

УДК 616.314.17-002-06:[616.329-002.2-02:616.33-008.17]-036-091.8:612.017.1]-07(045)

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПАРОДОНТА ПРИ НЕЭРОЗИВНОЙ ФОРМЕ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ: КЛИНИЧЕСКИЕ И ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Осипова Ю.Л., Булкина Н.В., Кропотина А.Ю.

ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, e-mail: meduniv@sgmu.ru

Цель исследования определить показатели клеточного обновления эпителиоцитов десны при воспалительных заболеваниях пародонта у больных неэрозивной формой гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (НФГЭРБ). Обследовано 120 больных. 60 больных НФГЭРБ с гингивитом и пародонтитом, 40 больных эрозивной формой (ЭФГЭРБ) с гингивитом и пародонтитом. Группу сравнения составили 20 практически здоровых лиц. Установлено, что гингивит и пародонтит являются последовательными стадиями нарушения клеточного обновления эпителиоцитов десны, усилением процессов пролиферации и замедлением процессов апоптоза. Успешно проведенное лечение улучшает показатели клеточного обновления.

Ключевые слова: пародонтит, гингивит, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ), пролиферация эпителиальных клеток, апоптоз

INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES AT NONEROSIVE FORM OF GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE: CLINICAL AND IMMUNOMORPHOLOGICAL ASPECTS

Osipova Y.L., Bulkina N.V., Kropotina A.Y.

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: meduniv@sgmu.ru

The aim of the research is to determine parameters of the cellular renewal of the gum epitheliocytes at inflammatory diseases of periodontitis in patients with nonerosive form of gastroesophageal reflux disease (NEGERD). 120 patients were examined. 60 patients having NEGERD with gingivitis and periodontitis, 40 patients having erosive form of the GERD with gingivitis and periodontitis. The comparison group consisted of 20 healthy persons. It is established that gingivitis and periodontitis are successive stages of disturbance of the cellular renewal of gum epitheliocytes, the enhancement of the processes of proliferation and slowing down the processes of apoptosis. Successful treatment improves the indices of cell renewal.

Keywords: periodontitis, gingivitis, gastroesophageal reflux disease (GERD), proliferation epithelial cells, apoptosis

Широкая распространенность воспалительных заболеваний пародонта, склонность к длительному и прогрессирующему течению определяют разработку вопросов этиопатогенеза, совершенствования методов лечения как одну из главных проблем современной стоматологии. В формировании воспалительных заболеваний пародонта существенное значение имеют системные изменения организма в целом и, в частности, заболевания органов пищеварения [1]. Частое сочетание гингивита, пародонтита с заболеваниями пищевода и желудка говорит о закономерности этой связи и об универсальности механизмов их развития.

Важную роль в прогрессировании нарушений клеточного гомеостаза эпителиоцитов слизистой полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта на фоне гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) принадлежит Ki-67, антиапоптозной молекуле Bcl-2 и апоптозу [2, 3, 4, 5]. Однако характер и степень изменений этих показателей при прогрессировании пародонтита на фоне катарального эзофагита недостаточно изучены. Данные, характеризующие соотношение пролиферации и апоптоза при различных степенях тяжести пародонтита

на фоне ГЭРБ, в литературе немногочисленны. В свою очередь, решение данных вопросов позволило бы улучшить раннюю диагностику, оптимизировать лечение и повысить качество жизни этой категории больных.

Цель исследования – определить параметры клеточного обновления эпителиоцитов десны при воспалительных заболеваниях пародонта у больных неэрозивной формой гастроэзофагеальной рефлюксной болезни.

Материалы и методы исследования

Всего обследовано 120 больных, из них 60 пациентов с заболеваниями пародонта на фоне неэрозивной формы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (НФГЭРБ), 40 пациентов с эрозивной формой (ЭФГЭРБ) и воспалительными заболеваниями пародонта, группы сравнения составили 20 практически здоровых лиц. Больные и здоровые обследованы в динамике по единой программе, включающей клинические методы исследования. Диагностику заболеваний пародонта проводили в соответствии с терминологией и классификацией болезней пародонта, утвержденными на XVI Пленуме Всесоюзного общества стоматологов (1983). Больным проводили комплексное клинико-рентгенологическое обследование тканей пародонта. Оценивали изменение цвета слизистой оболочки десны; степень кровоточивости десен [Muhlemann, 1971]; глубину пародонтальных

карманов (ВОЗ, 1989); патологическую подвижность зубов [Fleszar T.J. et al., 1980]. Также проводили индексную оценку состояния тканей пародонта, используя упрощенный индекс гигиены по Грину – Вермильону (1965); папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА) [Parma G., 1960]; пародонтальный индекс (ПИ), [Russel A., 1967]. Проводили рентгенологическое обследование зубочелюстной системы. Диагноз ГЭРБ устанавливался на основе результатов комплексного клинико-морфологического обследования и базировался на рекомендациях, принятых в 1997 г. в Генвале (Бельгия) международной группой по изучению рефлюксной болезни. Наблюдение за больными проводили по единой программе, включающей общеклиническое обследование, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, фиброгастродуоденоскопию (ФГДС), общее морфологическое и цитологическое, иммуногистохимическое исследования.

Для морфологической диагностики проводили биопсию слизистой оболочки маргинального края десны, десневых сосочков, а также слизистой оболочки в области переходной складки десны. Биопсийный материал фиксировался в 10% забуференном нейтральном формалине, по Лилли, в течение 24 часов с последующей промывкой в проточной воде в течение суток. После фиксации материал обезжизнялся и заливался в парафин. Для обзорного гистологического изучения депарафинированные серийные срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Для выявления апоптотных ядер исследуемый материал импрегнировали по Мозеру (1995). Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных мышечных антител к маркеру пролиферирующих клеток – Ki-67 (1:100, Novocastra) и к антиапоптотному белку Bcl-2 (1:100, Novocastra). В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышечные иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты от Novocastra).

Морфологические изображения, поступающие через оптическую систему микроскопа Nikon Eclipse 400 (увеличение $\times 320$: объектив 40, окуляр 10, фильтр 0,8), регистрировались цифровой цветной видеокамерой Nikon DXM1200, вмонтированной в тубус микроскопа, и передавались в компьютер Pentium-4. Количество Ki-67 и Bcl-2 – иммунопозитивных ядер клеток автоматически подсчитывалось в 10 рандомизированных полях зрения. При указанном увеличении и цифровые данные пересчитывались на 1 мм^2 с помощью пакета прикладных морфометрических программ «Видеотест-Морфология 4.0».

Гибель клеток в форме апоптоза определяли по индексу апоптоза ($I_{\text{АПТ}}$) по формуле $I_{\text{АПТ}} (\%) = N$ (число апоптотных ядер, окрашенных по методу Мозера) / N (общее число ядер) $\cdot 100$. Нами введен показатель $Ki-67/I_{\text{АПТ}}$ наилучшим образом характеризующий состояние клеточного гомеостаза.

Результаты исследования и их обсуждение

В соответствии с результатами обследования состояния пародонта, среди пациен-

тов с НФГЭРБ преобладали лица с генерализованным пародонтитом легкой степени (41,2%) или генерализованным катаральным гингивитом (28,0%), а среди пациентов с ЭФГЭРБ – с генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени тяжести (41,8%). В результате проведенного иммуногистохимического исследования установлено, что в норме эпителиоциты слизистой полости рта проявляют низкий потенциал пролиферативной и антиапоптотной активности – $I_{\text{Ki-67}} 10,5 \pm 0,7$; $I_{\text{Bcl-2}} 2,1 \pm 0,6$; $I_{\text{АПТ}}$ соответствует пролиферативной активности эпителиоцитов и составляет $0,50 \pm 0,02$. При хроническом гингивите как на фоне НФГЭРБ ($I_{\text{Ki-67}} 12,3 \pm 1,2$), так и ЭФГЭРБ ($I_{\text{Ki-67}} 12,7 \pm 1,5$) изменения показателей пролиферативной способности и апоптоза эпителиальных клеток десны не существенны. У пациентов с хроническим пародонтитом на фоне НФГЭРБ установлено достоверное повышение пролиферативной способности и увеличение процента гибели эпителиальных клеток десны в форме апоптоза ($I_{\text{Ki-67}} 34,6 \pm 2,0$; $I_{\text{Bcl-2}} 12,1 \pm 0,7$; $I_{\text{АПТ}} 0,65 \pm 0,04$) по сравнению со значениями у практически здоровых и у пациентов с хроническим гингивитом ($I_{\text{Ki-67}} 12,3 \pm 1,2$; $I_{\text{Bcl-2}} 3,1,1 \pm 0,7$; $I_{\text{АПТ}} 0,45 \pm 0,05$).

Из полученных данных видно, что изменение индекса пролиферации было односторонним и характеризовалось его достоверным повышением соответственно тяжести пародонтита. Обращает на себя внимание тот факт, что при хроническом пародонтите пролиферативная активность эпителиоцитов десны повышалась в большей степени (в 3,4 раза по сравнению со значением в группе практически здоровых лиц), чем показатель их апоптоза, увеличение которого было менее значимым (в 1,3 раза).

Следовательно, в эпителии десны, при хроническом генерализованном пародонтите преобладают пролиферативные процессы. Высокий уровень пролиферации обусловлен не только ее прямой стимуляцией, но и включением механизмов отрицательной обратной связи. Это подразумевает, что ускоренная гибель клеток приводит к их повышенному новообразованию. В свою очередь, усиленная пролиферация активирует апоптоз. Однако в отношении взаимосвязи пролиферации и апоптоза пока сложно определить, что является первичным. У пациентов с заболеваниями пародонта количество иммунопозитивных bcl-2-ядер в эпителии десны было увеличено соответственно тяжести поражения пародонта и пищевода: на фоне НФГЭРБ ($I_{\text{Bcl-2}} 3,1,1 \pm 0,7$ гингивит до $I_{\text{Bcl-2}} 12,1 \pm 0,7$; средне-тяжелое течение пародонтита) и соответственно

ЭФГЭРБ от $I_{Bcl-2} = 4,0,1 \pm 0,8$ гингивит до $I_{Bcl-2} = 15,1 \pm 0,7$; средне-тяжелое течение пародонтита). Полученные данные позволяют предположить, что в основе дисбаланса между процессами апоптоза и пролиферации при пародонтите на фоне эзофагеальной рефлюксной болезни лежит генетически детерминированные или приобретенные нарушения синтеза белка bcl-2. Кроме того, высокий индекс bcl-2-положительных ядер способствует задержке апоптоза воспалительных клеток, которые дольше остаются в тканях пародонта, продуцируют чрезмерное количество цитокинов, способствуя, тем самым, прогрессированию деструкции пародонта.

Проведенные через 2 месяца после эрадикационной терапии иммуногистохимические исследования показали значимое улучшение показателей клеточного обновления у всех обследованных групп пациентов: при гингивите – $I_{Ki-67} = 13,5 \pm 1,2$; $I_{Bcl-2} = 3,0 \pm 0,5$; $I_{АПТ} = 0,43 \pm 0,06$; при пародонтите $I_{Ki-67} = 16,6 \pm 1,2$; $I_{Bcl-2} = 3,3 \pm 0,7$; $I_{АПТ} = 0,63 \pm 0,06$. Происходило резкое снижение пролиферативного потенциала эпителиоцитов, на фоне относительно небольшого сокращения $I_{АПТ}$. Улучшение показателей клеточного гомеостаза после проведенной противовоспалительной терапии заболеваний пародонта и эрадикационной терапии пищевода объясняется падением активности воспалительного процесса в слизистой оболочке полости рта и пищевода и, как следствие этого, уменьшением альтеративных процессов, так как скорость пролиферации находится в прямой зависимости от степени повреждения клеток.

Выводы

Клеточное обновление эпителиоцитов при воспалительных заболеваниях пародонта на фоне эрозивной и неэрозивной форм ГЭРБ характеризуется прогрессирующим отставанием апоптоза эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта от скорости пролиферативных процессов. При воспалительных заболеваниях пародонта в эпителии десны преобладают гиперпролиферативные процессы, обусловленные ускоренной гибелью клеток. Комплексная противовоспалительная и эрадикационная терапия достоверно улучшает показатели клеточного обновления в тканях пародонта, что сопровождается уменьшением отношения пролиферации к апоптозу через 2 месяца после проведенного лечения.

Список литературы

1. Булкина Н.В. Хронический пародонтит при заболеваниях органов пищеварения: клинко-инструментальные,

морфологические и иммуногистохимические критерии возникновения и прогнозирования течения: дис. ... д-ра мед. наук. – Волгоград, 2004. – С. 89–117.

2. Булкина Н.В., Косачев М.А., Осадчук М.А. Заболевания пародонта при патологии органов пищеварения. – Самара: ООО «Офорт», 2006. – С. 48–85.

3. Осадчук А.М., Коган Н.Ю., Кветной И.М. Показатели пролиферации и апоптоза в патогенезе и прогнозировании течения заболеваний желудка, ассоциированных *H. Pylori* // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2007. – Т. 17, №4. – С. 20–24.

4. Осадчук А.М., Детюченко В.П., Милова-Филиппова Л.А. Влияние антигеликобактерной терапии на показатели клеточного гомеостаза (Ki-67, Bcl-2 и апоптоз) эпителиоцитов желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Рос.журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2008. – Т18, №4. – С. 41–47.

5. Jorge O., Cuello Carridin F.D., Jorge A. Helicobacter pylori infection affects the expression of PCNA, p53, cerbB-2 and Bcl-2 in the human gastric mucosa // Rev. Esp. Enferm. Dig. – 2003. – Vol. 95, №2. – P. 89–104.

6. Moss S.F., Calan J., Agarwal B. et al. Induction of gastric epithelial apoptosis by Helicobacter pylori // Gut. – 1996. – Vol. 38. – P. 498–501.

7. El-Zimaiti H.M., Graham D.Y., Genta R.M. et al. Sustained increase in gastric antral epithelial cell proliferation despite cure of Helicobacter pylori infection // Am. J. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 95, № 4. – P. 930–935.

References

1. Bulkina N.V. *Hronicheskiy parodontit pri zabojevanijah organov piwevarenija: kliniko-instrumental'nye, morfologicheskie i immunogistohimicheskie kriterii vozniknovenija i prognozirovanija techenija*: diss. ...d-ra med. nauk. Volgograd, 2004 S.89-117.

2. Bulkina N.V., Kosachev M.A., Osadchuk M.A. *Zabojevanija parodonta pri patologii organov piwevarenija*. Samara: ООО «Ofort», 2006. S.48-85.

3. Osadchuk A.M., Kogan N.Ju., Kvetnoj I.M. *Pokazateli proliferacii i apoptoza v patogeneze i prognozirovanii techenija zabojevanij zheludka, associirovannyh – H. Pylori Ros.zhurn. gastrojenterol. Gepatol. Koloproktol.* 2007. T17, №4. S. 20-24.

4. Osadchuk A.M., Detjuchenko V.P., Milova-Filippova L.A. *Vlijanie antigelikobakternoj terapii na pokazateli kletocnogo gomeostaza (Ki-67, Bcl-2, apoptoz) jepiteliocitov zheludka pri jazvennoj bolezni dvenadcatiperstnoj kishki Ros.zhurn. gastrojenterol – Gepatol. Koloproktol.* 2008. T18, №4. S. 41-47.

5. Jorge O., Cuello Carridin F.D., Jorge A. *Helicobacter pylori infection affects the expression of PCNA, p53, cerbB-2 and Bcl-2 in the human gastric mucosa Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2003. Vol.95, N 2. P. 89-104.

6. Moss S.F., Calan J., Agarwal B. et all. *Induction of gastric epithelial apoptosis by Helicobacter pylori Gut.* 1996. Vol. 38. P.498-501.

7. El-Zimaiti H.M., Graham D.Y., Genta R.M. et all. *Sustained increase in gastric antral epithelial cell proliferation despite cure of Helicobacter pylori infection Am. J. Gastroenterol.* 2000. Vol. 95, № 4. P. 930-935.

Рецензенты:

Лепилин А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», г. Саратов;

Михальченко В.Ф., д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии терапевтической ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 16.01.2012.