

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.314.17-002.2-078.33

Зорина О.А.<sup>1,2</sup>, Аймадинова Н.К.<sup>1</sup>, Борискина О.А.<sup>1,2</sup>, Шевелев А.Б.<sup>3</sup>**ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ФНО $\alpha$  И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ MMP8 И MMP9 В ТКАНИ ПАРОДОНТА В НОРМЕ И ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ**<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», 199911, г. Москва; <sup>2</sup>Центральный НИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, 199911, г. Москва; <sup>3</sup>Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, 142782, г. Москва

*Разработан метод полимеразной цепной реакции в реальном времени в сочетании с обратной транскрипцией, позволяющий получать воспроизводимые результаты при анализе мРНК человека в образцах, полученных из пародонтальных карманов. Показана положительная корреляция между содержанием в здоровой ткани пародонта мРНК фактора некроза опухоли (ФНО) и матриксных металлопротеиназ MMP8 и MMP9. Подобной корреляции не наблюдается при анализе образцов, взятых у пациентов с хроническим пародонтитом. Установлено, что координация механизма ФНО $\alpha$ -зависимой индукции синтеза металлопротеиназ более выражена у мужчин, чем у женщин.*

**Ключевые слова:** хронический пародонтит; полимеразная цепная реакция; транскриптом; воспаление; фактор некроза опухоли; матриксные металлопротеиназы.

**Для цитирования:** Зорина О.А., Аймадинова Н.К., Борискина О.А., Шевелев А.Б. Исследование регуляции экспрессии ФНО $\alpha$  и матриксных металлопротеиназ MMP8 и MMP9 в ткани пародонта в норме и при хроническом пародонтите. 2016; 20 (3): 125-130. DOI 10.18821/1728-2802 2016; 20 (3): 125-130

Zorina O.A.<sup>1,2</sup>, Aymadinova N.K.<sup>1</sup>, Boriskina O.A.<sup>1,2</sup>, Shevelev A.B.<sup>3</sup>

**STUDY OF COORDINATED REGULATION OF EXPRESSION OF TNF $\alpha$  AND MATRIX METALLOPROTEINASES MMP8 AND MMP9 IN PERIODONTAL TISSUE IN HEALTH AND PATHOLOGY**

<sup>1</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, 199911, Moscow; <sup>2</sup>Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery of Ministry of Health of the Russian Federation, 199911, Moscow; <sup>3</sup>Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis, 142782, Moscow

*A qPCR method combined with reverse transcription applicable for obtaining reproducible results of mRNA analysis of human periodontal swabs is established. A positive correlation between mRNA of TNF $\alpha$ , MMP8, MMP9 in healthy periodontal tissue is demonstrated. This correlation is not found in patients with chronic periodontitis. A mechanism of TNF $\alpha$ -dependent induction of MMP8 and MMP9 induction is found to be pronounced in men than in women.*

**Key words:** chronic periodontitis; polymerase chain reaction; transcriptom; inflammation; tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ); matrixin, metalloproteinase (MMP8, MMP9).

**For citation:** Zorina O.A., Aymadinova N.K., Boriskina O.A., Shevelev A.B. Study of coordinated regulation of expression of TNF $\alpha$  and matrix metalloproteinases MMP8 and MMP9 in periodontal tissue in health and pathology. Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal. 2016; 20 (3): 125-130. DOI 10.18821/1728-2802 2016; 20 (3): 125-130

**For correspondence:** Zorina Oksana Aleksandrovna, doctor of medicine, professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery of Ministry of Health of the Russian Federation, E-mail: dubova.l@gmail.com.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The work is executed at financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation (state task No. 19.1724.2014/in the academic sphere).

Received 01.04.16

Accepted 04.04.16

Несмотря на широкое развитие инструментальных и лабораторных методов исследования, ранняя и точная диагностика различных стоматологических заболеваний до сих пор остается крайне актуальным вопросом. На протяжении многих лет заболевания пародонта стабильно занимают по распространенности одно из ведущих мест в мире. Генетическая составляющая играет при этом одну из ведущих ролей [1], однако основной причиной хронического пародонти-

та является инфицирование пародонта патогенными бактериями, приводящее к дисбиозу [2–4].

До настоящего времени отсутствуют данные литературы о результатах исследований, выполненных молекулярными методами, позволяющие судить о влиянии гендерных различий на состояние пародонта и его защитных реакций, хотя последние работы [5, 6] косвенно свидетельствуют о вероятности существования такого влияния. Эффект половых гормонов эстрогена и прогестерона на ткани пародонта имеет длительную историю. Более 60 лет назад было обнаружено, что изменение гормонального статуса при беременности, пубертатном спурте и различных ста-

**Для корреспонденции:** Зорина Оксана Александровна, д-р мед. наук, Д.м.н., зав. отделением терапевтической стоматологии ЦНИИ-ИС и ЧЛХ, E-mail: zorina-cniis@yandex.ru

дях менструального цикла существенно влияет на реакцию пародонта на зубной налет. Гингивит беременных, который встречается, по различным данным, у 35–100% женщин, немедленно прекращается после родов. Существует доказательство провоспалительного эффекта половых гормонов, влияющих на продукцию простагландинов, проницаемость сосудов и скорость миграции нейтрофилов в тканях [7]. В настоящее время доказано, что эстроген также может давать защитный эффект в отношении пародонта, причем он не связан с изменением продукции цитокинов и простагландинов. Однако наблюдение, показавшее, что при беременности увеличивается риск развития воспалительных заболеваний пародонта вне зависимости от уровня гигиены полости рта, остается наиболее убедительным подтверждением системного влияния половых гормонов на ткани пародонта [8].

Физиологически обусловленные изменения половых гормонов в значительной мере имитируются при использовании комбинированных оральных контрацептивов на основе прогестогена (1,5 мг в день) или этинилэстрадиола (30–40 мкг в день) [9]. Поскольку эти контрацептивы достаточно эффективны и получили массовое применение (например, в Великобритании их систематически принимают ~25% женщин в возрасте от 16 до 49 лет), рекомендуемая их дозировка несколько снижена. Примечательно, что Британский национальный формуляр не включает воспаление пародонта в число побочных эффектов этих препаратов. Его составители объясняют это решение тем, что оральные контрацептивы не способны влиять на здоровый пародонт, а только усугубляют воспаление, вызванное зубным налетом. Аналогичные решения приняты надзорными органами и в ряде других стран.

При применении животных моделей установлено, что ответ хозяина является основным фактором разрушения пародонтальной связки при хроническом пародонтите [10]. Как системное, так и местное применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) приводит к подавлению синтеза простагландинов, вызывая снижение скорости разрушения альвеолярной кости при спонтанном поражении пародонта у собак и при наложении лигатуры на приматах. Аналогичным образом подавление продукции цитокинов фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ), интерлейкина-17 (ИЛ-17), комплемента и RANKL на модели деструкции пародонта при экспериментальной инфекции *A. actinomycetemcomitans* в условиях моделирования на приматах с помощью фистулы и наложения лигатуры привело к пониманию того, что все эти факторы непосредственно участвуют в разрушении пародонта [11]. Кроме того, в ходе этих исследований были предложены терапевтические средства для лечения пародонтита у человека. Напротив, искусственное введение ИЛ-1 или ФНО $\alpha$ , а также усиление их продукции в пародонте приводят к существенному ускорению лизиса костной ткани под действием микробного фактора [12]. Этому наблюдению соответствует и тот факт, что у трансгенных мышей с нарушенным синтезом ФНО $\alpha$  снижается скорость разрушения кости по сравнению с животными дикого типа. Данные об изменении состава транскриптома

поверхности пародонта в норме и при обострении пародонтита, в частности увеличение концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6 и ФНО $\alpha$  в кревикулярной жидкости при хроническом пародонтите по сравнению с нормой, достаточно многочисленны [11, 13, 14]. Однако недостатком опубликованных работ в этом направлении является практически полное игнорирование скорости изменения состава транскриптома. Очевидно, это объясняется практической сложностью взятия серий образцов у одного и того же пациента, хотя имеющиеся теоретические представления позволяют уверенно предсказать, что скорость реализации любых защитных реакций организма оказывает ключевое влияние на их эффективность. Именно с этой позиции стоит рассматривать многочисленные данные клинических исследований, подтверждающие устоявшуюся в литературе точку зрения об априорной неэффективности острого неспецифического иммунного ответа Th1-типа в плане предотвращения бактериальной инфекции пародонта и в конечном счете его разрушения с участием собственных клеток человека и его эндогенных протеолитических ферментов.

Использование количественных, а не только качественных методов, позволивших применить статистический анализ выборок в норме и при патологии, является основной причиной того, что в рамках настоящей работы были обнаружены существенные различия в составе микробиоценоза между мужчинами и женщинами, а также различия в составе транскриптов в тканях пародонта. Выявленная корреляция между концентрациями транскриптов ФНО $\alpha$  и матриксных протеиназ 8 и 9 (ММР8 и ММР9) у мужчин и лиц со здоровым пародонтом, но не у женщин, или в выборке пациентов с хроническим пародонтитом позволяет сформулировать новый подход к исследованию динамики синтеза защитных факторов, а также дает возможность пересмотреть утвердившееся в литературе представление о неэффективности и даже вредности острого неспецифического иммунного ответа Th1-типа с точки зрения предотвращения бактериальной инфекции пародонта.

В обзорной статье зарубежных авторов [9] представлены результаты применения терапевтических блокаторов ФНО $\alpha$  для лечения болезней пародонта. Авторы приводят подтверждения того, что воспаление пародонта сопровождается нарушением баланса противовоспалительных цитокинов: ИЛ, ФНО $\alpha$ , простагландинов и цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10. Исследования на животных моделях указывают на то, что ФНО $\alpha$  играет важную роль в патогенезе пародонтита, а его блокаторы пентоксифиллин и талидомид способны замедлять разрушение пародонтальной связки. Исследования на животных показали, что ФНО $\alpha$  наряду с другими цитокинами отвечает за прогрессирование гингивита и переход его в пародонтит. Уже в начале 80-х годов XX века доказано, что подобно НПВП блокаторы ФНО $\alpha$  в равной мере смягчают течение как пародонтита, так и ревматоидного артрита. В это время было установлено, что блокатор ФНО $\alpha$  инфликсимаб замедляет резорбцию альвеолярной кости, хотя не способен влиять на глубину пародонтальных карманов. При этом степень воспаления десны может даже

увеличиваться. Эти внешне противоречивые данные показали авторам неожиданными и были объяснены тем, что процессы воспаления пародонта могут регулироваться различными механизмами.

Воспалительная природа хронического пародонтита предполагает, что он будет подвержен влиянию противовоспалительных препаратов, которые принимаются пациентами в связи с другими заболеваниями: остеоартритом, ревматоидным артритом, аутоиммунными заболеваниями, связанными с поражением глаз, кожи и почек. Основными типами таких препаратов, влияющими на течение пародонтита, являются кортикостероиды, НПВП и недавно появившиеся средства для инактивации ФНО $\alpha$ , широко применяемые для лечения ревматоидного артрита. Кортикостероиды преднизолон, преднизон, бетаметазон и дексаметазон широко используются для лечения хронических воспалительных заболеваний или смягчения их симптоматики. Влияние преднизона на развитие и тяжесть пародонтита исследовали в выборке пациентов с рассеянным склерозом, которые проходили лечение стероидами от 1 до 4 лет. Глубина пародонтальных карманов, степень рецессии десны и потеря альвеолярной кости не различались между группой пациентов, лечившихся стероидами, и контрольной группой. В настоящее время считается доказанным, что даже длительная терапия кортикостероидами не оказывает влияния на течение пародонтита. Этот вывод согласуется с рядом более ранних работ на эту тему.

Анализируя природу острого неспецифического ответа на бактериальную инфекцию при хроническом пародонтите, необходимо отметить факт резкого подъема активности ММР, синтезируемых как фибробластами, так и макрофагами пародонта, при возникновении воспаления пародонта любой природы [15]. Особенно существенно то, что в сотни и тысячи раз при этом возрастает активность нейтрофильной коллагеназы ММР8 и желатиназы ММР9 – ферментов, участвующих в конечных стадиях деградации коллагена [16, 17]. На этом основании большинство исследователей делают вывод об аутопротеолитической природе деградации соединительнотканного матрикса пародонта, лежащего в основе пародонтита [7, 17, 18]. При этом роль бактериальных протеиназ в качестве разрушителей коллагена и других компонентов матрикса рассматривается как сигнальная, хотя иногда ей также приписывается существенное значение. Однако этой точке зрения во многом противоречит тот факт, что подъем активности первичных коллагеназ, способных атаковать нативный коллаген в составе внеклеточного матрикса, таких как ММР1 или ММР13, не связан со скоростью поражения пародонта [6]. Между тем активация одних только терминальных матриксинов, даже в несколько раз превышающая базовый уровень, не способна влиять на целостность коллагеновой основы пародонтальной связки.

При рассмотрении влияния ММР8 и ММР9 на деградацию матрикса пародонта важным вопросом является регуляторный механизм подъема их активности [19]. Исследования, выполненные молекулярным и иммунологическими методами, показывают существенное увеличение уровня мРНК ММР8 и ММР9 [18, 20] и соот-

ветствующих белковых продуктов [21] при поражении пародонта. Однако эти показатели лишь опосредованно отражают уровень активности соответствующих ферментов. Матриксины нормальной ткани присутствуют в форме предшественников, полностью лишенных активности. Активация предшественников происходит по каскадному механизму, причем активация терминальных ММР (желатиназ и стромелизинов) достигается за счет протеолитической активности матриксинов, находящихся в начале сигнального пути. Таким образом, повышенная продукция предшественников ММР8 и ММР9, наблюдаемая при воспалении пародонта, не является достаточным условием для подъема активности терминальных ММР: для этого требуется предварительная активация «праймерных» ММР1, ММР2 и ММР3. Кроме того, присутствие в тканях ингибиторов ММР – TIMP, общая концентрация которых существенно превышает концентрацию любой ММР, позволяет полностью подавлять активность даже тех молекул ММР, которые подверглись протеолитической активации и не имеют в составе пропептида.

С учетом сказанного следует констатировать, что роль матриксинов ММР8 и ММР9 в разрушении пародонтальной связки нуждается в конкретизации, хотя статистическая связь между гиперпродукцией предшественников этих матриксинов и тяжестью пародонтита сомнений не вызывает.

Описанным в публикациях моментом, касающимся роли матриксинов ММР8 и ММР9 в развитии хронического пародонтита, является механизм активации синтеза их предшественников регуляторными факторами: хемокинами и лимфокинами. Существуют неопровержимые доказательства того, что продукция ММР8 и ММР9 на пораженных участках пародонта коррелирует с увеличением концентрации в этом месте лимфокинов остро неспецифического ответа Th1-типа: ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО $\alpha$ , лиганда-активатора NF- $\kappa$ B (RANKL) и остеопротегерина (OPG). Напротив, повышение концентрации лимфокинов, стимулирующих антигензависимый ответ Th2-типа – ИЛ-10 и ИЛ-4, – коррелирует с падением продукции предшественников терминальных матриксинов ММР8 и ММР9 [22]. В то же время в этой фазе, как правило, наблюдается повышение уровня синтеза ИЛ-17 – фактора, стимулирующего заживление раневой поверхности после устранения инфекции. При исследовании содержимого пародонтальных карманов этот процесс удается наблюдать в основном в стадии ремиссии пародонтита. Имеются и прямые доказательства того, что стимуляция культивируемых *in vitro* фибробластов Th1-лимфокинами ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО $\alpha$  и RANKL на 2–3 порядка повышает уровень накопления предшественников металлопротеиназ, прежде всего ММР8 и ММР9: результаты определения мРНК и кодируемых ими белков-предшественников совпадают [23]. Таким образом, лимфокины должны рассматриваться в качестве одного из ключевых факторов активации продукции предшественников ММР в ответ на инвазию.

В рамках работы была апробирована система оценки содержания в тканях пародонта мРНК защитных

факторов организма ФНО $\alpha$ , MMP8 и MMP9. Выбор именно этих транскриптов обусловлен тем, что они наиболее часто упоминаются в литературе в качестве сигнала скорого разрушения пародонта. Многие авторы даже рассматривают их как непосредственную причину распада коллагена пародонтальной связки, приписывая им сугубо негативную роль в течении пародонтита [24, 25].

### Материал и методы

Клинический материал был собран на базе Центрального НИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России. Все пациенты ознакомлены с условиями участия в исследовании и подписали информированное согласие.

В исследовании принимали участие 288 человек в возрасте от 21 до 55 лет без тяжелой соматической патологии. В исследуемой выборке 204 пациента имели диагноз хронического генерализованного пародонтита (ХГП) и у 84 пациентов патология пародонта отсутствовала. Выборка состояла из 174 женщин (77 пациенток с ХГП и 97 женщин со здоровым пародонтом – группа контроля) и 114 мужчин (ХГП у 64 пациентов, группа контроля – 50 человек).

При обследовании пациентов учитывали наличие и характер жалоб, анамнез, проводили клиническую оценку состояния полости рта и пародонтального статуса (степень тяжести заболевания, наличие гноетечения из пародонтальных карманов, степень подвижности зубов, гигиенический индекс Силнес–Лоэ, индекс кровоточивости Мюллемана). Также учитывалась неблагоприятная наследственность пациентов.

Для выделения РНК штифты консервировали в пробирках типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащих по 0,5 мл IntactRNA (консервант для РНК) («Евроген», Россия). Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали наборы производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия) согласно инструкции производителя.

Смесь ОТ готовили по следующей схеме в стерильной пробирке объемом 1,5 мл:

- ОТ-буфер – 2 · (N+1) мкл;
- «праймеры + дНТФ» – (N+1) мкл;
- обратная транскриптаза 2 ед/мкл – 0,5 · (N+1) мкл,

где N – количество анализируемых образцов с учетом отрицательного контроля.

В пробирки, содержащие по 16,5 мкл препарата подготовленной РНК, добавляли по 3,5 мкл смеси ОТ. При постановке отрицательного контроля использовали пробирку, содержащую 16,5 мкл очищенной воды. Перемешивали реакционные смеси 5–7-кратным пипетированием. Пробирки инкубировали при 40 °С в течение 30 мин, затем останавливали реакцию прогреванием при 95 °С в течение 5 мин. Полученный препарат кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам вариационной статистики. Проверку гипотезы о достоверности различий между выборками выполняли с использова-

нием непараметрического критерия Манна–Уитни. При анализе взаимосвязей внутри пары количественных или порядковых качественных признаков использовали корреляционный анализ по методу Спирмена. Во всех случаях уровень статистической значимости принимали за 95% (согласно критерию Фишера,  $p \leq 0,05$ ).

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 8.0 для Windows (Net Application), США.

### Результаты и обсуждение

При использовании метода Спирмена для анализа корреляций в уровне представленности молекулярных маркеров в общей выборке пациентов выявлено синхронное изменение концентраций мРНК ФНО $\alpha$ /MMP8/MMP9 с положительной связью ( $p = 6 \cdot 10^{-4}$ );

При анализе корреляций в уровне представленности молекулярных маркеров в контрольной группе пациентов (без ХГП) было выявлено синхронное изменение (с положительной связью) соотношения концентраций мРНК ФНО $\alpha$ /MMP8/MMP9 ( $p = 10^{-4}$ ): сила связи выше, чем в случае общей выборки без разделения на случай и контроль.

Аналогичная корреляция не была обнаружена в группе пациентов с ХГП. По результатам анализа в этой группе синхронно (с положительной связью) изменялись только концентрации мРНК MMP8 и ФНО $\alpha$  ( $p = 0,054$ ): сила связи на 2 порядка слабее, чем в группе контроля ( $p = 10^{-4}$ ). Корреляция между содержанием в образцах мРНК ФНО $\alpha$  и MMP9 полностью утрачивалась. Корреляция содержания мРНК MMP8 и MMP9 вместо прямой становилась обратной ( $p = 0,02$ ).

Особенностью группы женщин по сравнению с общей выборкой явилась относительно слабая выраженность связей в кластере признаков мРНК ФНО $\alpha$ /MMP8/MMP9. Как и в группе пациентов с ХГП, корреляция между уровнем представленности мРНК MMP8 и MMP9 носила отрицательный, а не положительный характер. Корреляция между содержанием мРНК ФНО $\alpha$  и MMP9 не прослеживалась. Корреляция между содержанием мРНК ФНО $\alpha$  и MMP8 положительная, но находилась на пределе достоверности ( $p = 0,04$ ).

Хотя сопоставление степени тяжести симптомов поражения пародонта у мужчин и женщин не выявило статистически значимых различий, анализ выборки мужчин по молекулярным маркерам показал наличие ряда тенденций, не характерных для женщин.

Наиболее ярким отличием мужчин явилось наличие устойчивой корреляции между концентрациями мРНК ФНО $\alpha$ , MMP8 и MMP9: парные корреляции характеризовались величиной  $p = 0,0012$ , приближающейся к величине этого параметра в выборке здоровых пациентов.

Сопоставление выборок некурящих и курящих пациентов позволило выявить серьезные различия, несмотря на то, что в клиническом отношении состояние пародонта в этих группах достоверно не различалось. Для некурящих пациентов характерны высокая сила связи между параметрами комплекса признаков

мРНК ФНО $\alpha$ /ММР8/ММР9 –  $p$  в диапазоне от 0,00035 до 0,00037, в выборке курящих пациентов  $p$  на пределе достоверности: в диапазоне от 0,32 до 0,54. Это наблюдение показывает, что курение вызывает нарушение нормального функционирования сигнальных механизмов, обеспечивающих защиту пародонта от инфекции.

Представленные данные свидетельствуют о наличии важных различий в течении пародонтита между мужчинами и женщинами.

Важной задачей исследования является выработка концепции, описывающей связь исследуемых молекулярных маркеров с состоянием пародонта и процессами, определяющими это состояние. Решение этой задачи позволяет подойти к созданию метода ранней диагностики развития и оценки эффективности медикаментозного лечения пародонтита.

В качестве наиболее важных признаков был выбран возраст пациентов и степень заболевания пародонта. Пациенты были разделены на 3 возрастные группы: 1-ю группу – пациентов до 35 лет ( $n = 168$ ), 2-ю группу – от 36 до 55 лет ( $n = 102$ ), 3-ю группу – 56 лет и старше ( $n = 18$ ). При анализе представленности маркеров в выборках случая/контроля и мужчин/женщин методом непараметрического сравнения по Манну–Уитни было установлено, что уровень транскриптов ФНО $\alpha$ , ММР8 и ММР9 во всех четырех группах в среднем одинаков. Однако с помощью анализа по Спирмену было установлено, что внутри группы контроля наблюдалась существенно более выраженная корреляция в поведении пар маркеров ФНО $\alpha$ /ММР8 и ФНО $\alpha$ /ММР9, чем в генеральной совокупности всех пациентов. Более того, в контрольной выборке была обнаружена корреляция между маркерами ММР8 и ММР9 ( $R = 5,3$  при  $p = 1,8 \cdot 10^{-4}$ ), которая не наблюдалась в общей выборке. Это наблюдение позволяет предполагать, что скоординированное изменение уровня продукции ФНО $\alpha$ , ММР8 и ММР9 является необходимым элементом механизма защиты пародонта от патогенов. Разрушение этого механизма, приводящее к хаотической передаче сигналов, характеризует патологическое состояние пародонта.

Корреляционный анализ по Спирмену показал, что корреляция в уровне экспрессии ММР8 и ФНО $\alpha$  в группе пациентов с ХГП характеризуется  $R = 2,0$  ( $p = 5,5 \cdot 10^{-2}$ ), т. е. сила связи ниже, чем в группе контроля. Корреляция в экспрессии пары ФНО $\alpha$ /ММР9 в группе пациентов с ХГП полностью утрачена. Корреляция в экспрессии ММР8 и ММР9 меняет знак на отрицательный:  $R = -2,4$  ( $p = 2,1 \cdot 10^{-2}$ ).

В общей выборке женщин без разделения на лица с ХГП и группу контроля корреляция в уровне представленности маркеров мРНК ФНО $\alpha$ /ММР8/ММР9 существенно ниже, чем в генеральной совокупности. мРНК ФНО $\alpha$  и ММР9 экспрессируются независимо. Корреляция в экспрессии ФНО $\alpha$  и ММР8 формально выявляется, но находится на пределе достоверности.

В отличие от выборки женщин в выборке мужчин без разделения на ХГП и контроль при использовании критерия Манна–Уитни выявляется статистическая

связь в экспрессии мРНК ФНО $\alpha$ /ММР8 ( $R = 3,7$  ( $p = 1,1 \cdot 10^{-3}$ )) и ФНО $\alpha$ /ММР9 ( $R = 2,7$  ( $p = 1,3 \cdot 10^{-2}$ )).

Выявленная скоординированная экспрессия ФНО $\alpha$  с ММР8 и ММР9 может иметь существенное практическое значение. Полученные данные опровергают устоявшееся в литературе мнение о защитной неэффективности и даже вредности остро неспецифического ответа Th1-типа на пародонтопатогены в отличие от ответа Th2-типа, приводящего к выработке антител. По-видимому, при условии быстрого развития Th1-ответ, включающий в качестве сигнальных факторов ФНО $\alpha$ , ММР8 и ММР9, способен эффективно блокировать проникновение во внутреннюю среду организма пародонтопатогенов, прежде всего *P. gingivalis*. Лишь в случае запаздывания с последующим переходом в хроническую стадию эффективность Th1-ответа утрачивается. Описанный механизм, по-видимому, более эффективно срабатывает у мужчин, чем у женщин.

Полученные данные позволяют предложить количественные критерии оценки состояния пародонта, особенно необходимые для проведения лонгитудных тестов средств лечения пародонтита. Эти методы дают возможность проводить раннюю диагностику предрасположенности к пародонтиту в стадии, когда консорциум с участием пародонтопатогенов уже сложился, но деграция пародонта еще не началась. Эти тесты могут также играть роль при оценке эффективности лечения, что позволяет сократить время на подбор препарата для конкретного больного, а также при первичной оценке эффективности новых препаратов и методов лечения.

*Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.*

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (государственное задание № 19.1724.2014/К в сфере научной деятельности).*

#### ЛИТЕРАТУРА

2. Ламонт Р.Дж., Лантц М.С., Берне Р.А. и др. *Микробиология и иммунология для стоматологов*: Пер. с англ. М.: Практическая медицина; 2010.
18. Кулаков А.А., Зорина О.А., Борискина О.А. Роль защитных факторов организма в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. *Стоматология*. 2010; (6): 72–6.

#### REFERENCES

1. Michalowicz B.S. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J. Periodont.* 1994; (65): 479–88. doi: 10.1902/jop.1994.65.5s.479.
2. Lamont R.J., Lantts M.S., Berne R.A. et al. *Microbiology and Immunology for Dentists. [Mikrobiologiya i immunologiya dlya stomatologov]*: Transl. from Engl. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2010. (in Russian)
3. Page R.C. Critical issues in periodontal research. *J. Dent. Res.* 1995; (74): 1118–28. doi: 10.1177/00220345950740041301
4. Tanner A.C.R., Kent R. Jr., Dyke Van T. et al. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J. Periodont.* 2005; 76 (4): 573–81. doi: 10.1902/jop.2005.76.4.573
5. Dosseva-Panova V.T., Popova C.L., Panov V.E. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic

- periodontitis. *Folia Med. (Plovdiv)*. 2014; 56 (3): 152–60. doi: 10.2478/folmed-2014-0022.
6. Khalaf H., Lönn J., Bengtsson T. Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: possible role for TGF- $\beta$ 1 as a marker for disease progression. *Cytokine*. 2014; 67 (1): 29–35. doi: 10.1016/j.cyto.2014.02.007.
  7. Belibasakis G.N., Thurnheer T., Bostanci N. Interleukin-8 responses of multi-layer gingival epithelia to subgingival biofilms: role of the “red complex” species. *PLoS One*. 2013; (8): e81581. doi: 10.1371/journal.pone.0081581.
  8. Figueroa A., Cuadrado A., Fan J., et al. Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23 (14): 4991–5004. doi:10.1128/MCB.23.14.4991-5004.2003.
  9. Heasman P.A., Hughes F.J. Drugs, medications and periodontal disease. *Br. Dent. J.* 2014; 217 (8): 411–9. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.905.
  10. Hajishengallis G., Lamont R.J., Graves D.T. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*. 2015; 6 (3): 229–35. doi: 10.4161/21505594.2014.990806.
  11. Suzuki N., Yoneda M., Hirofujii T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int. J. Dentistry*. 2013, Article ID (58): 72–9, 6. doi:10.1155/2013/587279.
  12. Gaspersic R., Stiblar-Martincic D., Osredkar J., Skaleric U. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. *J. Periodont. Res.* 2003; 38: 198–203. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.01395.x>
  13. Duarte P.M., de Oliveira M.C., Tambeli C.H., Parada C.A., Casati M.Z., Nociti F.H., Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J. Periodont. Res.* 2007; 42: 377–81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00961.x>
  14. Navarro-Sanchez A.B., Faria-Almeida R., Bascones-Martinez A. Effect of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological response and glycaemic control in type 2 diabetic patients with moderate periodontitis. *J. Clin. Periodont.* 2007; 34: 835–43. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01127.x>.
  15. Gürkan A., Emingil G., Saygan B.H. et al. Matrix metalloproteinase-2, -9, and -12 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J. Periodont.* 2007; 78 (12): 2338–47. doi:10.1902/jop.2007.070148
  16. Irshad M., Scheres N., Anssari Moin D., Crielaard W., Loos B.G., Wismeijer D., Laine M.L. Cytokine and matrix metalloproteinase expression in fibroblasts from peri-implantitis lesions in response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodont. Res.* 2013; 48 (5): 647–56. doi: 10.1111/jre.12051.
  17. Javed F., Ahmed H.B., Mikami T., Almas K., Romanos G.E., Al-Hezaimi K. Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of rheumatoid arthritis patients with chronic periodontitis. *J. Invest. Clin. Dent.* 2014; 5 (1): 1–8. doi: 10.1111/jicd.12066.
  18. Kulakov A.A., Zorina O.A., Boriskina O.A. The role of organism protective factors in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Stomatologiya*. 2010; (6): 72–6. (in Russian)
  19. Moutsopoulos N.M., Chalmers N.I., Barb J.J., Abusleme L., Greenwell-Wild T., Dutzan N. et al. Subgingival microbial communities in leukocyte adhesion deficiency and their relationship with local immunopathology. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (3): e1004698. doi: 10.1371/journal.ppat.1004698. eCollection 2015 Feb.
  20. Noack B., Görgens H., Lorenz K. et al. TLR4 and IL-18 gene variants in chronic periodontitis: impact on disease susceptibility and severity. *Immunol. Invest.* 2009; 38 (3–4): 297–310. doi: 10.1080/08820130902846290.
  21. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; (3): 1796–804. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
  22. Lee S.I., Kang K.L., Shin S.I., Herr Y., Lee Y.M., Kim E.C. Endoplasmic reticulum stress modulates nicotine-induced extracellular matrix degradation in human periodontal ligament cells. *J. Periodont. Res.* 2012; 47 (3): 299–308. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01432.x.
  23. Finoti L.S., Corbi S.C., Anovazzi G., Teixeira S.R., Capela M.V., Tanaka M.H. et al. Pathogen levels and clinical response to periodontal treatment in patients with Interleukin 8 haplotypes. *Pathog. Dis.* 2013. doi: 10.1111/2049-632X.12062.
  24. Araújo A.A., Lopes de Souza G., Souza T.O., de Castro Brito G.A., Sabóia Aragão K., Xavier de Medeiros C.A. et al. Olmesartan decreases IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2013; 386 (10): 875–84. doi: 10.1007/s00210-013-0886-8.
  25. Türkoğlu O., Becerik S., Tervahartala T., Sorsa T., Atilla G., Emingil G. The effect of adjunctive chlorhexidine mouthrinse on GCF MMP-8 and TIMP-1 levels in gingivitis: a randomized placebo-controlled study. *BMC Oral Hlth.* 2014; (14): 55. doi: 10.1186/1472-6831-14-55.

Поступила 01.04.16

Принята в печать 04.04.16