

На правах рукописи

БАЛЫКИН РОМАН АНАТОЛЬЕВИЧ

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ
ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ПАРОДОНТИТА

14.01.14 - Стоматология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Зорина Оксана Александровна**

доктор медицинских наук, профессор **Ганковская Людмила Викторовна**

Официальные оппоненты:

Амхадова Малкан Абдрашидовна - доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им.М.Ф. Владимирского», факультет усовершенствования врачей, кафедра хирургической стоматологии и имплантологии, заведующая кафедрой.

Нестерова Ирина Вадимовна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, кафедра аллергологии и иммунологии факультета непрерывного медицинского образования, заведующая кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 24 октября 2019 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета (Д 208.111.01) при федеральном государственном бюджетном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119021, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д.16 (конференц зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.cniis.ru федерального государственного бюджетного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (119021, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д.16)

Автореферат разослан _____ 2019 г.

Учёный секретарь

Диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Гусева Ирина Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заболевания пародонта среди взрослого населения представляют одну из актуальных проблем стоматологии во всем мире. Благодаря внедрению в практику современных технологий, удалось выявить основные механизмы развития данного заболевания на молекулярно-генетическом уровне [Грудянов А.И. и соавт., 2009; 2016; 2017; Зорина О.А. и соавт., 2011; 2016; 2017; Cochran D. L. et al, 2008; 2015; Lin Z. et al, 2015; Yamaguchi Y. et al, 2017].

Эпителиальные клетки слизистой оболочки десны вместе с гуморальными и клеточными факторами слюны и десневой жидкости образуют первую линию защиты организма от инфекции и играют решающую роль в отношении пародонтопатогенных бактерий [Beklen A. et al, 2014; Savitri I. J. et al, 2015]. Эпителий слизистой оболочки десны экспрессирует Toll-подобные - рецепторы (TLR), которые распознают липополисахариды анаэробных бактерий и способствуют выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов и других медиаторов, регулирующих воспаление [Lin J. et al, 2014; Sun Y. et al, 2014]. Наряду с цитокинами эпителий слизистой оболочки десны продуцирует противомикробные пептиды β -дефензины (hBD), которые обладают широким спектром антимикробной активности, вызывая гибель микроорганизмов вследствие нарушения целостности их мембран [Lu Q. et al, 2009; Curtis M.A. et al, 2011; Cui D. et al, 2017].

Факторы врожденного иммунитета играют роль не только в противомикробной защите, они также поддерживают условия, необходимые для заживления и регенерации тканей пародонта. Поэтому различные лечебные подходы, влияющие на факторы врождённого иммунитета, рассматриваются как эффективные и перспективные [Payne J.V. et al, 2011]

На современном этапе лечения пародонтита предпринимаются попытки восстановления одновременно всех структур пародонта и активно

внедряются методы тканевой инженерии и направленной регенерации тканей [Cochran D. L. et all, 2008; 2015].

Одно из направлений стимуляции репаративной регенерации предполагает влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток тканей цитокинами и факторами роста, вырабатываемые аутологичными клетками иммунной системы [Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., 1995; 2000].

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день разработаны ряд тест-систем и налажен выпуск коммерческих наборов для определения TLR - рецепторов и цитокинов в биологических жидкостях человека. Определение факторов врождённого иммунитета позволяет совершенствовать методы диагностики воспалительных заболеваний различной этиологии. Благодаря этим методам изучена роль факторов врождённого иммунитета в патогенезе пародонтита.

Цитокиноотерапию активно используют во многих областях медицины: офтальмологии, гинекологии, хирургии. Метод применения аутологичного комплекса цитокинов разработан в нашей стране. Медицинская технология "Метод персонифицированной иммунотерапии" основана на локальном применении индивидуальной композиции иммунопептидов, полученных при культивировании лейкоцитов крови пациента. В зарубежной литературе подобных работ нам не встретилось.

Применение комплекса иммунопептидов при хирургическом лечении пародонтита позволяет повысить его эффективность, за счет влияния на репарацию тканей.

Цель исследования

Повышение эффективности хирургического лечения пародонтита путем применения аутологичного комплекса иммунопептидов.

Задачи исследования

1. Исследовать экспрессию гена Toll-подобного-рецептора TLR4 и β -дефензина hBD-3 в эпителии десны у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и оценить зависимость этих показателей от степени пародонтита.
2. Определить уровень провоспалительного цитокина IL-6 и противовоспалительного цитокина - TGF β 1 в десневой жидкости у пациентов с пародонтитом
3. Разработать алгоритм применения аутологичного комплекса иммунопептидов с активностью TNF α , TGF β -1 и противомикробного фактора α -дефензина (HNP) при хирургическом лечении пациентов с пародонтитом.
4. Оценить клиническую эффективность персонализированной иммунотерапии при хирургическом лечении пациентов с пародонтитом.
5. Рассмотреть уровень факторов врождённого иммунитета после хирургического лечения с применением аутологичного комплекса иммунопептидов.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование факторов врожденного иммунитета, экспрессии гена Toll-подобного-рецептора (TLR4) и β -дефензина (hBD-3) эпителием десны, цитокинового состава десневой жидкости (IL-6 и TGF β 1) для обоснования локального применения аутологичного комплекса иммунопептидов при хирургическом лечении пародонтита.

Впервые обоснован способ иммунотерапии пародонтита, заключающийся в локальном применении аутологичного комплекса иммунопептидов, состоящего из противомикробного иммунопептида α -дефензина-HNP, и набора цитокинов - ФНО α , TGF β -1, стимулирующего регенерацию тканей пародонта.

Впервые разработан алгоритм применения аутологичного комплекса иммунопептидов, при хирургическом лечении пародонтита.

Впервые установлено, что с помощью аутологичного комплекса иммунопептидов сокращаются сроки достижения лечебного эффекта, за счет быстрого снятия симптомов воспаления и ускорения репаративных процессов. Одновременно нормализуются показатели врожденного иммунитета, и достигается высокая концентрация TGF β -1 в десневой жидкости.

Теоретическая и практическая значимость

Обоснована целесообразность изучения состояния иммунной защиты при воспалительных заболеваниях пародонта для обоснования применения персонализированной иммунотерапии

Разработан информативный комплекс клинико-иммунологического обследования тканей пародонта, позволяющего решать вопрос о включении иммунотерапии с использованием аутологичного комплекса иммунопептидов в хирургическом лечении пародонтита.

Разработан алгоритм применения аутологичного комплекса иммунопептидов, содержащего цитокины и противомикробные пептиды, при хирургическом лечении пародонтита.

Методология и методы исследования

Диссертация выполнена в соответствии с принципами и правилами доказательной медицины. Используются клинические, рентгенологические, иммунологические и статистические методы исследования. Объектом исследования были 85 пациентов с ХГП обоих полов в возрасте от 36 до 65 лет. Предмет исследования - изучение факторов врожденного иммунитета (цитокинов IL-6 и TGF β -1 в десневой жидкости и экспрессии генов Toll-подобного-рецептора (TLR4) и противомикробного пептида β -дефензина (hBD-3) эпителием десны) до и после проведения хирургического лечения пародонтита с локальным применением аутологичного комплекса иммунопептидов.

Иммунологическое исследование включало определение экспрессии гена TLR4 и hBD-3 в эпителии десны методом ПЦР-диагностики в реальном времени и цитокинов IL-6, TGF β -1 в десневой жидкости методом ИФА.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комплексное исследование экспрессии гена TLR4 и β -дефензина hBD-3 эпителием десны, и цитокинов (IL-6 и TGF β -1) в десневой жидкости, является информативным подходом оценки состояния врожденной иммунной защиты пародонта и обоснованием целесообразности применения персонализированной иммунотерапии в хирургическом лечении пародонтита.

2. Применение аутологичного комплекса иммунопептидов, содержащего цитокины (TNF α , TGF β -1) и противомикробный пептид (α -дефензин), при хирургическом лечении пародонтита сокращает сроки достижения лечебного эффекта за счет быстрого снятия симптомов воспаления и ускорения репаративных процессов. Одновременно нормализуются показатели врожденного иммунитета, и достигается высокая концентрация TGF β -1 в десневой жидкости.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в практику терапевтического отделения ФГБУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздрава России и в учебный процесс кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством клинического материала, использованием современных методов обследования пациентов (клинических, иммунологических), адекватных поставленным задачам. Оценка факторов врожденного иммунитета осуществлялась у 115 пациентов. Хирургическое лечение в виде лоскутных

операций проведены у 40 пациентов с пародонтитом, из них с применением локальной иммунотерапии у 20 пациентов.

Добровольное участие пациентов в исследовании подтверждалось их письменным согласием. Сформулированные в диссертационной работе положения и выводы подтверждены полученными данными и результатами анализа проведённых исследований.

Материалы работы доложены на 8-й Научно-практической конференции молодых учёных «Актуальные проблемы стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (г. Москва, 19 мая 2017г.).

Апробация диссертации проведена 17 апреля 2019 года (протокол № 15) на совместном заседании сотрудников структурных подразделений: отделения терапевтической стоматологии, отделения хирургической стоматологии, отделения клинической и экспериментальной имплантологии, отделения пародонтологии, отдела лучевых методов диагностики, рентгенологического отделения, отделения профилактики стоматологических заболеваний.

Личный вклад автора в выполнение работы

Автор принимал участие в выборе направления исследования и проведении анализа современной научной литературы. Автором лично выполнены осмотр, лечение и наблюдение 85 пациентов с пародонтитом и 30 условно здоровых добровольцев, обработан весь массив данных клинико-лабораторного исследования больных, самостоятельно выполнен статистический анализ этих данных. Автор участвовал на всех этапах исследования от постановки задач до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах и их внедрении в практику.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 5 научных работ в журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты по специальности «Стоматология».

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 118 страницах и включает следующие главы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы содержит 163 источника (из них 37 отечественных и 126 зарубежных авторов). Диссертация содержит 9 таблиц и иллюстрирована 31 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Клиническое обследование и определение факторов врождённого иммунитета было проведено у 115 пациентов. Здоровые лица составили группу из 30-и человек. Пациенты с хроническим генерализованным пародонтитом с разной степенью тяжести составили 85 человек. С легкой степенью - 25 пациентов, со средней - 40 пациентов, с тяжелой – 20 пациентов. Пациентам со средней степенью пародонтита (40 человек) было проведено консервативное лечение, а через 1 месяц после него проводилось хирургическое лечение в виде лоскутных операций. Наблюдение за отдалёнными результатами после хирургического лечения было в сроки 1 -3 - 6 мес.

По полу пациенты распределялись следующим образом: 73 женщины и 42 мужчины. Возраст обследованных был от 35 до 65 лет. Средний возраст был 52 года.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Лица обоего пола в возрасте 35-65 лет с хронический генерализованным пародонтитом различной степени тяжести;
2. Здоровые лица без видимых клинических изменений тканей пародонта.

Критериями исключения являлись:

- Системные заболевания соединительной ткани;

- Злокачественные заболевания, курсы химиотерапии и лучевой терапии в анамнезе;
- Острые инфекционные и вирусные заболевания;
- Поливалентная аллергия;
- Беременность и лактация;
- Лица, не понимающие цели исследования и не подписавшие добровольного информированного согласия.

Иммунологическое исследование

1. Определение экспрессии гена TLR4 и hBD-3 в эпителии десны методом ПЦР-диагностики в реальном времени

Для определения экспрессии гена TLR4 и hBD-3 в эпителии десны получали соскоб в области прикреплённой десны при помощи одноразовых стерильных зондов, которые помещали в пробирку «Эппендорф» на 2-3 секунды с 0,5 мл физиологического раствора и доставляли в лабораторию. Забор биологического материала проводили до лечения, после консервативного лечения, перед проведением лоскутных операций, а затем через 1, 3 и 6 мес. после хирургического лечения.

Из образцов была выделена РНК с использованием комплекта реагентов «Ампли ПРАЙМ Рибо-сорб» (Интер Лаб Сервис, РФ), строго по протоколу. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов была получена кДНК с помощью реакции обратной транскрипции (Набор «ОТ-1», Синтол, РФ). На следующем этапе исследования с полученной в результате реакции ОТ кДНК проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе ДТ-96 (ДНК-Технология, РФ). Реакция проводилась с использованием «Комплекта реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Последовательность праймеров для определения уровня экспрессии данных генов подбирали с помощью программы Vector NTI 8.0 (последовательности мРНК были получены в базе данных GeneBank). Системы для определения экспрессий генов TLR4 и hBD-3 были

отработаны ранее. Определение уровня экспрессии исследуемых генов проводилось относительно экспрессии гена GAP. Данные по экспрессии исследуемых генов представлены в виде десятичного логарифма от числа копий соответствующего гена относительно 10^6 копий гена GAP (исследование экспрессии гена TLR4) и 10^3 копий гена GAP (исследование экспрессии гена hBD-3).

2. Определение цитокинов IL-6, TGF β -1 в десневой жидкости

Для определения цитокинов содержимое пародонтальных карманов (ПК) забирали с помощью стерильных бумажных полосок, изготовленных из фильтровальной бумаги, размером 0,3 на 0,5 мм в течение 30 секунд, затем помещали в пробирку «Эппендорф» со 100 мкл физиологического раствора и замораживали при температуре - 20°C до момента исследования.

Исследование спектра цитокинов в десневой жидкости включало определение уровня цитокинов – интерлейкина-6 (IL-6) и трансформирующего фактора роста - TGF β -1. В работе использовали коммерческие наборы TGF β -1 “eBioscience ” (США) для постановки твердофазного иммуноферментного метода (ИФА) согласно рекомендуемым методикам. В основе этого иммунологического метода определения различных соединений в биологических жидкостях лежит реакция антиген-антитело.

Учет результатов проводили с помощью спектрофотометра “Anthos 2020”, измеряя оптическую плотность при длине волны 450 нм. Используя полученные данные, строили калибровочные кривые для соответствующих цитокинов.

Этапы комплексного лечения пациентов с пародонтитом

После проведения клинических и иммунологических исследований составляли план лечения индивидуально для каждого пациента.

Первый этап включал в себя определение факторов врождённого иммунитета у пациентов со средней степенью пародонтита (40 человек) до

и после этапа предварительной терапии и консервативного лечения, перед проведением им хирургического лечения.

Хирургическое лечение заключалось в проведении лоскутных операций по методу Видмана-Неймана. Для заполнения глубоких костных дефектов применяли остеопластический материал Bio-Oss. Всего были проведены лоскутные операции у 40 пациентов с пародонтитом в области 165 зубов.

В зависимости от применения локальной иммунотерапии во время хирургического лечения пациенты были разделены на две группы. Основную группу составили лица (20 человек, $n_{\text{зубов}} = 84$), которым проводили хирургическое лечение в виде лоскутных операций с применением локальной иммунотерапии, и группу сравнения (20 человек, $n_{\text{зубов}} = 81$), которым проводили хирургическое лечение без иммунотерапии.

Второй этап включал в себя получение аутологичного комплекса иммунопептидов накануне проведения хирургического лечения у больных основной группы. Был создан алгоритм применения иммунотерапии во время проведения лоскутных операций и в последующие 3 недели после операции.

Третий этап включал динамическое наблюдение, проведение оценки эффективности применения локальной иммунотерапии в ближайшие и отдалённые сроки после проведения хирургического лечения через 6 месяцев.

Для оценки эффективности хирургического лечения сравнивали данные клинических, рентгенологических и иммунологических исследований, полученных до лечения и после проведенного лечения.

Применение аутологичного комплекса иммунопептидов

Медицинская технология "Метод персонифицированной иммунотерапии" разработан на кафедре иммунологии ФГБОУ ВО "РНИМУ им. Н.И.Пирогова", утвержден и разрешен к применению

Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития в 2011 году (ФС№2011/212 от 28.07.11).

Метод локальной иммунотерапии, основанный на данной медицинской технологии, заключался в нанесении на раневую поверхность супернатанта, содержащего аутологичный комплекс иммунопептидов, вырабатываемых лейкоцитами пациента.

Получение аутологичного комплекса иммунопептидов включало:

1. Пациентам основной группы перед проведением хирургического лечения проводился забор 10 мл венозной крови из локтевой вены для получения аутологичного комплекса иммунопептидов .

2. В лаборатории из 10 мл крови выделяли лейкоциты, культивировали их 24 часа, центрифугировали, лейкоциты удалялись, а бесклеточный супернатант в количестве 5 мл стерилизовали через фильтры, определяли в нем уровень пептидов, тестировали его эффективность, сравнивая его показатели с показателями у здоровых лиц. Средние значения пептидов у пациентов основной группы практически не отличались от показателей здоровых доноров ($P>0,05$)(таблица 1).

3. Супернатант, содержащий цитокины и противомикробные пептиды: $TNF\alpha$, $TGF\beta-1$, α -дефензин-HNP1-3, применяли во время хирургическое лечение (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация иммунопептидов в аутологичном комплексе иммунопептидов пациентов ХГП и здоровых доноров

Иммунопептиды	Среднее значение иммунопептидов в аутологичном комплексе (пг/мк)	
	Здоровые доноры (n=30)	Пациенты с пародонтизом (n=20)
$TNF\alpha$	2,3±1,0	4,9±2,8
$TGF\beta-1$	368,7±110,3	489,7± 135,8
HNP 1-3	3256,0±280,0	3680,8±500,1

Техника применения аутологичного комплекса иммунопептидов во время лоскутных операций на пародонте заключалась в орошении операционного поля и пропитывании остеотропного материала перед наложением швов.

Ход операции состоял в следующем: под инфильтрационной анестезией Sol.Ultracaini 2%-5,0 отслаивали слизисто-надкостничный лоскут, удаляли зубные отложения, грануляции, проводили полировку костного края с помощью бормашины, дезэпителизацию десневого края, раневую поверхность орошали раствором, содержащим аутологичный комплекс иммунопептидов, из шприца в количестве 1,0-1,5 мл.

Костный дефект заполняли остеопластическим материалом, который так же пропитывали аутологичным комплексом иммунопептидов, затем накладывали швы в каждом межзубном промежутке.

При этом дополнительная обработка лекарственными веществами или введение антибиотиков не требовалась.

Количество раствора, содержащего аутологичный комплекс иммунопептидов (от 1 до 1,5 мл), определялось величиной оперируемого участка. В следующие посещения - на 7-й, 14й и 21-й день вводили раствор в количестве 0,5 мл под слизистую по переходной складке.

Статистическую обработку проводили с использованием общепринятых, стандартных методов вариационной статистики, рассчитывая в группах средние величины (M), ошибку среднего (m) (Гланц С.,1999). Оценку достоверности различий результатов между двумя сравниваемыми группами проводили по критерию Стьюдента, вычисляя коэффициент достоверности (t). Различия средних показателей считали достоверными, если величина t соответствовала уровню значимости $p < 0,05$.

В ряде исследований результаты выражали в медиане и процентилях (25-75-й). Для оценки достоверности различий применяли непараметрические

критерии Вилкоксона и Манна-Уитни. Различие показателей считалось достоверным при уровне значимости менее 0,05.

Результаты лабораторных и клинических исследований обрабатывали методами вариационной статистики, используя программу Microsoft Excel с приложением Stat Plus. Статистически достоверным считали различия показателей при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Была проведена оценка факторов врожденного иммунитета для изучения патогенеза пародонтита (ХГП), а также определения показаний для иммунотерапии.

У всех пациентов с ХГП ($n=85$) уровень экспрессии гена TLR4 в клетках эпителия десны был повышен в среднем в 12 раз и достоверно отличался от показателей у здоровых лиц ($p < 0,05$). Показатели экспрессии гена TLR4 у здоровых лиц равнялись 11 501 копий гена (25%; 75% процентиля 7 979; 25 938), а у пациентов с ХГП равнялись 65 429 (20 399; 451 460). Наиболее была выражена экспрессия гена TLR4 при тяжелой степени ХГП, которая в 5 раз превышала показатели при легкой степени и в 3 раза при средней степени. Была выявлена достоверность различий показателей между группами ($p < 0,05$). После проведенной консервативной терапии показатели нормализовались. Показатели экспрессии гена TLR4 у пациентов с ХГП до консервативного лечения равнялись 79 215 (51 562; 202 150) копий гена, а после лечения равнялись 18 405 (9652; 20132) копий гена ($p < 0,05$).

Показатели экспрессии гена hBD-3 в клетках эпителия десны у пациентов с ХГП были повышены в среднем в 5 раз и достоверно отличались от показателей у здоровых лиц ($p < 0,05$). Показатели экспрессии гена hBD-3 у здоровых лиц равнялись 2 614 (25% – 75% 1 330; 4 958) копий гена, а у пациентов ХГП были равны 7 607 (4 556-26 113) копий гена. Самые высокие показатели выявлены при легкой степени ХГП, превышающие

показатели при средней и тяжелой степени в 2 раза. Была выявлена достоверность различий показателей между группами с легкой и тяжелой степенью ХГП ($p < 0,05$). Высокие показатели экспрессии гена hBD-3 после консервативного лечения снижались и были в пределах нормальных значений. До лечения они были 9 012 (6 396;26 113) копий гена, а после лечения равнялись 4 280(3739;10632) копий гена ($p < 0,05$).

Уровень провоспалительного цитокина ИЛ-6 в десневой жидкости у пациентов с ХГП в среднем был повышен в 7 раза по сравнению со здоровыми лицами. Наиболее выражены показатели при лёгкой степени, в 2 раза превышающие показатели при средней и тяжёлой степени. Показатель уровня цитокина ИЛ-6 у здоровых лиц был равен 0,3(0,1;1) пг/мл. У пациентов с ХГП легкой степени уровень цитокина ИЛ-6 был равен - 7,0 (0,2;14) пг/мл, при средней степени он равнялся - 3,0 (0,1;11) пг/мл, а при тяжелой степени – 2,0 (0,5;11) пг/мл.

У пациентов с лёгкой степенью ХГП уровень цитокина ИЛ-6 был самый высокий и превышал в 3,5 раза показатели у пациентов с тяжёлой степенью, и в 2 раза со средней степенью. Различия в показателях между группами были достоверными ($p < 0,05$).

Проведение консервативного лечения, включающее противовоспалительную терапию, влияло на уровень цитокина ИЛ-6, показатели снижались до нулевых значений, что соответствовало показателям у здоровых лиц.

Уровень противовоспалительного цитокина ТФР $_{\beta-1}$ в десневой жидкости у пациентов с ХГП был повышен, в среднем, в 10 раз по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,05$). При средней и тяжелой степени ХГП уровень цитокина ТФР $_{\beta-1}$ в 2 раза превышал показатели при легкой степени ($p < 0,05$). Показатель цитокина ТGF $_{\beta-1}$ у здоровых лиц был равен 469 (412;583) пг/мл, а при ХГП равнялся 4582 (811;8930) пг/мл.

Показатели цитокина TGF β -1 в десневой жидкости у пациентов с ХГП после проведения консервативного лечения достоверно снижались и были в пределах показателей здоровых лиц. До лечения медиана была равна 4420(1 206;8 930) пг/мл, после лечения - 526 (264;588) пг/мл ($p < 0,05$).

Таким образом, оценка факторов врожденного иммунитета (экспрессии генов TLR4 и hBD-3 в клетках эпителия десны и уровень цитокинов TGF β -1 и IL-6 в десневой жидкости) показала их важную роль в патогенезе хронического генерализованного пародонтита. Это определило показания для использования медицинской технологии «Метод персонифицированной иммунотерапии», заключающегося в применении аутологичного комплекса иммунопептидов, полученных из собственной крови пациента, в хирургическом лечении пародонтита.

Клиническая эффективность иммунотерапии, с применением аутологичного комплекса иммунопептидов при лоскутных операциях, заключалась в значительно менее выраженном отёке и отсутствии болей на 3-5 сутки, активном ускорении репаративных процессов слизистой десны с краёв раны, полном удалении швов на 5-7 сутки. В группе сравнения все эти признаки происходили на 7-14 сутки.

Через 12 мес. на рентгенограмме в области оперированных зубов определялось уплотнение костной ткани, чёткая выраженность кортикальной пластинки в обеих сравниваемых группах.

Лечение с применением аутологичного комплекса иммунопептидов легко переносилось пациентами. Оно позволяло ограничивать обработку раны антисептиками и прием антибиотиков после хирургического лечения. Нагноения или других осложнений не наблюдалось ни в одном случае. К преимуществам хирургического лечения с применением аутологичного комплекса иммунопептидов можно отнести безвредность его в отношении вирусов гепатита В и ВИЧ.

Влияние аутологичного комплекса иммунопептидов на показатели экспрессии гена TLR4 в клетках эпителия десны в основной группе и в группе сравнения в отдаленные сроки после хирургического лечения достоверно отличались ($p < 0,05$). В группе сравнения показатели были повышены в 3 раза по сравнению с показателями основной группы, особенно в сроки через 6 мес. после операции (рисунок 1).

Снижение показателей экспрессии гена TLR4 в клетках эпителия в течение 1-го месяца в обеих группах было связано с хирургическим вмешательством. В сроки 3-6 месяцев после операции показатели экспрессии гена TLR4 в клетках эпителия десны в основной группе были в пределах нормы, а в группе сравнения были в пределах нормальных значений до 3 мес., а затем в сроки 6 мес. после операции имели тенденцию к повышению, были в 1,5 раза выше исходного уровня ($p > 0,05$).

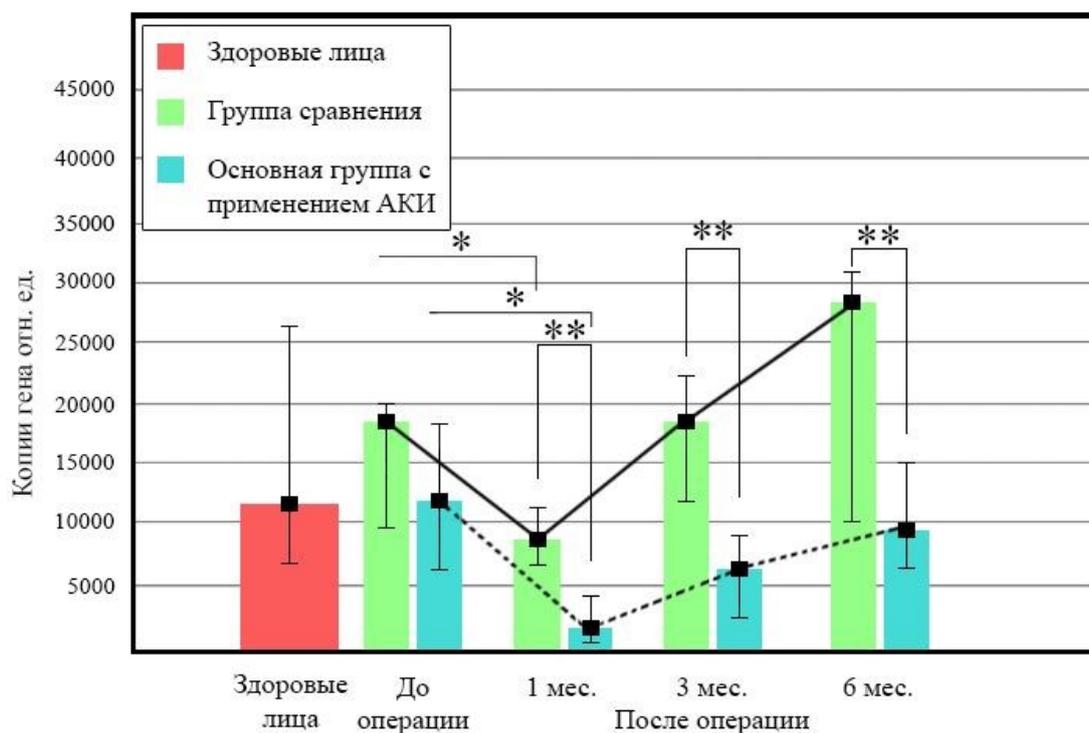


Рисунок 1. Экспрессия гена TLR4 в эпителии десны после проведения лоскутных операций в основной группе, с применением аутологичного комплекса иммунопептидов, и группе сравнения; * - достоверность различий по сравнению с исходными данными, $p < 0,05$; ** - достоверность различий между группами больных, $p < 0,01$.

Подобная тенденция отмечалась и в показателях экспрессии гена hBD-3 в клетках эпителия десны. В группе сравнения показатели экспрессии гена hBD-3 имели тенденцию к повышению, и были выше, чем показатели основной группы в 2 раза в сроки 6 мес. (рисунок 2).

Показатель уровня цитокина IL-6 в десневой жидкости в обеих группах во все сроки наблюдения был высоким. В основной группе показатель снижался до нормы к сроку 6 мес., а в группе сравнения показатель оставался высоким, как через 3, так и через 6 мес. (рисунок 3). В сроки 6 мес. в группе сравнения отмечалось повышение показателей цитокина IL-6 в 2-3 раза по сравнению с исходным уровнем и показателями основной группы ($p < 0,01$).

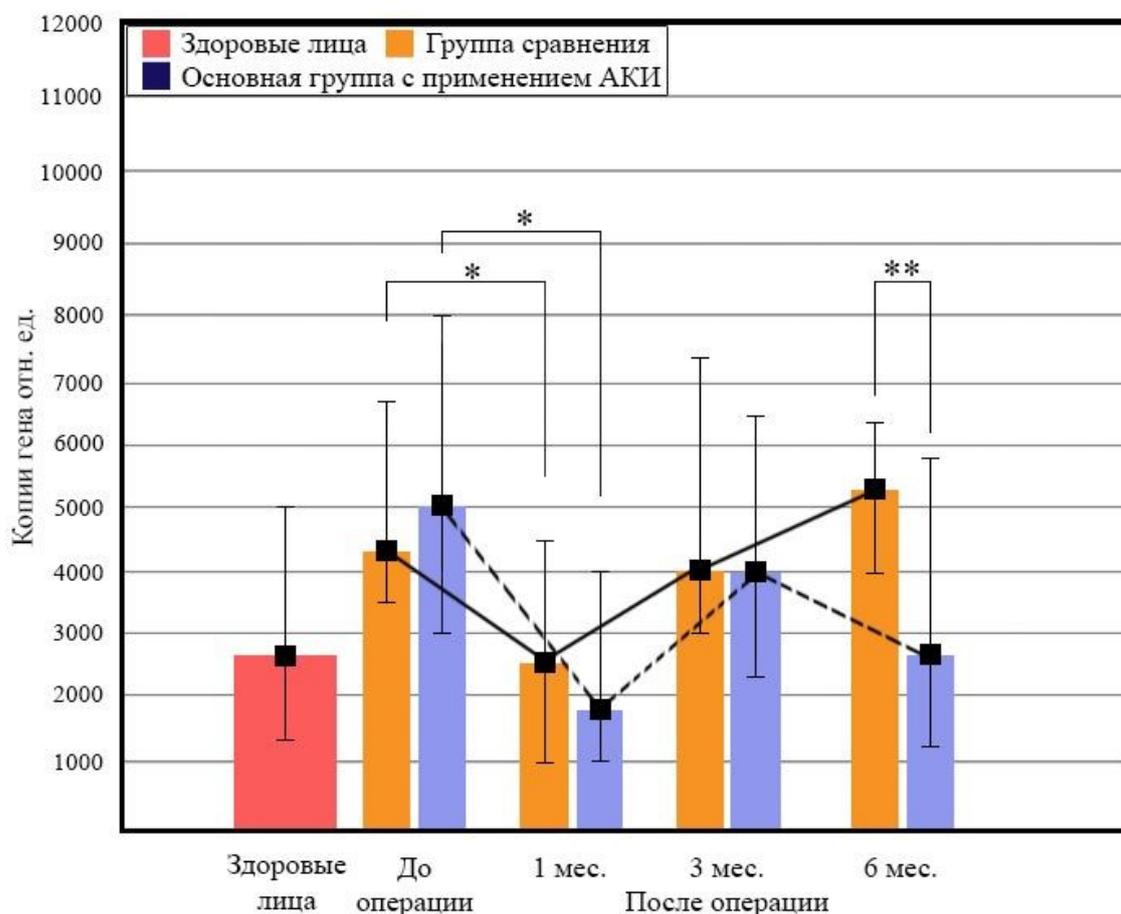


Рисунок 2. Показатели экспрессии гена hBD-3 в клетках эпителия десны после проведения лоскутных операций с применением аутологичного комплекса иммунопептидов; * - достоверность различий по сравнению с

исходными данными, $p < 0,05$; ** - достоверность различий между группами больных, $p < 0,01$

Показатели уровня цитокина $TGF\beta-1$ в десневой жидкости в сравниваемых группах резко отличались (рисунок 4). В группе сравнения показатели были в пределах нормальных значений во все сроки наблюдения, а в основной группе уровень $TGF\beta-1$ был значительно повышен ($p < 0,01$). В основной группе в сроки 3 мес. после операции он был повышен в среднем в 6 раз, а в сроки 6 мес. в 5,5 раз по сравнению с показателями в группе сравнения.

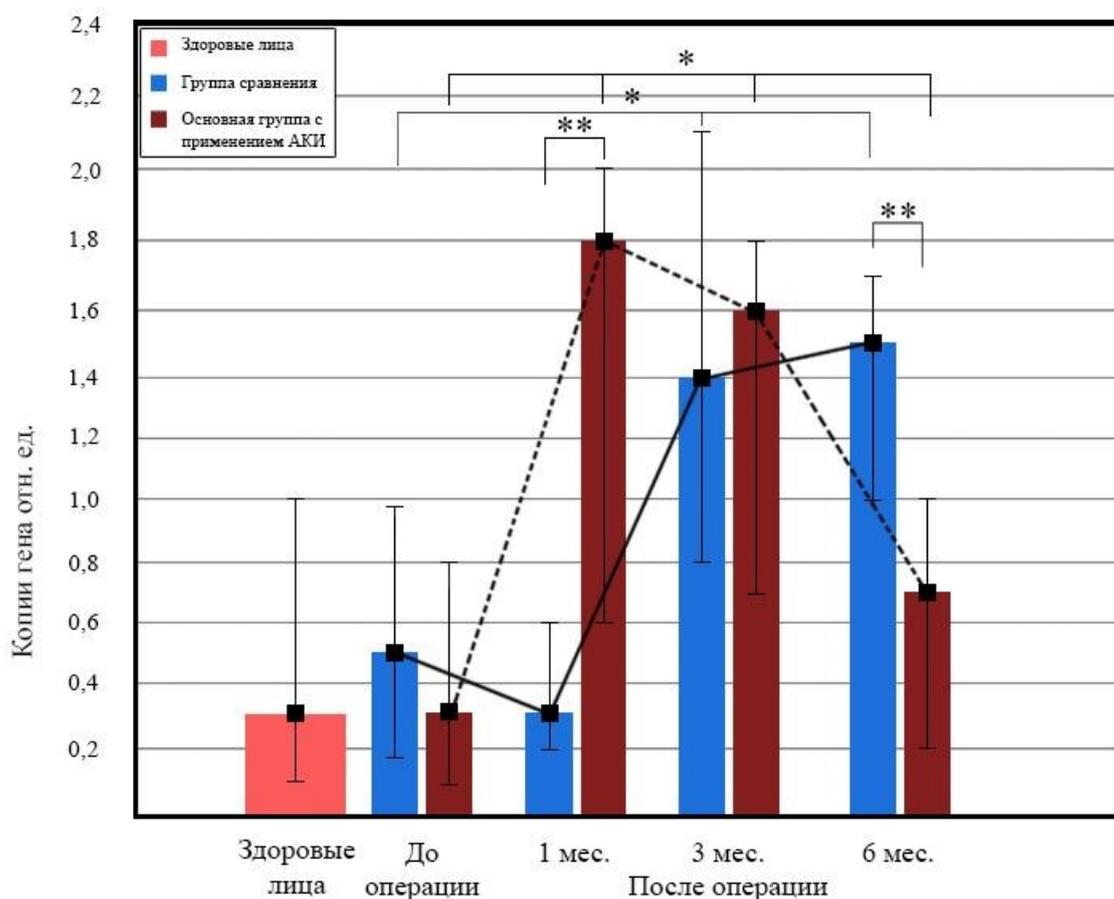


Рисунок 3. Показатели цитокина IL-6 в десневой жидкости после хирургического лечения в основной группе и группе сравнения; * - достоверность различий по сравнению с исходными данными, $p < 0,05$; ** - достоверность различий между группами больных, $p < 0,01$.

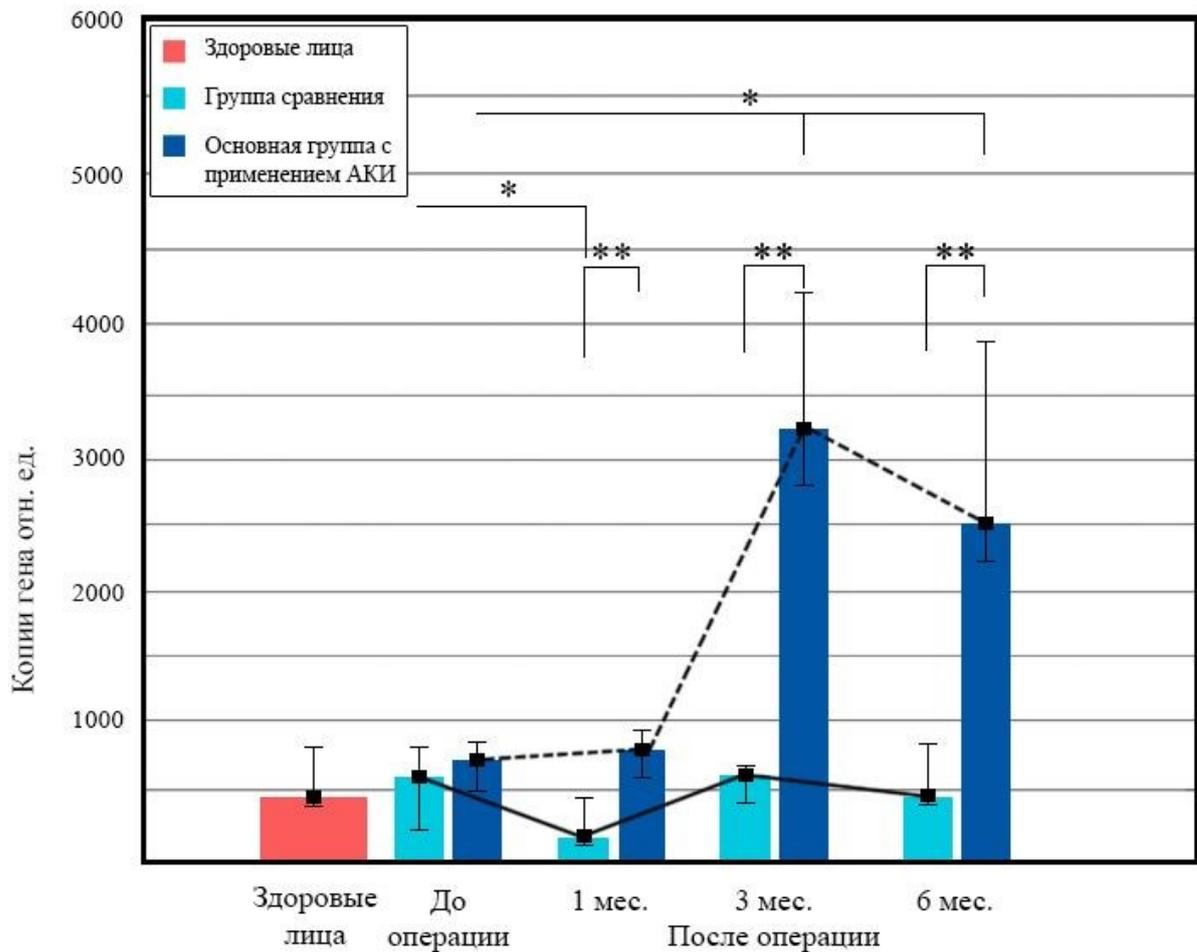


Рисунок 4. Показатели цитокина $TGF\beta-1$ в десневой жидкости у больных ХГП после проведения лоскутных операций с применением аутологичного комплекса иммунопептидов; * - достоверность различий по сравнению с исходными данными, $p < 0,05$; ** - достоверность различий между группами больных, $p < 0,01$.

В заключении можно отметить, что проведенное нами исследование показало важное значение факторов врождённого иммунитета в механизмах развития ХГП. Дисбаланс факторов врождённого иммунитета при пародонтите явился обоснованием применения иммунопептидов при хирургическом лечении ХГП. Применение аутологичного комплекса иммунопептидов при хирургическом лечении ХГП является патогенетически обоснованным и позволяет повысить его эффективность. Использование аутологичного комплекса иммунопептидов, состоящего из набора цитокинов ($TNF\alpha$, $TGF\beta-1$) и нейтрофильного противомикробного пептида (α -

дефензина-HNP), способствовало созданию высокой концентрации фактора роста TGF β -1 в зоне хирургического лечения.

Выводы

1. У пациентов с ХГП повышена экспрессия гена TLR4 в клетках эпителия десны в 12 раз по сравнению со здоровыми лицами. При тяжелой степени ХГП уровень экспрессии гена TLR4 был самым высоким, в 5 раз превышал показатели при легкой степени и в 3 раза при средней. Экспрессия гена hBD-3 в эпителии десны у пациентов с ХГП повышена в 5 раз по сравнению со здоровыми лицами. При легкой степени ХГП экспрессия гена hBD-3 в клетках эпителия десны превышала показатели при средней и тяжелой степени в 2 раза.

2. Уровень провоспалительного цитокина IL-6 в десневой жидкости у пациентов с ХГП был повышен в 4 раза по сравнению со здоровыми лицами. Уровень противовоспалительного цитокина TGF β -1 в десневой жидкости у пациентов с ХГП был повышен в 10 раз по сравнению со здоровыми лицами.

3. Алгоритм применения аутологичного комплекса иммунопептидов с активностью TNF α , TGF β -1 и противомикробного фактора α -дефензина (HNP1-3), полученного из крови пациента, при хирургическом лечении пародонтита, заключается в стимуляции факторов противомикробной защиты и процессов репарации тканей пародонта.

4. Применение аутологичного комплекса иммунопептидов при хирургическом лечении пародонтита сокращало сроки достижения лечебного эффекта в 2 раза, что выражалось в быстром снятии симптомов воспаления и ускорении репаративных процессов.

5. Включение в хирургическое лечение аутологичного комплекса иммунопептидов приводило к нормализации экспрессии гена TLR4 и hBD-3 в клетках эпителия десны и уровня провоспалительного цитокина IL-6 в десневой жидкости, созданию высокой концентрации фактора роста TGF β -1 в

зоне хирургического лечения, который был повышен в 6 раз, по сравнению с показателями в группе сравнения.

Практические рекомендации

1. Для диагностики показателей врожденного иммунитета при ХГП рекомендуется проводить определение экспрессии гена TLR4 и hBD-3 в клетках эпителия десны методом ПЦР-диагностики в реальном времени (ПЦР в РВ) и определять уровень про-и противовоспалительных цитокинов IL-6 и TGF β -1 в десневой жидкости методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2. Для повышения эффективности хирургического лечения ХГП следует проводить предоперационную подготовку и локальное применение аутологичного комплекса иммунопептидов во время оперативного вмешательства.

3. Схема применения аутологичного комплекса иммунопептидов в хирургическом лечении предусматривает 3 этапа.

Первый этап: сдача пациентом венозной крови для приготовления супернатанта содержащего цитокины и дефензины.

Второй этап: во время хирургической операции следует проводить орошение раневой поверхности раствором, содержащим аутологичный комплекс иммунопептидов, и увлажнение им остеопластического материала.

Третий этап: подслизистое введение аутологичного комплекса иммунопептидов на 7-е,14-е,21-е сутки после операции в количестве 0,3-0,5 мл для создания высокой концентрации TGF β -1 в зоне хирургического лечения на длительный срок.

Список работ

11. Экспрессия генов TLR4 и NBD-3 в эпителиальных клетках слизистой оболочки при хирургическом лечении пародонтита/ О.А. Зорина, Л.В. Ганковская, Р.А. Балыкин, О.А. Свитич и др.// Стоматология.-2016.-№ 4.- С.13-15.
2. Балыкин, Р.А. Значение факторов врожденного иммунитета в развитии воспалительно - деструктивных поражений пародонта/ Р.А. Балыкин // Стоматология.-2016.- №3. - С.64-65.
3. Балыкин, Р.А. Исследование аутологичных иммунопептидов при хирургическом лечении пародонтита/ Р.А. Балыкин, О.А. Зорина, Л.В. Ганковская / Стоматология. – 2016. - №6. – С.30-31.
4. Балыкин, Р.А. Положительный эффект применения аутологичных иммунопептидов при хирургическом лечении воспалительно-деструктивных поражений пародонта/ О.А. Зорина, Л.В, Ганковская, Р.А. Балыкин, Т.П. Иванюшко и др.// Российский стоматологический журнал.-2017.-№1.-С.4-7.
5. Балыкин, Р.А. Молекулярные механизмы патогенеза пародонтита / О.А. Зорина, Л.В. Ганковская, Р.А. Балыкин, Т.П. Иванюшко и др. / Стоматология для всех.-2017.-№3.-С.41-45.