.

В ході імуногістохімічних досліджень в зразках пародонту було оцінено цитоплазматичну реакцію маркеру каспаза-3 та інтрануклеарну реакцію маркерів p21, p53, Bcl-2. Результати розподілу експресії маркерів апоптозу за градаціями наведені в таблиці 2.

Треба відмітити, що онкопротейн-супресор p21 та ефекторна каспаза-3 демонстрували позитивне ПГХ забарвлення з різною інтенсивністю в клітинах запального інфільтрату стромы і в епітеліоцитах багат шарового плоского епітелію, що знаходяться в тісному взаємозв'язку між собою. Найвищі показники експресії цих маркерів ми спостерігали в ділянках активного запалення в групі прогресивного перебігу ГП. Контрольна група з інтактним пародонтом в обох дослідженнях показала 100% реакції на рівні слабкої експресії: з маркером каспаза-3 градація (0), з маркером p21 градація (+1) (табл. 3). Таким чином, має місце статистично вірогідна різниця між всіма групами дослідження (всі $p < 0,05$ відповідно) (табл. 3).

Розподіл кількості пацієнтів за градаціями експресії маркерів апоптозу

Градації експресії маркерів апоптозу	Кількість випадків (n=86)	Хронічний перебіг ГП (n=35)	Прогресуючий перебіг ГП (n=36)	Контроль-на група (n=15)	p
Каспаза-3 град. 0	39 (45,3%)	16 (45,7%)	8 (22,2%)	15 (100%)	$p_{ХГП}^* < 0,05$
Каспаза-3 град. 1	47 (54,7%)	19 (54,3%)	28 (77,8%)	0 (0%)	$p_{ПГП}^* < 0,05$
		0 (0%)	0 (0%)		$p_{ПГП}^{**} < 0,05$
		13 (37,1%)	0 (0%)	0 (0%)	
p21 град. 0	0 (0%)	12 (34,3%)	15 (41,7%)	15 (100%)	$p_{ХГП}^* < 0,05$
p21 град. 1	28 (32,6%)	10 (28,6%)	21 (58,3%)	0 (0%)	$p_{ПГП}^* < 0,05$
p21 град. 2	27 (31,4%)	11 (31,1%)	7 (22,2%)	0 (0%)	$p_{ПГП}^* < 0,05$
p21 град. 3	24 (27,9%)	24 (68,9%)	28 (77,8%)	0 (0%)	
p53 град. 0	31 (36,0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (40,0%)	$p_{ПГП}^{**} < 0,05$
p53 град. 1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (60,0%)	
p53 град. 2	24 (27,9%)	18 (51,4%)	23 (63,9%)	0 (0%)	
p53 град. 3	17 (19,8%)	17 (48,6%)	13 (36,1%)	0 (0%)	$p_{ХГП}^* > 0,05$
Bcl-2 град. 0	62 (72,1%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (26,7%)	$p_{ПГП}^* > 0,05$
Bcl-2 град. 1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (73,3%)	$p_{ПГП}^* > 0,05$
Bcl-2 град. 2	0 (0%)			0 (0%)	$p_{ПГП}^{**} > 0,05$
Bcl-2 град. 3	0 (0%)			0 (0%)	$p_{ПГП}^{**} > 0,05$
	45 (52,3%)				
	41 (47,7%)				$p_{ХГП}^* < 0,05$
	0 (0%)				$p_{ПГП}^* < 0,05$
	0 (0%)				$p_{ПГП}^{**} > 0,05$

При * – різниця вірогідна по відношенню до контрольної групи при 5% рівні значущості ($p < 0,05$);

** – різниця вірогідна по відношенню до хронічного пародонтиту при 5% рівні значущості ($p < 0,05$).

Аналізуючи експресію інших двох маркерів апоптозу p53 та Bcl-2, виявилось, що позитивна ПГХ реакція спостерігалася, більшим чином або виключно, в

базальному шарі багат шарового плоского епітелію пародонту, на відміну від каспази-3 та p21, що навпаки активно експресувалися клітинами запального інфільтрату. Експресія онкогену-супресору p53 трохи підвищувалась в групі ХГП (68,9%) і тим більше в групі ПГП (77,8%), порівняно з контрольною групою (60,0%), але статистично вірогідної різниці між групами дослідження виявлено не було (всі $p > 0,05$ відповідно) (табл. 3).

Антиапоптотичний білок Bcl-2 показав зниження експресії з підвищенням активності запалення пародонту (табл. 3), аж до повної втрати в більше половини зразків ПГП (63,9%) (рис. 2 Б). Згідно даних точного тесту Фішера статистично вірогідна різниця експресії Bcl-2 була знайдена між прогресуючим перебігом ГП і контрольною групою ($p_{\text{ПГП}}^* < 0,05$), між хронічним перебігом ГП і контрольною групою ($p_{\text{ХГП}}^* < 0,05$), але не існувало ніяких відмінностей між та ХГП і ПГП ($p_{\text{ПГП}}^{**} > 0,05$).

Висновки.

Таким чином, перебіг прогресивного ГП характеризувався більш вираженою експресією маркерів апоптозу каспаза-3 і p21 порівняно з контрольною групою ($p_{\text{ПГП}}^* < 0,05$), а також порівняно з хронічним ПГ ($p_{\text{ПГП}}^{**} < 0,05$). Стосовно антиапоптотичного протеїну Bcl-2, статистично вірогідна різниця виявилася тільки в порівнянні з контрольною групою ($p_{\text{ПГП}}^* < 0,05$).

Кількість статистичної невірогідної різниці показників експресії між контрольною групою та групою з прогресивним перебігом ГП (як між іншим і групою з хронічним перебігом ГП) стосувалося лише маркеру p53 ($p_{\text{ПГП}}^* > 0,05$), що ставить під сумнів прогностичну значущість останнього для оцінки динамічних змін процесів апоптозу при запаленні в тканинах маргінального пародонту.

Перебіг хронічного ГП показав аналогічну тенденцію, але із меншою різницею в показниках, порівняно з контрольною групою (табл. 3).

Аналіз показників експресії всіх вищезазначених маркерів в групах ПГП та ХГП між собою не дав вірогідної різниці лише при ІГХ дослідженнях з

онкосупресором p53 та антиапоптоичним протеїном Bcl-2 (обидва $p_{\text{ПГП}}^{**} > 0,05$ відповідно), що говорить про неможливість використання цих маркерів для визначення активності перебігу запалення пародонту при ГП.

Використана література:

1. Антиоксидантная терапия в комплексном лечении пародонтита / П.В. Иванов, И.В. Маланьин, А.В. Стоматов, Ю.В. Грибовская // *Фундаментальные исследования*. – 2008. – № 11. – С. 23–27.
2. Безрукова И.В. Агрессивные формы пародонтита / И.В. Безрукова, А.И. Грудянов. – М.: «Медицинское информационное агентство», 2002. – 127 с.
3. Вольф Г.Ф. Пародонтология / Г.Ф. Вольф, Э.М. Ратейцхак, К. Ратейцхак. – М.: «МЕДпресс-информ», 2008. – 548 с.
4. Грудянов А. И. Методы диагностики воспалительных заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, О.А. Зорина. – М.: «Медицинское информационное агентство», 2009. – 112 с.
5. Самойленко А.В. Патогенетическое значение различных пародонтальных микроорганизмов в развитии иммунологических и клинических нарушений у больных генерализованным пародонтитом // *Український стоматологічний альманах*. – 2001.- №6. – С. 44-47.
6. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry // J. Gamonal, A. Bascones, A. Acevedo [et al.] / *J. Periodontol.* – 2001. – Vol. 72. – P. 517–525.
7. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway // A. Agrawal, S. Agrawal, J.-N. Cao [et al.] / *J. of Immunology*. – 2007. – Vol. 2178. – P. 6912-6922. – Режим доступу до журн.: <http://www.jimmunol.org/content/178/11/6912>.
8. Apoptosis de fibroblastos gingivales en periodontitis // R. Mauricio Arce, O. Tamayo, A. Cortes / *Colomb Med.* – 2007. – Vol. 38. – P. 197–209.

9. Biomarkers of periodontitis in oral fluids / Balwant Rai, Simmi Kharb, Rajniish Jain, Suresh C. Anand // *J. of Oral Science*. – 2008. – Vol. 50, № 1. – P. 53–56.
10. COX-1 and COX-2 in human periodontal disease states / R.I. Marshall, E. Gemmell, C. Carter [et al.] // *Australian Dental J.* – 2003. – Vol. 48. – P. 4.
11. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients / J. Gamonal, M. Sanz, A. O'Connor [et al.] // *J. Clin Periodontol.* – 2003. – Vol. 30. – P. 616–628.
12. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients // J. Gamonal, M. Sanz, A. O'Connor [et al.] // *J. Clin Periodontol.* – 2003. – Vol. 30. – P. 616–623.
13. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive / Şule Bulut, Hilal Uslu, B Handan Özdemir, Ömer Engin Bulut // *Head & Face Medicine*. – 2006. – Vol. 2. – P. 17. – Режим доступа до журн.: www.head-face-med.com/content/2/1/17.
14. Ford P.J. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis / P.J. Ford, J. Gamonal, G.J. Seymour // *Periodontology 2000*. – 2010. – Vol. 53. – P. 111–123.
15. Immunohistochemical Detection of Activated Caspases in Apoptotic Hepatocytes in Rat Liver // Veit-Simon Eckle, Albrecht Buchmann, Wilfried Bursch, [et al.] // *Toxicologic Pathology*. – 2004. – Vol. 32. – P. 9–15.