

**ЦИТОКИНОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ В ПОЗДНИЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО БАКТЕРИАЛЬНО-ИММУННОГО ПАРОДОНТИТА****А.Е. Демкович, Ю.И. Бондаренко, Ю.В. Сорока**

ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МЗ Украины», г. Тернополь, Украина

Ключевые слова: бактериально-иммунный пародонтит, иммунная система, воспаление, провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины.**Key words:** bacterial-immune periodontitis, immune system, inflammation, inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines.

В статье приведены результаты исследований показателей цитокинового звена иммунной защиты организма у подопытных животных – белых крыс, которые определяли по уровню провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови животных на 30-е сутки развития экспериментального пародонтита. При этом обнаружены характерные изменения показателей цитокинового механизма иммунной системы на позднем этапе развития экспериментального бактериально-иммунного пародонтита. В частности, в период хронизации воспалительной реакции, на 30-е сутки исследования, устанавливалось стабильное повышение в сыворотке крови концентрации ИЛ-1 β и ФНО- α , а содержание ИЛ-10, ИЛ-4 при данных условиях стойко снижалось. При этом соотношение про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β / ИЛ-10), как важного показателя иммунной реакции, повышалось. На основании данных результатов было доказано, что формирование патологического процесса в поздний период развития воспалительной реакции в пародонтальном комплексе сопровождается дисбалансом в системе цитокиногенеза, что свидетельствует о ведущей роли их в регуляции иммунно-воспалительного ответа при данном моделируемом патологическом процессе.

**CYTOKINES MECHANISMS IN A LATE PERIOD OF EXPERIMENTAL BACTERIAL-IMMUNE
PERIODONTITIS DEVELOPMENT****A.Ye. Demkovych, Yu.I. Bondarenko, Yu.V. Soroka**

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

The article presents the results of research of the cytokine link of immune system in the experimental animals – white rats, which were determined by the level of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in blood serum of the intact animals and on the 30th day for experimental periodontitis development. For that characterised changes of the cytokine mechanism more expressed in a late stage of the experimental bacterial-immune periodontitis. In particular, in the period of chronic inflammatory response, on the 30th day of the study, were increased concentrations of IL-1 β and TNF- α , while the IL-10, IL-4 content decreased in these conditions. At that, the ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β / IL-10) as an important indicator of the immune response was increased. Based on these results, it was proved that the formation of the pathological process in the periodontal complex is accompanied in a result of imbalance in the cytokinogenesis system for the late period of the inflammatory response development, that evidence their leading role in the regulation of the immune-inflammatory response in this modeled pathological process.

Введение. Высокая распространенность заболеваний пародонта со склонностью к прогрессированию и многогранным влияниям на зубо-челюстную систему и организм в целом, а также неоднозначность лечения позволяют отнести их к числу актуальных проблем современной медицины [1,2]. Генерализованный пародонтит развивается под влиянием местных и общих факторов, ведущим из которых считается бактериальный [3]. Пародонтопатогенные факторы запускают ряд защитных реакций организма, приводя, в частности, к развитию воспаления тканей пародонтального комплекса [4,5]. Воспаление начинается в области десневой борозды и эпителиального прикрепления с последующим разрушением зубодесневого соединения и образованием пародонтального кармана, что и означает переход воспаления десен (гингивит) в пародонтит [6].

В настоящее время установлена ведущая роль про- и противовоспалительных цитокинов в регуляции иммунно-воспалительного ответа [7]. В качестве факторов резорбции кости альвеолярных отростков челюстей исследователи называют нарушение баланса между активностью остеобластов и остеокластов при воздействии продуктов жизнедеятельности бактерий (например, липополисахаридов), а также стимуляцию остеокластов с участием ИЛ

-1 β , ИЛ-6, ФНО- α [8]. Данные цитокины способны активизировать остеокластогенез и резорбцию кости остеокластами. Усиленная миграция макрофагов под влиянием цитокинов и их постоянное присутствие в тканях усиливает деструктивные процессы в пародонте [9]. При этом степень резорбции альвеолярной кости зависит от выраженности аутоиммунных реакций организма на бактериальную инвазию. Противовоспалительные цитокины (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12) ингибируют этот процесс и в отличие от провоспалительных цитокинов приостанавливают остеопороз и подавляют макрофагальную активность, способствуя облегчению течения воспалительной реакции в пародонтальном комплексе [10].

Однако, взаимосвязь между клинико-морфологическими показателями и медиаторами воспалительно-деструктивного процесса в пародонте изучены недостаточно, поэтому прогресс в понимании механизмов развития воспалительного процесса в пародонтальном комплексе позволит не только глубже представлять взаимосвязь между воспалением и иммунной системой, но и позволит внедрить в пародонтологию новые методы лечения, основанные на модулирующей роли цитокинов в регуляции иммунного ответа организма [11].

Цель исследования. Выяснить патогенетическую роль цитокиногеза на поздних этапах развития экспериментального бактериально-иммунного пародонтита.

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных клинически здоровых крысах-самцах массой 150-200 г в условиях вивария. Животные находились на стандартном рационе, сбалансированном по элементам питания. Эксперименты проводились с соблюдением общих правил и положений Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 1986), общих этических принципов экспериментов на животных (Киев, 2001).

Подопытные животные были разделены на две экспериментальные группы: первая группа – интактные животные, контроль ($n = 10$); вторая группа – животные с экспериментальным пародонтитом на 30-е сутки ($n = 8$). Экспериментальный бактериально-иммунный пародонтит у подопытных животных вызывали путем введения в ткани пародонтального комплекса смеси микроорганизмов, разбавленной яичным протеином [12]. С целью усиления иммунного ответа одновременно выполнялась инъекция полного адьюванта Фрейнда в заднюю лапку крысы. На 14-е сутки эксперимента проводилось повторное введение патогена и инъекция адьюванта. Для выполнения дальнейших исследований отбирали сыворотку крови, в которой определяли содержание фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерлейкина-1 бета (ИЛ-1 β), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-10 (ИЛ-10) методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя набор реагентов «RayBio Rat Cytokine Antibody Array» (RayBiotech, Norcross, США) [13]. Концентрацию ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-10 выражали в нг/л. Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программного обеспечения «STATISTICA» 10.0 («Statsoft», США) [14]. Достоверность различий значений между независимыми количественными величинами определяли при нормальном распределении по U-критерию Манна-Уитни [15].

Результаты и их обсуждение. В проведенных нами исследованиях установлено, что у животных с экспериментальным генерализованным пародонтитом (на позднем этапе развития воспалительного процесса) в сыворотке крови достоверно повышенное содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО- α , по сравнению с интактными (табл. 1).

ИЛ-1 β относится к группе провоспалительных цитокинов и является активатором Т-клеток, НК-клеток, НКТ-клеток, стимулирует образование Т-клетками цитокинов [16].

При детальном анализе полученных результатов исследования, что касается провоспалительных цитокинов, то при этом оказалось, что содержание ИЛ-1 β в сыворотке крови животных с экспериментальным бактериально-иммунным пародонтитом на 30-е сутки исследования увеличилось на 247,26% ($p < 0,01$) относительно показателей контрольной группы.

При исследовании ФНО- α , который стимулирует активность лейкоцитов, продукцию клетками ИЛ-1 β , ИЛ-6 и оказывает деструктивное воздействие на ткани, было обнаружено,

Таблица 1.

Содержание цитокинов в сыворотке крови подопытных животных в поздний период развития экспериментального пародонтита ($M \pm m$)

Форма опыта	Контроль. Интактные животные	Животные с экспериментальным пародонтитом
Продолжительность эксперимента (сутки)	-	30
Количество животных	10	8
ИЛ-1 β , нг/л	8,40 $\pm$ 0,51	29,17 $\pm$ 0,83 p<0,01
ФНО- α , нг/л	25,80 $\pm$ 0,51	33,20 $\pm$ 2,11 p<0,05
ИЛ-10, нг/л	71,06 $\pm$ 2,96	29,20 $\pm$ 3,47 p<0,01
ИЛ-4, нг/л	20,05 $\pm$ 1,04	10,82 $\pm$ 0,79 p<0,01
ИЛ-1 β / ИЛ-10	0,12 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,11 p<0,01

Примечание: p – достоверность различий относительно интактных животных.

что на 30-е сутки развития воспаления в тканях пародонтального комплекса содержание данного цитокина в сыворотке крови увеличилось на 45,61%; p<0,05) по сравнению с контролем (рис. 1).

Относительно изменений содержания противовоспалительных цитокинов, к которым относится ИЛ-10 и ИЛ-4, то концентрация их в крови животных при данном моделируемом воспалительном процессе изменилась в противоположном направлении (табл. 1).

ИЛ-10 относится к группе противовоспалительных цитокинов, является важным эндогенным регулятором иммунных и воспалительных процессов, способен подавлять активацию и функции Т-клеток, НК-клеток, макрофагов, продукцию ими провоспалительных цитокинов [17]. Так, на 30-е сутки эксперимента, содержание данного интерлейкина в крови крыс уменьшилось на 58,91% (p<0,01) относительно показателей интактных животных (рис. 2).

Что касается изменения содержания другого противовоспалительного цитокина – ИЛ-4 в сыворотке крови экспериментальных животных с пародонтитом, то следует отметить, что на 30-е сутки исследования характер изменений оказался подобным предыдущему, то есть произошло достоверное уменьшение содержания ИЛ-4 (рис. 2) относительно данных контрольной группы (на 46,03%; p<0,01).

Вследствие снижения содержания противовоспалительных и повышение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови подопытных животных возник их дисбаланс (ИЛ-1 β / ИЛ-10). При сравнении соотношения ИЛ-1 β / ИЛ-10 в сыворотке крови экспериментальных животных оказалось, что оно было значительно больше по сравнению с данным показателем группы интактных животных на 808,33% (p<0,01). Динамическое повышение соотношения ИЛ-1 β / ИЛ-10 указывает на прогрессивное развитие воспалительной реакции в пародонтальных тканях (рис. 3).

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на участие провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в патогенезе воспалительной реакции в пародонтальном комплексе.

Выводы:

1. Формирование экспериментального пародонтита на поздней стадии развития воспалительной реакции в тканях пародонтального комплекса (30 день) сопровождается комплексом иммунно-цитокиновых изменений, которые характеризуются достоверным прогресси-

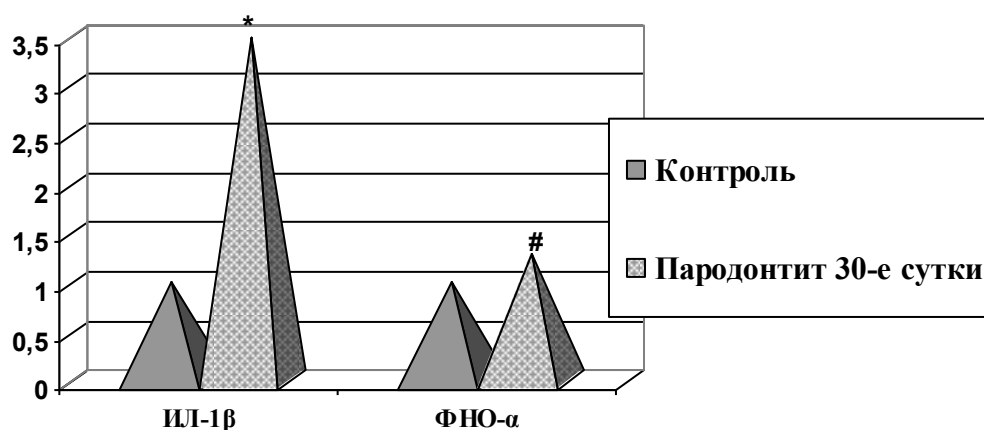


Рис. 1. Динамика содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови белых крыс в условиях развития экспериментального пародонтита (разы, относительно контроля).

Примечания: * – достоверность различий относительно интактных животных ($p < 0,01$);
– достоверность различий относительно интактных животных ($p < 0,05$).

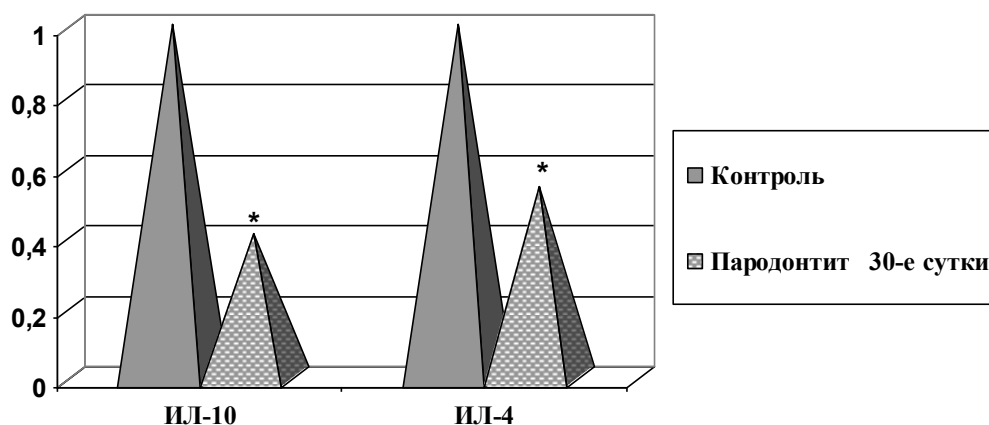


Рис. 2. Динамика содержания противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови белых крыс в условиях развития экспериментального пародонтита (разы, относительно контроля).

Примечание: * – достоверность различий относительно интактных животных ($p < 0,01$).



Рис. 3. Динамика соотношения провоспалительных цитокинов к противовоспалительным у крови белых крыс в условиях развития экспериментального пародонтита (разы, относительно контроля).

Примечание: * – достоверность различий относительно интактных животных ($p < 0,01$).

рующим увеличением концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови животных, в частности ФНО- α и ИЛ-1 β , и свидетельствует об участии их в патогенезе заболеваний пародонта.

2. При экспериментальном бактериально-иммунном пародонтите (на 30-е сутки исследования) уменьшается уровень в сыворотке крови животных противовоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-10 и ИЛ-4, что свидетельствует о недостаточности их в регуляции иммунно-воспалительного ответа при данной моделируемой патологии и хронизации воспалительного процесса.

Использованная литература:

1. Cekici A. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease / A. Cekic, A. Kantarci, H. Hasturk [et al.] // *Periodontol* 2000. – 2014. – V. 64, №1. – P. 57-80.
2. Silva N. Host response mechanisms in periodontal diseases / N. Silva, L. Abusleme, D. Bravo [et al.] // *J Appl Oral Sci.* – 2015. – V. 23, №3. – P. 329-355.
3. Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium / G. Hajishengallis, T. Abe, T. Maekawa [et al.] // *Semin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25, № 1. – P. 65-72.
4. Demkovych A. Ye. Necrotic and apoptotic changes of neutrophils and mononocytes of blood in experimental periodontitis and their corrections by quercetin / A. Ye. Demkovych // *Фізіологічний журнал.* – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 33-40.
5. Demkovych A. Oxidative modification of proteins in the process of experimental periodontitis development / A. Demkovych, Yu. Bondarenko, P. A. Hasiuk // *Interventional Medicine and Applied Science.* – 2017. – Vol. 9, № 4. – P. 218-221.
6. Борисенко А. В. Заболевания пародонта / А. В. Борисенко // Киев: ВСИ «Медицина». – 2013. – 455 с.
7. Волкова М.Н. Исследование интерлейкина 1 β , интерферона γ , интерлейкина 2 в ротовой жидкости пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом, хроническим гингивитом и периодонтально здоровых / М.Н. Волкова, В.В. Янченко // *Цитокины и воспаление.* – 2011. – Т.10. – № 4. – С.56-60.
8. Liu Y. C. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles / Y. C. Liu, U. H. Lerner, Y. T. Teng // *Periodontol.* 2000. – 2010. – № 52. – P. 163-206.
9. Biochemical markers as predictors of bone remodelling in dental disorders: a narrative description of literature / M. Duvina, L. Barbato, L. Brancato [et al.] // *Clin. Cases Miner Bone Metab.* – 2012. – № 9 (2). – P. 100-106.
10. Deo V. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response / V. Deo, M. L. Bhongade // *Dent. Today.* – 2010. – № 29 (9). – P. 60-62, 64-66.
11. Periodontitis and bone metabolism / L. Barbato, E. Francioni, M. Bianchi [et al.] // *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* – 2015. – № 12 (2). – P. 174-177.
12. Демкович А. Є. Патогенетичні основи моделювання пародонтиту у тварин / А. Є. Демкович, Ю. І. Бондаренко // *Здобутки клінічної і експериментальної медицини.* – 2015. – № 1 (22). – С. 54-57.
13. Сенников С. В. Методы определения цитокинов / С. В. Сенников, А. Н. Силков // *Цитокины и воспаление.* – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 22-27.
14. Орлов А. И. Математика случая: Вероятность и статистика – основные факты: учебное пособие / А. И. Орлов. – М.: МЗ-Пресс, 2004. – 100 с.
15. Berger. R. L., Casella. G. *Statistical Inference* 2nd ed. – Florida: Duxbury Press. – 2001. – 374 p.
16. Endothelin-1 stimulates proinflammatory cytokine expression in human periodontal ligament cells via mitogen-activated protein kinase pathway / L. Liang, J. Yu, W. Zhou [et al.] // *J. Periodontol.* – 2014. – Vol. 85, № 4. – P. 618-626.
17. Wilson E. B. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections / E. B. Wilson, D. G. Brooks // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 2011. – № 350. – P. 39-65.