

ID: 2013-03-67-A-2593

Оригинальная статья

Осипова Ю.Л., Осадчук М.А., Булкина Н.В.

Пролиферативная активность и апоптоз эпителиоцитов десны в патогенезе хронического генерализованного пародонтита у больных рефрактерной формой гастроэзофагеальной рефлюксной болезни

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

Цель исследования определить показатели клеточного обновления эпителиоцитов десны у больных с хроническим пародонтитом на фоне рефрактерной формы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ). Обследовано 60 больных, 20 пациентов с хроническим пародонтитом на фоне рефрактерной ГЭРБ; 20 больных хроническим без патологии пищевода, группу сравнения составили 20 практически здоровых лиц. Исследованы количественные показатели клеточного обновления десны, и апоптоза при заболеваниях пародонта и у групп сравнения. Анализ стоматологического статуса пациентов с хроническим пародонтитом на фоне рефрактерной ГЭРБ свидетельствует о более выраженном воспалительном поражении пародонтального комплекса, в сравнении с пациентами без патологии пищевода. У больных хроническим пародонтитом, на фоне рефрактерной ГЭРБ клеточная пролиферация характеризуется прогрессирующим отставанием от апоптозной активности эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта, что находит отражение в возрастании экспрессии Ki-67 и Bcl-2.

Ключевые слова: пародонтит, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, пролиферация, апоптоз.

Abstract

The aim of the study to determine the rates of cell renewal of epithelial cells in patients with chronic gum periodontitis against refractory forms of gastroesophageal reflux disease (GERD). 60 patients, 20 patients with chronic periodontitis against refractory GERD, 20 patients with chronic diseases of the esophagus without, the comparison group consisted of 20 healthy individuals. The numerical parameters of cellular renovation gums, and apoptosis in periodontal disease and comparison groups. Analysis of the dental status of patients with chronic periodontitis against refractory GERD indicates more severe inflammatory lesions of periodontal complex, compared to patients with no abnormalities of the esophagus. In patients with chronic periodontitis, against refractory GERD cell proliferation characterized by a progressive delay of apoptosis activity of epithelial cells of the oral mucosa, which is reflected in the increased expression of Ki-67 and Bcl-2.

Введение

Патология органов пищеварительной системы значительно ухудшает клиническое течение заболеваний пародонта, а они в свою очередь нарушают функцию жевательного аппарата, то есть имеет место взаимоотягивающее влияние [1]. При гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) воспалительные заболевания пародонта встречаются в 85,7% случаев [2, 3]. Установлено, что нарушение контроля клеточной гибели и пролиферации приводит к нарушению клеточного гомеостаза и прогрессированию хронических заболеваний [4]. Изучение клеточной пролиферации и апоптоза эпителиоцитов десны у больных хроническим пародонтитом на фоне рефрактерной ГЭРБ определяют степень воспалительных и деструктивных поражений пародонта на фоне ГЭРБ, и коррелируют со степенью тяжести заболеваний пародонта [5,6,7]. В связи с этим, особый интерес представляет изучение параметров клеточной пролиферации и апоптоза эпителиоцитов десны у больных хроническим пародонтитом на фоне рефрактерной ГЭРБ, которое может быть использовано в целях клинической диагностики, эффективности лечения и прогноза воспалительных заболеваний пародонта [8,9,10].

Цель исследования: определить параметры клеточной пролиферации и апоптоза эпителиоцитов десны у больных хроническим генерализованным пародонтитом на фоне рефрактерной формы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни

Материал и методы

Обследовано 60 больных, 20 пациентов хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) на фоне рефрактерной ГЭРБ; 20 больных ХГП без патологии пищевода, группу сравнения составили 20 практически здоровых лиц. Больные и здоровые обследованы в динамике по единой программе, включающей клинические методы исследования. Диагностику заболеваний пародонта проводили в соответствии с терминологией и классификацией болезней пародонта, утвержденными на XVI Пленуме Всесоюзного общества стоматологов (1983). Больным проводили комплексное клинко-рентгенологическое обследование тканей пародонта. Оценивали изменение цвета слизистой оболочки десны; степень кровоточивости десен [Muhlemann, 1971]; глубину пародонтальных карманов (ВОЗ, 1989); патологическую подвижность зубов [Fleszar T.J. et al., 1980]. Также проводили индексную оценку состояния тканей пародонта, используя упрощенный индекс гигиены по Грину – Вермильону (1965); папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА) [Parma G., 1960]; пародонтальный индекс (ПИ), [Russel A., 1967]. Рентгенологическое обследование зубочелюстной системы. Диагноз ГЭРБ устанавливался на основе результатов комплексного клинко-морфологического обследования и базировался на рекомендациях, принятых в 1997г. в Генвале (Бельгия) международной группой по изучению рефлюксной болезни. Наблюдение за больными проводили по единой программе, включающей общеклиническое обследование, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, фиброгастродуоденоскопию (ФГДС), общее морфологическое и цитологическое, иммуногистохимическое исследования. Для верификации ГЭРБ, при наличии дисплазии забор биопсийного материала проводили по 4-квadrантному методу.

Для морфологической диагностики проводили биопсию слизистой оболочки маргинального края десны, десневых сосочков, а также слизистой оболочки в области переходной складки десны. Биопсийный материал фиксировался в 10% забуференном нейтральном формалине, по Лилли, в течение 24 часов с последующей промывкой в проточной воде в течение суток. После фиксации материал обезвоживался и заливался в парафин. Для обзорного гистологического изучения депарафинированные

серийные срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Для выявления апоптозных ядер исследуемый материал импрегнировали по Мозеру (1995). Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием моноклональных мышиных антител к маркеру пролиферирующих клеток – Ki-67 (1:100, Novocastra) и к антиапоптозному белку Bcl-2 (1:100, Novocastra). В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные анти-мышиные иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты от Novocastra).

Морфологические изображения, поступающие через оптическую систему микроскопа Nikon Eclipse 400 (увеличение x320: объектив 40, окуляр 10, фильтр 0,8) регистрировались цифровой цветной видеокамерой Nikon DXM1200, вмонтированной в тубус микроскопа и передавались в компьютер Pentium-4. Количество Ki-67 и Bcl-2 - иммунопозитивных ядер клеток автоматически подсчитывалось в 10 рандомизированных полях зрения. При указанном увеличении и цифровые данные пересчитывались на 1 мм² с помощью пакета прикладных морфометрических программ «Видеотест-Морфология 4.0».

Гибель клеток в форме апоптоза определяли по индексу апоптоза ($I_{\text{АПТ}}$) по формуле: $I_{\text{АПТ}} (\%) = N$ (число апоптозных ядер, окрашенных по методу Мозера)/ N (общее число ядер) $\times 100$.

Результаты

При анализе полученных результатов обследования состояния пародонта, среди пациентов с ХГП без патологии пищевода, преобладали лица с хроническим пародонтитом легкой степени (42,2%) или хроническим катаральным гингивитом (25,3%), а среди пациентов с ХП на фоне рефрактерной ГЭРБ – преобладал хронический генерализованный пародонтит средней (34,5%) и тяжелой степени тяжести (41,8%). По анамнестическим данным установлено, что наличие воспалительных заболеваний пародонта коррелирует с длительностью заболевания ГЭРБ. При продолжительности гастроэзофагеальной рефлюксной болезни более 5 лет, значительно возрастает частота встречаемости средней и тяжелой степени хронического генерализованного пародонтита. Анализ результатов иммуногистохимического исследования показал, что в норме эпителиоциты слизистой полости рта проявляют низкий потенциал пролиферативной и антиапоптозной активности Ki-67 - (11,5 $\pm$ 0,5); Bcl-2 - (0,44 $\pm$ 0,2); индекс апоптоза соответствует пролиферативной активности эпителиоцитов и составляет $I_{\text{АПТ}}$ - (2,8 $\pm$ 0,4). Хронический генерализованный пародонтит без патологии пищевода характеризуется увеличением экспрессии Ki-67 - (17,5 $\pm$ 0,3) и Bcl-2 - (0,52 $\pm$ 0,05), при относительно низком $I_{\text{АПТ}}$ - (2,7 $\pm$ 0,5). На фоне рефрактерной ГЭРБ, пародонтит характеризовался увеличением экспрессии Ki-67 - (26,5 $\pm$ 0,2) и Bcl-2 - (7,1 $\pm$ 0,4) на фоне низкой апоптозной активности $I_{\text{АПТ}}$ - (0,8 $\pm$ 0,6), по сравнению с хроническим пародонтитом без патологии пищевода.

Обсуждение

Анализ стоматологического статуса пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом на фоне рефрактерной ГЭРБ свидетельствует о более выраженном воспалительном поражении пародонтального комплекса, в сравнении с пациентами без патологии пищевода. Одним из факторов риска возникновения заболеваний пародонта у лиц, страдающих ГЭРБ, становится длительность болезни пищевода.

Важную роль в течение воспалительных заболеваний пародонта, играет нарушение процессов клеточного обновления – пролиферации и апоптоза эпителиоцитов десны. При ХП на фоне рефрактерной ГЭРБ в эпителии десны преобладают гиперпролиферативные процессы. Высокий уровень пролиферации обусловлен не только ее прямой стимуляцией, но и отягощающим влиянием патологии пищевода на ткани пародонта. В свою очередь, усиленная пролиферация активирует апоптоз. Однако, у больных хроническим пародонтитом, на фоне рефрактерной ГЭРБ клеточное обновление эпителиоцитов характеризуется прогрессирующим отставанием апоптоза эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта от скорости пролиферативных процессов.

Заключение

Полученные изменения процессов клеточной пролиферации и апоптоза, во многом определяют степень воспалительных и деструктивных поражений пародонта на фоне рефрактерной ГЭРБ, и коррелируют со степенью тяжести воспалительных заболеваний пародонта.

Литература

1. Булкина Н.В., Косачев М.А., Осадчук М.А. Заболевания пародонта при патологии органов пищеварения – Самара: ООО «Офорт», 2006. – С.48-85.
2. Горбачева И.А., Кирсанов А.И., Орехова Л.Ю. Единство системных патогенетических механизмов при заболеваниях пародонта у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *H. pylori* // Пародонтология.-2004. - №3.- С. 6-11.
3. Маев И.В., Барер Г.М. Стоматологические проявления гастроэзофагеальной рефлюксной болезни //Клиническая медицина. – 2005. №11. - С. 33-38.
4. Осипова Ю.Л., Булкина Н.В., Кропотина А.Ю. и др. Роль тучных клеток слизистой оболочки десны в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта // Фундаментальные исследования. – 2009. - №7. – С. 55-56.
5. Осипова Ю.Л., Булкина Н.В., Кропотина А.Ю. Воспалительные заболевания пародонта при неэрозивной форме гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: клинические и иммуноморфологические аспекты // Фундаментальные исследования. – 2012. - №2 (часть 2). – С. 325-327.
6. Осадчук А.М., Осадчук А.М., Балашов Д.В., Кветной И.М. Клинические формы гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: клинические, эндоскопические, функциональные и морфологические особенности //Медицинский альманах. – 2011. - №2.(15). – С.53-58.
7. Boyd C.A. Amine uptake and peptide hormone secretion: APUD cells in a new landscape. J. Physiol.2001; 15 (3):581.
8. Lundell L. Advanced in treatment strategies for gastroesophageal refluxdisease// In:EAGE postgraduate course.- Geneva,2002.- P.13-22.
9. Richter J.E. Role of the Gastroesophageal Reflux Disease: Acid, Weak Acid and Bile. Am J Med Sci. 2009. Jul. №8. P. 63-69.
10. Valasco M.J., Ortiz V., Ponce J. Gastroesophageal reflux disease refractory to esomeprazole. Gastroenterol. Hepatol. 2005. Feb. №28 (2). P. 65-77.