

На правах рукописи

СПЕРАНСКАЯ Екатерина Михайловна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ДЕСНЫ
ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ
В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ**

Специальность 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Чебоксары – 2023

Работа выполнена на кафедре общей и клинической морфологии и судебной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Голубцова Наталья Николаевна

Официальные оппоненты: **Челышев Юрий Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии

Сирак Алла Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой гистологии

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

Защита состоится «15» июня 2023 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.434.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» по адресу: г. Чебоксары, Московский пр., д. 15 (корпус Г), зал заседаний, кабинет Г-205.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова по адресу: 428034, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38 и на сайте www.chuvsu.ru.

Автореферат диссертации разослан 19 апреля 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.2.434.01
доктор биологических наук, доцент

Наталья Николаевна Голубцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы работы.

Среди медико-биологических проблем вопросы регенерации имеют первостепенную значимость. основополагающими звеньями механизмов, регулирующих регенерацию, являются пролиферация и апоптоз. Из литературы известно, что восстановление после повреждения имеет особенности в сравнении с физиологической регенерацией и характеризуется тканеспецифичностью. В этой связи изучение регенерации слизистой рта при воспалительных процессах представляет особый интерес, поскольку отсутствие лечения или неадекватное лечение хронических воспалительных заболеваний зубочелюстного аппарата приводит к деструкции тканей поддерживающего аппарата зуба и потере зубов.

Статистические данные свидетельствуют, что с возрастом увеличивается тяжесть пародонтита¹. Принципы современной терапевтической стоматологии направлены на устранение или подавление патогенных микроорганизмов при лечении данного заболевания². В этой ситуации метод лазерной терапии в пародонтальном кармане оказывает бактерицидное и детоксикационное действие, клинически уменьшая глубину карманов и подвижность зубов, а значит, влияет на процессы репарации³. В настоящее время имеются противоречивые сведения об эффективности диодного лазера⁴. Также отсутствуют данные о стандартной процедуре в отношении режима, уровня энергии или периода применения диодных лазеров и ассоциированных с возрастом аспектах их применения, что требует проведения дальнейших исследований⁵.

Для фундаментальной медицины и клинической пародонтологии приоритетное значение имеет определение клеточных мишеней для эффективного терапевтического лазерного воздействия на ткани пародонта при воспалении в возрастном аспекте.

¹ Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk / D. S. Michaud [et al.] // *Epidemiologic reviews*. 2017. Vol. 39(1). P. 49–58.

² Zhao H., Hu J., Zhao L. Adjunctive subgingival application of Chlorhexidine gel in nonsurgical periodontal treatment for chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis // *BMC Oral Health*. 2020. Vol. 20, № 1. P. 34.

³ Savita A. M., Nageswaran G. R., Reddy R. Comparative analysis of cytocompatible properties of the root surface exposed to diode laser (970 nm) as adjunct to scaling and root planing: An in vitro study // *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021. Vol. 25, № 2. P. 292–298.

⁴ Qualitative Analysis of Periodontal Pathogens in Chronic Periodontitis Patients after Nonsurgical Periodontal Therapy with and without Diode Laser Disinfection Using Benzoyl-DL Arginine-2-Naphthylamide Test: A Randomized Clinical Trial / A. Fenol [et al.] // *Contemporary clinical dentistry*. 2018. № 9(3). P. 382–387.

⁵ Clinical effects of photodynamic and low-level laser therapies as an adjunct to scaling and root planing of chronic periodontitis: A split-mouth randomized controlled clinical trial / S. Malgikar [et al.] // *Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research*. 2016. Vol. 27, № 2. P. 121–126.

Степень разработанности темы исследования. Системный подход, объединяющий морфологические методы и методы математической статистики для характеристики тканево-клеточных взаимодействий в десне при трех функциональных состояниях: без воспаления, при хроническом воспалении и в условиях стимуляции регенерации лазерным воздействием, является оригинальным.

Возрастные аспекты гистологических изменений десны при хроническом воспалении и в условиях стимуляции регенерации диодным лазером в литературе практически не рассматриваются.

Недостаточно изученными остаются параметры численности и пролиферативной активности фибробластов и эпителиоцитов десны без воспаления, при хроническом воспалении и в условиях стимуляции регенерации лазерным воздействием; особенности участия тучных клеток и CD68⁺ макрофагов десны человека в механизмах воспаления и регенерации с учетом возраста пациентов; особенности экспрессии E-кадгерина в межклеточных контактах эпителиальных клеток десны и распределения VEGFR-3⁺ сосудов в десне при разных состояниях.

Изложенное определило цель исследования.

Цель работы – изучить особенности пролиферации, апоптоза и межклеточных взаимодействий в эпителии и собственной пластинке десны человека в условиях хронического воспаления и стимуляции регенерации лазерным воздействием у людей двух возрастных групп.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать численность фибробластов, тучных клеток, CD68⁺ макрофагов, VEGFR-3⁺ сосудов в собственной пластинке десны у людей без признаков воспаления в возрасте 20–40 и 41–60 лет.

2. Изучить процессы пролиферации и апоптоза фибробластов десны, установить их изменения при воспалении, а также их влияние на численность фибробластов десны людей двух возрастных групп.

3. Исследовать особенности межклеточных взаимодействий, пролиферации и апоптоза клеток эпителия десны человека при воспалении с учетом возраста.

4. Изучить особенности участия тучных клеток и CD68⁺ макрофагов десны человека в механизмах воспаления и регенерации с учетом возраста пациентов.

5. Исследовать особенности распределения VEGFR-3⁺ сосудов в десне при воспалении и регенерации в возрастном аспекте.

6. Проанализировать морфологические особенности регенерации тканей десны у людей двух возрастных групп при хроническом воспалении.

Научная новизна работы:

1. Впервые доказано, что пролиферативная и апоптотическая активность фибробластов имеет возрастные различия в десне без воспаления, при пародонтите и пародонтите при воздействии лазера: в возрасте 20–40 лет индекс пролиферации и апоптоза увеличивается при хроническом воспалении и снижается при лазерном облучении. Выявлено, что в возрасте 41–60 лет индекс

пролиферации и апоптоза фибробластов статистически значимо повышается только при пародонтите.

2. Установлено, что в возрасте 20–40 лет в десне без воспаления пролиферативная активность фибробластов обратно пропорциональна количеству лимфатических сосудов, в 41–60 лет – прямо пропорциональна.

3. Новыми являются полученные данные о динамических изменениях тучных клеток и макрофагов десны в условиях воспаления и лазерного облучения.

4. Впервые представлены данные по содержанию фибробластов, тучных клеток, макрофагов (CD68⁺) и лимфатических сосудов (VEGFR-3⁺) в десне человека в возрасте 20–40 и 41–60 лет при воспалении и воздействии диодным лазером, что подтверждает новизну данной работы.

5. Получены новые научные знания об экспрессии E-кадгерина в межклеточных контактах эпителиальных клеток десны в физиологических условиях, при воспалении и лазерном облучении.

6. Впервые проанализировано влияние диодного лазера с длиной волны 940 нм на изменение клеточного состава собственной пластинки десны человека в возрастные периоды 20–40 и 41–60 лет.

7. В результате выполненной работы получены новые научные знания о влиянии лазерного воздействия на ткани десны человека в различные возрастные периоды, которые могут стать основой для разработки тактики лечения пациентов с заболеваниями пародонта в возрасте 20–40 и 41–60 лет.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа имеет фундаментально-прикладной характер, выводы об организации структур десны при воспалении и лазерном облучении могут представлять интерес для специалистов в области клеточной биологии, гистологии и пародонтологии.

Теоретическую значимость имеют результаты о динамических изменениях количественного состава тучных клеток, макрофагов, сосудов, о качестве межклеточных контактов, пролиферативной и апоптотической активности эпителиоцитов многослойного плоского эпителия и фибробластов собственной пластинки, о корреляционных связях исследуемых параметров, которые дополняют сведения о цитоархитектонике слизистой рта у людей разных возрастов.

Практическая значимость работы заключается в использовании полученных данных при проведении исследований в области морфологии, а также в лечебной стоматологической деятельности. Результаты исследования дополняют существующие данные о возрастных изменениях в структурах десны и могут быть использованы при чтении лекций, проведении лабораторных занятий на медицинских факультетах вузов, а также при написании монографий и учебных пособий, посвященных проблемам регенераторного потенциала пародонта при воспалительно-деструктивных поражениях. Полученные данные могут быть полезны практикующим специалистам для разработки новых терапевтических подходов в лечении хронического пародонтита диодным лазером у пациентов в возрасте 20–40 и 41–60 лет.

Методология и методы исследования. Изучение многослойного эпителия и собственной пластинки десны проведено с использованием общегистологических, гистохимических, иммуногистохимических, морфометрических и статистических методов. В качестве объекта исследования были выбраны пациенты в возрасте от 20 до 60 лет без воспаления пародонта, с хроническим пародонтитом и пародонтитом после лечения диодным лазером. Материал исследования – биоптаты десны, полученные по медицинским показаниям, – был разделен на две группы в зависимости от возраста пациентов: группа I (20–40 лет) и группа II (41–60 лет).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Снижение пролиферативной активности фибробластов, числа VEGFR-3⁺ сосудов десны и экспрессии белка межклеточных контактов E-кадгерина, наряду с увеличением экспрессии белка p53 и количества тучных клеток, представляет собой звенья механизма уменьшения общей численности фибробластов десны людей 41–60 лет по сравнению с 20–40-летними и, как следствие, угнетения регенераторного потенциала с возрастом.

2. Изменение индексов пролиферации и апоптоза эпителиоцитов и фибробластов, интенсивности экспрессии белка E-кадгерина и VEGFR-3⁺ сосудов, а также корреляционные взаимосвязи между содержанием CD68⁺ макрофагов и тучных клеток десны являются морфологическими критериями регенерации десны при воспалении под воздействием лазерного излучения и зависят от возраста.

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством пациентов, включенных в исследование (64 пациента: 28 мужчин и 36 женщин), применением современных общегистологических, гистохимических, иммуногистохимических и статистических методов исследования.

Апробация результатов исследований. Результаты работы доложены и обсуждены на межрегиональной научной конференции, посвященной 10-летию образования кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний и новых технологий (Чебоксары, 2016); Всероссийской научно-практической конференции «Междисциплинарные аспекты реабилитации пациентов с заболеваниями пародонта» (Чебоксары, 30 марта 2017 г.); Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 95-летию со дня рождения профессора Д.С. Гордон (Чебоксары, 22 ноября 2017 г.); 76-й международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 25–28 апреля 2018 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии реабилитации пациентов с заболеваниями пародонта и слизистой оболочки рта на фоне соматической патологии» (Чебоксары, 24 мая 2018 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Междисциплинарность в стоматологии – фактор инновационного развития», посвященной 550-летию г. Чебоксары (Чебоксары, 25 апреля 2019 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Достижения современной морфологии – практической медицине и образованию» (Курск, 26

марта 2021 г.); Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 13–14 мая 2021 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семеновны Гордон (Чебоксары, 22 ноября 2022 г.).

Соответствие паспорту специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки):

– Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов (п. 10).

– Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели (п. 13).

– Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды (п. 14).

Реализация и внедрение результатов работы. Результаты диссертационного исследования применяются в учебном процессе на кафедре общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами II курса медицинского факультета специальности «Стоматология» (при изучении темы «Гистологическое строение ротовой полости»). Также результаты исследования внедрены в лечебную деятельность АУ «Республиканская стоматологическая поликлиника» Минздрава Чувашии, стоматологической клиники ООО «ЭКОДЕНТ» в г. Чебоксары.

Личный вклад автора. Выбор объекта исследования, набор биопсийного материала, установление сроков лечения хронического пародонтита диодным лазером проведены самим диссертантом. Лично диссертантом осуществлялось приготовление микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, расчет индекса дегрануляции тучных клеток, описание иммуногистохимических методов исследования, статистическая обработка данных. Микроскопия препаратов, фотографирование, морфометрия также проводились автором самостоятельно. Написание глав диссертационного исследования, подготовка материалов диссертации к публикации осуществлялись автором лично.

Публикации. Основные положения диссертации отражены в 10 научных публикациях, 2 из которых напечатаны в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 – в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденные приказом Минобрнауки России.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы из 187 наименований, включает в себя 143 страницы машинописного текста, 80 рисунков, 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** представлены актуальность данного исследования, степень разработанности проблемы, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов научных исследований, внедрение результатов исследования.

В **первой главе** проведен обзор литературы, который включает сведения о морфологическом строении пародонта, строении десны в возрастном аспекте, данные о хроническом пародонтите, о лазерных методах лечения тканей пародонта, иммуногистохимических исследованиях десны человека.

Вторая глава посвящена материалу и методам исследования. В качестве объекта исследования были выбраны пациенты в возрасте от 20 до 60 лет. Материалом исследования служил биопсийный материал десны, полученный по пародонтологическим, хирургическим, ортопедическим и ортодонтическим показаниям у пациентов с клинически здоровым пародонтом, хроническим генерализованным пародонтитом легкой/средней степени тяжести, хроническим генерализованным пародонтитом после терапии диодным лазером.

В исследование были включены 64 пациента (28 мужчин и 36 женщин в возрасте 20–60 лет). Все пациенты были разделены на 2 группы: группа I – пациенты 20–40 лет (n=32), группа II – пациенты 41–60 лет (n=32). Каждая группа включала в себя подгруппы: контрольная подгруппа (пациенты без воспаления пародонта), подгруппа с воспалением пародонта (пациенты с хроническим пародонтитом легкой/средней степени тяжести), подгруппа после лазеротерапии (пациенты с хроническим пародонтитом легкой/средней степени тяжести после воздействия диодным лазером).

Пародонтальные карманы пациентов с пародонтитом обрабатывали диодным лазером Prometey (Spectrum International, США) с длиной волны 940 нм, мощностью 0,5 Вт, импульсно-периодическим режимом 10 Гц без инициации оптического волокна в течение 1 минуты 30 секунд в первое посещение – 1-й день лечения (после проведения закрытого кюретажа пародонтального кармана), во второе посещение – на 3-й день лечения и третье посещение – на 7-й день лечения. Биопсийный материал у пациентов данных подгрупп был взят после проведения лазеротерапии и закрытого кюретажа в третье посещение.

Перед началом вмешательства все пациенты оформили информированное добровольное согласие. Проведение исследования одобрено этическим

комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (протокол № 20/06 от 16.06.2020).

В работе использовали следующие методы исследования:

1. *Гистологические методы:* а) общая окраска гематоксилином и эозином; б) окрашивание полихромным толуидиновым синим.

2. *Иммуногистохимические методы:* а) Ki-67 – ядерный антиген пролиферирующих клеток; б) p53 – транскрипционный фактор, регулирующий апоптоз; в) E-кадгерин – маркер межклеточной адгезии; г) VEGFR-3 – фактор роста эндотелия лимфатических сосудов; д) CD68 – маркер активированных макрофагов.

В каждом образце десны человека были сфотографированы 5–10 полей зрения, выбранные случайным образом. В эпителии десны подсчитывали число Ki-67⁺ и p53⁺ эпителиоцитов на 100 клеток базального и шиповатого слоев. В результате определяли долю Ki-67⁺ и p53⁺ эпителиоцитов. В соединительной ткани собственной пластинки подсчитывали общее число фибробластов при 400-кратном увеличении и число Ki-67⁺ и p53⁺ фибробластов в этом же фрагменте. В результате рассчитывали долю фибробластов с положительной реакцией на 1 мм² ткани десны. Также подсчитывали индекс отношения пролиферации к апоптозу ($I_{P/A} = Ki-67^+/p53^+$) эпителиоцитов и фибробластов десны. Количественно оценивали долю E-кадгерин⁺ эпителиоцитов на 100 клеток базального и шиповатого слоев многослойного плоского эпителия десны при увеличении в 400 раз. В результате определяли процентное соотношение иммунопозитивных к E-кадгерину эпителиоцитов по отношению к общему числу эпителиоцитов базального и шиповатого слоев. Также определяли численность тучных клеток, макрофагов, лимфатических сосудов на 1 мм² ткани десны.

3. *Статистическая обработка результатов.* Количественную оценку результатов исследования проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из светового микроскопа Nikon Eclipse E200 с цифровой камерой Nikon DS-Fi3, микроскопа Leica DM4000B с цифровой камерой Leica DFC 425. Также для компьютерной морфометрии использовали лицензионную программу Leica Application Suite 3.6.0 (Германия), «Микроанализ» (Россия), персональный компьютер с операционной системой Windows 10 и демоверсию программы Sigma Scan Pro 5.0 (SPSS Inc., США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием лицензионного пакета программ STATISTICA Application версия 10.0.228.2. В каждой подгруппе рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку (m). Достоверность влияния возраста на исследуемые параметры в нескольких группах оценивали с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа ANOVA – критерия Краскела – Уоллиса (p_{K-W}). При значениях переменных, соответствующих требованиям нормальности распределения методом Шапиро – Уилка, сравнение проводили с использованием критерия Стьюдента, не соответствующих обозначенным требованиям, – с использованием критерия Манна – Уитни (p_{m-u}).

Достоверность динамических различий в подгруппах пациентов, получающих лечение диодным лазером, оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона (p_w). Взаимосвязи между возрастом и параметрами изучаемых данных десны оценивали с применением непараметрического рангового корреляционного анализа Спирмена (r_s). Статистически значимыми считали отличия при $p \leq 0,05$.

В **третьей главе** представлены результаты собственных исследований.

При сравнении двух возрастных групп (20–40 лет и 41–60 лет) численность фибробластов уменьшалась с возрастом на 11 % при сравнении контрольной подгруппы 1 и контрольной подгруппы 2 ($r_s = -0,70$; $p < 0,05$); на 15 % ($r_s = -0,73$; $p < 0,05$) при сравнении подгруппы с воспалением пародонта 1 и подгруппы с воспалением пародонта 2; на 21,7 % при сравнении подгруппы после лазеротерапии 1 и подгруппы после лазеротерапии 2 ($r_s = -0,78$; $p < 0,05$).

Пролиферативная активность эпителиальных клеток десны уменьшалась при пародонтите (рисунок 1А) и увеличивалась после лазеротерапии в возрасте 20–40 лет и 41–60 лет (рисунок 1Б).

Доля $p53^+$ эпителиоцитов увеличивалась с возрастом в 1,4 раза ($r_s = 0,7$; $p < 0,05$) при сравнении контрольной подгруппы 1 и контрольной подгруппы 2; уменьшалась в 1,6 раза при сравнении подгруппы с воспалением пародонта 1 и подгруппы с воспалением пародонта 2 ($r_s = -0,79$; $p < 0,05$); уменьшалась в 1,5 раза при сравнении подгруппы после лазеротерапии 1 и подгруппы после лазеротерапии 2 ($r_s = -0,74$; $p < 0,05$).

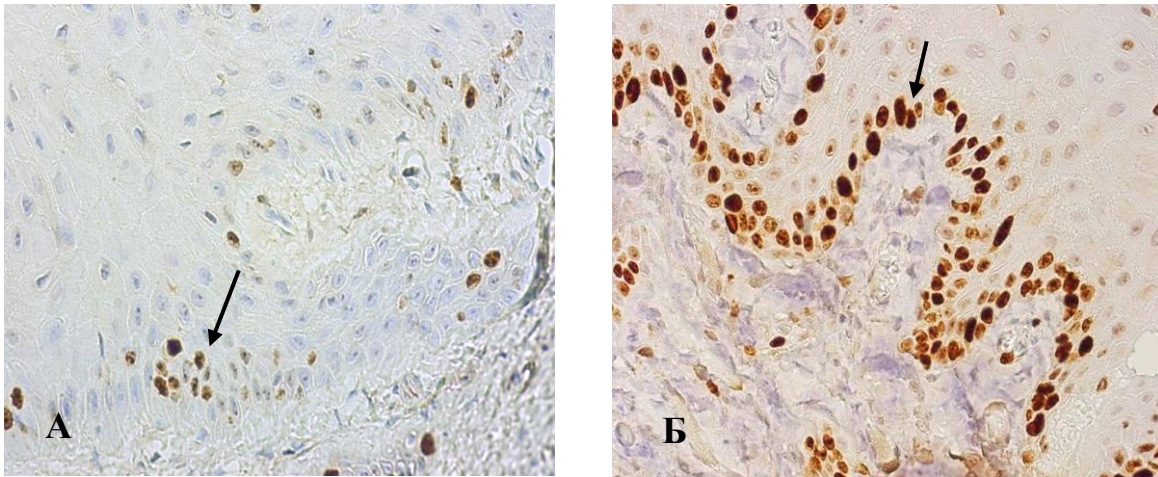
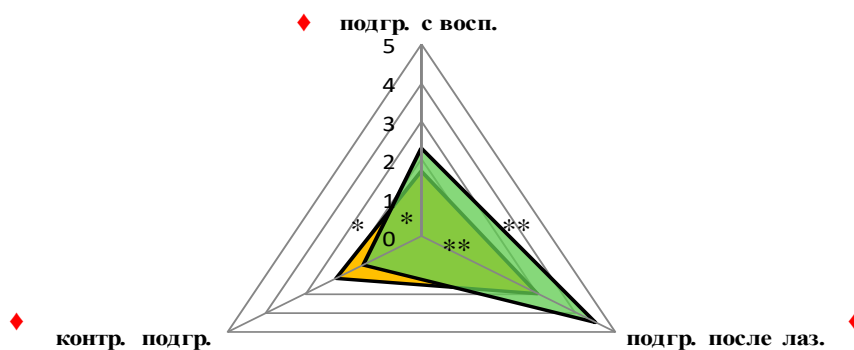


Рисунок 1 – Увеличение доли $Ki-67^+$ эпителиоцитов в десне с хроническим воспалением после воздействия диодным лазером: А – многослойный плоский неороговевающий эпителий десны пациента 58 лет с хроническим пародонтитом до лазеротерапии; Б – многослойный плоский неороговевающий эпителий десны пациента 60 лет с хроническим пародонтитом после лазеротерапии. Иммуногистохимическая реакция на $Ki-67$ с докраской ядер гематоксилином. Увеличение 400

Индекс пролиферации и апоптоза эпителиоцитов в десне без воспаления с возрастом уменьшался, в десне с хроническим воспалением и после воздействия диодным лазером – увеличивался (рисунок 2).



■ Индекс отношения пролиферации и апоптоза ($I_{P/A}$) эпителиоцитов десны группы I (20-40 лет)

■ Индекс отношения пролиферации и апоптоза ($I_{P/A}$) эпителиоцитов десны группы II (41-60 лет)

Рисунок 2 – Индекс отношения пролиферации и апоптоза ($I_{P/A}$) эпителиоцитов десны в исследуемых группах. * – сравнение показателей контрольной подгруппы и подгруппы с воспалением пародонта, $p_{m-u} \leq 0,05$; ** – сравнение показателей подгруппы с воспалением пародонта и подгруппы после лазеротерапии, $p_w \leq 0,05$; ♦ – корреляционная связь между возрастом и $I_{P/A}$ эпителиоцитов, $p \leq 0,05$

Доля Ki-67⁺ фибробластов уменьшалась с возрастом в 1,3 раза ($r_s = -0,66$; $p < 0,05$) при сравнении контрольной подгруппы 1 и контрольной подгруппы 2; в 1,2 раза при сравнении подгруппы с воспалением пародонта 1 и подгруппы с воспалением пародонта 2 ($r_s = -0,54$; $p < 0,05$); в 1,2 раза при сравнении подгруппы после лазеротерапии 1 и подгруппы после лазеротерапии 2 ($r_s = -0,67$; $p < 0,05$).

Экспрессия p53 в фибробластах собственной пластинки десны человека в возрастной период 20–40 лет не изменялась при хроническом воспалении. При лазеротерапии увеличивалась доля p53⁺ фибробластов у пациентов в возрасте от 20 до 40 лет. У пациентов в возрасте 41–60 лет изменение доли p53⁺ фибробластов соединительной ткани собственной пластинки десны взаимосвязано с хроническим воспалением и не зависело от воздействия диодного лазера. С возрастом доля фибробластов, находящихся в состоянии апоптоза, статистически значимо увеличивалась в собственной пластинке десны без воспаления и при хроническом воспалении. Возраст не оказывал влияние на изменение доли p53⁺ фибробластов при лазерном облучении.

В период от 20 до 60 лет в десне без воспаления, с хроническим воспалением и после воздействия диодным лазером индекс пролиферации и апоптоза фибробластов уменьшался (рисунок 3).

Таким образом, направленность и доминирование процессов пролиферации или апоптоза имеет достоверные отличия, связанные с возрастом, наличием воспаления и условиями регенерации, стимулированной лазерным воздействием (рисунок 2, 3).



■ Индекс отношения пролиферации и апоптоза ($I_{P/A}$) фибробластов десны группы I (20–40 лет)

■ Индекс отношения пролиферации и апоптоза ($I_{P/A}$) фибробластов десны группы II (41–60 лет)

Рисунок 3 – Индекс отношения пролиферации и апоптоза ($I_{P/A}$) фибробластов десны в исследуемых группах. * – сравнение показателей контрольной подгруппы и подгруппы с воспалением пародонта, $p_{m-u} \leq 0,05$; ** – сравнение показателей подгруппы с воспалением пародонта и подгруппы после лазеротерапии, $p_w \leq 0,05$; ♦ – корреляционная связь между возрастом и $I_{P/A}$ фибробластов, $p \leq 0,05$

В группе I (20–40 лет) при хроническом воспалении преобладали межклеточные контакты со слабым окрашиванием на Е-кадгерин в базальном и шиповатом слоях эпителия десны ($p_{m-u} < 0,001$) по сравнению со значениями контрольной подгруппы 1. При воздействии диодного лазера были выявлены межклеточные контакты со средней окраской в базальном слое многослойного эпителия ($p_w < 0,001$) по сравнению с подгруппой с воспалением пародонта 1 (рисунок 4).

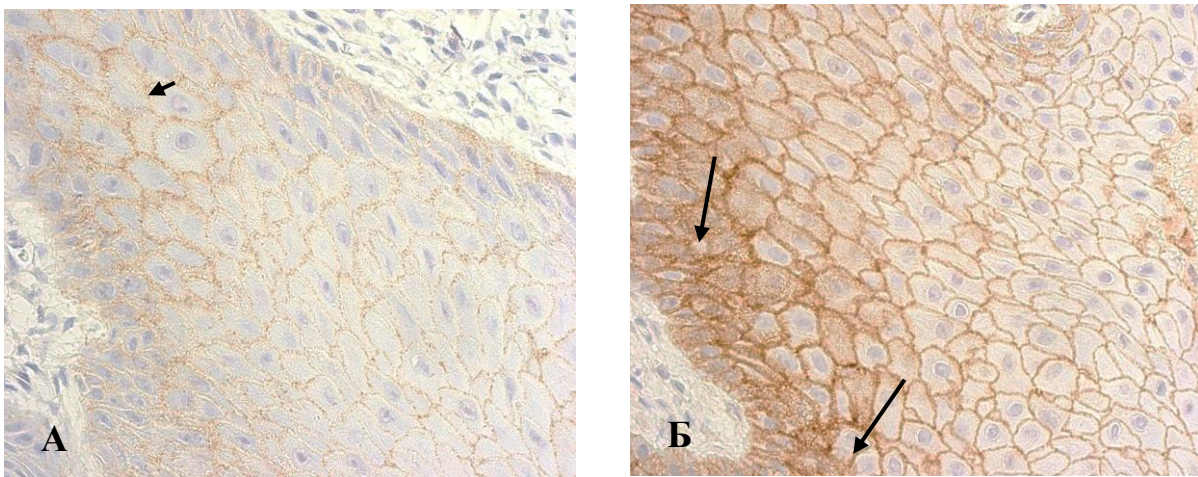


Рисунок 4 – Увеличение интенсивности окрашивания межклеточных контактов в базальном и шиповатом слоях эпителия десны женщины 30 лет с хроническим пародонтитом после лазеротерапии: А – многослойный плоский неороговевающий эпителий десны до лазеротерапии; Б – после лазеротерапии. Иммуногистохимическая реакция на Е-кадгерин с докраской ядер гематоксилином. Увеличение 400

Во группе II (41–60 лет) отмечали различия по сравнению с I группой по интенсивности окрашивания межклеточных контактов на Е-кадгерин в базальном и шиповатом слоях многослойного плоского эпителия десны: в подгруппе с воспалением пародонта 2 в базальном слое были выявлены межклеточные контакты со слабым окрашиванием по сравнению с контрольной подгруппой 2. В подгруппе после лазеротерапии 2 преобладали межклеточные контакты со средней экспрессией в базальном и шиповатом слоях эпителия десны, в сравнении с подгруппой с воспалением пародонта 2.

В подгруппе с воспалением пародонта 1 и в подгруппе с воспалением пародонта 2 наблюдалось незначительное увеличение числа макрофагов ($p_{m-u} < 0,001$) по сравнению с контрольными подгруппами 1 и 2 соответственно. Увеличение числа CD68⁺ макрофагов более чем на 80 % ($p_w < 0,001$) наблюдали в результате воздействия диодного лазера как в 20–40 лет, так и в 41–60 лет по сравнению с подгруппами с воспалением пародонта. Корреляционный анализ не показал достоверной взаимосвязи между возрастом и численностью CD68⁺ макрофагов в собственной пластинке десны при пародонтите и после воздействия диодного лазера ($r_s = -0,31$; $p > 0,05$).

Численность тучных клеток увеличивалась с возрастом на 63,7 % ($r_s = 0,75$; $p < 0,05$) при сравнении контрольных подгрупп 1 и 2; на 56,3 % при сравнении подгрупп с воспалением пародонта 1 и 2 ($r_s = 0,82$; $p < 0,05$); на 42 % при сравнении подгрупп после лазеротерапии 1 и 2 ($r_s = 0,74$; $p < 0,05$). В подгруппах с воспалением пародонта 1 и 2 наблюдалось повышение индекса дегрануляции ($p_{m-u} < 0,01$) по сравнению с контрольными подгруппами 1 и 2 соответственно. В 20–40 лет и 41–60 лет наблюдали уменьшение индекса дегрануляции тучных клеток после воздействия диодным лазером ($p_{m-u} < 0,001$) по сравнению с подгруппами с воспалением пародонта. Индекс дегрануляции тучных клеток собственной пластинки десны достоверно становился выше при увеличении возраста как в образцах десны без воспаления пародонта, так и при хроническом воспалении.

В группе I (20–40 лет) попарные сравнения с применением критерия Манна – Уитни позволили определить, что при хроническом воспалении незначительно снижается численность лимфатических сосудов в собственной пластинке десны ($p_{m-u} < 0,001$), преобладают лимфатические сосуды со средней экспрессией VEGFR-3. После воздействия диодного лазера наблюдалось увеличение численности сосудов на 39 % ($p_w < 0,001$). В данной подгруппе преобладали лимфатические сосуды без окрашивания и со слабой экспрессией VEGFR-3. Во II группе (41–60 лет) имелись различия по сравнению с I группой по распределению количества лимфатических сосудов в собственной пластинке десны среди подгрупп. При хроническом воспалении количество лимфатических сосудов увеличивалось на 16,5 % ($p_{m-u} < 0,001$), в равной степени были представлены сосуды со слабой, средней и сильной экспрессией VEGFR-3. После воздействия лазера численность лимфатических сосудов снижалась и приближалась к параметрам контрольной подгруппы 2, окрашивание сосудов было таким же, как и в подгруппе с воспалением пародонта 2.

Численность лимфатических сосудов уменьшалась с возрастом на 13,5 % ($r_s=-0,76$; $p<0,05$) при сравнении контрольной подгруппы 1 и контрольной подгруппы 2. Количество сосудов увеличивалось с возрастом на 4,5 % ($r_s=0,47$; $p<0,05$) при сравнении подгруппы с воспалением пародонта 1 и подгруппы с воспалением пародонта 2. При сравнении подгруппы после лазеротерапии 1 и подгруппы после лазеротерапии 2 наблюдалось уменьшение параметра на 32,1 % ($r_s=-0,77$; $p<0,05$).

В контрольной подгруппе 1 при проведении корреляционного анализа выявлено, что имеется прямая слабая взаимосвязь между долей Ki-67⁺ эпителиоцитов и долей межклеточных контактов с сильной реакцией на E-кадгерин в базальном слое ($r_s=0,11$; $p<0,05$). Установлено, что имеет место заметная обратная взаимосвязь между количеством CD68⁺ макрофагов и тучными клетками ($r_s=-0,67$; $p<0,05$). Обратная заметная корреляционная связь определена между количеством лимфатических сосудов и долей Ki-67⁺ фибробластов ($r_s=-0,51$; $p<0,05$). Определена обратная высокая корреляционная связь между количеством лимфатических сосудов и долей сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3 ($r_s=-0,76$; $p<0,05$).

В подгруппе с воспалением пародонта 1 при проведении корреляционного анализа установлено, что имеет место обратная заметная взаимосвязь между долей Ki-67⁺ эпителиоцитов и долей межклеточных контактов с сильной реакцией на E-кадгерин в шиповатом слое ($r_s=-0,53$; $p<0,05$). Определена заметная положительная корреляционная связь между численностью фибробластов и долей сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3 ($r_s=0,59$; $p<0,05$). Выявлена заметная прямая взаимосвязь между количеством CD68⁺ макрофагов и тучных клеток ($r_s=0,65$; $p<0,05$).

В подгруппе после лазеротерапии 1 имеется прямая слабая корреляционная взаимосвязь между долей Ki-67⁺ эпителиоцитов и долей межклеточных контактов с сильной реакцией на E-кадгерин в базальном слое ($r_s=0,11$; $p<0,05$).

В контрольной подгруппе 2 имеет место заметная положительная взаимосвязь между количеством фибробластов и количеством лимфатических сосудов ($r_s=0,57$; $p<0,05$). Определена обратная высокая корреляционная связь между количеством лимфатических сосудов и долей сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3 ($r_s=-0,73$; $p<0,05$).

В подгруппе с воспалением пародонта 2 выявлена заметная прямая взаимосвязь между количеством лимфатических сосудов и долей сосудов с сильной экспрессией VEGFR-3 ($r_s=0,53$; $p<0,05$).

В подгруппе после лазеротерапии 2 при проведении корреляционного анализа установлено, что имеется прямая заметная взаимосвязь между p53⁺ эпителиоцитами и p53⁺ фибробластами ($r_s=0,56$; $p<0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ диссертационной работы содержит сопоставление полученных результатов исследования с данными литературы.

Исследование показало, что пролиферативная активность эпителиальных клеток десны уменьшается при пародонтите и увеличивается после

лазеротерапии в возрасте 20–40 и 41–60 лет. У пациентов в возрасте 20–40 лет в эпителии десны без воспаления пролиферативная активность клеток базального и шиповатого слоев сопровождается укреплением межклеточных контактов ($r_s = -0,51$; $p < 0,05$), а при хроническом воспалении угнетение пролиферативной активности клеток базального и шиповатого слоев сопровождается укреплением межклеточных контактов за счет компенсаторных механизмов ($r_s = -0,53$; $p < 0,05$).

В условиях отсутствия воспаления у пациентов в возрасте 20–40 лет экспрессия E-кадгерина была интенсивнее по сравнению с 41–60-летними. При хроническом воспалении пародонта наблюдалось уменьшение интенсивности окрашивания межклеточных контактов в обеих возрастных группах. Вероятно, это связано с нарушением патогенными микроорганизмами, такими как *Porphyromonas gingivalis*, процессов межклеточной адгезии эпителиоцитов десны. В результате происходит разрушение эпителиального барьера десны и ускорение воспалительной реакции. Данные изменения нивелировались трехкратным применением диодного лазера независимо от возраста пациентов.

Численность фибробластов в собственной пластинке десны статистически значимо становится ниже с возрастом. При хроническом пародонтите увеличено число фибробластов в соединительнотканых структурах десны как в 20–40 лет, так и в 41–60 лет, что сопровождается снижением численности фибробластов, находящихся в состоянии апоптоза. Воздействие диодного лазера снижает количество фибробластов в собственной пластинке десны, активизируя процессы пролиферации и апоптоза в популяции данных клеток.

Результаты нашей работы показали, что возраст, хроническое воспаление тканей пародонта, воздействие диодного лазера достоверно влияют на изменение числа тучных клеток в соединительнотканых структурах десны. У пациентов с хроническим воспалением пародонта и после воздействия диодного лазера в возрасте 20–40 и 41–60 лет достоверно увеличивается количество тучных клеток, которые участвуют в патогенезе заболеваний пародонта. Дегрануляция тучных клеток увеличивается при пародонтите и уменьшается после воздействия диодным лазером.

Корреляционная связь между количеством фибробластов и тучных клеток установлена в структурах собственной пластинки десны только у пациентов 41–60 лет с хроническим пародонтитом после терапии диодным лазером.

Число макрофагов взаимосвязано с числом тучных клеток у пациентов 20–40 лет без воспаления пародонта и с хроническим пародонтитом. Заметная обратная корреляционная взаимосвязь выявлена между количеством $CD68^+$ макрофагов и тучных клеток в образцах десны людей от 20 до 40 лет. Следует отметить, что при хроническом воспалении данная корреляция меняется на положительную. В настоящем исследовании выявлена достоверная взаимосвязь между хроническим пародонтитом и увеличением количества активированных макрофагов у пациентов 41–60 лет. Также установлено достоверное влияние диодного лазера на изменение численности $CD68^+$ макрофагов в соединительнотканых структурах десны. Соотношение числа тучных клеток и макрофагов может рассматриваться как одно из звеньев механизма,

регулирующего пролиферацию/апоптоз при воспалении и в условиях стимуляции регенерации лазерным воздействием.

Настоящее исследование показало, что диодный лазер достоверно влияет на изменение количества лимфатических сосудов в собственной пластинке десны во всех исследуемых возрастных периодах. В возрасте 20–40 лет хроническое воспаление пародонта незначительно снижает количество сосудов в собственной пластинке десны. В 20–40 лет происходит увеличение численности лимфатических сосудов после лазеротерапии, в 41–60 лет – уменьшение. Хронический пародонтит влияет на увеличение количества VEGFR-3⁺ лимфатических сосудов с интенсивно окрашенными эндотелиоцитами. По литературным данным, в ответ на повреждение эндотелиоциты лимфатических капилляров наряду с фибробластами выделяют ангиокринные факторы, способствуя восстановлению.

После воздействия диодным лазером данные показатели уменьшаются в возрастном периоде 20–40 лет и увеличиваются в 41–60 лет. Следовательно, можно предположить, что у пациентов 20–40 лет хроническое воспаление в тканях пародонта способствует пролиферативной активности эндотелиальных клеток, что, коррелирует с новообразованием лимфатических сосудов, а воздействие диодного лазера замедляет ангио- и лимфангиогенез. Напротив, у пациентов 41–60 лет выявлено незначительное снижение количества сосудов после воздействия диодным лазером, несмотря на увеличение количества сосудов с интенсивным окрашиванием эндотелиальных клеток. Следовательно, воздействие диодного лазера не оказывает такого влияния на лимфангиогенез в соединительнотканых структурах десны у пациентов в возрасте от 41 до 60 лет.

Выводы:

1. Численность фибробластов в здоровой десне людей в возрасте от 20 до 60 лет уменьшается на 11 %, численность тучных клеток увеличивается на 39 % с достоверным ростом индекса дегрануляции. Содержание CD68⁺ макрофагов в этот возрастной период не имеет достоверно значимых отличий, а количество VEGFR-3⁺ сосудов уменьшается на 13,5 %.

2. Доля Ki-67⁺ фибробластов десны пациентов в возрасте от 20 до 60 лет становится меньше на 24 %, а доля p53⁺ фибробластов увеличивается на 37 %. Динамика изменения численности фибробластов, наличие корреляционной взаимосвязи между возрастом и долей Ki-67⁺ фибробластов, между возрастом и долей p53⁺ фибробластов позволяют предположить, что угнетение пролиферации и активация апоптоза являются звеньями механизма регуляции численности фибробластов в здоровой и воспаленной десне.

3. Доля межклеточных контактов без окраски и со слабым окрашиванием на E-кадгерин в базальном и шиповатом слоях эпителия десны увеличивается в возрастной динамике от 20 до 60 лет. Доля Ki-67⁺ эпителиоцитов достоверно уменьшается с возрастом при хроническом воспалении. Доля эпителиоцитов, экспрессирующих p53, на 27 % больше в десне без воспаления у людей 41–60 лет, уменьшается при хроническом воспалении и лазерном воздействии. Корреляционный анализ показал, что у пациентов в возрасте от 20 до 40 лет в

эпителии десны без воспаления и в условиях лазерного воздействия пролиферация эпителиоцитов связана с укреплением межклеточных контактов.

4. Численность и дегрануляция тучных клеток увеличивается при хроническом пародонтите. В результате воздействия диодного лазера численность тучных клеток увеличивается при одновременном уменьшении индекса дегрануляции тучных клеток независимо от возраста. Число CD68⁺ макрофагов увеличивается на 13 % при воспалении и на 45 % при применении диодного лазера независимо от возраста.

5. Изменение интенсивности экспрессии VEGFR-3⁺ в сосудах десны и выявление обратной высокой корреляционной взаимосвязи между возрастом и количеством лимфатических сосудов в десне без воспаления, положительной умеренной взаимосвязи при пародонтите, обратной высокой взаимосвязи после лазерного облучения позволяют предположить вовлечение сосудистого компонента тканей десны в механизмы регуляции, ассоциированные с возрастом, воспалением и регенерацией.

6. Превалирование процессов пролиферации над апоптозом, корреляция пролиферативной активности с усилением экспрессии E-кадгерина в эпителии десны, снижение численности фибробластов, коррелирующее с увеличением доли p53⁺ фибробластов, с одновременным увеличением числа макрофагов и тучных клеток, числа лимфатических сосудов со слабой и отрицательной экспрессией VEGFR-3 характеризуют морфологические особенности репаративной регенерации десны человека в возрасте от 20 до 40 лет. Стимуляция пролиферации эпителиоцитов при одновременном угнетении процесса апоптоза, уменьшении экспрессии E-кадгерина в эпителии десны; снижение численности фибробластов, коррелирующее с уменьшением доли p53⁺ фибробластов, числа лимфатических сосудов со средней экспрессией VEGFR-3 отличают регенерацию десны человека в возрасте 41–60 лет.

Практические рекомендации:

1. Научные разработки и положения диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по теме «Гистологическое строение органов полости рта» со студентами II курса специальности «Стоматология». Результаты настоящего исследования внедрены в лечебный процесс отделения терапевтической стоматологии с кабинетами пародонтологии, эндодонтии и лечения заболевания слизистой оболочки АУ ЧР «Республиканская стоматологическая поликлиника» МЗ ЧР, а также в лечебную деятельность стоматологической клиники ООО «ЭКОДЕНТ», г. Чебоксары.

2. Полученные данные могут быть использованы в практической деятельности врача – стоматолога-пародонтолога для определения тактики лечения хронического пародонтита у пациентов разного возраста, так как демонстрируют необходимость учитывать возраст пациента при назначении кратности терапии диодным лазером с длиной волны 940 нм для оптимального клинического результата.

3. Разработан экспериментальный подход для комплексной оценки межклеточных взаимодействий в эпителии и собственной пластинке десны при трех функциональных состояниях: без воспаления, при хроническом воспалении и в условиях стимуляции регенерации лазерным воздействием, который может применяться для изучения механизмов регенерации в ротовой полости при разработке новых терапевтических методов лечения.

Основные положения диссертационного исследования отражены в следующих публикациях автора:

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Сперанская, Е. М. Фибробласты, тучные клетки, макрофаги десны у больных пародонтитом после лазерной терапии / **Е. М. Сперанская** // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 218–219 (0,01 п. л.).

2. Сперанская, Е. М. Численность тучных клеток и макрофагов при хроническом воспалении десны у людей молодого возраста / **Е. М. Сперанская**, А. Ф. Салеева, Н. Н. Голубцова // Acta Medica Eurasica. – 2022. – № 4. – С. 65–72 (0,06/0,02 п. л.).

Статьи, опубликованные в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования

3. Е-кадгерин и эпителиальный барьер десны / **Е. М. Сперанская**, Н. Н. Голубцова, Л. Р. Мухамеджанова, Е. В. Москвичев // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2022. – Т. 17, № 4. – С. 461–466 (0,05/0,01 п. л.).

4. Межклеточные контакты, пролиферация и апоптоз эпителия десны у пациентов с пародонтитом после лазерной терапии / **Е. М. Сперанская** [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 22–29 (0,1/0,02 п. л.).

Публикации в других изданиях

5. Сперанская, Е. М. Клинико-морфологическое обоснование применения диодного лазера при воспалительно-деструктивных поражениях пародонта / **Е. М. Сперанская** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов (Волгоград, 25–28 апреля 2018 г.). – Волгоград, 2018. – С. 220 (0,002 п. л.).

6. Морфологическое обоснование применения диодного лазера при хроническом генерализованном пародонтите / **Е. М. Сперанская**, Л. Р. Мухамеджанова, Н. Н. Голубцова, Л. И. Никитина // Acta Medica Eurasica. – 2018. – № 4. – С. 61–65 (0,08/0,02 п. л.).

7. **Сперанская, Е. М.** Изменения в тканях десны процессов пролиферации и апоптоза при хроническом пародонтите и воздействии диодного лазера / **Е. М. Сперанская, Н. Н. Голубцова** // Достижения современной морфологии – практической медицине и образованию: сборник научных статей по материалам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию Курского государственного медицинского университета, 120-летию со дня рождения профессора К. С. Богоявленского, 100-летию со дня рождения профессора Д. А. Сигалевича, 100-летию со дня рождения профессора З. Н. Горбачевич / под редакцией В. А. Лазаренко. – Курск, 2020. – С. 471–479 (0,01/0,005 п. л.).

8. Иммуногистохимический маркер VEGF в диагностике заболеваний пародонта / **Е. В. Москвичев, Е. М. Сперанская, М. В. Черненко, В. В. Москвичев** // Современное состояние диагностики и лечения злокачественных новообразований: сборник материалов Межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 75-летию АУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Чувашии; «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»; «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Чувашской Республики. – Чебоксары, 2021. – С. 76–81 (0,02/0,01 п. л.).

9. Влияние диодного лазера на макрофаги собственной пластинки десны при хроническом пародонтите / **Е. М. Сперанская** [и др.] // Стоматология – наука и практика, перспективы развития: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Е. А. Магида. – Волгоград, 2021. – С. 198–200 (0,01/0,002 п. л.).

10. **Сперанская, Е. М.** Численность тучных клеток и макрофагов десны людей молодого возраста в условиях хронического воспаления / **Е. М. Сперанская, А. Ф. Салеева, Н. Н. Голубцова** // Морфология в теории и практике: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семеновны Гордон; Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова. – Чебоксары, 2022. – С. 195–201 (0,02/0,01 п. л.).

СПЕРАНСКАЯ Екатерина Михайловна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ДЕСНЫ
ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ
В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать 12.04.2023. Формат 60×84 1/16. Печ. л. 1,25.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 100 экз. Заказ № 418.

Отпечатано в типографии ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И.Н. Ульянова»
428015 Чебоксары, Московский просп., 15