

Министерство здравоохранения Республики Беларусь
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
1-я кафедра терапевтической стоматологии
кафедра патологической анатомии»
Научная сессия БГМУ

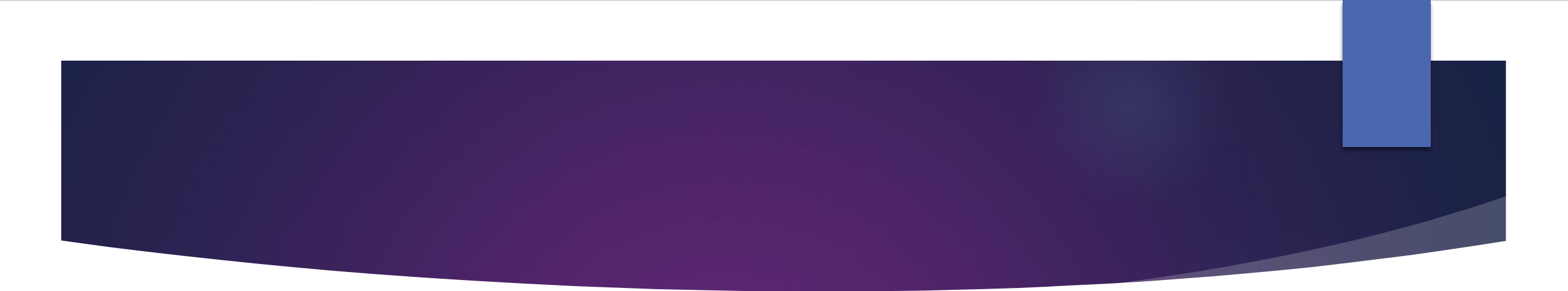
Прогнозирование течения патологии периодонта

Л. А. Казеко, В.А. Захарова, Е.А. Анфиногенова, Е.Д. Черствый

МИНСК 2021

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Важное значение в патогенезе воспаления, в том числе тканей периодонта, в настоящее время придается матриксным металлопротеиназам (ММПs).
- В качестве основных протеаз, участвующих в деструкции тканей периодонта, рассматриваются коллагеназы (ММП8, ММП13) и желатиназы (ММП2, ММП9), определяющие деградацию коллагена I типа, представляющего преобладающий компонент периодонтального внеклеточного матрикса.
- Исследование особенностей экспрессии ММПs имеет важное значение в понимании механизмов патогенеза воспалительно-деструктивных заболеваний периодонта и может быть использовано как для определения характера течения на этапе первичной диагностики и мониторинга заболевания в динамике, так и для разработки патогенетически обоснованной терапии данной группы заболеваний.



Цель - установить значение характера и уровней экспрессии матриксных металлопротеиназ для дифференциальной диагностики и определения характера течения периодонтитов на этапе манифестации заболевания путем морфометрической оценки их экспрессии в биопсийном материале десны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование

- Объект исследования - биопсийный материал десен 82 пациентов на базах 1-ой кафедры терапевтической стоматологии (ГУ «Республиканская клиническая стоматологическая поликлиника») и патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет» с различным характером течения периодонтитов: быстро прогрессирующим (БПП, n=26), хроническим простым (ХПП, n=18), хроническим сложным (ХСП, n=38).
- Критериями включения в исследование явились клинико-рентгенологические признаки деструкции периодонта и возраст пациентов для быстро прогрессирующего периодонтита от 18 до 35 лет, для хронического (простого и сложного) периодонтита 36-60 лет.
- Проведено клинико-инструментальное обследование и лечение пациентов с патологией периодонта, включенных в исследование, с получением у каждого из пациентов информированного согласия.

Гистологическое исследование

При проведении морфологической оценки биопсийного материала десны пациентов с различными формами патологии периодонта оценке подлежали признаки альтеративных изменений в эпителиальном компоненте в виде

- десквамации эпителия
- гидропической дистрофии
- изъязвления
- акантоза
- межэпителиальных лейкоцитов
- разрушения или гипертрофии коллагеновых волокон, кровоизлияний, воспалительной инфильтрации с преобладанием сегментоядерных лейкоцитов и/или мононуклеарной инфильтрации в сосочковом и сетчатом слое десны.

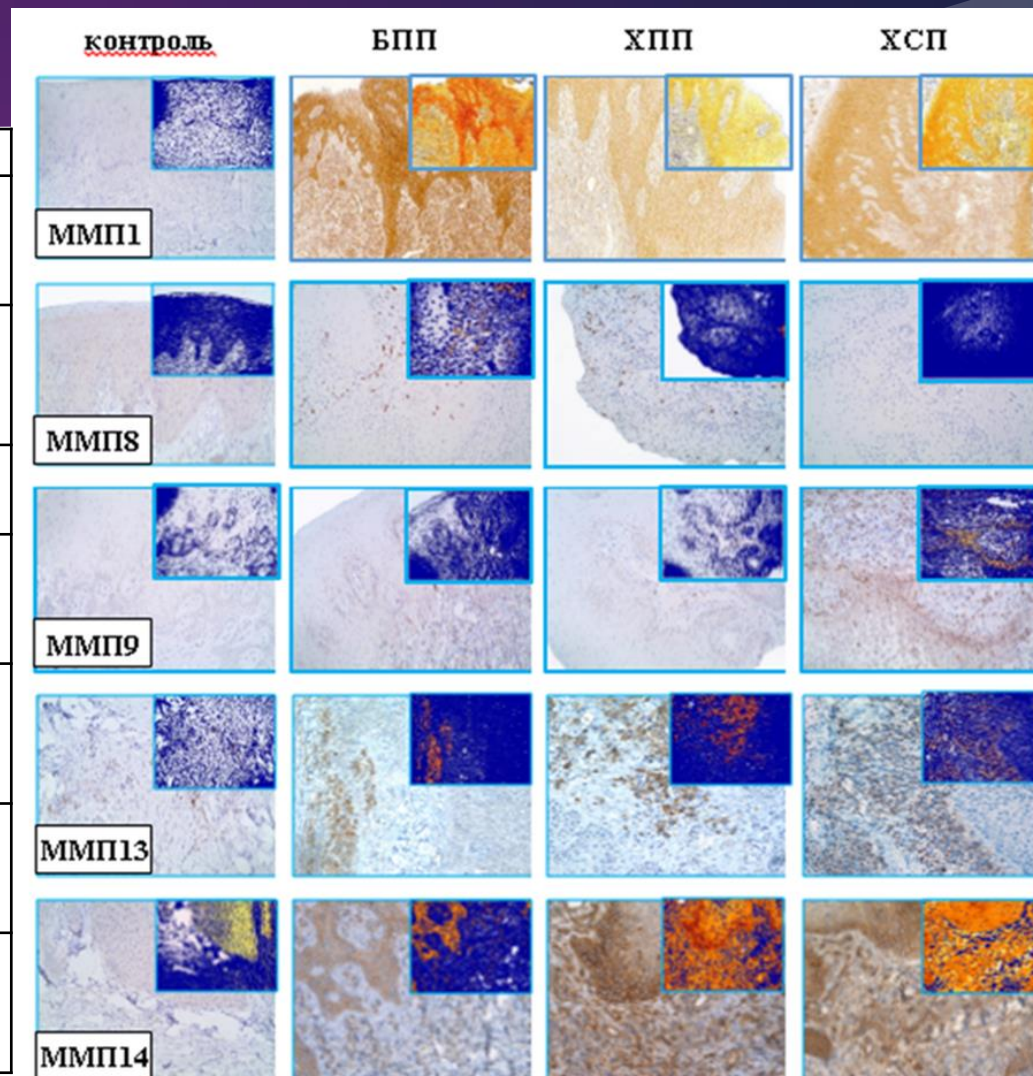
Иммуногистохимическое исследование

Реактивы, использованные для проведения ИГХМ

Первичное антитело, клон	Происхождение антител	Демаскировочный буфер, рН	Визуализирующая система	Разведение	Время экспозиции хромогена	Позитивный контроль
ММП1	кроличьи	рН=9,0 125° 1'	rabbit	1:1000	3 минуты	слизистая желудка
ММП 2	кроличьи	рН=9,0 125° 1'	rabbit	1:100	5 минут	слизистая толстой кишки
ММП 7	мышинные	рН=9,0 125° 1'	mouse	1:250	5 минут	почка
ММП 8	кроличьи	рН=9,0 125° 2.5'	rabbit	1:1000	3 минуты	костный мозг
ММП 9	мышинные	рН=9,0 125° 2.5'	mouse	1:1600	5 минут	костный мозг
ММП 13	мышинные	рН=9,0 125° 30''	mouse	1:250	5 минут	слизистая желудка
ММП 14	кроличьи	рН=9,0 125° 30''	rabbit	1:500	5 минут	слизистая желудка

ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ ММПs В БИОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ ДЕСЕН ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПЕРИОДОНТИТОВ

ММПs	Характер экспрессии
ММП1	Гомогенное окрашивание цитоплазмы лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности
ММП2	Гомогенное окрашивание цитоплазмы эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев), фибробластов, эндотелия и лейкоцитов в коричневый цвет различной интенсивности
ММП7	Гомогенное окрашивание цитоплазмы фибробластов, эндотелия и фокально эпителия в коричневый цвет различной интенсивности
ММП8	Гомогенное окрашивание цитоплазмы лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности
ММП9	Гомогенное окрашивание цитоплазмы лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев) в коричневый цвет различной интенсивности
ММП13	Гомогенное окрашивание цитоплазмы лейкоцитов/гистиоцитов, фибробластов, эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности
ММП14	Гомогенное окрашивание цитоплазмы эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев), фибробластов, эндотелия и лейкоцитов в коричневый цвет различной интенсивности



Морфометрический анализ

- Для морфометрического анализа выполняли сканирование препаратов, окрашенных с использованием ИГХМ, с применением цифрового слайд-сканера MoticEasyScan с последующим программным анализом изображений с использованием AperioImageScope v12.4.0.5043.
- В рамках программного анализа изображений проводилось выделение 6 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение x20), с анализом ИГХ окрашивания в поле зрения в целом (которое включало эпителиальный и стромальный компонент в равных пропорциях по 3 поля зрения – all), а также отдельно в стромальном компоненте десны (по 3 поля зрения – stromal).
- В процессе программного анализа экспрессии ММПs в ткани десны интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции ДАБ-хромогена) измерялась AperioImageScope автоматически и разделялась на 3 уровня интенсивности и негативную реакцию. Результат программной оценки показателей позитивности и доли пикселей с высокой и умеренной экспрессией имел прямую взаимосвязь, а интенсивности экспрессии – обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки.

Морфометрический анализ

Для анализа исследуемых групп по характеру экспрессии MMPs с использованием программы Aperio Image Score рассчитывались следующие параметры для каждого маркера:

- **позитивность** (Positivity – отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей $\times 100\%$),
- **доля пикселей с высокой и умеренной интенсивностью** (Nsr+p – отношение числа позитивных пикселей с высокой и умеренной интенсивностью к общему числу позитивных и негативных пикселей $\times 100\%$),
- **индекс интенсивности в иммунопозитивных участках** (MMPs_index – отношение суммы интенсивностей пикселей с высокой, средней, низкой интенсивностью к числу позитивных пикселей),
- **общий индекс интенсивности ИГХ реакции** (MMPs_INDEX – отношение суммы интенсивностей негативных и позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей).



Статистический анализ

Проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 10.0 с вычислением медианы (Me), интерквартильного (25% и 75% процентиля – IQR) и 95% доверительного интервалов, максимального и минимального значения.

- Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро-Уилка (W).
- Парное сравнение независимых выборок по количественным признакам осуществляли с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определением критерия Манна – Уитни (U-критерий).
- С целью решения задачи классификации периодонтитов и оценки ее диагностической эффективности выполнен ROC-анализ с определением пороговых значений и их операционных характеристик (диагностической чувствительности (ДЧ) и специфичности (ДС)). При этом информативность параметров экспрессии оценивали по показателю AUC (площади под ROC-кривой) в соответствии со следующей шкалой: 0,9-1,0 – наивысшая информативность, 0,8-0,9 – хорошая, 0,7-0,8 – приемлемая, 0,6-0,7 – слабая, 0,5-0,6 – крайне слабая. Уровень статистической значимости устанавливался $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Проведенный анализ характера экспрессии ММПs в биопсийном материале десен пациентов с патологией периодонта показал, что ММП2 и ММП13 приблизительно в равной степени участвуют в развитии и течении всех изученных форм периодонтитов. В патогенезе же быстро прогрессирующей формы наибольшее значение имеют более высокие, чем при хронических медленно прогрессирующих формах, параметры экспрессии ММП1, ММП8, ММП14 и более низкие – ММП9, характер экспрессии которых клинически и рентгенологически ассоциирован с прогрессирующей деструкцией тканей периодонта и альвеолярного отростка.
- Наилучшими диагностическими характеристиками для дифференциации и определения характера течения периодонтитов на этапе первичной диагностики обладают параметры стромальной экспрессии ММП14, а хорошей и приемлемой степенью характеризуются параметры общей и стромальной экспрессии ММП1, ММП8, ММП9 и параметры общей экспрессии ММП14.

Заключение

- Выполненный ROC-анализ подтвердил значение изученных показателей экспрессии MMPs для классификации периодонтитов на этапе манифестации заболевания. Для дифференциальной диагностики быстро прогрессирующего периодонтита с хроническими формами, в том числе хроническим сложным периодонтитом, в качестве диагностических наиболее информативными определены следующие показатели экспрессии MMPs: позитивность, доля пикселей с выраженной и умеренной интенсивностью и индексы общей и стромальной экспрессии MMP1, позитивность стромальной экспрессии, доля пикселей с выраженной и умеренной интенсивностью, индексы общей и стромальной экспрессии MMP8, позитивность и доля пикселей с выраженной и умеренной интенсивностью общей и стромальной экспрессии MMP9 и MMP14.
- Полученные результаты, с одной стороны, позволяют охарактеризовать некоторые из звеньев патогенеза различных форм периодонтитов с позиции характера экспрессии изученных MMPs. С другой стороны, быстро прогрессирующий периодонтит и связанная с ним потеря зубов уже отнесены к факторам, модифицирующим общее здоровье пациентов. Поэтому, выделение на этапе манифестации заболевания пациентов с агрессивным быстро прогрессирующим течением патологии периодонта, позволит максимально персонифицировать терапию, исключить либо отсрочить потерю зубов, снизить затраты на лечение, в том числе протезирование, улучшить качество жизни.