

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАБАРДИНО - БАЛКАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ. Х.М. БЕРБЕКОВА»
ИНСТИТУТ СТОМАТОЛОГИИ И ЧЕЛЮСТНО - ЛИЦЕВОЙ
ХИРУРГИИ
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ХАМУКОВА АСИЯТ АХМЕДОВНА

**КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА НА
ОСНОВАНИИ ИЗУЧЕНИЯ ГИПОКСИЯ-ЗАВИСИМЫХ
АНТИМИКРОБНЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ**

3.1.7 - стоматология (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Магомет Шабазович Мустафаев

Нальчик-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ГИПОКСИЯ-ЗАВИСИМЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ И ЛЕЧЕБНЫЕ СПОСОБЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА (Обзор литературы)	14
1.1. Патогенетическое значение гипоксии и роль гипоксия-зависимого фактора-1 α в развитии и течении воспалительных процессов в пародонте..	14
1.2. Врожденный иммунный ответ как компонент барьерной функции на пути распространения пародонтопатогенных бактерий и его гипоксия-зависимый контроль	25
1.3. Цитокины и гипоксия в патогенезе хронического пародонтита	29
1.4. Физиологическое обоснование и эффективность применения в составе комплексного лечения кофермента никотинамидадениндинуклеотида у пациентов с хроническим пародонтитом.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Состав групп пациентов, дизайн исследования и формирование базы первичных данных больных	39
2.2. Методы исследования	51
2.3. Статистический анализ результатов исследования.....	65
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	66
ГЛАВА 3. СОСТОЯНИЕ ГИПОКСИЯ-ЗАВИСИМЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ И В ПРОЦЕССЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ С КОРРЕКЦИЕЙ ЭНЕРГООБМЕНА ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА	66

3.1. Пародонтологический статус пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и состояние гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов в зависимости от степени тяжести заболевания	66
3.2. Исходная концентрация гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов во взаимосвязи с характеристиками микробиоценоза в содержимом пародонтальных карманов в клинических подгруппах при хроническом генерализованном пародонтите до лечения	83
3.3. Клиническая эффективность кофермента никотинамидадениндинуклеотида в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита	87
3.4. Патогенетическая значимость кофермента никотинамидадениндинуклеотида в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита для коррекции нарушений гипоксия-зависимых иммунных реакций	92
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Патогенетические факторы развития воспалительных изменений в тканях пародонта, среди которых заслуживают внимания локальные механизмы нарушения тканевого дыхания, связанные с интенсивным образованием и накоплением реакционноактивных радикалов. Свободные радикалы за счет неспаренных электронов располагают высоким потенциалом к взаимодействию с химическими веществами. Реализация данного потенциала приводит к окислительной модификации сложных молекул – нуклеиновых кислот, белков, углеводов, нарушению дыхательных процессов в митохондриях, гидроксигированию жирных кислот, стероидов [126]. В результате в пародонте возникают деструктивные процессы ввиду повреждения ДНК, РНК рибосом, активации внутриклеточных ферментов и активного разрушения белков [129]. Следствием нарушения тканевого дыхания является развитие в пародонте гипоксии, хронического воспалительного процесса и токсического воздействия продуктов воспаления [156,159]. Еще в 1984 году в исследовании G.R. Mettraux с соавт. было установлено, что при колонизации пародонтогенных микробов в зубодесневом желобке парциальное напряжение кислорода снижается с 8,4 кПа до 2,33 кПа [136]. При гингивите и развитии пародонтальных карманов формирование биопленки и размножение анаэробных бактерий приводит к еще более выраженному ограничению кислородного снабжения тканей, что имеет патогенетическое значение для прогрессирования хронического пародонтита. В последнее время благодаря молекулярно-генетическим исследованиям доказано, что адаптация к низкому напряжению кислорода или гипоксии в тканях опосредуется путем транскрипционного фактора, который называется гипоксия-зависимым фактором (Hypoxia-inducible factor, HIF) [170, 172]. При генетических исследованиях был установлен факт экспрессии HIF-1 α в тканях пародонта человека [142].

При лечении хронического генерализованного пародонтита (ХГП), кроме местных антисептических и антибактериальных средств, стоматологи обращают свое внимание на препараты, которые не содержат химических агрессивных агентов, обладают естественными механизмами нормализации функциональной активности клеток и тканей [14,15,20]. Одним из перспективных направлений в клинической практике является применение средств, которые, не изменяя состояния микробиоценоза различных биотипов полости рта, могут повысить уровень иммунной защиты и восстановить функции поврежденных клеток [15]. Кофермент никотинамидадениндинуклеотид (НАД), проникая через клеточную и митохондриальную мембраны, вступает в цикл Кребса, повышает выработку АТФ клеткой, нейтрализует свободные радикалы [133]. Разработан специальный дентальный гель, содержащий восстановленную форму НАД и представляющий собой один из мощнейших биологических антиоксидантов [55]. Применение НАД при ХГП обеспечивает дополнительное воздействие на патогенетические механизмы воспаления и регенерации в ткани. При этом, его влияние на гипоксия-зависимые факторы регуляции иммунных реакций при ХГП неизвестны, что определяет интерес к проведению научных разработок данного плана.

Степень разработанности темы исследования

При ХГП дисбаланс в тканях между доставкой и потреблением кислорода приводит к накоплению HIF-1 α , усилению экспрессии под его влиянием генов фактора роста эндотелия сосудов, тромбоцитарного фактора роста, ангиопротейна-1 и -2, гена синтазы оксида азота, что улучшает локальное микроциркуляторное обеспечение [80]. Кроме того, HIF-1 α перестраивает энергетический обмен клеток путем подавления аэробного дыхания и перехода к гликолизу, ограничивает включение пирувата в цикл Кребса [113]. Однако, если причина гипоксии и хронического воспаления не

устранена, то тканевая гипоксия становится основным патогенетическим звеном для развития болезни, что требует принятия лечебных мер.

Если гипоксия-опосредованное усиление микроциркуляторных процессов в ткани при ХГП активно изучается, то вопросы влияния гипоксии, HIF-1 α на активность врожденного и адаптивного иммунитета, микробиоценоз полости рта, мало освещены в научной литературе. Между тем, известно, что регулируемый HIF-1 α гликолитический метаболизм необходим при дифференцировке В-лимфоцитов [116] и метаболизме Т-лимфоцитов [153]. Это обуславливает высокий научный интерес к изучению гипоксия-регулируемых антимикробных иммунных реакций, в частности к взаимосвязи между накоплением HIF-1 α в тканях пародонта и секрецией антимикробного пептида кателицидина LL37, провоспалительного и остеорезорбтивного медиатора интерлейкина-6 (ИЛ-6), продуцируемого многими иммунокомпетентными клетками.

Все вышеуказанное определяет значимость изучения диагностической и клинической информативности уровня HIF-1 α в локальных биотопах при воспалительных процессах полости рта в динамике лечения ХГП с дополнительным воздействием на энергетический метаболизм клеток.

Цель исследования

Повышение эффективности диагностики, лечения и прогноза развития хронического пародонтита на основе современных методов исследования гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов.

Задачи исследования:

1. Изучить диагностическую информативность клинико-лабораторных показателей у пациентов с хроническим пародонтитом в зависимости от степени тяжести.

2. Оценить диагностическую значимость определения у пациентов с хроническим пародонтитом транскрипционного гипоксия-зависимого фактора, антимикробного пептида и провоспалительного цитокина в

экссудате во взаимосвязи с характеристиками микробиоценоза содержимого пародонтального кармана.

3. Определить клиническую эффективность дентального геля, содержащего кофермент никотинамидадениндинуклеотид, в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита.

4. Установить патогенетическую значимость дентального геля, содержащего кофермент никотинамидадениндинуклеотид, для коррекции нарушений гипоксия-зависимых иммунных реакций при лечении ХГП.

5. Разработать метод лечения хронического пародонтита легкой и средней степени тяжести, направленный на коррекцию энергообмена клеток, с учетом содержания в экссудате пародонтальных карманов гипоксия-зависимого фактора-1 α , кателицидина LL37 и интерлейкина-6.

Новизна исследования

Впервые изучено влияние транскрипционного фактора HIF-1 α на секрецию антимикробного пептида кателицидина LL37 в полости рта и активность провоспалительного цитокина ИЛ-6 в тканях пародонта. В результате установлено влияние HIF-1 α на активность врожденного антимикробного иммунитета при развитии воспалительных изменений пародонта. Проведен анализ эффективности дополнительного воздействия на энергетический обмен посредством применения дентального геля, содержащего кофермент НАД, при лечении ХГП. Впервые установлено, что использование дентального геля с коферментом НАД сопровождалось коррекцией гипоксии в тканях, о чем свидетельствовало снижение уровня HIF-1 α в экссудате пародонтальных карманов. В работе доказано, что при снижении уровня HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов происходило сочетанное ограничение синтеза ИЛ-6 и кателицидина LL37, что по совокупности отражало эффективное ограничение воспалительного

повреждения тканей пародонта при коррекции энергетического метаболизма в тканях пародонта.

Теоретическая и практическая значимость

В работе дана объективная оценка состояния гипоксия-зависимого контроля врожденного антимикробного иммунитета и секреции провоспалительного медиатора ИЛ-6 при ХГП и разработаны критерии оптимизации лечения заболевания. Установлены дифференциальные уровни концентрации ИФ-1 α и кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов для прогноза течения ХГП. Доказано, что превышение концентрации биомаркеров относительно установленных разделительных критериев являлось патогенетическим обоснованием для назначения дентального геля с коферментом НАД при лечении ХГП у пациентов при аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств и/или дисбактериозе кишечника, когда складывались ограничения к обработке пародонтальных карманов антисептическими стоматологическими гелями. Доказано повышение клинической эффективности лечения ХГП легкой и средней степени тяжести при дополнительном назначении к стандартной терапии дентального геля с коферментом НАД.

Методология и методы исследования

В проведенной диссертационной работе использована методология организации проспективного исследования со сравнительным анализом клинической эффективности оптимизации стандартного лечения в основной и контрольной группах. Методы исследования: клинические способы оценки стоматологического статуса, иммунологический иммуноферментный анализ, генетические исследования параметров биологического материала, статистические способы изучения медико-биологических результатов.

Объект изучения - 60 пациентов в возрасте 30-45 лет в динамике лечения ХГП легкой и средней степени тяжести (МКБ К 05.3). Предмет исследования: хронический генерализованный пародонтит, врожденный иммунитет, антимикробная защита, пародонтопатогенные микроорганизмы, жидкость зубодесневого желобка, медиаторы воспаления, интерлейкин-6, транскрипционные факторы, ИИФ-1 α .

Положения, выносимые на защиту

1. Гипоксия-зависимые реакции контроля врожденной иммунной защиты полости рта у пациентов с ХГП являются патогенетически значимыми при развитии неблагоприятного течения заболевания.

2. Гипоксия-зависимые реакции контроля врожденной иммунной защиты полости рта, проявляющиеся совместным повышением концентрации в содержимом пародонтальных карманов ИИФ-1 α , антимикробного пептида кателицидина LL37 и цитокина ИЛ-6, активируются при средней тяжести ХГП.

3. Дополнительное назначение дентального геля с коферментом НАД к стандартному лечению ХГП средней степени тяжести сопровождается повышением клинической эффективности терапии за счет активации гипоксия-зависимых и иммунорегуляторных защитных механизмов, локального ограничения воспаления и деструкции тканей пародонта.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности результатов диссертации обусловлена четкой постановкой цели и задач исследования, логичным и последовательным изложением гипотез и доказательств, применением адекватных для анализа результатов медико-биологических исследований, статистических методов. На первом организационном этапе был разработан

дизайн исследования с определением необходимого числа больных для доказательства выдвинутых гипотез, при обсуждении материала привлечен обширный круг источников научной литературы последних лет.

Молекулярно-генетические и иммунологические исследования были проведены с использованием методов описательной статистики, при оценке различия средних величин применяли непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона. Статистически значимыми считали различия при величине доверительной вероятности $p < 0,05$. Клинические исследования проводились с учетом современных высокоинформативных методов диагностики и лечения, анализа полученных результатов.

Личный вклад автора в выполнение работы

Личный вклад автора в проведение диссертационного исследования заключался в непосредственном исполнении следующих разделов: подбор и анализ источников научной информации по теме; обследование и лечение больных, входящих в группы исследования; забор биологического материала с доставкой в лаборатории (жидкость зубодесневого желобка и экссудат пародонтальных карманов); статистический анализ клинических и лабораторных показателей.

Диссертантом проведены анализ статистических данных, полученной научной информации, интерпретация результатов, разработаны новые меры оптимизации лечения ХГП в сложной клинической ситуации при аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств и дисбактериозе кишечника.

Автором лично проведены оформление и подготовка научных публикаций.

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «КБГУ им. Х.М.Бербекова» Институт стоматологии и челюстно - лицевой хирургии в

соответствии с планом научной работы по проблеме 19.02 – «терапевтическая стоматология» в отделении терапевтической стоматологии.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в работу терапевтического отделения ГБУЗ «Республиканский стоматологический центр имени Т.Х.Тхазаплижева» Министерства здравоохранения Кабардино-Балкарской Республики, ООО «ГАММА», Северо - Кавказском научно - практическом центре челюстно-лицевой хирургии и стоматологии С - MED. Материалы используются при обучении ординаторов и аспирантов.

Апробация работы

Апробация диссертации проведена на совместном заседании международной комиссии по проведению апробации диссертационных работ сотрудников Института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова», кафедры хирургической стоматологии и имплантологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО «МОНИКИ им.М.Ф.Владимирского», кафедры факультетской терапевтической стоматологии Ташкентского государственного стоматологического института, кафедры хирургической и детской стоматологии НАО «Западно-Казахстанский государственный медицинский университет имени Марата Оспановича» 19.04.2021 года.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация имеет соответствие с паспортом научной специальности «3.1.7 – стоматология». Формула специальности: «стоматология – область науки, занимающаяся изучением этиологии, патогенеза основных стоматологических заболеваний (кариес зубов, заболевания пародонта и др.), разработкой методов их профилактики, диагностики и лечения. Совершенствование методов лечения стоматологических заболеваний будет способствовать сохранению здоровья населения страны». Область исследований соответствует пункту 2. Отрасль наук: медицинские науки.

Публикации

Опубликовано по материалам исследования 3 печатные работы в изданиях, входящих в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации, в том числе 2 публикации в международных изданиях, включенных в базы данных Scopus:

1. Мустафаев, М.Ш. Комплексное лечение хронического пародонтита легкой и средней степени тяжести с использованием никотин аденин динуклеотид гидрида / М.Ш. Мустафаев, М.А. Амхадова, И.С. Амхадов, **А.А. Хамукова**, Э.Ш. Алескеров // **Медицинский алфавит**. -2020. -№12. -С.19-23.

2. Зорина, О.А. Особенности остеоиммунологических аспектов остеорезорбции при периимплантите, хроническом пародонтите и раке альвеолярного отростка и альвеолярной части челюстей / О.А. Зорина, М.А. Амхадова, **А.А. Хамукова**, Э.Ш. Алескеров, Г.А. Айрапетов, А.А. Демидова // **Стоматология**. -2020. -Т.99, №4. -С.27-32.

3. Зорина, О.А. Гипоксия-зависимый транскрипционный контроль активности деструктивных изменений пародонта воспалительного и злокачественного генеза / О.А. Зорина, М.А. Амхадова, З.М. Абаев, А.А. Хамукова, А.А. Демидова // **Стоматология**. -2020. -Т.99, №3. -С.32-36.

Объем и структура диссертации

Объем диссертационной работы составляет 141 страницу текста. Работа состоит из введения, обзора научной литературы по теме, главы по материалам и методам исследования, главы с результатами собственных исследований, главы по обсуждению полученных результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций. Указатель использованной литературы включает 207 источников, из них 45 российских и 162 иностранных. Иллюстрации диссертации представлены 3 схемами, 33 таблицами и 30 рисунками.

ГЛАВА 1

ГИПОКСИЯ-ЗАВИСИМЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАРОДОНТИТЕ И ЛЕЧЕБНЫЕ СПОСОБЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА (Обзор литературы).

1.1. Патогенетическое значение гипоксии и роль гипоксия-зависимого фактора-1 α в развитии и течении воспалительных процессов в пародонте

При дыхании градиент парциального давления кислорода (pO_2) при транспорте через кровеносные сосуды от легких к различным органам, а затем к периферическим тканям и клеткам прогрессивно падает. Снижение pO_2 в крови мониторируется хеморецепторами каротидного клубочка в месте бифуркации сонных артерий, что ведет к компенсаторному увеличению частоты и глубины дыхания [5]. Экспериментально у крыс установлено, что pO_2 при вдохе в альвеолах составляет около 21,3 кПа. Когда кровь течет по альвеолярным капиллярам, то концентрация падает уже до 14 кПа и затем постепенно снижается до 2,1; 1,3 и 0,27–3,3 кПа в селезенке, тимусе и сетчатке, соответственно [60, 194]. В головном мозге pO_2 достигает 0,05–1,07 кПа [8, 9, 77].

На уровне ткани снабжение кислородом зависит от расстояния до прекапиллярных артериол и капилляров. Диффузионное расстояние кислорода по отношению к кровеносным микрососудам *in vivo* варьирует в пределах 100–200 мкм. В тканях, удаленных от питающих сосудов на 100 мкм, зарегистрировано близко к нулевому значению pO_2 [9, 204]. Следовательно, для обеспечения жизнедеятельности необходим тканевой и клеточный гипоксия-зависимый механизм, помогающий в адаптации тканей к естественным и патологическим изменениям доступности кислорода.

На уровне тканей и клеток, в том числе пародонта человека, адаптивные реакции на низкое напряжение кислорода или на гипоксию, в

основном, опосредованы через ключевой механизм клеточной транскрипции или переноса генетической информации с ДНК на РНК. В этом плане наибольший интерес представляет изучение HIF-1 α [42].

Кислород необходим для адекватного транспорта электронов, окислительного фосфорилирования и выработки энергии. Различные потребности тканей в кислороде объясняются рядом физиологических или патологических состояний. Но все ткани должны адаптироваться к различным концентрациям O₂, включая гипоксию. Чтобы выжить, клетки млекопитающих развивались таким образом, что клеточная доступность O₂ жестко контролируется и регулируется. Это стало возможным благодаря HIF-системе [18, 156].

Клеточная гипоксия – явление нередкое и может вызвать значительные изменения на клеточном уровне. Различают немедленные или отсроченные реакции на гипоксию, включая рост или апоптоз клеток, пролиферацию или выживание клеток, регуляцию рН и энергетический метаболизм, миграцию клеток, качество их барьерной функции и ангиогенез, вазомоторную регуляцию [102, 111, 123, 134, 170, 189]. Эти биологические процессы включают в себя активные способы обеспечения дополнительной подачи кислорода через усиление циркуляции крови, мониторинг его концентрации, доставку и потребление клетками. Все процессы строго контролируются, что обеспечивает выживание многоклеточного организма в целом [34, 159].

Как описано ранее, нормальные уровни pO₂ в тканях/клетках млекопитающих зависят от их локализации и физиологии [188]. Гипоксия в клетках/тканях полости рта является частым явлением [142]. Так, из-за заселения поддесневого пространства микрофлорой, формирующей биопленку, концентрация кислорода дополнительно падает вследствие его потребления, что способствует распространению колоний факультативных анаэробных микробов в пародонтальной борозде с последующим присоединением воспаления [198].

Местная гипоксия тканей пародонта часто развивается как следствие сахарного диабета, курения, при инфекционных воспалительных процессах полости рта. В качестве адаптивных к гипоксии механизмов можно привести регенерацию клеток полости рта, а также реваскуляризацию через стимуляцию сети кровеносных сосудов фактором роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF), секретируемым стволовыми клетками апикального сосочка [35, 196].

С другой стороны, было отмечено, что вызванная химическим веществом - хлоридом кобальта - высокая степень гипоксии, может оказывать цитотоксический эффект на стволовые клетки периодонтальной связки через митохондриально-апоптотический и аутофагический пути с участием HIF-1 α [176].

При раке слизистой оболочки полости рта низкий уровень кислорода может регулировать миграцию опухолевых клеток, влияя на инвазию и метастазирование злокачественных клеток [30, 68, 178].

Пародонтит характеризуется хроническим воспалением тканей, поддерживающих зубы, которое инициируется множеством грамотрицательных анаэробных патогенов, включая *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* [23, 171, 172]. При биопсии тканей пародонта у больных ХГП с использованием иммуноокрашивания вестерн-блоттингом и анти-HIF-1 α установлены гипоксические изменения тканей и повышенное содержание HIF-1 α [184].

В экспериментальных исследованиях на мышах при подавлении экспрессии гена *HIF1A* и синтеза белкового фактора HIF-1 α наблюдалось снижение синтеза ряда иммунных эффекторных молекул, таких как оксида азота и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α). В результате бактерицидная защитная функция полости рта снижалась [154]. Таким образом, способность адаптироваться к гипоксии и обеспечивать контроль за иммунными клетками во всех тканевых средах, является необходимым условием для успешной ликвидации патологического процесса [69].

Провоспалительные цитокины и матричные металлопротеиназы выступают в качестве медиаторов для воспалительного процесса и играют роль в деградации внеклеточного матрикса. В клинических и экспериментальных исследованиях часто определяют концентрации этих биологических маркеров в биологических жидкостях полости рта для оценки тяжести заболеваний пародонта и контроля результатов лечения [31, 58]. Недавние исследования показали, что гипоксическая среда может усиливать синтез провоспалительных цитокинов и экспрессию генов матричных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях пародонта [149]. Исследования показали, что у человека гипоксия дополнительно стимулирует индуцированную липополисахаридами экспрессию ФНО- α , интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 через Толл-подобные рецепторы, которые, в свою очередь, активируют фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, - ядерного фактора каппа В (NF- κ B) [88, 107, 160].

На фоне разрушения коллагена эпителиальные клетки пародонта могут продуцировать матричные металлопротеиназы в ответ на вызванную бактериями активацию патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, в том числе Толл-рецепторов. Эти ферменты способствуют деградации внеклеточного матрикса, что усиливает местные воспалительные реакции, сдвигая по времени последующее ремоделирование ткани, которое следует после прекращения воспаления [123, 165].

В моноцитах человека липополисахариды и гипоксия синергически активируют NF-1 α через митоген активируемые протеинкиназы и NF- κ B. Тем не менее, повторное воздействие липополисахаридов может вызвать толерантность к бактериальным эндотоксинам и, следовательно, ослаблять соответствующую индукцию NF-1 α . Таким образом снижается способность моноцитарных клеток выживать и функционировать при низком содержании кислорода [81, 82].

Некоторые пародонтопатогены помимо того, что они действуют как эффективные медиаторы воспаления пародонта, способны нанести существенный вред человеку в среде с низким pO_2 . Например, липополисахариды *Porphyromonas gingivalis* при гипоксии увеличивают окислительный стресс фибробластов периодонтальной связки и вызывают снижение активности каталазы. В результате происходит разрушение защитного механизма, способствующего ограничению накопления активных форм кислорода (АФК) и прогрессирования воспалительных заболеваний полости рта [11, 88].

Итоги нескольких работ по изучению заживления ран ротовой полости, привели к выводу, что заживление может усиливаться или ускоряться при гипоксии посредством фактора HIF-1 α [73, 180]. Например, заживление ран слизистой оболочки неба у крыс ускорялось ингибитором гидроксилазы – диметилноксалилглицином, который относят к веществам, активирующим HIF-1 α . Сообщалось, что он вызывает гипоксия-миметический ангиогенез [204].

Метаболические сдвиги при гипоксии - частые спутники воспалительных процессов в пародонте. Накопление внутриклеточного HIF-1 α способствует транскрипции спектра генов, направленных на поддержание клеточного гомеостаза, а именно - экспрессию ряда ангиогенных факторов для улучшения кровоснабжения в необходимых областях, включая воспаленный периодонт [46]. Речь идет о VEGF, тромбоцитарном факторе роста и ангиопротейне-1 и -2 [43, 161].

Связанные гены контролируют перфузию кислорода посредством рецепторов к тромбоцитарному фактору роста- β , циклооксигеназы-2 и синтазы оксида азота. Синтаза оксида азота модулирует функции клеток гладких мышц сосудов и реагирует на изменения клеточного уровня HIF-1 α [80]. Более того, активация HIF-1 α способствует метаболическому переходу

для снижения потребления кислорода путем изменения энергетического обмена от аэробного дыхания к гликолизу [150].

Активация HIF-1 α усиливает экспрессию киназы пируват-дегидрогеназы, что уменьшает включение пирувата в цикл лимонной кислоты [113]. Это метаболическое переключение имеет важное значение для иммунитета, поскольку такой HIF-1 α -регулируемый гликолитический метаболизм необходим для дифференцировки В-лимфоцитов [116] и метаболизма Т-клеток [153].

Активность HIF-1 α способна ингибировать метаболизм хемокинов и вывести из строя экспрессию гена HIF-1 α с помощью небольшой интерферирующей РНК, что может заметно ослабить продукцию липополисахаридов, активацию стимулированных никотином металлопротеиназ и секрецию простагландина E2 из клеток периодонтальных связок [19]. Такие наблюдения говорят о том, что HIF-1 α является потенциальной мишенью при разрушении тканей пародонта, вызванных курением и скоплением зубного налета [114].

Гранулоциты и моноциты/макрофаги являются основными эффекторными клетками врожденного иммунитета, в том числе и в ротовой полости [93, 100]. Когда происходит обширное воспаление, гранулоциты и моноциты/макрофаги перемещаются в ткани с низким рО₂ (то есть в область воспаления), чтобы предотвратить проникновение микробов. При этом эффекторные клетки используют интенсивный, энергетически затратный метаболизм. Поэтому для врожденного иммунитета полости рта гипоксия и уровень HIF-1 α являются модулирующими факторами [7, 185, 186]. Защитные иммунные клетки для получения энергии и производства АТФ в значительной степени используют гликолиз, что компенсирует ограниченный окислительный обмен при гипоксии. В экспериментальных условиях показано, что отсутствие синтеза HIF-1 α , как критического модулятора экспрессии ферментов гликолиза, ввиду нокдауна одноименного

гена приводило к значительному снижению доступности АТФ в гранулоцитах [84].

HIF-1 α для борьбы с вторгающимися патогенами способствует активации полиморфно-ядерных нейтрофилов и восстановлению кровотока в воспаленных тканях путем усиления неоваскуляризации. При гипоксии HIF-1 α восстановленная перфузия способствует диапедезу полиморфно-ядерными нейтрофилами [117, 132]. Кроме того, при гипоксии апоптоз полиморфно-ядерных нейтрофилов посредством HIF-1 α ослабляется [185, 186]. Такое регулирование возможно посредством передачи сигналов от ядерного фактора NF- κ B к HIF-1 α [164].

Связанный со стрессом клеточный фактор транскрипции NF- κ B тесно связан с гипоксией. Его активация при гипоксии часто сопровождалась активацией трансформирующего фактора роста В-киназы и ингибитора комплекса κ B-киназ [49, 193]. Активные формы кислорода как ключевой регулятор воспаления при хроническом пародонтите, опосредуют индукцию HIF-1 α в зависимости от уровня NF- κ B [57, 182].

Дендритные клетки – это группа специализированных антигенпрезентирующих клеток, играющих ключевую связующую роль между врожденной и адаптивной иммунными системами. Они «знакомят» антиген с лимфоцитами, содействуя таким образом развитию специфического адаптивного иммунного ответа на патогены. Установлено, что гипоксия играет важную роль в созревании и высвобождении цитокинов из дендритных клеток [24, 146].

Исследования показали, что нокдаун HIF-1 α в дендритных клетках ингибирует их созревание и значительно ухудшает их способность стимулировать аллогенные Т-лимфоциты, вероятно из-за зависимости от HIF-контролируемого гликолиза [79, 106]. С другой стороны, сообщается, что низкое напряжение кислорода препятствовало защите дендритных клеток от липополисахаридов и сильно повышало производство провоспалительных цитокинов в клетках [131]. Подобные результаты могут

наблюдаться у человека при противогрибковом ответе: гипоксия в месте колонизации *Aspergillus fumigatus* ингибирует полную активацию и функции дендритных клеток [78]. Можно сказать, что гипоксия выступает в качестве регулятора против опосредованной чрезмерной реакции иммунитета посредством дендритных клеток.

Известно, что лимфоциты участвуют в защитных механизмах тканей пародонта и их функциональное расстройство возможно при ХГП. Дефицит $\text{NF-}\alpha$ сопряжен с аномальным развитием В-лимфоцитов, что показали модели на мышах [115]. Другие работы доказали, что в регуляции Т-лимфоцитов $\text{NF-}\alpha$ играет решающую роль в предотвращении повреждений тканей у линий мышей с диабетом [125]. Подобный механизм защиты может быть и ХГП на фоне сахарного диабета. Следовательно, гипоксия и $\text{NF-}\alpha$ через регуляцию функций дендритных клеток и лимфоцитов может оказывать заметное влияние на врожденный и адаптивный клеточный иммунитет в тканях пародонта, но точный механизм влияния пока не ясен.

Пародонт представляет собой уникальную среду для микроорганизмов. Одной из характерных особенностей у человека является наличие ничем не прикрытой поверхности твердых тканей зубов, на которой микроорганизмы могут оставаться неограниченное время и размножаться без затруднений. Чтобы противостоять вторжению возможных патогенов, местные эпителиальные ткани создают эффективный барьер против колонизирующих микробов [29, 92].

При сохранении ежедневной гигиены полости рта, взаимодействие бактерий и человека-хозяина находится в равновесии, а пародонт находится в состоянии здоровья или слабо выраженного субклинического воспаления. За много лет сосуществования люди и их сложная микрофлора ротовой полости приспособились друг к другу [147]. Толл-рецепторы на эпителиальных клетках пародонта и/или десны распознают условно-патогенные молекулярные структуры патогенных бактерий и ограничивают их проникновение, что помогает поддерживать здоровье полости рта [94].

У людей с неудовлетворительной гигиеной полости рта равновесие сдвигается в сторону провоспалительного состояния, что клинически приводит к гингивиту [28]. Из-за плохой гигиены полости рта и наследственных и/или приобретенных рисков, примерно у 20% населения планеты развивается хронический генерализованный пародонтит с деструкцией костной ткани [142, 143].

HIF-1 α не только опосредует иммунный ответ хозяина на условно-патогенную микрофлору, но и обеспечивает защиту от пародонтопатогенных микробов. Однако, в ряде случаев, HIF-1 α может способствовать разрушению тканей, поддерживающих пародонт, и, следовательно, к пролонгированию пародонтита [171]. Объединяя всю имеющуюся в настоящее время информацию, можно сказать, что гипоксия может привести как к благотворному, так и к вредному воздействию на здоровье пародонта. На данном этапе можно предположить, что гипоксия слабой степени посредством изменения концентрации HIF-1 α обеспечивает базовый уровень защиты пародонта для «надзора» за собственной микрофлорой и защитой от вторжения чужеродных патогенных микробов [37].

Эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта и кишечника склонны к гипоксии [65]. Соответствующий градиент кислорода между эпителием и субэпителиальной перфузией обеспечивает соответствующий клеточный градиент HIF-1 α в вовлеченных тканях, что поддерживает физиологические показатели клеточного гомеостаза. Таким образом, HIF-1 α функционирует как внутриклеточный датчик pO_2 , обеспечивая соответствующие адаптивные реакции для выживания клеток [22].

Помимо антимикробных пептидов, есть много других факторов, регулирующих уровень HIF-1 α в эпителиальном барьере пародонта. Например, трефоилловые пептиды (TFF), секретируемые слизистой оболочкой, участвуют в защите ротовой полости от повреждения тканей и в формировании иммунного ответа [61, 64]. На интенсивность их секреции влияют клеточные концентрации pO_2 . Так, HIF-1 α опосредовал индукцию

экспрессии гена TFF1 и обеспечивал адаптивную связь для поддержания барьерной функции во время гипоксии клеток слизистых оболочек полости рта [83, 98]. Муцины слюны образуют защитный слой на слизистой ротовой полости, что служит барьером против бактериальной инвазии [112, 166]. Как и в случае с TFF, выработка муцинов повышалась при гипоксии [202]. Данные факты указывают на то, что гипоксия-зависимый механизм регуляции посредством HIF-1 α в эпителиальных барьерных клетках может принимать участие в развитии и течении заболеваний пародонта.

Бактериальные компоненты могут вызывать накопление HIF-1 α при ХГП независимо от степени гипоксии [122]. Эксперимент по иммунопреципитации показал, что накопление HIF-1 α в фибробластах десны человека индуцировалось липополисахаридами бактерий в зависимости от дозы и времени. Накопление HIF-1 α может модулироваться Толл-рецепторами. Более того, экспрессия активных центров в Толл-рецепторах как в кератиноцитах десны человека, так и в фибробластах эпителиальных компартментах пародонта, *in vivo* оказалась различной, что говорит о неоднородной концентрации липополисахаридов в ротовой полости, в том числе и по причине разного уровня гипоксии [121].

Недавнее исследование плоскоклеточной карциномы полости рта выявило новый механизм взаимодействия HIF-1 α и Толл-рецепторов. Сообщалось, что активация Толл-рецепторов 3 и 4 стимулировала экспрессию HIF-1 α через NF- κ B, в то время как накопление HIF-1 α увеличивало экспрессию Толл-рецепторов 3 и 4 через прямое связывание с промотором. Это наблюдение предоставило доказательства того, что путь первый путь может образовывать петлю положительной обратной связи с HIF-1 α , что, теоретически, может произойти и в ткани пародонта [173]. Для подтверждения данного постулата необходимо проведение дальнейших исследований.

HIF-1 α играет важную функциональную роль в костном гомеостазе, стимулируя резорбцию и регенерацию кости, два основных биологических процесса в костном гомеостазе/репарации. Сообщается, что недостаток кислорода в тканях пародонта может способствовать резорбции альвеолярной кости и, таким образом, утяжелять заболевание [44, 195]. Хроматин-иммунопреципитация показала, что HIF-1 α связывается с рецепторным активатором промотора лиганда NF- κ B (RANKL). Мутации предполагаемого места связывания HIF-1 α и RANKL предотвращали гипоксию. Активация транскрипции RANKL при ХГП предполагает, что HIF-1 α опосредует индуцированное гипоксией усиление экспрессии RANKL и активацию остеокластогенеза [151]. Кроме того, сообщалось, что гипоксия вызывала HIF-зависимую дифференцировку периферических мононуклеарных клеток крови в функциональные остеокласты [67].

HIF-1 α считается ключевым медиатором неоангиогенеза, необходимым для регенерации кости [190, 191, 201]. HIF-имитирующие агенты или HIF-стабилизирующие агенты являются триггерами для инициации и стимулирования ангиогенно-остеогенного механизма [71, 170].

Недавнее исследование на животных позволило установить активацию остеогенеза и ангиогенеза посредством сверхэкспрессии HIF-1 α , приводящей к усиленной регенерации альвеолярного дефекта кости [200]. Цементобластная дифференцировка дентальных стволовых клеток человека являлась ключевым клеточным механизмом в регенерации пародонта, который стимулируется гипоксией через активацию HIF-1 α [63]. Однако точный характер влияния HIF-1 α на регенерацию пародонта при ХГП, неизвестен и требует дальнейших исследований. Изучения гипоксия-опосредованных процессов в пародонте, позволит разработать новые терапевтические стратегии при лечении ХГП.

1.2. Врожденный иммунный ответ как компонент барьерной функции на пути распространения пародонтопатогенных бактерий и его гипоксия-зависимый контроль

Помимо физического барьера от внешнего проникновения, кожа и слизистая оболочка продуцируют ряд антимикробных пептидов (АМП), которые обладают широким спектром активности в отношении колонизации как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, оболочечных вирусов, грибов и даже трансформированных или опухолевых клеток [26]. АМП дефензины и пептиды семейства кателицидинов, особенно LL-37, играют важную роль в поддержании здоровья полости рта, включая антимикробные эффекты и опосредованный хемотаксис иммунных клеток [91,181]. Установлена связь между дефицитом кателицидина LL-37 и персистенцией *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, что приводит к развитию ХГП тяжелой степени [75].

Врожденный иммунитет является первой линией защиты от пародонтопатогенов. Его функции – распознавание, ослабление и устранение патогенных микробов и запуск иммунных реакций. Врожденный иммунный ответ хозяина опосредуется в основном нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, Т и В-лимфоцитами. Нейтрофилы являются первыми клетками, которые попадают в воспалительный инфильтрат.

Кателицидины — это группа антимикробных пептидов, единственный представитель которых у человека обозначается как LL-37 (он состоит из 37 аминокислотных остатков). В слюне кателицидин продуцируется преимущественно нейтрофилами и, в меньшей степени, клетками эпителия языка, десны и слизистой оболочки щек в виде неактивного предшественника, состоящего из N-концевого кателиноподобного и C-концевого антимикробного доменов [2, 145]. Однако стоит заметить, что продукция кателицидина в кератиноцитах в норме мала, вещество пребывает

в неактивной форме. Все меняется при развитии воспаления. Максимальная концентрация кателицидина отпечатывается на дне десневой борозды [99].

Снижение кателицидина LL-37 в десневой жидкости многими авторами рассматривается как предиктор развития воспалительных заболеваний пародонта [50, 137]. Кателицидин LL-37 является активной формой пептида. Образуется из кателицидина путем протеолиза ферментом протеаза-3 из экзозекул лейкоцитов. После образования активной формы LL-37 пептид действует, как противовирусный, антибактериальный, а также противогрибковый фактор. При развитии своего эффекта антимикробный пептид за счет электростатических сил контактирует с мембранами патогенов [120]. Далее кателицидин LL-37 вступает во взаимодействие с большим разнообразием грамотрицательных и грамположительных бактерий, в том числе и с возбудителями ХГП – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Porphyromonas gingivalis* [47, 105].

Одна треть аминокислотных остатков кателицидина LL-37 имеет положительный заряд, большая часть заряда не имеет, то есть неполярна. При нейтральной реакции pH в ткани молекулы кателицидина LL-37 притягиваются анионными центрами фосфолипидов мембран патогенных микроорганизмов. В водной среде молекула изучаемого пептида представлена в форме беспорядочного клубка, однако при встраивании в двойной слой липидов биологических мембран видоизменяется в α -спираль [197]. Преобразование LL-37 в α -спираль определяет его антимикробную активность [89]. При достижении критической концентрации LL-37 в мембране клетки-мишени появляются сквозные дыры, что ведет к лизису микробной клетки. LL-37 накрывает мембрану микроба сверху и разрушает ее с образованием большого количества мицелл.

Однако, если концентрация кателицидина становится в 20–50 раз больше, чем это нужно для подавления микробов, пептид начинает разрушать эукариотические клетки сходным с бактерицидным воздействием способом [21]. Бактерии сильнее предрасположены к разрушительному

влиянию LL-37 в связи с большим отрицательным зарядом их клеточной стенки в сравнении с таковой у эукариотических клеток [140].

При слущивании эпителиальных клеток со слизистых оболочек полости рта, апоптозе эпителиоцитов, их старении во внеклеточном матриксе появляются свободные нуклеиновые кислоты [101]. Путем электростатического притяжения молекулы кателицидина LL-37 комплексируют со свободными нуклеиновыми кислотами, оберегая тем самым их от протеолитического разрушения нуклеазами [167]. Комплекс из свободных нуклеиновых кислот и кателицидина LL-37 проникает внутрь клетки по механизму эндоцитоза, оберегая от разрушения нуклеазами [101].

Продукция кателицидина LL-37 зависима от наличия патогенных микроорганизмов и регулируется факторами роста и дифференцировки [56]. При хронических пародонтитах концентрация кателицидина LL-37 значительно повышена, что при гингивите – редкость. Данное обстоятельство является важным для дифференцирования этих заболеваний [181].

Кателицидин LL-37 выступает в роли хемоаттрактанта для иммунных клеток, а именно он обеспечивает хемотаксис нейтрофилов, Т-лимфоцитов и моноцитарных клеток в зону воспаления. При участии кателицидина LL-37 происходят клеточноопосредованные иммунные реакции и созревание дендритных клеток. Уровень кателицидина LL-37 при повреждениях эпителия или слизистых оболочек растет, что позволяет его считать сигналом тревоги [51]. Кателицидин LL-37 одним из первых сигнализирует о наличии бактериальной инвазии, являясь по своей сути активатором антиген-презентирующих клеток [86, 162, 192].

При реэпителизации раневой поверхности кателицидин LL-37 угнетает продукцию и выброс ряда биологически активных веществ – гистамина, цитокинов, хемокинов. При процессах заживлении ран локальная концентрация кателицидина LL-37 резко возрастает, что дает основания считать кателицидин LL-37 ростовым фактором кератиноцитов [72, 97].

Реакция хозяина во время ХГП включает врожденные и адаптивные иммунные реакции, что приводит к хроническому воспалению и прогрессирующему разрушению зубных тканей. Патогенез ХГП включает сложное взаимодействие между пародонтопатогенами и иммунными клетками хозяина, зависящее от генетических (диабет) и средовых факторов (курение, гипоксия и др.) [41].

Эффекторные иммунные реакции, опосредованные, в том числе, через $\text{NF-}\kappa\text{B}$, поддерживают здоровье пародонта. Однако, большая или меньшая активность иммунитета при гипоксии в тканях пародонта посредством регуляции $\text{NF-}\kappa\text{B}$, может привести к повреждению тканей пародонта и альвеолярной кости [6].

Гипоксия, развиваясь в очаге воспаления, увеличивает экспрессию определенных Толл-рецепторов в клетках десны человека [62]. Взаимодействие лейкоцитов при низком содержании кислорода с бактериальными лигандами *in vivo* потенциально увеличивает производство цитокинов и антимикробных пептидов и, таким образом, теоретически, помочь уменьшить или устранить проблемы, связанные с пародонтопатогенами [13]. Бактериальные компоненты, такие как липополисахариды и пептидогликаны, выделяемые бактериями, и распознаваемые Толл-рецепторами провоцируют целый каскад воспалительных реакций [129]. В обычных условиях активация Толл-рецепторов комменсальными бактериями играет важную роль для поддержания здоровья полости рта. Таким образом, Толл-рецепторы обеспечивают первую линию защиты в поддержании здоровья пародонта и ротовой полости [10]. При стимуляции, например, через распознавание Толл-рецепторами патогенов, полиморфоядерные нейтрофилы демонстрируют повышенный хемотаксис и продукцию провоспалительных цитокинов [45].

Биологическое влияние низкого pO_2 на функции Т-лимфоцитов было отражено эффектами $\text{NF-}\kappa\text{B}$ и аденозинового рецептора [174]. Действительно, и лимфоциты, и миелоидные клетки были затронуты

вызванными гипоксией изменениями адаптивного иммунного ответа. Хорошо известно, что при ХГП часто отмечается низкое напряжение кислорода [38]. Соответствующие местные иммунные ответы должны адаптироваться к этой проблеме.

Врожденный иммунный ответ включает в себя распознавание микробных компонентов в зараженном микроокружении Толл-подобными рецепторами [12]. Антигенпредставляющие клетки активируются бактериальными продуктами и взаимодействуют с нулевыми Т-хелперными клетками (Th), которые дифференцируются в несколько подмножеств, таких как Th1, Th2, Th17 и Treg [17]. Т-лимфоциты являются центральными для адаптивного иммунитета и помогают В-клеткам вырабатывать специфические антитела.

Активированные нулевые Th могут дифференцироваться в:

- лимфоциты Th1, экспрессирующие интерлейкин-2, интерферон- γ и ФНО- α ;
- Th2-лимфоциты, экспрессирующие интерлейкины-4, -5 и -13;
- Th17, экспрессирующие интерлейкины-17A, -17F, -21 и -22;
- Т-клетки памяти [1, 39].

Врожденный иммунитет не распознает все возможные антигены. Вместо этого он распознает лишь несколько облигатных структур, присутствующих во многих микроорганизмах. Это – липополисахариды, пептидогликаны, бактериальная ДНК, двухцепочечная РНК, N-формилметионин, ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны [4, 40, 183]. В связи с этим, врожденные иммунные реакции не имеют четкой направленности против ликвидации соответствующего антигена и носят характер универсальной защиты, регулируемой, очевидно, в том числе и гипоксией.

1.3. Цитокины и гипоксия в патогенезе хронического пародонтита

Резидентные и мигрирующие иммунокомпетентные клетки выделяют цитокины во время воспалительной реакции при ХГП. В частности, мигрирующие нейтрофилы и фибробласты периодонтальной связки продуцируют интерлейкины-1, -6 и ФНО- α . Десневые фибробласты также синтезируют ИЛ-6 и ФНО- α . Фибробласты периодонтальной связки и бактериальные антигены могут способствовать экспрессии RANKL остеобластами. ИЛ-12, -6, -18, трансформирующий фактор роста бета взаимодействуют с Т-лимфоцитами [126, 169].

После первичного ответа на бактериальную инвазию активация Т-хелперов инициирует адаптивный ответ. Воспаление пародонта усиливается и хронизируется через многочисленные аутокринные и паракринные реакции цитокинов, действующих на клетки пародонта. Цитокины представляют собой низкомолекулярные водорастворимые гликопротеины, секретируемые гемопоэтическими и негематопоэтическими клетками в ответ на внедрение инфекции [36, 128]. Они являются важными ключевыми молекулами и сигнальными медиаторами в патогенезе периодонтита, участвующими в очень сложном скоординированном иммунопатологическом ответе при ХГП и играют роль в воздействии специфических лейкоцитов на ткани пародонта, при активации остеокластогенеза и стимуляции резорбции кости [48, 139].

Установлено, что выключение синтеза белка NF- κ B приводит к значительному снижению продукции ИЛ-6 при воздействии липополисахаридов, что свидетельствовало о том, что NF- κ B поддерживает зависимость от липополисахаридов микробных пародонтогенов экспрессию ИЛ-6, который, в свою очередь, предотвращал истощение АТФ и, следовательно, защищал миелоидные клетки против апоптоза, вызванного комплексом Липополисахариды/Толл-рецепторы 4 [119].

Защитные клетки имеют рецепторы распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и запускают немедленный ответ против микроорганизмов. Рецепторы распознавания патоген-

ассоциированных молекулярных паттернов обнаружены на периодонтальных резидентных клетках ткани, таких как эпителиальные клетки, фибробласты десны, фибробласты периодонтальной связки, дендритные клетки и остеобласты. Эти рецепторы включают Толл-рецепторы, нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации, кластер дифференцировки 14 CD14, рецептор–комплемент–3, лектины и рецепторы–поглотители [96, 108].

После заражения бактериями резидентные клетки распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны через толл-рецепторы и инициируют производство провоспалительных цитокинов и хемокинов, запускают процессы воспаления. Толл-рецепторы 4, например, могут распознать липополисахариды грамотрицательных бактерий. Цитокины, такие как ФНО- α , интерлейкин- 1β и ИЛ-6 при повреждениях пародонта, организуют целый каскад разрушительных процессов в пародонтальных тканях [109]. Эти процессы включают в себя производство воспалительных ферментов и медиаторов (таких как матриксные металлопротеиназы и простагландины), остеокластов, а также дифференцировку через рецепторный активатор ядерного фактор- $\kappa\beta$ -лиганд RANKL-зависимых и – независимых путей, приводящих к необратимому повреждению твердой и мягкой ткани при ХГП [127, 179].

Некоторые цитокины являются провоспалительными (ИЛ-1, -12, -17, -18, ФНО- α), другие – противовоспалительными (ИЛ-4, ИЛ-10) медиаторами воспалительного процесса [3, 32, 90].

ИЛ-6 представляет собой плейотропный цитокин, который не только оказывает иммунологическое воздействие, но и функционирует в структуре гематопоза, гомеостазе костной ткани и ее регенерации. ИЛ-6 – это цитокин, продуцируемый Т-клетками, В-клетками, моноцитами/макрофагами, эндотелиальными клетками и десневыми фибробластами. Он обладает многофункциональными свойствами и

секретируется в ответ на бактериальные липополисахариды или ИЛ-1 β и ФНО- α [25, 59].

ИЛ-6–связывающий рецептор (ИЛ-6R) расположен в мембране клеток и димеризуется связью с двумя субъединицами gp130. Кроме этого, существует также и растворимая форма рецептора. ИЛ-6 может задействоваться в регуляции разрушения тканей. ИЛ-6 индуцирует продукцию ингибиторов металлопротеиназ, подавляет экспрессию ИЛ-1 β и ФНО- α , индуцирует антагонист рецептора ИЛ-1 [70]. ИЛ-6 может стимулировать фибробласты для получения коллагена и гликозаминогликана, играть роль в дифференцировке В-клеток, пролиферации Т-клеток [155].

Этот цитокин оказывает важное влияние на патогенез пародонтита, главным образом в вопросах регуляции метаболизма кости. Во время развития ХГП множественные биологические действия опосредованы ИЛ-6, включая гематопоз, индукцию ангиогенеза, активацию иммунцитов и дифференцировку остеокластов. Кроме того, ИЛ-6 в синергизме с ФНО- α и NIF-1 α способен индуцировать дифференцировку предшественников остеокластов непосредственно или стимулировать стромальные клетки для производства RANKL [66, 144], что составляет механизм влияния гипоксии на остеоиммунологические процессы в пародонте.

1.4. Физиологическое обоснование и эффективность применения в составе комплексного лечения кофермента никотинамидадениндинуклеотида у пациентов с хроническим пародонтитом.

При развитии воспалительных процессов в пародонте происходит образование и накопление свободно-радикальных частиц. За счет их высокой реакционной способности, обусловленной неспаренным электроном на внешней оболочке, свободные радикалы легко вступают во взаимодействие с белками, нуклеиновыми кислотами, углеводами. Данное взаимодействие

приводит к окислительной модификации сложных молекул. В результате нарушаются процессы клеточного дыхания в митохондриях, происходит структурная деформация ДНК в ядре, мембран органелл, запускаются внутриклеточный протеолиз. В ткани формируются такие процессы как гипоксия, хроническое воспаление, скопление токсинов [135].

Вследствие частого и бесконтрольного применения различных лекарственных средств местного действия возник ряд проблем, таких как: появление и распространение устойчивых форм бактерий, сенсбилизация с последующим форсированным аллергическим ответом [33, 74].

В связи с вышеизложенным, необходим поиск лекарственных средств без химически агрессивных веществ в составе, лучше на основе экологически чистого субстрата, с функциями нормализации кислородного обмена в клетках и тканях, повышения иммунной защиты и реэпитализацией поврежденных участков. Также важно, чтобы данные препараты не вмешивались в сформировавшиеся микробные сообщества биотипов ротовой полости. На эту роль хорошо подходит кофермент никотинамидадениндинуклеотид [53, 168].

Механизм действия НАД состоит в том, что он, проходя через клеточную, а затем митохондриальную мембрану, встраивается в цикл Кребса, приводя к увеличению продукции АТФ. Восстановленная форма НАД вступает во взаимодействие с активными формами кислорода, образуя воду и энергию, в том числе нейтрализуя свободные радикалы. Соответственно, чем больше этого субстрата находится в клетке, тем больше энергии она может генерировать, а значит дольше функционировать.

Внутри клеток у человека восстановленный НАД находится в цитоплазме и в митохондриях. При транспортировке восстановленного НАД через митохондриальную мембрану используется малат–аспартатный механизм. Попадая на электроно–транспортный конвейер, в митохондриях восстановленный НАД окисляется белками, запускается процесс

окислительного фосфорилирования, конечной целью которого является синтез АТФ [118].

В эпителиальные клетки полости рта восстановленный НАД транспортируется, упакованный в лецитиновые липосомы. НАД⁺ имеет хороший восстановительный потенциал [199]. НАД присутствует во всех клетках животных и растений. При ежедневном питании человека поступление НАД происходит через потребление рыбы и мяса. Но через стенки пищеварительного тракта поступление НАД минимально, поскольку желудочный сок быстро разрушает его структуру [103].

В следующем исследовании было показано, что разные дозы НАД в разы могут увеличивать синтез ИЛ-6, который, в свою очередь, модифицирует иммунные реакции адаптивного иммунитета [141].

В другой работе была показана роль НАД как стимулятора синтеза оксида азота, обладающего дезагрегантным и сосудорасширяющим действием, что несомненно оптимизирует кровообращение органов и тканей. Оксид азота является медиатором физиологического эндотелий-зависимого фактора релаксации, регулирующего сосудистый тонус. Оксид азота сдерживает агрегацию тромбоцитов, заполняющих просвет кровеносных сосудов и, тем самым, ухудшающих кровотоки. Самое важное, что нитроксид непосредственно расслабляет и расширяет кровеносные сосуды, таким образом, в ткани поступает больше крови/кислорода/питательных веществ. Дозозависимое применение НАД повышает синтез оксида азота в клетках [55].

Дентальный гель, содержащий кофермент НАД, успешно применяется во многих стоматологических клиниках при лечении десен. Благодаря этому время заживления ран и реэпителизации заметно сокращалось. Гингивит и кровоточивость десен купировались за несколько дней, а длительность заживления ран после хирургических вмешательств (после экстракции зуба) уменьшалась на 30%. Дентальный гель, содержащий кофермент НАД, также способен влиять на патогенные микроорганизмы в ротовой полости [54, 133].

Кофермент НАД выполняет функцию антиоксиданта, который нейтрализует радикалы, токсичные вещества и активные формы кислорода при определенных условиях. В работе Reibnegger G. et al. (2003) авторы в двойном слепом плацебо–контролируемом исследовании наблюдали за группами из 37 студентов медицинского вуза, которые добровольно осуществляли пероральный прием препарата НАД [163]. Одна из групп состояла из курильщиков, у которых НАД несколько снижал концентрацию малонового диальдегида ($p=0,0080$) и белка карбонила, а также окислял другие нежелательные вещества, образующиеся в процессе курения. Снижение концентрации веществ, образовавшихся при контакте слизистых полости рта с сигаретным дымом в период приема кофермента НАД приближался к уровню некурящих. Антиоксидантная способность НАД измерялась тестом на глутатион и тестом на аутоантитела против окисленных ЛПНП.

У заядлых курильщиков патологические изменения слизистой оболочки полости рта с накоплением маркеров окислительного стресса в биологических жидкостях полости рта выражены в большей мере. Благотворные влияния НАД на окислительный статус проявляются более отчетливо. Проведенное исследование доказало, что НАД – мощный биологический антиоксидант как *in vitro*, так и *in vivo*, а его антиоксидантные возможности приближаются по силе к аскорбиновой кислоте, хотя его прооксидантный эффект может быть менее выражен [163].

Уникальность следующего исследования состоит в том, что впервые удалось проследить влияние дентального геля, содержащего кофермент НАД, на состояние системы микроциркуляции тканей десны после хирургического вмешательства у больных с ХГП [27]. Дентальный гель с НАД применялся в послеоперационном периоде после хирургического вмешательства в ротовой полости в плановом порядке. Критерием включения в исследование являлось наличие у больных ХГП. Пациенты были разделены на 2 группы: в 1 группе из 10 пациентов проводилось

плановое удаление ретенированных, дистопированных зубов. Дентальный гель с НАД применяли наружно, в виде аппликаций на слизистую оболочку десны с экспозицией на 20 мин. Дальнейшее применение осуществлялось в домашних условиях, в течение 10 дней. 2 группу составляли пациенты, которым в плановом порядке производили удаление зубов с одномоментной установкой имплантатов. Воздействие препаратом осуществляли аналогично в двух группах [27].

В исследовании было установлено, что при применении дентального геля с восстановленным коферментом НАД после оперативного вмешательства, микрогемодинамика в тканях пародонта налаживалась. У пациентов плотность капилляров в маргинальной десне выросла на десятую долю с последующим возвращением к нормальному уровню. В месте прикрепления десны число капилляров возросло на 8%. Исходно в переходной складке плотность капилляров была повышенной, но в динамике наблюдения происходило снижение показателя на 12%. Имело место и возвращение диаметра капиллярных сосудов десны до исходного уровня. Околососудистая зона сокращалась на 12%, снижение перфузионного баланса происходило на 18%. Анализ совокупных данных по микрогемодинамике свидетельствовал о восстановлении сдвигов транскапиллярного обмена [27].

Таким образом, в работе был сделан вывод, что кофермент НАД активизирует микроциркуляцию в тканях пародонта, что отражено повышением плотности функционирующих капилляров, восстановлением морфометрии капилляров и перфузионного баланса, усилением линейной и объемной скорости кровотока. Также благодаря применению геля улучшалась перфузия тканей пародонта кровью, что положительно сказывалось на течении ХГП [27].

Эффективность применения дентального геля с НАД в составе комплексного лечения у пациентов с ХГП была изучена также в статье Зориной О.А. с соавт. (2016) [15]. Для работы было отобрано 40 человек с

ХГП средней степени в возрасте 35–45 лет. Среди пациентов выделяли две группы по 20 человек в каждой. Базовое лечение хронического пародонтита происходило в двух группах одинаково. В 1–ой группе на слизистую десны на 20 минут наносили аппликации витаминно-минерального комплекса, содержащего витамины С, Е, группы В и микроэлементы - железо, кальций, калий, марганец, магний, селен и йод. Данный препарат являлся дополнительным средством при местной патогенетической терапии ХГП в составе комплексного консервативного лечения. Во 2–ой группе дентальный гель с коферментом НАД вводили в пародонтальные карманы также на 20 минут. До и после окончания терапии проводилась компьютерная капилляроскопия в тканях пародонта. Результаты исследования показали, что в двух группах через 2 недели после окончания комплексного лечения клинично–лабораторные показатели улучшились. У 1–ой группы снижение индекса Mühlemann наблюдалось на 40%. Во 2–ой группе – динамика индекса кровоточивости стала лучше: по сравнению с исходом индекс снизился на 60%. Оценка выраженности явлений воспаления в пародонте показала, что наиболее выраженное изменение индекса РМА имело место во 2–й группе. Исходя из полученных результатов, авторы заключили, что дополнительное назначение к базовой терапии ХГП лекарственных веществ, активирующих окислительно–восстановительные процессы, нормализует состояние тканей пародонта, а именно уменьшает явления кровоточивости и глубины пародонтальных карманов у пациентов двух групп, однако все же результаты 2–ой группы были заметно лучше. После финала консервативной терапии при ХГП отмечалось улучшение морфометрических количественных характеристик микрососудов. Более заметные положительные сдвиги отмечались в 2–ой группе. Архитектоника капилляров десны теряла извитость, капиллярные петли приобретали правильную форму, Ток крови становился непрерывным, линейная и объемная скорость кровотока увеличивались. Микроциркуляторное обеспечение десны в 1–ой группе хотя и улучшалось, но полностью микрогемодинамика не восстанавливалась.

Обобщая клинические данные, полученные в ходе работы, авторы пришли к мнению, что дентальный гель с НАД обеспечивает хороший противовоспалительный эффект при ХГП. Местное использование геля заметно сокращало длительность консервативной терапии и благоприятствовало нормализации функционирования всего пародонтального комплекса [15].

Патофизиологический механизм действия дентального геля с коферментом НАД на ткани пародонта при лечении пациентов с ХГП до конца не изучен. Установленный благоприятный эффект НАД на микроциркуляторное обеспечение тканей пародонта при лечении не может не сказаться на местном тканевом кислородном обеспечении, напряжении pO_2 и выраженности гипоксии в очаге воспаления. Следовательно, возможно предположить при применении дентального геля с коферментом НАД у пациентов с ХГП изменение гипоксия-зависимых иммунных реакций в ответ на бактериальное воспаление. В связи с вышеизложенным, изучение гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов при ХГП может пролить свет на новые аспекты патогенеза заболевания и методы его лечения.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Состав групп пациентов, дизайн исследования и формирование базы первичных данных больных

Для осуществления поставленной цели было обследовано 60 пациентов. На первом этапе исследования формировали общую клиническую группу из 60 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (МКБ К 05.3) легкой и средней степени тяжести на фоне аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств, включая аллергию на метрогил, дисбактериоза кишечника III-IV степени. До начала лечения характеризовали исходный пародонтологический статус, проводили отбор содержимого пародонтальных карманов (ПК) для последующего качественно-количественного анализа концентрации пародонтогенных микроорганизмов с помощью мультиплексной ПРЦ-системы и определения содержания HIF-1 α , интерлейкина-6 и кателицидина-LL37 методом иммуноферментного анализа. Оценивали диагностическую значимость транскрипционного фактора HIF-1 α , антимикробного пептида кателицидина-LL37 и провоспалительного ИЛ-6 во взаимосвязи с характеристиками микробиоценоза содержимого пародонтального кармана и с учетом тяжести ХГП.

Критериями включения пациентов в общую клиническую группу были:

- хронический генерализованный пародонтит легкой и средней степени тяжести (МКБ К 05.3);
- возраст больных 30-45 лет;
- аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств, включая аллергию на метрогил;

- дисбактериоз кишечника III-IV степени;
- пациенты, подписавшие добровольное информированное согласие на участие и полностью информированные о цели исследования.

Критериями невключения явились:

- пациенты с ХГП, потерей клинического приклепления, глубиной ПК более или равно 6 мм, в стадии обострения;
- агрессивный пародонтит;
- с тяжелой общесоматической патологией, включающей онкологические заболевания, декомпенсацию сердечно-сосудистых заболеваний;
- пациенты, системно принимающие медикаментозные препараты общего или местного действия, в том числе стероидные или нестероидные противовоспалительные, антибиотики, антимикробные препараты, по ходу исследования или менее чем за 3 месяца до начала исследования;
- наличие беременности или период грудного вскармливания;
- пациенты, имеющие в анамнезе аллергическую реакцию на кофермент НАД.

Критериями исключения были:

- отказ пациента от динамического наблюдения в указанные сроки наблюдения;
- развившаяся аллергическая реакция на применяемое лекарственное средство при лечении ХГП.

На втором этапе зависимости от тактики лечения выделены две группы: 1 группа (n=30) – в состав комплексного лечения пациентов дополнительно к стандартному лечению включена обработка ПК дентальным гелем с восстановленной формой кофермента НАД (экспозиция по 20 мин 1 раз в день в течение 10 дней). Дентальный гель с коферментом НАД был направлен на коррекцию энергообмена и активацию окислительно-восстановительных реакций в тканях пародонта, улучшение локального микроциркуляторного обеспечения, антиоксидантную защиту в условиях

ограничения применения антимикробных средств. 2 группа (n=30) - пациенты получали стандартное лечение ХГП, включающее устранение микробного налета и удаление зубных минерализованных отложений ультразвуковым способом, полирование поверхностей зубов, антисептическую обработку.

По окончании лечения контроль гигиены полости рта и определение пародонтальных индексов осуществляли через 14 дней (ранний период наблюдения), 3 месяца (окончание восстановительного периода функционального состояния после воспалительных заболеваний) и 6 месяцев (начало отдаленного периода наблюдения), а концентрацию гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов в содержимом ПК измеряли через 3 и 6 месяцев.

На окончательном этапе исследования проводили оценку эффективности дополнительного назначения дентального геля с коферментом НАД в составе комплексного лечения ХГП для коррекции нарушений гипоксия-зависимых иммунных реакций по динамике ИИФ-1 α , кателицидина LL37 и ИЛ-6 в содержимом ПК.

Дизайн исследования отражен на схеме 1.

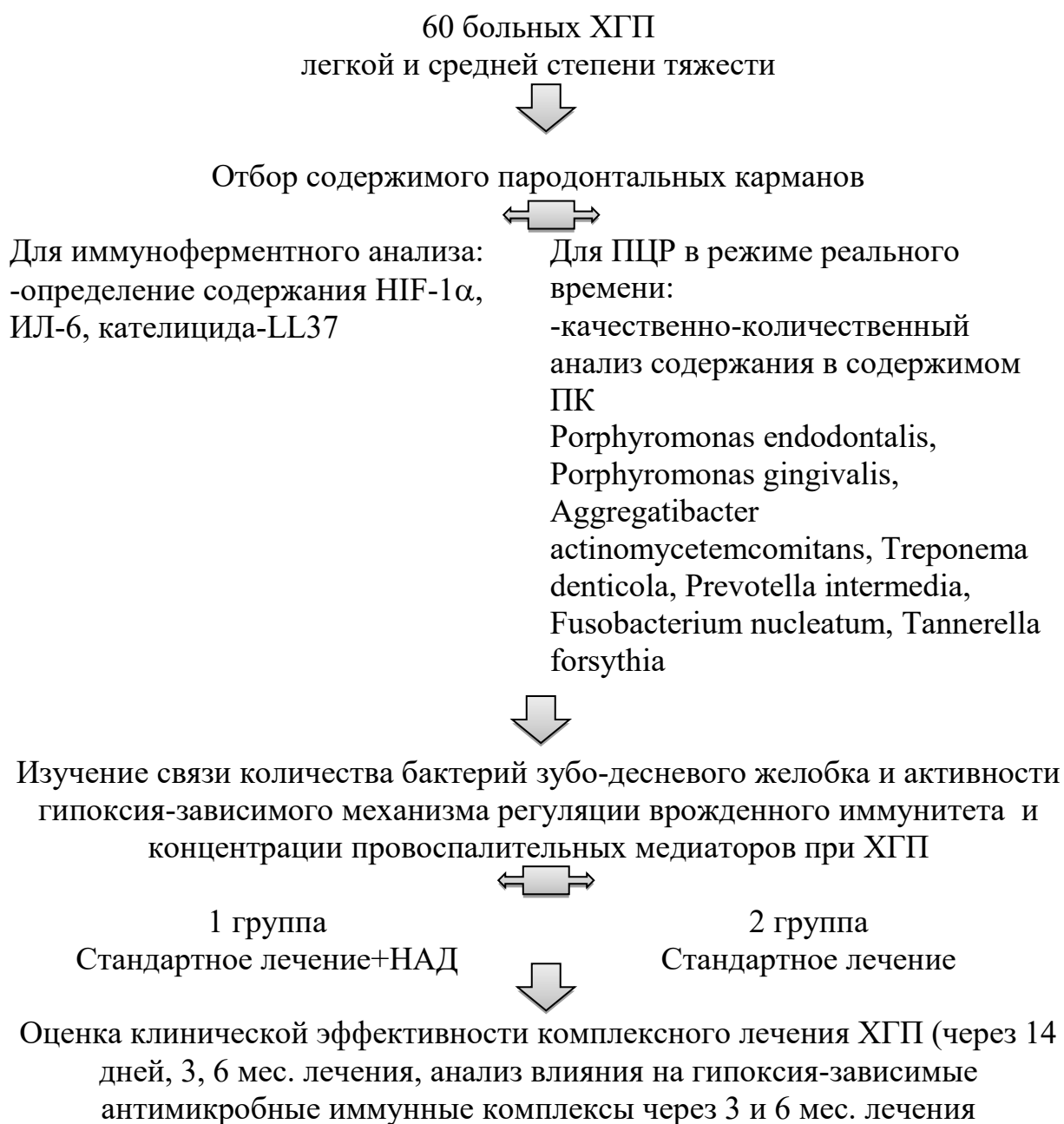


Схема 1. Дизайн исследования.

Проведенные исследования и их объем представлены в таблице 1.

Таблица 1

Тип проведенных исследований и их объем

№ п/п	Тип исследования	Объект обследования	Характер исследования	Количество
1	Клиническое стоматологическое	Полость рта, пародонт 60 пациентов с ХГП	Стоматологическое исследование полости рта с определением индексов гигиены по ОНI-S, папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (РМА), глубины пародонтальных карманов, пародонтологического индекса Рассела до начала лечения и через 14 дней, 3,6 месяцев после окончания лечения	240
3	Иммунологическое исследование	Содержимое пародонтальных карманов	Иммуноферментный метод определения концентрации ИФ-1 α , ИЛ-6, кателицида-LL37 до начала лечения и через 3 и 6 месяцев после окончания лечения	180
4	ПЦР в режиме реального времени	Содержимое пародонтальных карманов	Качественное и количественное определение соотношения облигатно-анаэробных бактерий <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Tannerella forsythia</i> до начала лечения	60

Все полученные результаты исследования пациентов заносились в индивидуальную регистрационную карту пациента, представленную в таблице 2. Из аналоговой регистрационной карты первичные данные пациентов переносили в электронную таблицу, сформированную в табличном процессоре Microsoft Excel. Далее систематизированные первичные данные экспортировали в программу STATISTICA 12.0 (StatSoft, США), с помощью которой осуществляли этапы статистического анализа.

Таблица 2

Индивидуальная регистрационная карта пациента

ФИО пациента				
Пол				
Возраст				
№ карты				
Диагноз: ХГП	<input type="checkbox"/>			
легкая степень тяжести	<input type="checkbox"/>			
средняя степень тяжести	<input type="checkbox"/>			
Этап наблюдения	Исходно	Чз 14 дн	Чз 3 мес	Чз 6 мес
Индекс гигиены по ОНІ-S				
РМА индекс				
Пародонтальный индекс				
Глубина ПК, мм				
Этап наблюдения	Исходно		Чз 3 мес.	Чз 6 мес
НІF-1α в содержимом ПК, пг/мкл				
ИЛ-6 в содержимом ПК, пг/мл				
Кателицидин LL37 в содержимом ПК, пг/мл				
Исходно				
Содержимое ПК до лечения:	Кач.	IgKOE	>КЗК	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<i>Treponema denticola</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<i>Prevotella intermedia</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<i>Tannerella forsythia</i>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	

Характеристика обследованных пациентов

Диссертационное исследование проводили на клинической базе ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2018 по 2020 г.г.

Всего в работе были обследованы и пролечены 60 пациентов в возрасте от 30 до 45 лет. Средний возраст составлял $38,05 \pm 0,54$ года (медиана 39 лет, межквартильный диапазон 35-42 года).

В контрольную группу для иммунологических показателей вошли 15 практически здоровых лиц (8 мужчин и 7 женщин) возраста 30-40 лет без патологии пародонта, у которых определяли значения изучаемых иммунологических показателей в норме.

60 пациентов наблюдались с диагнозом K05.31 по МКБ-10 (хронический генерализованный пародонтит).

Общую клиническую группу составили 34 женщины (56,7%) и 26 (43,3%) мужчин (схема 2). Средний возраст женщин был $37,5 \pm 0,78$ лет (медиана 38 лет) и мужчин $38,8 \pm 0,71$ лет (медиана 39 лет, межквартильный диапазон 36-43 года).

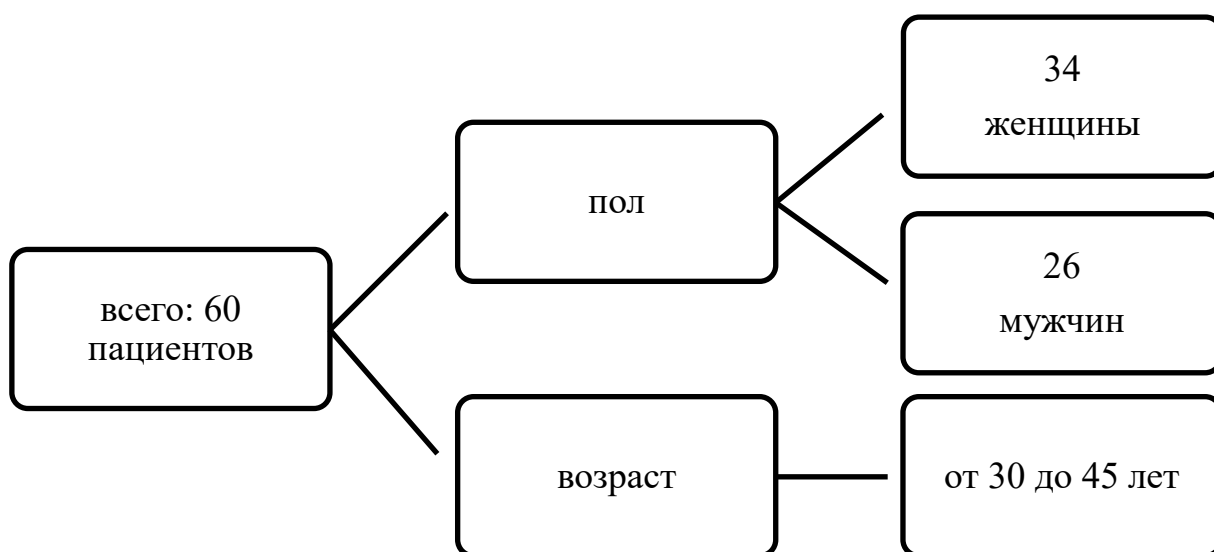


Схема 2. Распределение пациентов по полу и возрасту

В классификации МКБ-10 отсутствуют сведения о разделении пациентов, страдающих ХГП, по тяжести заболевания. По данным литературы главным системообразующим параметром, позволяющим разделить пациентов по тяжести ХГП, является глубина ПК. Пациенты с ХГП в зависимости от глубины ПК были разделены на две категории – с легкой степенью тяжести (глубина ПК до 3,5 мм) и средней степенью тяжести (глубина ПК от 4 до 5 мм включительно). Число пациентов с легкой степенью тяжести составило 27 (45%), а со средней степенью тяжести – 33 (55%) (схема 3).

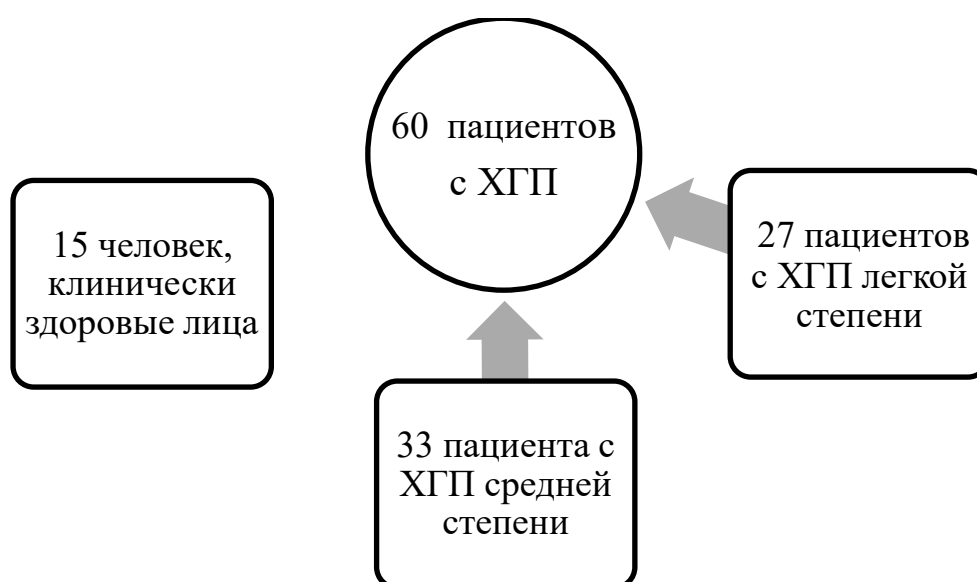


Схема 3. Распределение пациентов в зависимости от состояния пародонта.

Подгруппы пациентов были сформированы в зависимости от тактики лечения ХГП. В состав комплексного лечения пациентов 1 группы (n=30) дополнительно включена обработка ПК дентальным гелем с восстановленной формой кофермента НАД (Фарма ГмбХ, Австрия). Длительность экспозиции составляла 20 минут 1 раз в день в течение 10 дней (Рисунок 1).



Рисунок 1. Дентальный гель с коферментом НАД (Фарма ГмбХ, Австрия)

В основе дополнительно использованного в 1 группе препарата лежит вещество НАД (коэнзим никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма, синонимы кофермент витамина В3, кофермент I), которое является естественным, поскольку присутствует во всех клетках. Номер никотинамидадениндинуклеотида по базе данных химических соединений и смесей PubChem 5892, аналогичной базе ChemSpider 5681.

НАД принадлежит к семейству коферментов дегидрогеназ, катализирующих реакции отщепления атомов водорода, в системе окислительно-восстановительных реакций. НАД относится к донаторам и отвечает за транспорт электронов и водорода. Водород поступает от окисляемых веществ. В результате НАД обеспечивает тканевое дыхание и молекулу можно считать резервным источником энергии в клетках. Дентальный гель содержит кофермент НАД в виде лецитиновых липосом, что обеспечивает транспорт вещества внутрь клетки.

Дентальный гель с восстановленной формой НАД разрешен к применению в полости рта, не содержит фториды и перекись водорода, не является лечебно-профилактическим средством, декларирован как продукция, соответствующая требованиям технических регламентов Евразийского экономического союза. Гипоаллергенный, безопасный, не имеет противопоказаний, подходит пациентам с сахарным диабетом, в составе нет лактозы, глютена, алкоголя, продуктов животного происхождения, искусственных консервантов, красителей и ароматизаторов.

Лечение пациентов 2 группы (n=30) было стандартным: обучение правильной индивидуальной гигиене, профессиональная гигиена полости рта путем аппаратного удаления наддесневых и поддесневых зубных отложений, пигментированного налета аппаратами Piezon Master 400 и Air flow (EMS, Швейцария) с последующим медикаментозным орошением пародонтальных карманов 0,06% раствором хлоргексидина биглюконата, полирование поверхностей зубов пастой Detartrine Z (Septodont, Франция), устранение местных факторов, способствующих скоплению и активации действия микробного фактора (коррекция пломб и протезов), шинирование подвижных зубов с применением материалов на основе неорганической матрицы-стекловолокна (GlasSpan, США, и Fiber Splint, Швейцария) и жидких фотополимеров, функциональное избирательное пришлифовывание, устранение дефектов окклюзии и артикуляции.

Возраст пациентов 1 группы составил $38,1 \pm 0,75$ лет (медиана 39 лет, межквартильный диапазон 37-42 года) и во 2 группе $37,9 \pm 0,79$ лет (медиана 38 лет, межквартильный диапазон 35-43 года) (Рисунок 2).

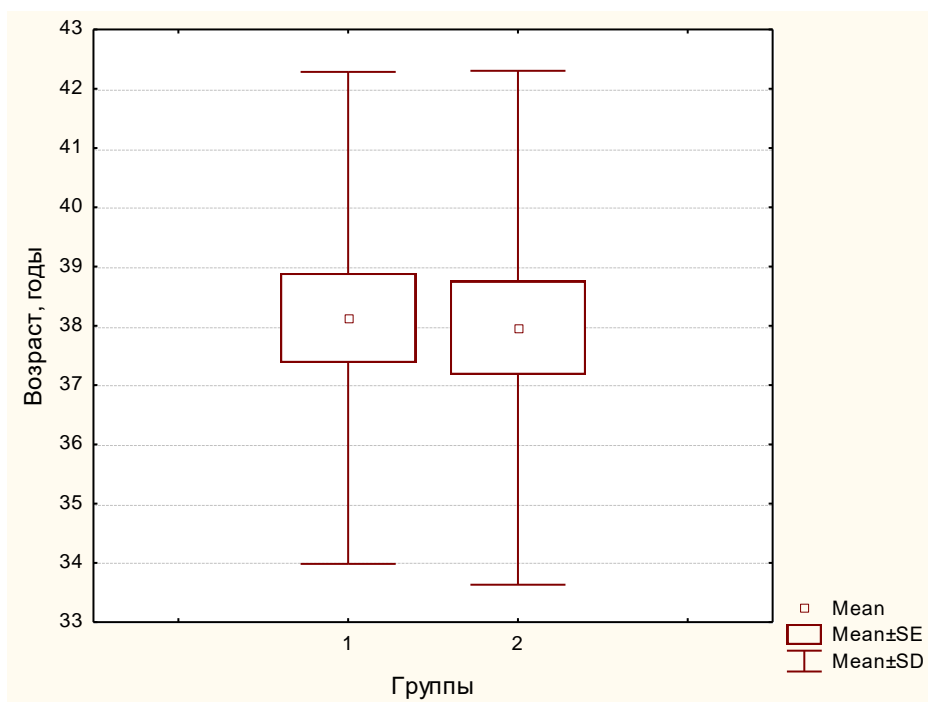


Рисунок 2. Среднее значение (Mean), размах стандартной ошибки средней (SE) и стандартного отклонения (SD) возраста в 1 и 2 группах.

Статистически значимые различия возраста в двух группах отсутствовали ($p=0,89$).

В 1 группе число женщин было 16 (53,3%), мужчин 14 (46,7%). Во 2 группе число женщин было 18 (60%), мужчин 12 (40%). Соотношение между мужчинами и женщинами в 1 и 2 группах было сходным ($p>0,05$).

В 1 группе число пациентов с легкой степенью тяжести ХГП было 14 (46,7%), а со средней степенью тяжести ХГП - 16 (53,3%). Во 2 группе число пациентов с легкой степенью тяжести ХГП было 13 (43,3%), а со средней степенью тяжести ХГП - 17 (56,7%). Соотношение между пациентами легкой и средней степенью тяжести ХГП в 1 и 2 группах не различалось ($p>0,05$).

Распределение пациентов 1 и 2 групп с учетом пола и тяжести заболевания отражено в таблице 3.

Таблица 3

Распределение пациентов с ХГП 1 и 2 групп с учетом пола и тяжести заболевания

Группа	Пол	Величина	ХГП легкой степени тяжести	ХГП средней степени тяжести	Всего
1 (n=30)	Жен.	Абс.	8	8	16
		%	50,00%	50,00%	
	Муж.	Абс.	6	8	14
		%	42,86%	57,14%	
	Всего	Абс.	14	16	30
		%	46,67%	53,33%	100,00%
2 (n=30)	Жен.	Абс.	7	11	18
		%	38,89%	61,11%	
	Муж.	Абс.	6	6	12
		%	50,00%	50,00%	
	Всего	Абс.	13	17	30
		%	43,33%	56,67%	100,00%

Соотношение долей пациентов в зависимости от пола и тяжести заболевания в двух группах было сходным. Учитывая также отсутствие различия возрастных характеристик в группах, можно сделать заключение, что две выборки характеризовали общую генеральную совокупность и не имели отличительных особенностей, препятствующих проведению сравнительного исследования.

2.2. Клинические методы исследования

Клиническое обследование пациентов

При клиническом обследовании пациентов опрашивали и собирали жалобы, уточняли анамнез заболевания, определяли величину клинических стоматологических индексов, осуществляли рентгенологические и лабораторные исследования биологического материала. По результатам анализа формировали диагноз ХГП и определяли степень тяжести заболевания.

При опросе пациенты предъявляли жалобы на кровоточивость десен, которая усиливалась при чистке зубов, пережевывании пищи твердой консистенции. Пациенты обращали внимание на наличие боли в области десен при приеме пищи, их отечность, припухлость. Беспокоил неприятный запах изо рта.

При опросе обращали внимание на необходимость исключения агрессивного пародонтита, учитывая особенности начальных этапов развития и дальнейшего течения заболевания, возраста, наследственной отягощенности.

Следуя рекомендациям (1997), этапность внешнего осмотра челюстно-лицевой области и полости рта включала пальпацию регионарных лимфатических узлов, оценку состояния слизистой оболочки полости рта. Оценивали особенности предверия по структурно-топографическим данным, определяли фенотип десны. Определение стоматологического статуса включало определение количества зубов, наличия кариеса и его осложненных форм. Оценивалось число и состояние пломб, присутствие и состоятельность ортопедических либо шинирующих зубочелюстных конструкций.

Оценку пародонтологического статуса проводили, следуя принципам Руководства ВОЗ «Стоматологическое обследование – основные методы»

(2013). Для определения глубины ПК использовали металлический зонд. Показатель измеряли в шести пунктах вокруг каждого зуба (Рисунок 3).



Рисунок 3. Определение глубины пародонтального кармана.

В качестве гигиенического использовали *индекса гигиены ротовой полости по Грин-Вермиллиону (ОHI-S)*. Определение данного индекса подразумевало оценку количества зубного камня и зубного налета (Green J.C., Vermillion J.R., 1964). Выделяли три уровня гигиены: хороший, удовлетворительный и плохой. При хорошем уровне гигиены суммарное значение индекса ОHI-S варьировало в диапазоне 0,0-1,2 баллов, при удовлетворительном уровне – 1,3-3,0 баллов, плохом уровне - 3,1-6,0 баллов. При отдельной оценке количества зубного налета или зубного камня пользовались следующей шкалой: при хорошем уровне гигиены значения баллов находились в диапазоне 0,0-0,6, удовлетворительном - 0,7-1,8 баллов, плохом - 1,9-3,0 баллов.

Для оценки состояния десен и степени тяжести гингивита использовали *папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА)* в модификации Parma (1960). При отсутствии гингивита индекс РМА имеет величину 0. С усилением проявлений гингивита величина индекса повышалась. Выделяли три уровня степени тяжести гингивита: легкая степень (РМА 30% и менее), средняя – 31-60% и тяжелая – 61% и выше.

Пародонтальный индекс (PI) (Russel A.L., 1956) позволил оценить степень патологии пародонта. Выделяли три ранга: начальная и легкая степень воспалительных изменений пародонта (PI=0,1–1,0 баллов),

среднетяжелая степень (PI=1,5–4,0 баллов), тяжелая степень (PI=4,0–8,0 баллов).

Для подтверждения диагноза и оценки состояния альвеолярного отростка челюстей проводили цифровую ортопантограмму и компьютерную томограмму в отделении рентгенологии ГБУЗ «Республиканский стоматологический центр имени Т.Х.Тхазалиева» Минздрава КБР.

Ортопантограмма челюстей позволяла оценить величину и характер резорбции альвеолярной кости. При анализе ортопантограмм обращали внимание на форму, высоту и состояние межальвеолярных перегородок и кортикальной пластинки альвеолярного отростка, расширение периодонтальной щели, остеопороз межальвеолярных перегородок и костной ткани тела челюстей. Для оценки типов десневых карманов, их глубины, и распространенности, состояния костной ткани, окружающей зуб, в различных плоскостях, активности деструктивного процесса использовали компьютерную томографию.

Рентгеновское исследование осуществляли на универсальной рентгеновской системе Orthophos XG 5 («Sirona», Германия). Компьютерная томография выполнялась на спиральном компьютерном томографе HiSpeed DX/I (фирмы General Electric).

Забор содержимого пародонтальных карманов для определения содержания гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов методом иммуноферментного анализа

Пинцетом помещали бумажный эндодонтический штифт размером №25 в пародонтальный карман не менее, чем на 10 сек, максимально стараясь достичь дна кармана или самих глубоких отсеков. Сорбировали экссудат. Объем экссудата определяли по разнице весов бумажного штифта до и после сорбции экссудата.

Пропитанный экссудатом штифт помещали в 300 мкл фосфатно-солевого буфера (0,05% полисорбата 20 (Tween 20, Sigma-Aldrich, США)).

Инкубация штифта в буфере осуществлялась 20 минут с периодическим перемешиванием на орбитальном шейкере (240 об/мин). Температура была комнатной. Далее для извлечения сорбента проводили центрифугирование: число оборотов 13000 об/мин, время 5 минут, температура + 4°C.

Осторожно полученный после центрифугирования супернатант переливали в полипропиленовые пробирки. Пробирки хранили при температуре -80 °C. Допустимое время хранения до двух месяцев. Перед постановкой реакции пробирки доставали из холодильника и доводили до комнатной температуры 18–25°C, после содержимое пробирок разводили с кратностью 200 раз. С этой целью необходимо перенести 20 мкл супернатанта в 180 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с концентрацией 0,01 моль/л и pH = 7,0-7,2. (разведение 1:10). Далее перенести 20 мкл полученного раствора в 380 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (разведение 1:200).

Иммуноферментный анализ проводили на приборе Lisa ("Эрба Лахема с.р.о.", Чехия). В биологической жидкости последовательно определяли концентрацию HIF-1 α , ИЛ-6 и кателицидина LL37. В каждом случае использовали соответствующие тест-системы: ELISA Kit for Nuxoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 α) (Cloud-Clone Corp., США), набор реактивов для иммуноферментного анализа интерлейкина-6 человека (BENDER MEDSYSTEMS GMBH, Австрия), набор реагентов для количественного определения кателицидина LL-37 методом иммуноферментного анализа (Nucult Biotechnology (H.V.T.) B.V., Нидерланды).

Забор содержимого пародонтальных карманов для качественно-количественного определения пародонтогенных бактерий методом ПЦР в режиме реального времени.

Перед взятием образца для исследования пациенты не проводили индивидуальную гигиену полости рта и не полоскали ротовую полость антисептическими и антимикробными средствами, не принимали пищу. Забор содержимого пародонтальных карманов осуществляли утром, после

полоскания стерильным физиологическим раствором. Место около пародонтального кармана высушивали воздушной струей, карман изолировали от ротовой жидкости валиками. Бумажный эндодонтический штифт размером №25 помещали в пародонтальный карман на 10-20 сек. Бумажный эндодонтический штифт после сбора экссудата переносили в пробирку, где предварительно находился реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС», не требующий предварительной обработки. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС» представлял собой одновременно транспортную среду и реагент для выделения ДНК (Рисунок 4). Доставка в лабораторию биопробы проводилась в термоконтейнере в течение 12 часов после забора экссудата (Рисунок 5).



Рисунок 4. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС» для транспорта и выделения РНК в экссудате пародонтальных карманов



Рисунок 5. Этапы подготовки биопробы к определению бактерий методом ПЦР в режиме реального времени.

Штифт с биоматериалом находился в пробирке до момента выделения ДНК (до 6 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$). Далее штифт удаляли из пробирки. Экстрагирование ДНК длилось 20 минут и включало этапы: 1. Перемешивание содержимого пробирки с реактивом «ДНК-ЭКСПРЕСС» на вортексе – длительность 10 сек. 2. Нагрев пробирок в твердотельном термостате – время 20 мин, температура 98°C . 3. Отделение 50 мкл супернатанта с ДНК посредством центрифугирования – время 15-20 сек, обороты 12000 об/мин. Схема выделения ДНК из биопробы представлена на рисунке 6.

Полученный супернатант хранили при температуре -20°C в течение 6 мес.



Рисунок 6. Схема выделения ДНК из биопробы

Метод ПЦР осуществляли на амплификаторе CFX 96 (БиоРад, США) . Качественно-количественный анализ микробов проводили в супернатанте объемом 3 мкл. Критический уровень микроорганизмов в 1 мл исследуемого материала, составлял 10^5 .

*Метод ПЦР в режиме реального времени панелью «Дентоскрин»
для качественно-количественной оценки пародонтопатогенных
бактерий в экссудате ПК*

Панель «Дентоскрин» (ООО НПФ «Литех», Россия) использовалась для качественного и количественного определения соотношения облигатно-анаэробных бактерий *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*.

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали набор формата OneStep 12x8 Strip, представляющий собой полностью готовые к применению расфасованные в пробирки смеси.

В состав формата входили: пробирки с готовой смесью для ПЦР по слою масла (Рисунок 7); 2. Пробирки с фоновой смесью; 3. Готовый положительный контрольный образец; 4. Разбавитель.

Матрица ДНК

Масло

Тaq-полимераза

Реакционная смесь:

- ПЦР-буфер
- $MgCl_2$
- дНТФ
- праймеры

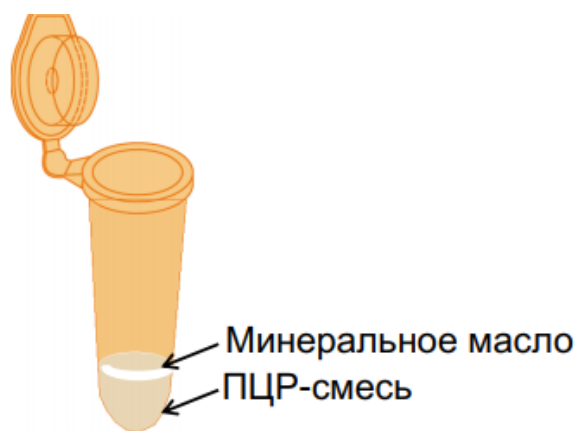


Рисунок 7. Готовая смесь реагентов для ПЦР под слоем масла.

В качестве матрицы ДНК выступала ДНК инфекционного агента, выделенная с помощью реагента «ДНК-экспресс». Отличительной особенностью формата OneStep являлось наличие готовой смеси для амплификации. Для детекции продуктов амплификации использовали флуоресцентные методы (Рисунок 8).

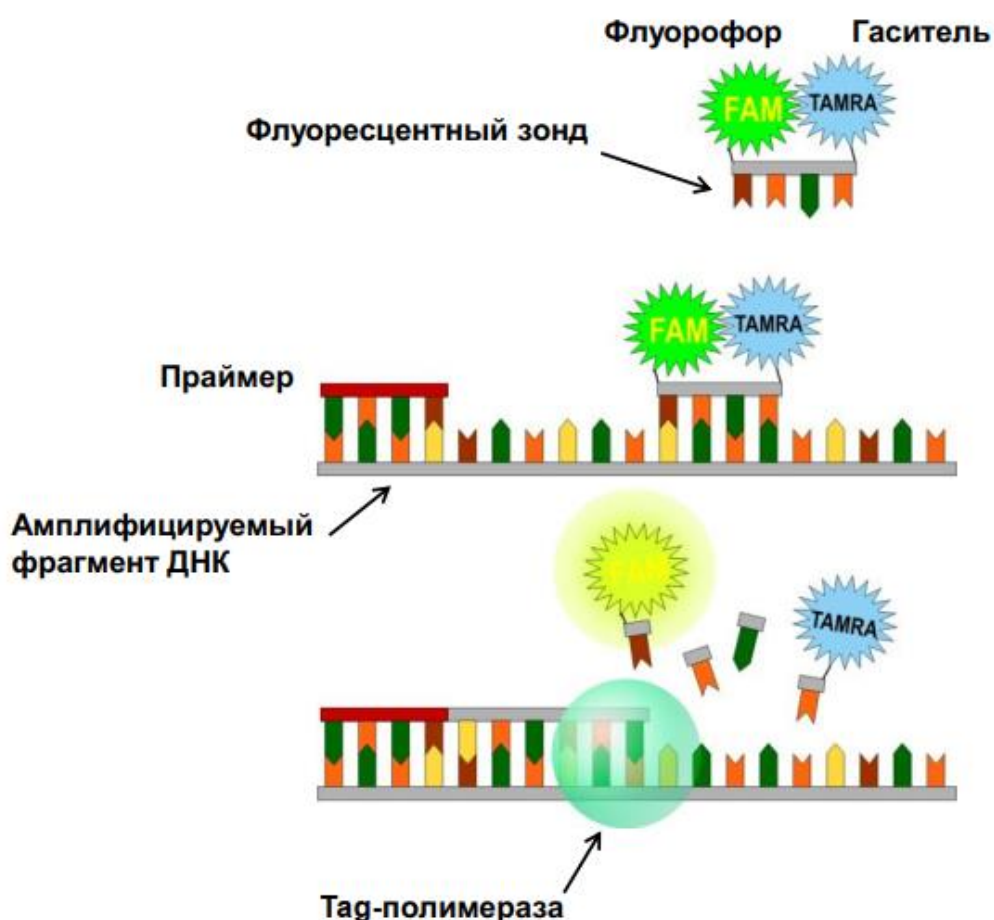


Рисунок 8. Механизм флуоресцентной детекции продуктов ПЦР.

В основе флуоресцентных методов лежало использование флуорохромов. Флуорохромы при поглощении энергии света способны к свечению. Использовали флуоресцентный зонд, меченный красителем FAM. Краситель TAMRA использовали как тушитель для красителя FAM. Для анализа результатов ПЦР в процессе амплификации использовали

специальный ДНК-амплификатор CFX (BioRad, США) с оптическим блоком, позволяющим детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе амплификации. Такая технология позволила минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов.

Качественный положительный результат заключался в превышении концентрации бактерии выше значений клинически значимого титра. Пороги значений концентрации клинически значимых титров пародонтогенных микроорганизмов для развития воспалительных заболеваний пародонта были следующими: для *Porphyromonas endodontalis* - 10^5 , *Porphyromonas gingivalis* - 10^5 , *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - 10^4 , *Treponema denticola* - 10^6 , *Prevotella intermedia* - 10^6 , *Fusobacterium nucleatum* - 10^6 , *Tannerella forsythia* - 10^6 .

Концентрацию изучаемых микроорганизмов в биоматериале определяли по формуле

$$K = \frac{1,7 * (Nst * E * (Cst - Ct))}{V}$$

где K - концентрация микроорганизмов, копий ДНК/мл;

Nst - стандартная начальная концентрация ДНК;

E – эффективность реакции ПЦР в режиме реального времени - число, показывающее, во сколько раз за один цикл изменится количество фрагментов ДНК

Cst - значение порогового цикла стандартного образца;

Ct - значение порогового цикла опытного образца;

V - объем исследуемой пробы, мл;

1,7 – коэффициент пересчета

Иммунологические методы

Иммуноферментный анализ (ИФА) заключается в постановке реакции связывания специфических антител с соответствующим антигеном. Антитела либо антиген конъюгирован с ферментом. При добавлении хромогенного субстрата образуется окрашенный продукт, раствор получает окраску. Концентрацию окрашенного продукта определяют спектрофотометрическим методом.

Для проведения ИФА в работе использовали следующие приборы: термошейкер ST3 (Латвия), фотометр Multilabel Counter 1420 Victor (Финляндия).

Определение уровня HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов

Для определения содержания HIF-1 α в экссудате пародонтального кармана иммуноферментным анализом использовали тест-систему ELISA Kit for Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha (HIF1 α) (Cloud-Clone Corp., США).

В лунки помещали 7 стандартных и 1 контрольный (пустой) образцы, а также подготовленные пробы содержимого пародонтальных карманов в объеме 100 мкл.

Специальной покровной пластиной накрывали сверху лунки. Далее при температуре 37°C на протяжении двух часов осуществляли инкубацию. Затем отбирали содержимое из лунок и при отсутствии промывки планшета приливали раствор антител в объеме 100 мкл. При температуре 37°C на протяжении одного часа осуществляли инкубацию. На следующем этапе планшет трехкратно промывали: по 350 мкл промывочного раствора в каждую лунку. Одновременно рамку встряхивали на шейкере 1-2 мин. Тщательно удаляли из лунок остатки жидкости. При этом рамку переворачивали и постукивали по фильтровальной бумаге. Вновь промывали лунки. Стартовое удаление жидкости проводили путем аспирации или декантации.

На следующем этапе в каждую лунку для идентификации реагента В добавляли рабочий раствор в объеме 100 мкл. При температуре 37°C на

протяжении 30 минут осуществляли инкубацию. Предварительно покрывали планшет пленкой. Далее в лунки приливали по 90 мкл свежеприготовленной субстратной смеси. При температуре 37°C в темноте на протяжении 15-25 мин осуществляли инкубацию. Раствор окрашивался в синий цвет. Промывку осуществляли 5 раз, аспирировали содержимое лунок. Останавливали реакцию 50 мкл стоп-раствора. Жидкость изменяла цвет на желтый.

На фотометре определяли оптическую плотность растворов из разных лунок при длине волны 450 нм.

По калибровочному графику для определения концентрации ИИФ-1 α (Рисунок 9), учитывая значения оптической плотности растворов, коэффициент разбавления, определяли концентрацию вещества у различных больных.

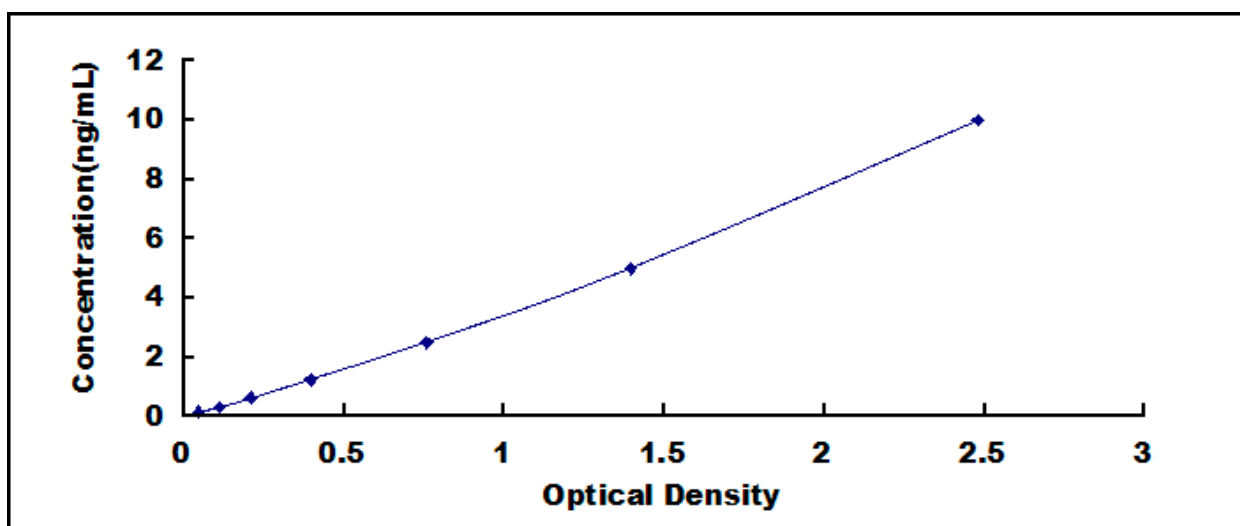


Рисунок 9. Калибровочный график для определения концентрации ИИФ-1 α .

Минимальная концентрация ИИФ-1 α , которую возможно определить в растворе, соответствовала 1 пг/мл.

Измерение уровня кателицидина LL-37 в содержимом пародонтальных карманов

Для постановки ИФА при оценке содержания кателицидина LL-37 использовали набор реактивов фирмы «Hycult Biotech human LL-37 ELISA» (Нидерланды). Единица измерения концентрации нг/мл.

В лунки планшета помещали 7 разведенных по инструкции стандартных растворов, 1 контрольный образец и по 100 мкл образцов экссудата пародонтальных карманов. Планшет покрывали пленкой и инкубировали 60 мин. при температуре 37°C. Далее удаляли жидкость из лунок, не промывая и помещали по 100 мкл рабочего раствора *Детектирующего реагента А*. Вновь заклеивали плёнкой для планшета и инкубировали 60 мин. при температуре 37°C. Вновь удаляли жидкость из лунок и промывали каждую лунку 350 мкл промывающего раствора при помощи пипетки или диспенсера. Оставляли на 1-2 минуты. Полностью удаляли оставшуюся жидкость из всех лунок вытряхиванием на фильтровальную бумагу. Повторяли процедуру 3 раза. После последней промывки удаляли остатки жидкости аспирацией или вытряхиванием. Переворачивали планшет на фильтровальную бумагу.

На следующем этапе добавляли по 100 мкл рабочего раствора *Детектирующего реагента В* в каждую лунку. Заклеивали плёнкой для планшета и инкубировали 30 минут при температуре 37 С. 6. Повторяли промывание лунок по вышеописанному плану пятикратно.

Добавляли 90 мкл ТМБ в каждую лунку, инкубировали 10-20 минут, закрыв пленкой, при температуре 37°C. Жидкость приобретала голубой цвет.

Добавляли 50 мкл Стоп-реагента в каждую лунку. Жидкость желтела. Перемешивали жидкость постукиванием по боковой части планшета. Помещали планшет в ридер и сделайте измерение на длине волны 450 нм.

Концентрацию кателицидина LL37 в биопробах рассчитывали в соответствии со стандартной (калибровочной) кривой (Рисунок 10).

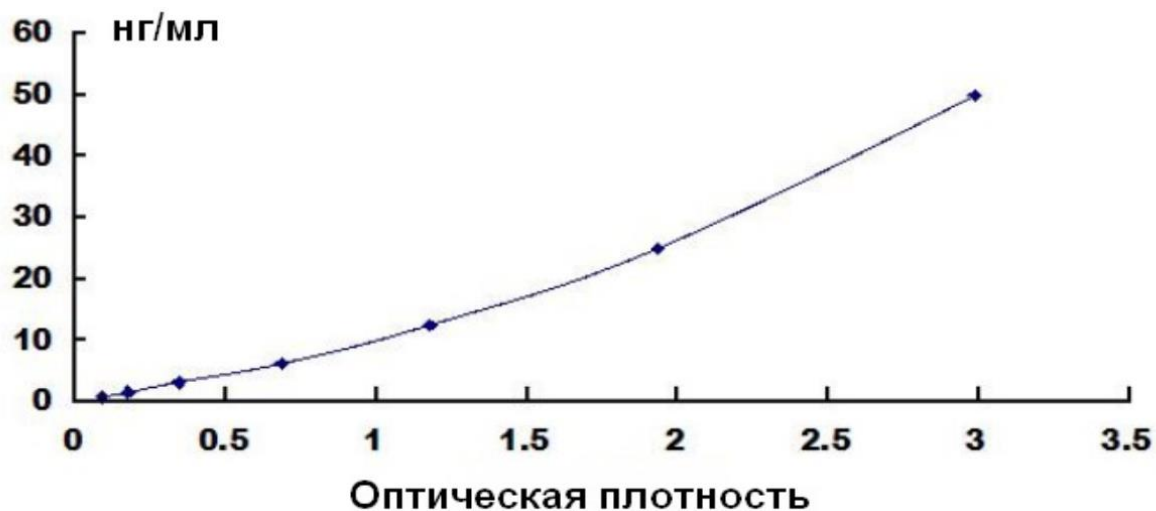


Рисунок 10. Калибровочный график для определения концентрации кателицидина- LL37.

Диапазон определения кателицидина- LL37 – 0,78-50 нг/мл.
Минимальная определяемая концентрация 0,27 нг/мл.

Определение уровня интерлейкина-6 в содержимом пародонтальных карманов

Для постановки ИФА при оценке содержания ИЛ-6 использовали набор реактивов фирмы «ИЛ-6-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», г.Новосибирск).

При проведении методики в лунки планшета вносили по 0,1 мл буферного раствора А. В семь лунок добавляли стандартные образцы из набора и образцы десневой жидкости пациентов. При температуре 37°C на протяжении двух часов осуществляли инкубацию со встряхиванием. Промывку лунок осуществляли трехкратно путем добавления по 0,25 мл промывочного буфера. Стартовое удаление содержимого проводили декантированием.

Далее во все лунки добавляли по 0,1 мл раствора антител. При температуре 37°C на протяжении одного часа осуществляли инкубацию со встряхиванием.

Добавляли по 0,1 мл раствора конъюгата Е. При температуре 37°C на протяжении 30 минут осуществляли инкубацию со встряхиванием. Затем лунки промывали.

За 5 минут до окончания инкубации готовили субстратную смесь (буфер С, раствор ТМБ (тетраметилбензидина)), которую вносили в каждую лунку по 0,1 мл и инкубировали в темноте 15-20 минут.

Ферментативную реакцию останавливали путем добавления по 0,05 мл “Стоп-реагента”, встряхивали на шейкере 5 минут.

Концентрацию ИЛ-6 в биопробах рассчитывали в соответствии со стандартной (калибровочной) кривой (Рисунок 11).

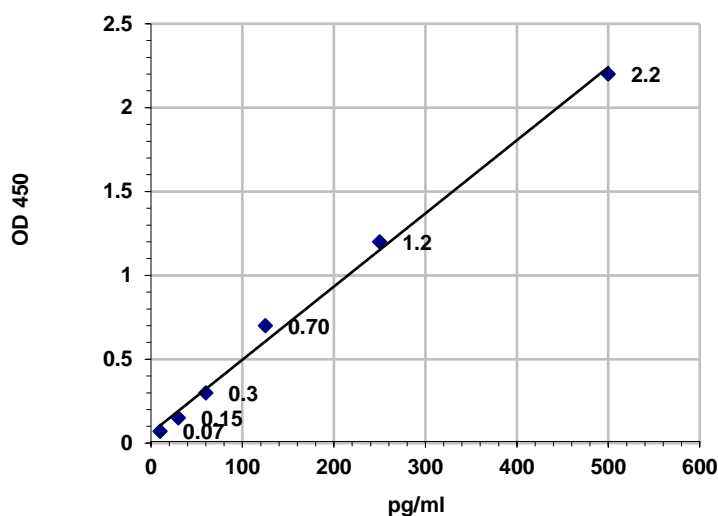


Рисунок 11. Калибровочный график для определения концентрации интерлейкина-6.

Минимальная концентрация ИЛ-6, которую возможно определить в растворе, соответствовала 5 пг/мл.

2.3. Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ результатов был выполнен с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). Тест на нормальность распределения был выполнен с помощью критерия Шапиро-Уилка. Большинство выборочных данных не соответствовали нормальному распределению, что явилось основанием для использования непараметрических критериев. Парное сравнение между группами проводили с помощью критерия Манна-Уитни, при оценке различия показателей до и после лечения с помощью критерия Вилкоксона. Тесноту корреляционной связи оценивали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена. Все тесты были выполнены при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

СОСТОЯНИЕ ГИПОКСИЯ-ЗАВИСИМЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ И В ПРОЦЕССЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ С КОРРЕКЦИЕЙ ЭНЕРГООБМЕНА ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА

3.1. Пародонтологический статус пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и состояние гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов в зависимости от степени тяжести заболевания

Индекс гигиены ротовой полости у пациентов клинической группы оценивали по методу Грин-Вермиллиона. В общем у пациентов с ХГП индекс гигиены составил $2,45 \pm 0,06$ баллов с колебанием показателя около медианы в 50% наблюдений от 2 до 2,95 баллов (Таблица 4), что соответствует удовлетворительному состоянию гигиенического статуса полости рта.

Таблица 4

Параметры гигиенического статуса полости рта у пациентов общей клинической группы и здоровых лиц

Группа	ИГ, баллы		
	$M \pm m$	Me	[25-75]
Здоровые	$0,80 \pm 0,03$	0,83	[0,6-0,9]
ХГП в общем по группе	$2,45 \pm 0,06$	2,4	[2,0-2,95]
p	<0,001		

У пациентов с ХГП средней степени тяжести индекс гигиены был выше ($2,8 \pm 0,06$ баллов) в отличие от ХГП легкой степени ($2,0 \pm 0,04$ баллов) (Таблица 5). Однако, по качественной характеристике у пациентов общей клинической группы независимо от тяжести заболевания гигиенический статус ротовой полости соответствовал удовлетворительному.

Таблица 5

Параметры гигиенического статуса полости рта у пациентов ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	ИГ, баллы		
	M±m	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	2,0±0,04	2,0	[1,9-2,2]
ХГП средней степени	2,8±0,06	2,9	[2,6-3,1]
p	<0,001		

Сравнительный анализ ИГ между подгруппами пациентов и здоровыми лицами с оценкой статистической значимости различия, иллюстрированный на рисунке 12, показал, что индекс гигиены у пациентов с ХГП легкой степени (2,0±0,04 против 0,80±0,03 баллов) и средней степени (2,8±0,06 против 0,80±0,03 баллов) был статистически значимо выше ($p < 0,001$), соответственно, в 2,5 и 3,5 раза.

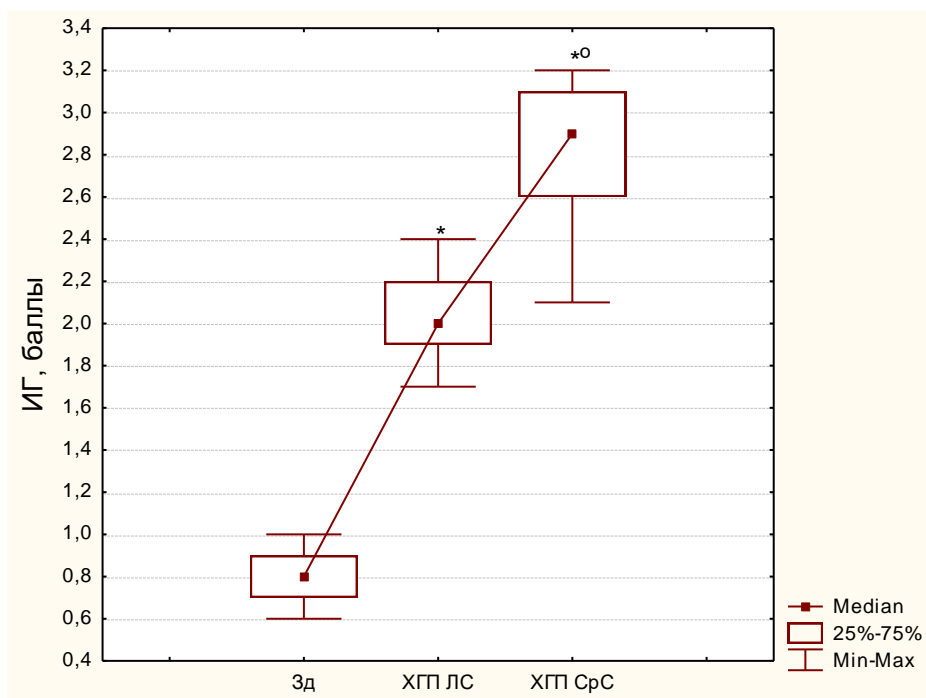


Рисунок 12. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха индекса гигиены у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС) и у здоровых (Зд). * - статистически значимые различия по сравнению со

здоровыми лицами, о – по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

Индекс РМА у пациентов общей клинической группы имел среднюю величину $42,6 \pm 1,58\%$, межквартильный диапазон около медианы составил от 22 до 50% (Таблица 6), что соответствовало средней степени интенсивности гингивита.

Таблица 6

Оценка состояния десен у пациентов общей клинической группы и здоровых лиц

Группа	РМА, %		
	$M \pm m$	Me	[25-75]
Здоровые	$1,7 \pm 0,44$	1,0	[0-3]
ХГП в общем по группе	$42,6 \pm 1,58$	44	[22-50]
p	<0,001		

У пациентов при ХГП средней степени тяжести индекс РМА ($50,6 \pm 0,85\%$) был выше в отличие от легкой степени заболевания ($32,9 \pm 2,19\%$) за счет сдвига колебаний показателя к более высоким значениям и большей выраженности воспалительных изменений десен (Таблица 7).

Таблица 7

Оценка состояния десен у пациентов ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	РМА, %		
	$M \pm m$	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	$32,9 \pm 2,19$	29	24-45
ХГП средней степени	$50,6 \pm 0,85$	50	47-55
p	<0,001		

Показатели РМА у пациентов при ХГП средней степени были статистически значимо выше ($p < 0,001$) по сравнению с больными с легкой степенью заболевания и здоровыми лицами (Рисунок 13).

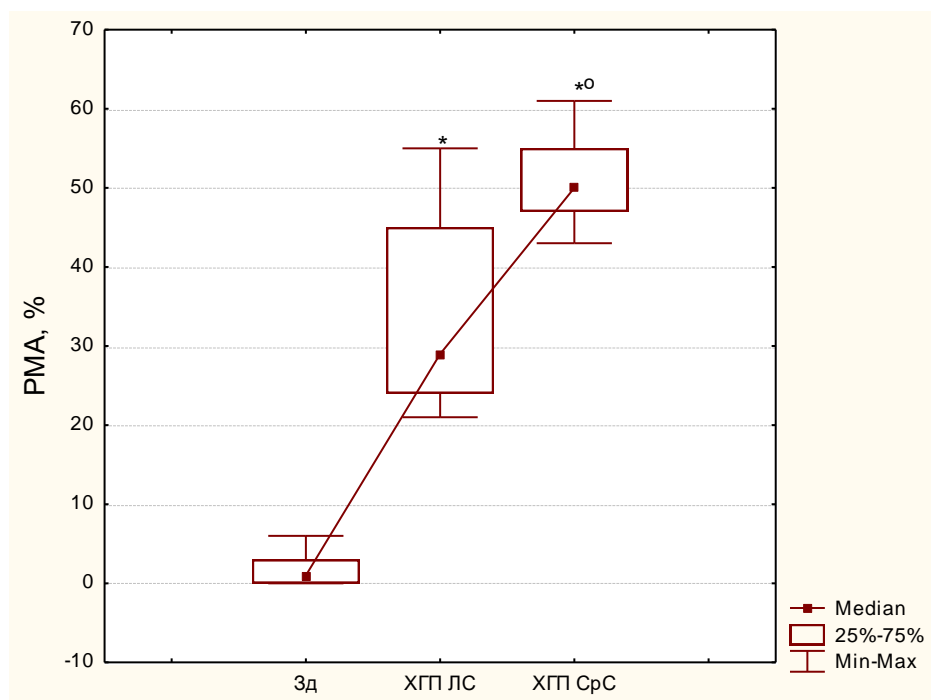


Рисунок 13. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха индекс РМА у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС) и у здоровых (Зд). * - статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами, o – по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

Глубина пародонтальных карманов у пациентов с ХГП соответствовала тяжести воспалительных изменений пародонта в целом по группе ($4,08 \pm 0,18$ мм) (Таблица 8) и при легкой ($2,85 \pm 0,17$ мм) и средней ($4,97 \pm 0,14$ мм) степени тяжести заболевания (Таблица 9).

Таблица 8

Глубина пародонтальных карманов у пациентов общей клинической группы и глубины зубо-десневого желобка у здоровых лиц

Группа	Глубина ПК, мм		
	$M \pm m$	Me	[25-75]
Здоровые	$0,27 \pm 0,12$	0	[0-1]
ХГП в общем по группе	$4,08 \pm 0,18$	4	[3-5]
p	<0,001		

Различия глубины ПК у пациентов подгрупп и с глубиной зубо-десневого желобка у здоровых лиц были статистически значимыми ($p < 0,001$) (Рисунок 14).

Таблица 9

Глубина пародонтальных карманов у пациентов ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	Глубина ПК, мм		
	M±m	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	2,85±0,17	3,0	2-4
ХГП средней степени	4,97±0,14	4,98	4-5
p	<0,001		

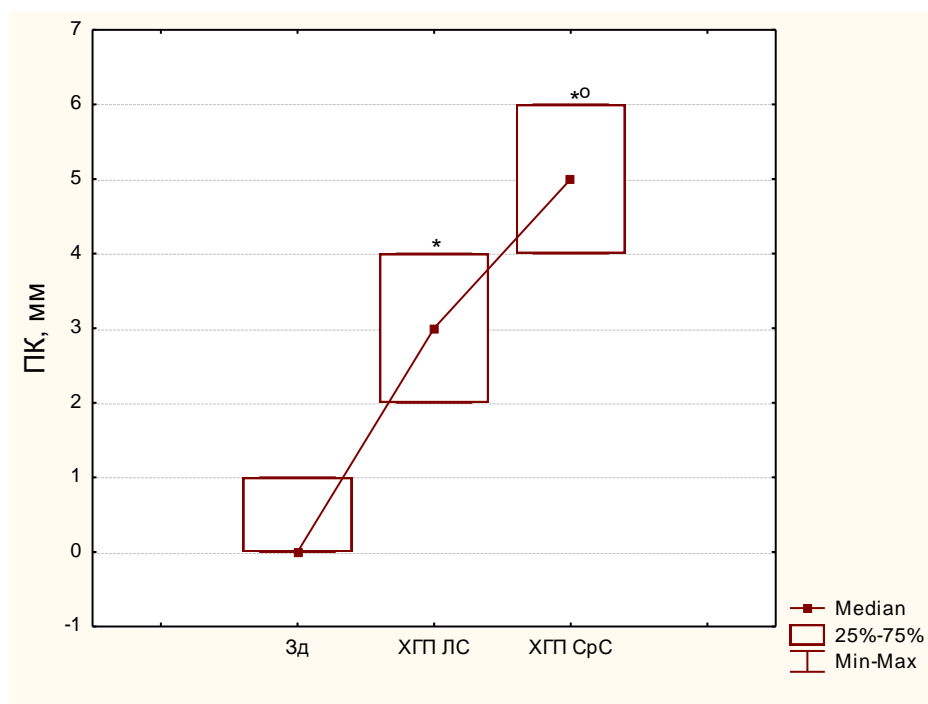


Рисунок 14. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха глубины ПК у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС). * - статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами (Зд), o - по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

Интегративный пародонтальный индекс Рассела в общем по группе составил $2,02 \pm 0,12$ баллов (Таблица 10), что соответствовало средней

степени выраженности воспалительных изменений пародонта. У пациентов с ХГП легкой степени пародонтальный индекс имел величину $1,12 \pm 0,05$ баллов, а при ХГП средней степени - $2,75 \pm 0,11$ баллов (Таблица 11), что соответствовало легкой и средней степени выраженности патологии пародонта.

Таблица 10

Параметры пародонтологического статуса полости рта у пациентов общей клинической группы и здоровых лиц

Группа	PI, баллы		
	M±m	Me	[25-75]
Здоровые	$0,06 \pm 0,03$	0	[0-0,1]
ХГП в общем по группе	$2,02 \pm 0,12$	1,75	[1,1 - 3]
p	<0,001		

Таблица 11

Параметры пародонтологического статуса полости рта у пациентов ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	PI, баллы		
	M±m	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	$1,12 \pm 0,05$	1,0	0,9-1,4
ХГП средней степени	$2,75 \pm 0,11$	3,0	2,3-3,3
p	<0,001		

Индекс Рассела у пациентов клинических подгрупп был статистически значимо выше ($p < 0,001$) по сравнению со здоровыми лицами (Рисунок 15).

Таким образом, в общем, по клинической группе у пациентов были установлены удовлетворительный уровень гигиенического статуса полости рта, средняя степень интенсивности гингивита, пародонтальные карманы со средней величиной глубины $4,08 \pm 0,18$ мм и медианой 4 мм, средней степенью выраженности воспалительных изменений пародонта по индексу

Рассела. Учет тяжести ХГП выявил повышение пародонтальных индексов при средней степени тяжести по сравнению с легкой степенью заболевания.

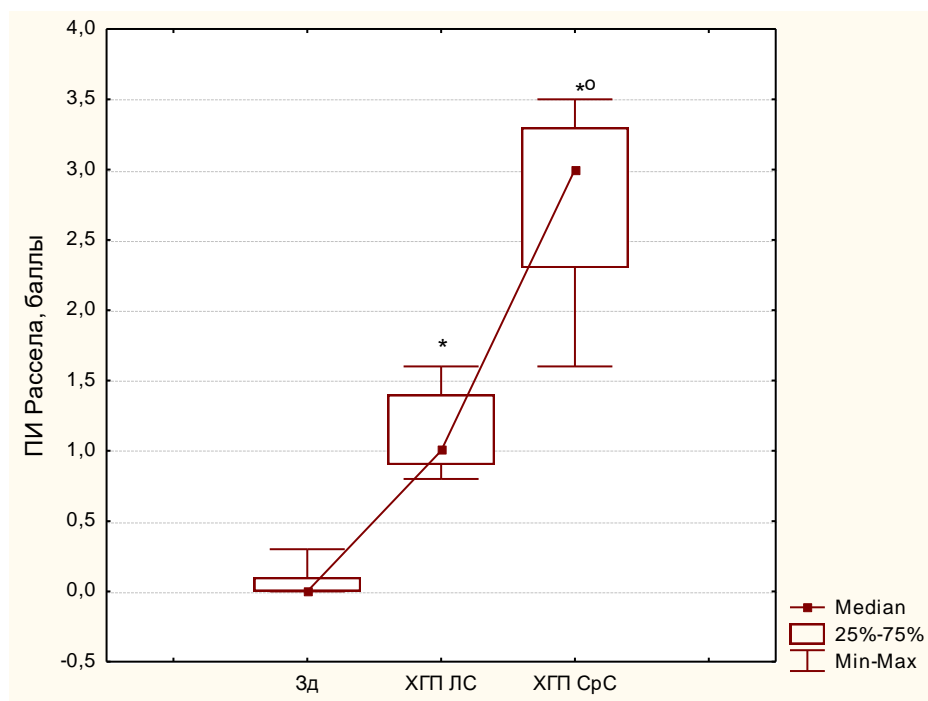


Рисунок 15. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха пародонтального индекса у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС) и у здоровых лиц (Зд). * - статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами, o – по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

Энергетический гомеостаз в присутствии кислорода является основой для жизнедеятельности клеток. Такие патофизиологические процессы как гипоксия и воспаление часто сопряжены и моделируют интенсивность друг друга [52, 76]. Гипоксия имеет патогенетическое значение для развития хронических воспалительных изменений в тканях пародонта. Грамотрицательные анаэробные бактерии, размножаясь в пародонтальных карманах, способствуют снижению тканевого напряжения кислорода у основания карманов [177]. При воспалительной инфильтрации пародонта иммунокомпетентными клетками и активации резидентных Т-лимфоцитов наблюдается повышенное потребление кислорода [110]. При этом, повреждение эндотелия микрососудов и отек ткани при воспалении

пародонта приводят к нарушению микроциркуляции и снижению кислородного обеспечения ткани [20]. Низкий уровень кислорода в тканях пародонта может быть мощным иммуномодулирующим сигналом. Так, в условиях гипоксии клетки периодонтальных связок у человека экспрессируют провоспалительные цитокины - интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, простагландин E2, рецептор-активатор ядерного фактора-каппа В (RANKL) и остеопротегерин [138, 195], которые тесно связаны с разрушением тканей пародонта [16, 85].

При гипоксии в ткани происходит накопление и активация HIF-1 α [52]. Наличие усиленной экспрессии белка HIF-1 α в биоптатах десневой ткани у пациентов с ХГП установлено в современных исследованиях [143, 175]. Эти данные указывают на возможную роль гипоксия-зависимых механизмов в регуляции иммунных реакций в ответ на бактериальное воспаление тканей пародонта.

У здоровых доноров в содержимом зубо-десневого желобка концентрация HIF-1 α была в среднем $81,2 \pm 1,20$ пг/мкл с колебанием от 74 до 91 пг/мкл. Межквартильный диапазон составил от 77,6 до 84,3 пг/мкл (Таблица 12).

Таблица 12

Концентрация HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП в общей клинической группе и в десневой жидкости у здоровых лиц

Группа	HIF-1 α , пг/мкл		
	M \pm m	Me	[25-75]
Здоровые	$81,2 \pm 1,20$	81,1	[77,6-84,3]
ХГП в общем по группе	$196,4 \pm 13,87$	176,4	[92,5-302,6]
p	<0,001		

У больных с ХГП легкой и средней степенью тяжести в общем по группе концентрация HIF-1 α была в среднем $196,4 \pm 13,87$ пг/мкл с

колебанием от 76 до 378 пг/мкл, медианой 176,4 пг/мкл и межквартильным диапазоном 92,5-302,6 пг/мкл. По сравнению со здоровыми донорами содержание HIF-1 α в пародонтальных карманах было выше в 2,4 раза ($p < 0,001$).

Концентрация HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП зависела от тяжести заболевания: при ХГП легкой степени составляла $89,9 \pm 1,69$ пг/мкл, а при ХГП средней степени была выше в 3,15 раз ($p < 0,001$) и соответствовала $283,6 \pm 10,75$ пг/мкл (Таблица 13).

Таблица 13

Концентрация HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	HIF-1 α , пг/мкл		
	M \pm m	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	$89,9 \pm 1,69$	90,4	[83,2-97,6]
ХГП средней степени	$283,6 \pm 10,75$	301,2	[264,7-324,1]
p	<0,001		

Концентрация HIF-1 α в десневой жидкости у здоровых лиц и у пациентов с ХГП легкой степени тяжести статистически значимо не различалась, а у больных с ХГП средней степени тяжести была выше в содержимом пародонтальных карманов в 3,5 раза ($p < 0,001$) (Рисунок 16). Следовательно, накопление гипоксия-зависимого фактора контроля транскрипционных процессов в клетках в пародонтальных карманах при ХГП имело место только при средней степени тяжести заболевания в отличие от легкой степени заболевания, то есть при формировании костной деструкции крестальной кости.

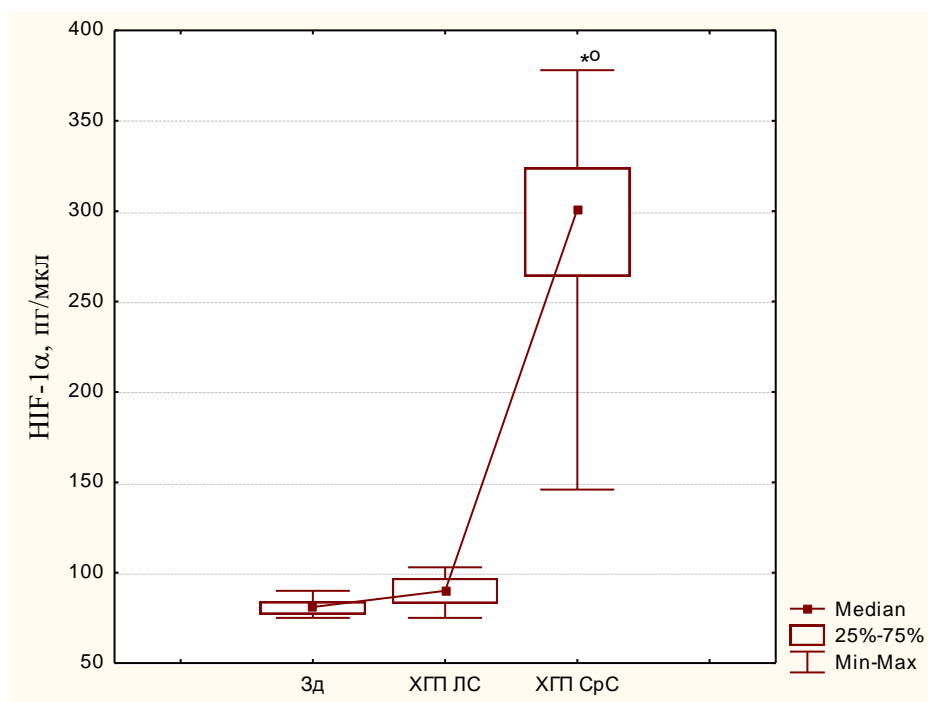


Рисунок 16. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха концентрации ИЛ-1 α у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС) и у здоровых лиц (Зд). * - статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами, o – по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

При ХГП накопление интерлейкинов в биологических жидкостях полости рта после контакта пародонтопатогенных микроорганизмов с Толл-рецепторами слизистой оболочки является неотъемлемым патогенетическим звеном. Активация рецепторов приводит к синтезу целого каскада цитокинов, в том числе ИЛ-6, которые прямо или опосредованно активируют остеокластическую резорбцию [187].

У пациентов с ХГП в общей клинической группе концентрация ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов ($29,1 \pm 0,05$ пг/мл) в 12,6 раз ($p < 0,001$) превышала уровень цитокина в десневой жидкости у здоровых лиц ($2,3 \pm 0,54$ пг/мл) (Таблица 14). Уровень ИЛ-6 в экссудате пародонтальных карманов у пациентов при ХГП легкой степени составлял $26,3 \pm 0,57$ пг/мл, а при ХГП средней степени тяжести $31,4 \pm 0,65$ пг/мл (Таблица 15). Концентрация ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП при повышении

Таблица 14

Концентрация ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП в общей клинической группе и в десневой жидкости у здоровых лиц

Группа	ИЛ-6, пг/мл		
	M±m	Me	[25-75]
Здоровые	2,3±0,54	2,3	[2,1-2,4]
ХГП в общем по группе	29,1±0,05	29,15	[25,5-32,9]
p	<0,001		

Таблица 15

Концентрация ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	ИЛ-6, пг/мл		
	M±m	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	26,3±0,57	25,7	[23,7-29]
ХГП средней степени	31,4±0,65	31,2	[29-34,6]
p	<0,001		

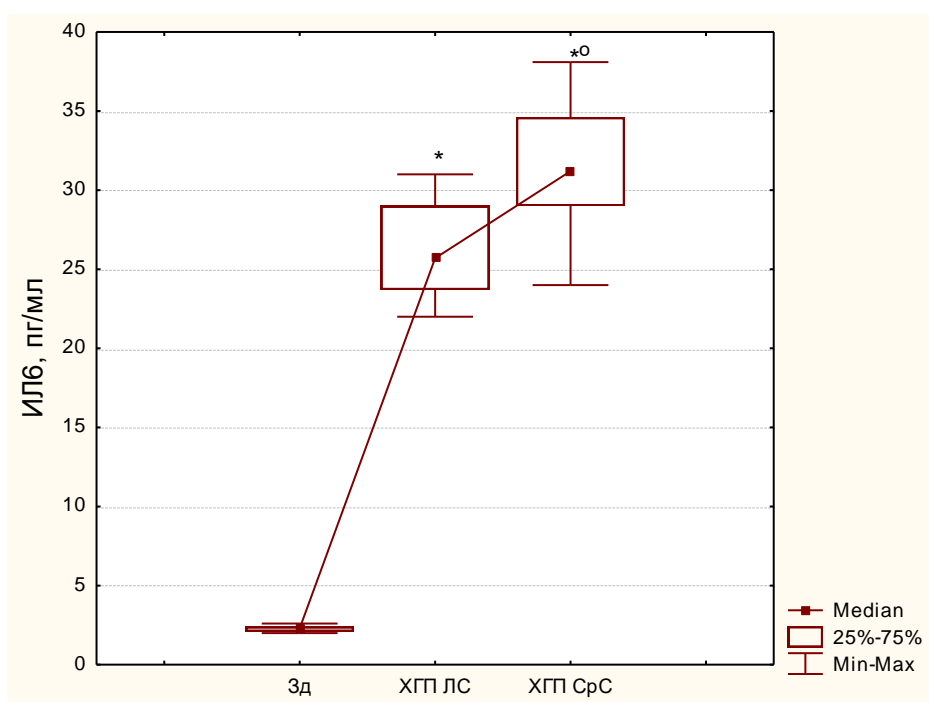


Рисунок 17. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха концентрации ИЛ-6 у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС) и у здоровых лиц (Зд). * - статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами, o – по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

тяжести заболевания от легкой к средней хотя и повышалась ($p < 0,001$), но в двух подгруппах значительно, в 11,4 и 13,6 раз превышала уровень ИЛ-6 в десневой жидкости здоровых лиц (Рисунок 17). Следовательно, повышение провоспалительного цитокина ИЛ-6 при ХГП уже при легкой степени воспалительных изменений пародонта было выраженным.

Концентрация кателицидина LL37 повышается при воспалительных изменениях в тканях [95]. Данный антимикробный пептид выступает как аттрактант для моноцитов, нейтрофилов и Т-лимфоцитов, способствуя активации Т-клеточного иммунитета [148]. Его врожденные антимикробные свойства обусловлены прямым электростатическим взаимодействием с бактериями с образованием сквозных дыр в мембране-мишени [120]. Однако, в высоких концентрациях кателицидин LL37 может оказать токсическое повреждающее воздействие и на нормальные клетки тканей [21]. Существует гипоксия-зависимый контроль секреции кателицидина LL37. Генетическая делеция, при которой происходит снижение экспрессии гена *HIF1A*, сопровождается снижением синтеза кателицидина LL37 [152].

У пациентов с ХГП в общей клинической группе концентрация кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов ($20,6 \pm 1,08$ пг/мл) в 2,9 раз ($p < 0,001$) превышала уровень антимикробного пептида в десневой жидкости у здоровых лиц ($7,2 \pm 0,07$ пг/мл) (Таблица 16).

Таблица 16

Концентрация кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП в общей клинической группе и в десневой жидкости у здоровых лиц

Группа	Кателицидин LL37, пг/мл		
	M±m	Me	[25-75]
Здоровые	7,2±0,07	7,3	[7-7,5]
ХГП в общем по группе	20,6±1,08	23,7	[11,5-28,4]
p	<0,001		

Уровень кателицидина LL37 в экссудате пародонтальных карманов у пациентов при ХГП легкой степени составлял $12,0 \pm 0,5$ пг/мл, а при ХГП средней степени тяжести был в 2,3 раза выше ($27,7 \pm 0,49$ пг/мл) (Таблица 17).

Таблица 17

Концентрация кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП в зависимости от тяжести заболевания

Группа	Кателицидин LL37, пг/мл		
	M±m	Me	[25-75]
ХГП легкой степени	$12,0 \pm 0,5$	11,3	[10,1-14,8]
ХГП средней степени	$27,7 \pm 0,49$	28,5	[24,8-29,8]
p	<0,001		

На рисунке 18 иллюстрировано выраженное повышение кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов при средней степени тяжести ХГП.

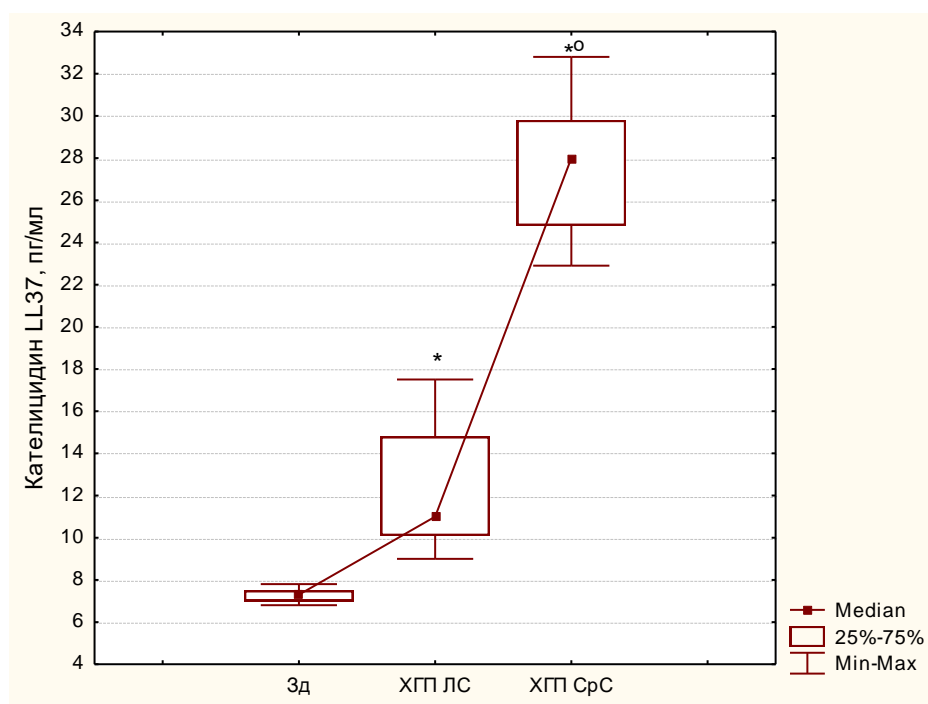


Рисунок 18. Показатели медианы, межквартильного диапазона и размаха концентрации кателицидина LL37 у пациентов с ХГП легкой (ЛС) и средней тяжести (СрС) и у здоровых лиц (Зд). * - статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами, o – по сравнению с пациентами с ХГП легкой степени при $p < 0,05$.

Таким образом, у пациентов с ХГП по сравнению со здоровыми лицами, а также при повышении степени тяжести ХГП от легкой к средней установлено сочетанное повышение в содержимом пародонтальных карманов HIF-1 α , антимикробного пептида кателицидина LL37, интерлейкина-6.

Для характеристики взаимосвязи между иммунорегуляторными и кислород-зависимыми защитными реакциями при ХГП был проведен корреляционный анализ. В результате была выявлена очень тесная взаимосвязь между концентрацией HIF-1 α и антимикробного пептида кателицидина LL37 ($R=0,88$; $p<0,001$), тесная связь между антимикробным защитным фактором и провоспалительным цитокином ИЛ-6 ($R=0,70$; $p<0,001$) и умеренная связь между концентрацией HIF-1 α и провоспалительным медиатором ИЛ-6 ($R=0,56$; $p<0,001$) (Таблица 18).

Таблица 18

Результаты корреляционного анализа между иммунорегуляторными и кислород-зависимыми факторами в содержимом пародонтальных карманов при ХГП

Биомаркеры	HIF-1 α	ИЛ-6
ИЛ-6	$R=0,56$; $p<0,001$	
Кателицидин LL37	$R=0,88$; $p<0,001$	$R=0,70$; $p<0,001$

На рисунках 19-21 графически иллюстрирована взаимосвязь между изменениями концентрации HIF-1 α и кателицидина LL37, ИЛ-6 и кателицидина LL37, HIF-1 α и ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов при ХГП с помощью корреляционного поля точек и линии регрессии. Наиболее тесные взаимосвязи установлены между изменениями концентрации HIF-1 α и кателицидина LL37, поскольку линия регрессия отличалась высоким градиентом, корреляционное поле точек занимало малую площадь (Рисунок 19).

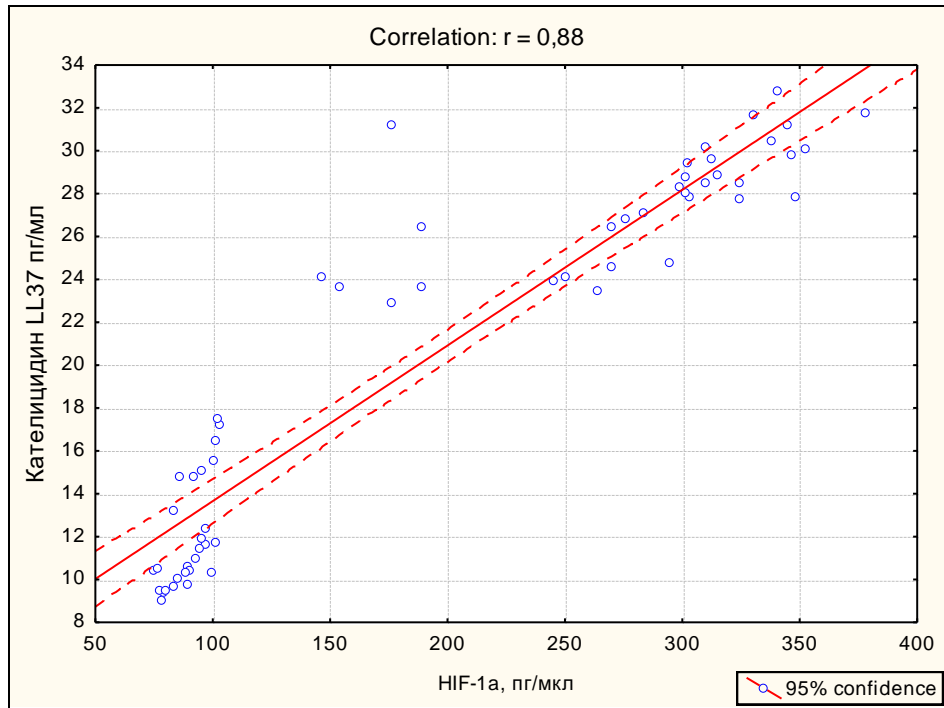


Рисунок 19. Корреляционное поле точек и линия регрессии связи между изменениями HIF-1 α и кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов при ХГП. Пунктиром указан доверительный интервал.

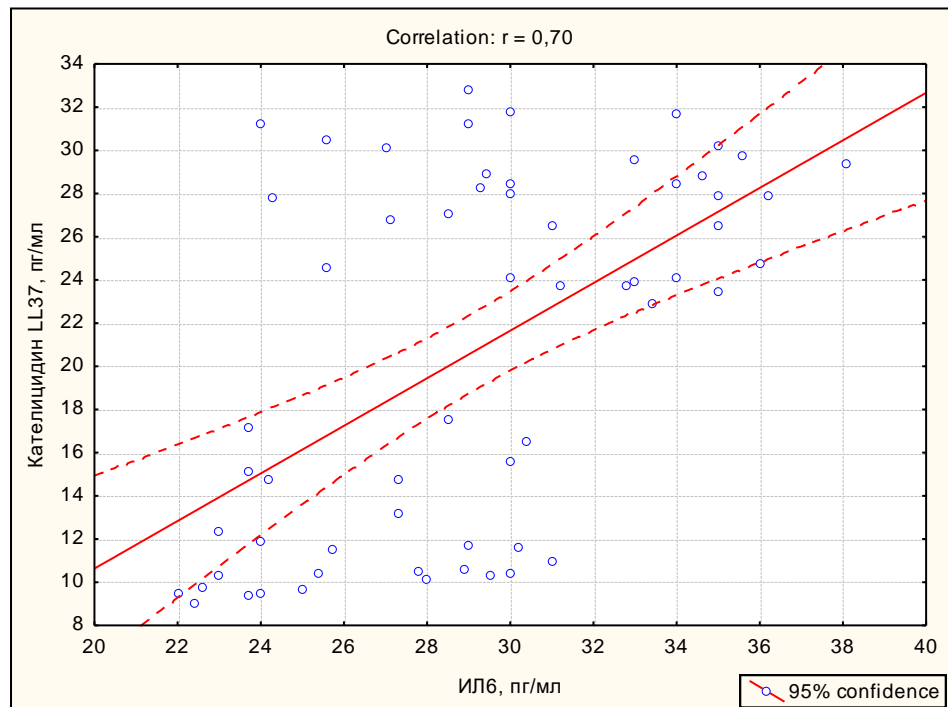


Рисунок 20. Корреляционное поле точек и линия регрессии связи между изменениями ИЛ-6 и кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов при ХГП. Пунктиром указан доверительный интервал.

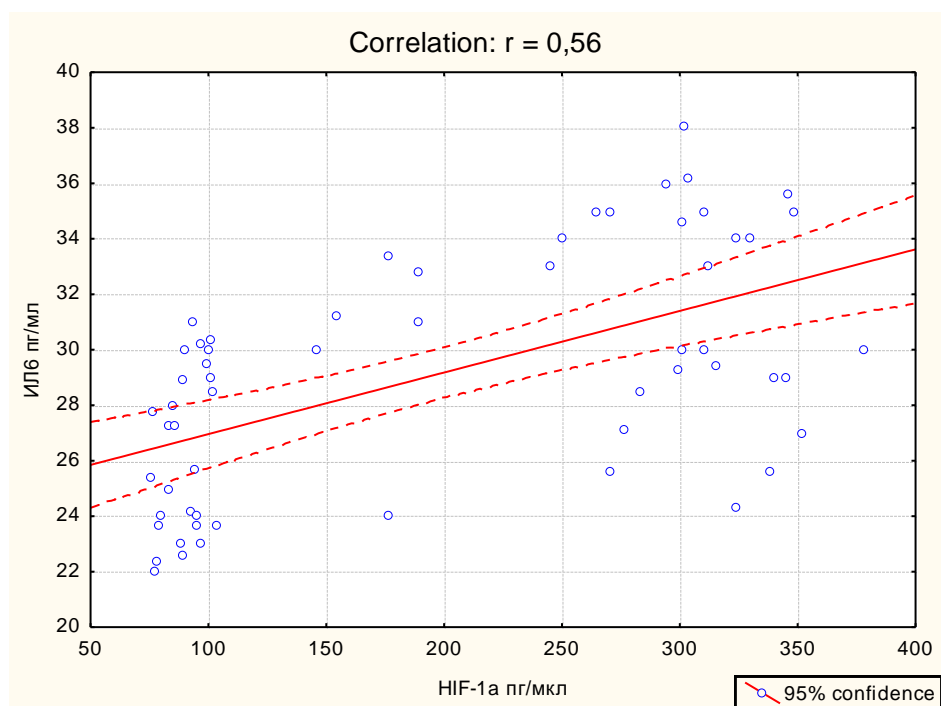


Рисунок 21. Корреляционное поле точек и линия регрессии связи между изменениями HIF-1 α и ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов при ХГП. Пунктиром указан доверительный интервал.

Следовательно, HIF-1 α в большей степени контролирует синтез антимикробного пептида кателицидина LL37, способствуя его накоплению. Как известно, лейкоциты в тканевых локусах воспаления для обезвреживания фагоцитируемых микробов одновременно используют кислородзависимые и кислороднезависимые антимикробные механизмы. При этом участие HIF-1 α заключается в усилении транскрипции генов антимикробных полипептидов [198]. Меньшее по выраженности, но весомое влияние HIF-1 α оказывает на синтез провоспалительного медиатора ИЛ-6. ИЛ-6 при воспалительных изменениях пародонта контролирует каскад деструктивных событий в тканях пародонта. Эти события включают усиленный синтез воспалительных ферментов и медиаторов (матриксные металлопротеиназы и простагландины) в тканях, активацию остеокластов, а также дифференцировку через рецепторный активатор ядерного фактора RANKL путей необратимого повреждения мягких и твердых тканей пародонта при ХГП. Гипоксия стимулирует индуцированные липополисахаридами микробов реакции

синтеза ФНО- α , интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 через Толл-рецепторы [87, 160]. Таким образом, установленная в работе взаимосвязь между факторами HIF-1 α , кателицидин LL37 и ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов имеет патофизиологическое объяснение.

На следующем этапе была изучена связь между биомаркерами и клиническими пародонтальными индексами у пациентов с ХГП (Таблица 19).

Таблица 19

Результаты корреляционного анализа между иммунорегуляторными и кислород-зависимыми факторами в содержимом пародонтальных карманов при ХГП

Биомаркеры	ИГ	РМА	Глубина ПК	ПИ
HIF-1 α	R=0,76; p<0,001	R=0,72; p<0,001	R=0,76; p<0,001	R=0,93; p<0,001
ИЛ-6	R=0,87; p<0,001	R=0,78; p<0,001	R=0,71; p<0,001	R=0,59; p<0,001
Кателицидин LL37	R=0,77; p<0,001	R=0,73; p<0,001	R=0,84; p<0,001	R=0,92; p<0,001

Концентрация HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов при ХГП в большей мере была связана с необратимым пародонтальным индексом Рассела (R=0,93; p<0,001), интегративно характеризующим деструкцию тканей пародонта, ИЛ-6 – с индексом гигиены (R=0,87; p<0,001) и выраженностью гингивита (R=0,78; p<0,001), а кателицидин LL37 – с глубиной ПК (R=0,84; p<0,001) и пародонтальным индексом (R=0,92; p<0,001).

3.2. Исходная концентрация гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов во взаимосвязи с характеристиками микробиоценоза в содержимом пародонтальных карманов в клинических подгруппах при хроническом генерализованном пародонтите до лечения

Исходно до лечения у пациентов двух групп проводили оценку клинических пародонтальных индексов. Их величины не различались у больных двух групп ($p > 0,05$) (Таблица 20).

Таблица 20

Величина пародонтальных индексов у пациентов 1 и 2 групп до лечения

Показатель	1 группа, n=30	2 группа, n=30	P
ИГ по ОНІ-S	2,42±0,08	2,49±0,10	>0,05
РМА, %	41,0±2,24	44,3±2,22	>0,05
Глубина ПК, мм	4,1±0,26	4,06±0,25	>0,05
PI	1,97±0,17	2,07±0,19	>0,05

Примечание: доверительная вероятность p определена с помощью критерия Манна-Уитни.

Концентрация гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп до лечения отражена в таблице 21.

Таблица 21

Концентрация гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп до лечения

Показатель	1 группа, n=30	2 группа, n=30	P
ИИF-1 α , пг/мкл	189,3±19,2	203,6±20,3	>0,05
ИЛ-6, пг/мл	28,8±0,80	29,4±0,75	>0,05
Кателицидин LL37, пг/мл	20,2±1,44	21,1±1,62	>0,05

Примечание: доверительная вероятность p определена с помощью критерия Манна-Уитни.

Межгрупповых различий концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-6 и кателицидина LL37 в экссудате установлено не было ($p>0,05$).

Все изучаемые пародонтопатогенные бактерии, включенные в панель «Дентоскрин», с высокой частотой выявлялись в 1 и 2 группах (Таблица 22). Межгрупповых различий частоты выявления бактерий не наблюдалось. Частота качественного обнаружения *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* была несколько выше других возбудителей в спектре микроорганизмов.

Таблица 22

Частота выявления пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтального кармана в 1 и 2 группах до лечения

Вид микроба	1 группа, n=30		2 группа, n=30		p
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	30	100	30	100	>0,05
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	28	93,3	27	90	>0,05
<i>Prevotella intermedia</i>	27	90	28	93,3	>0,05
<i>Treponema denticola</i>	27	90	26	86,7	>0,05
<i>Tannerella forsythia</i>	26	86,7	27	90	>0,05
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25	83,3	26	86,7	>0,05
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	22	73,3	21	70	>0,05

У больных 1 и 2 групп частота превышений клинически значимой концентрации пародонтопатогенных бактерий отражена в таблице 23.

В 1 и 2 группах частота детекции пародонтопатогенных бактерий в содержимом ПК была высокой и превышала КЗК. Чаще встречалась *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, развивающая высокую патогенность в

отношении воспалительных процессов в пародонте, деструктивных изменений костной ткани даже при низких концентрациях [92]. Метаболизм

Таблица 23

Частота превышений клинически значимой концентрации (КЗК) бактерий в содержимом пародонтального кармана в 1 и 2 группах до лечения

Вид микроба	1 группа, n=30		2 группа, n=30		p
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	29	96,7	30	100	>0,05
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	26	86,7	26	86,7	>0,05
<i>Treponema denticola</i>	26	86,7	25	83,3	>0,05
<i>Prevotella intermedia</i>	25	83,3	27	90	>0,05
<i>Tannerella forsythia</i>	25	83,3	26	86,7	>0,05
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	24	80	25	83,3	>0,05
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	21	70	20	66,7	>0,05

Porphyromonas gingivalis приводит к накоплению в тканях протеолитических ферментов, эндогенных токсинов, адгезинов, продуктов цитотоксичности, что вызывает повреждение десневой ткани и костных структур пародонта [165]. *Treponema denticola* обеспечивает формирование «остова» биопленки, что усиливает адгезивные свойства пародонтопатогенных бактерий [187]. Обсемененность *Prevotella intermedia* и *Fusobacterium nucleatum*, как правило, сопровождается острым и быстро прогрессирующим течением инфекционного процесса [147]. *Tannerella forsythia* продуцирует протеолитические ферменты и липополисахариды, что приводит к снижению активности антимикробных пептидов и снижает местную иммунную защиту. В результате метаболизма *Porphyromonas endodontalis* образуются активные протеазы, ингибирующие фагоцитоз и ограничивающие потенциал врожденных иммунных реакций [187].

Проведение корреляционного анализа позволило выявить, что все изучаемые биомаркеры в воспалительном экссудате имели статистически значимую прямую корреляционную связь с количеством пародонтопатогенных бактерий (Таблица 24). Однако, с большей теснотой бактериальная обсемененность была связана с концентрацией кателицидина LL37 ($R=0,913$; $p<0,001$) и HIF-1 α ($R=0,728$; $p=0,004$).

Таблица 24

Результаты корреляционного анализа между иммунорегуляторными, кислород-зависимыми факторами и количеством пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов при ХГП

Биомаркеры	Концентрация пародонтогенных микроорганизмов в материале К
HIF-1 α	$R=0,728$; $p=0,004$
ИЛ-6	$R=0,497$; $p=0,02$
Кателицидин LL37	$R=0,913$; $p<0,001$

Если связь количественных показателей, характеризующих микробиоценоз полости рта с концентрацией антимикробных пептидов, факт доказанный, то относительно HIF-1 α - факт новый. Объяснение установленной корреляционной связи между количеством пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов и HIF-1 α при ХГП видится в следующем. Местная гипоксия при ХГП повышает выживаемость анаэробных грамотрицательных патогенов и еще больше снижает кислородное напряжение в тканях в непосредственной близости. Клеточные линии мышей, лишенных гена *HIF1A* имели ослабленные иммунные эффекторные молекулы и сниженную бактерицидную способность биологических жидкостей [69]. Таким образом, способность адаптироваться к снижению тканевого напряжения кислорода, который поддерживает контроль за иммунными клетками во всех тканевых средах, необходим при успешной ликвидации патогенов.

3.3. Клиническая эффективность кофермента никотинамидадениндинуклеотида в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита

В клинических подгруппах пародонтологические индексы по ходу лечения и последующего наблюдения течения заболевания определяли в динамике через 14 дней, 3 месяца и 6 месяцев от начала консервативной терапии.

Динамика ИГ у пациентов 1 группы (стандартная терапия+НАД) и 2 группы (стандартная терапия) с учетом тяжести ХГП представлена в таблице 25. На рисунке 22 иллюстрировано изменение индекса ИГ по ходу наблюдения в группах без учета степени тяжести заболевания.

Исходно до лечения и через 14 дней у пациентов 1 и 2 групп как при легкой, так и при средней степени тяжести ХГП ИГ не различались ($p>0,05$).

Таблица 25

Динамика ИГ у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	Через 14 дней	Через 3 мес.	Через 6 мес.
1	Легкая	2,07±0,06	0,77±0,04	1,03±0,05	1,59±0,04
	Средняя	2,71±0,09	1,16±0,05	1,10±0,05	1,91±0,05
2	Легкая	1,95±0,06	0,80±0,03	1,28±0,06*	1,68±0,04
	Средняя	2,89±0,08	1,17±0,05	1,58±0,08*	1,94±0,04

Примечание: * - достоверная вероятность различия 1 и 2 групп при $p<0,05$ (по критерию Манна Уитни).

Через 3 мес. наблюдения в 1 группе ИГ оставались в области низких значений: при легкой степени тяжести ХГП - 1,03±0,05 баллов, при средней степени тяжести - 1,10±0,05 баллов. Между тем, во 2 группе ИГ был статистически значимо ($p<0,05$) выше: при легкой степени тяжести ХГП - 1,28±0,06 баллов, при средней степени тяжести - 1,58±0,08 баллов. Через 6 мес. наблюдения индексы ИГ в двух группах были сходными ($p>0,05$).

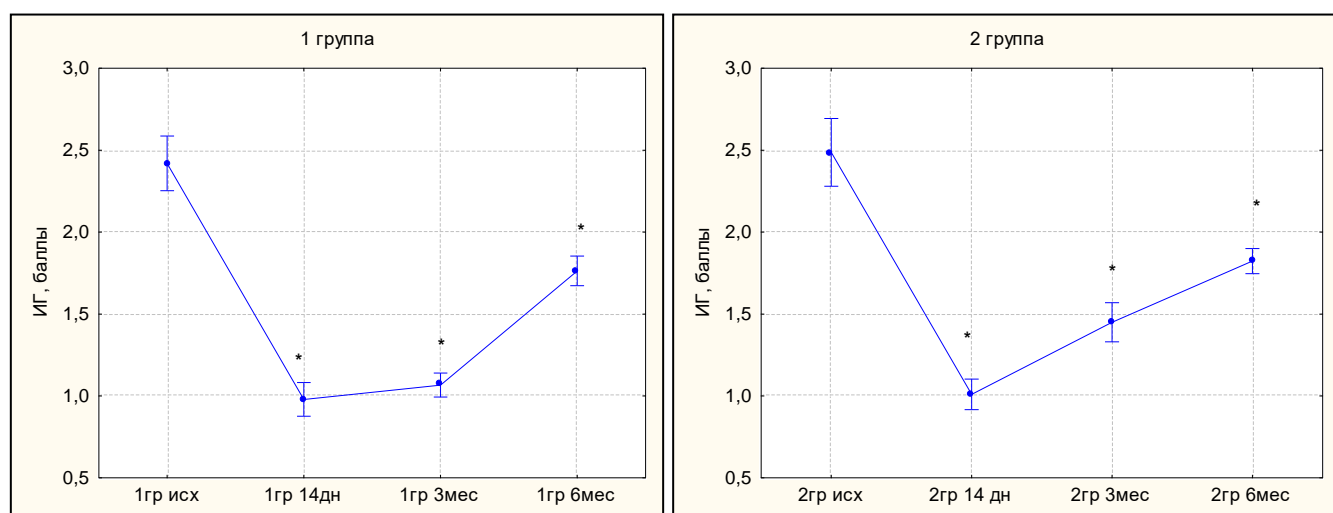


Рисунок 22. Динамика ИГ у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

По сравнению с исходным уровнем ИГ в течение 6 мес. наблюдения за пациентами в двух группах был ниже ($p < 0,05$). Однако, у пациентов 1 группы через 3 мес. при дополнительном воздействии НАДГ ИГ не повышался, а во 2 группе начинал возрастать относительно первоначального снижения (Рисунок 23). В отдаленный период (6 мес.) повышение ИГ в двух группах было сходным. Таким образом, использование НАД в комплексном лечении пациентов с ХГП сопровождалось улучшением гигиенического состояния полости рта в течение 3 мес. от начала терапии. При стандартной терапии ХГП во 2 группе период выраженного снижения ИГ отмечался в более сжатые сроки с формированием тенденции к повышению ИГ уже через 3 месяца наблюдения.

При сравнительном анализе индекса РМА в 1 и 2 группах на различных этапах наблюдения было установлено, что через 14 дней при легкой степени тяжести РМА был ниже в 1 группе по сравнению со 2 ($13,9 \pm 1,34\%$ против $19,5 \pm 0,96\%$) (Таблица 26). Через 3 мес. индекс РМА был ниже в 1 группе по сравнению со 2 группой как при легкой ($16,1 \pm 1,07\%$ против $20,2 \pm 0,62\%$), так и при тяжелой степени заболевания ($21,6 \pm 0,86\%$ против $29,8 \pm 1,11\%$), а через

6 мес. – только при легкой степени ХГП ($20,7\pm 0,66\%$ против $26,6\pm 0,75\%$) (Таблица 26).

Таблица 26

Динамика РМА у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	Через 14 дней	Через 3 мес.	Через 6 мес.
1	Легкая	$31,2\pm 2,83$	$13,9\pm 1,34$	$16,1\pm 1,07$	$20,7\pm 0,66$
	Средняя	$49,6\pm 1,22$	$33,8\pm 1,19$	$21,6\pm 0,86$	$28,9\pm 0,71$
2	Легкая	$34,7\pm 3,41$	$19,5\pm 0,96^*$	$20,2\pm 0,62^*$	$26,6\pm 0,75^*$
	Средняя	$51,6\pm 1,17$	$36,7\pm 2,51$	$29,8\pm 1,11^*$	$32,8\pm 1,24$

Примечание: * - доверительная вероятность различия 1 и 2 групп при $p < 0,05$ (по критерию Манна Уитни).

В 1 группе снижение индекса РМА относительно исходного уровня наблюдалось в большей мере по сравнению со 2 группой (Рисунок 23). Следовательно, при использовании НАДГ воспалительные изменения десны в 1 группе купировались лучше, особенно при легкой степени тяжести ХГП.

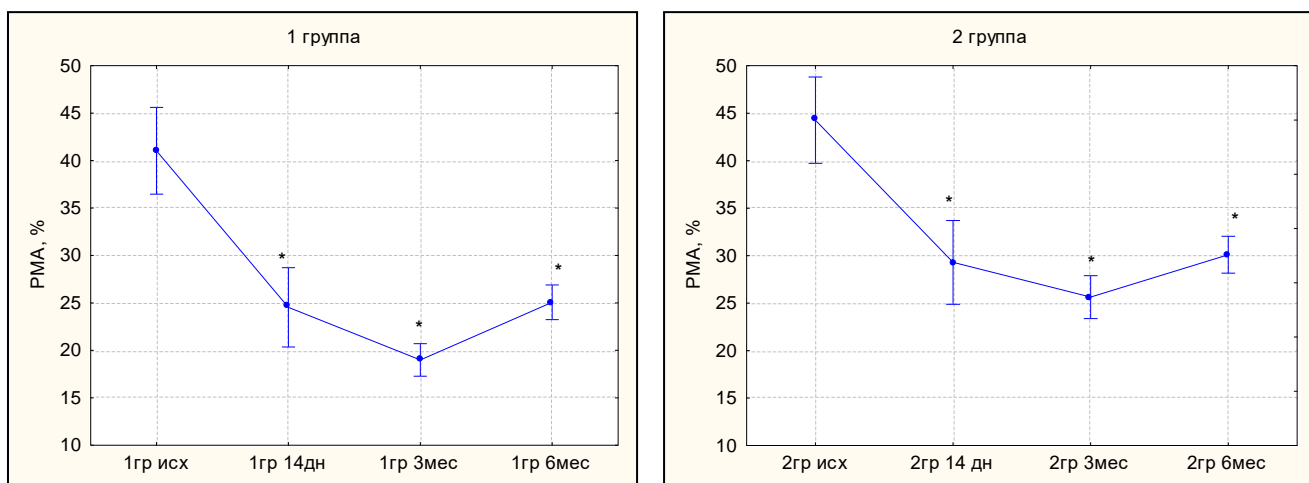


Рисунок 23. Динамика РМА у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

Динамика глубины ПК у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания представлена в таблице 28. Через

14 дней в 1 группе глубина ПК по сравнению со 2 группой была меньше ($3,7\pm 0,17$ мм против $4,2\pm 0,12$ мм) ($p < 0,05$) при средней степени тяжести ХГП. Аналогичная ситуация отмечалась и через 3 мес. наблюдения. Через 6 мес. глубина ПК была меньше в 1 группе по сравнению со 2 группой как при легкой ($1,6\pm 0,05$ мм против $2,2\pm 0,09$ мм), так и при средней степени тяжести ($2,3\pm 0,04$ мм против $3,0\pm 0,08$ мм) (Таблица 27).

Таблица 27

Динамика глубины ПК у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	Через 14 дней	Через 3 мес.	Через 6 мес.
1	Легкая	$2,9\pm 0,24$	$1,6\pm 0,18$	$1,5\pm 0,05$	$1,6\pm 0,05$
	Средняя	$4,97\pm 0,22$	$3,7\pm 0,17$	$2,2\pm 0,06$	$2,3\pm 0,04$
2	Легкая	$2,8\pm 0,23$	$1,8\pm 0,08$	$1,8\pm 0,05$	$2,2\pm 0,09^*$
	Средняя	$4,99\pm 0,18$	$4,2\pm 0,12^*$	$2,8\pm 0,09^*$	$3,0\pm 0,08^*$

Примечание: * - достоверная вероятность различия 1 и 2 групп при $p < 0,05$ (по критерию Манна Уитни).

По сравнению с исходным уровнем глубина ПК сокращалась с более выраженным градиентом в 1 группе по сравнению со 2 группой (Рисунок 24).

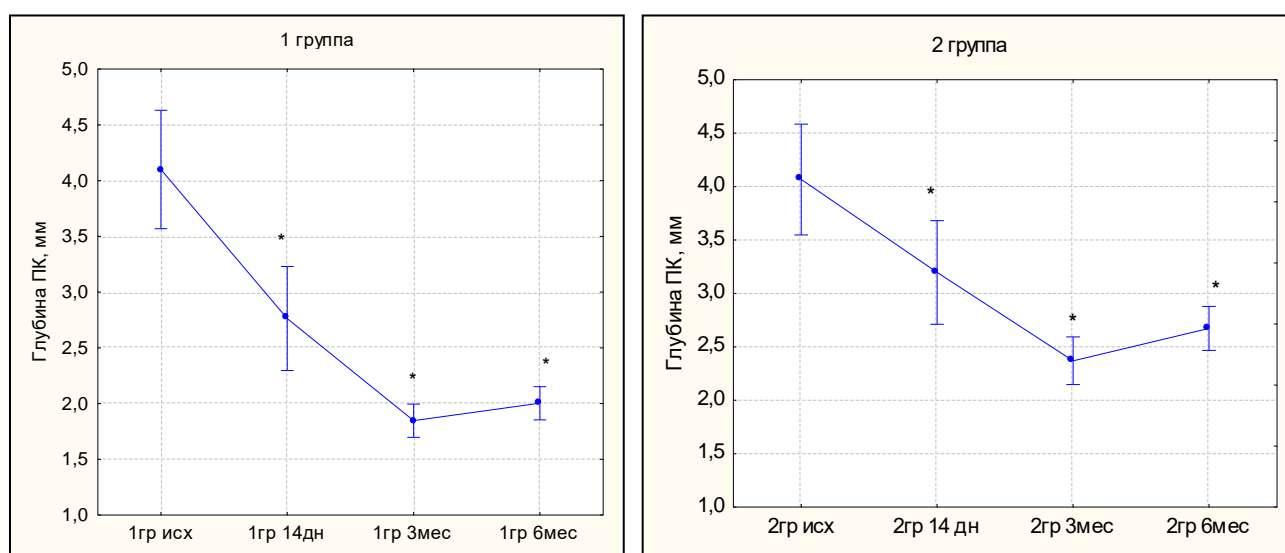


Рисунок 24. Динамика глубины ПК у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

Следовательно, ограничение деструкции мягких и твердых тканей пародонта с сокращением глубины ПК было более эффективным в 1 группе.

Анализ динамики PI у пациентов 1 и 2 групп позволил установить эффективный отдаленный эффект лечения в 1 группе: как при легкой, так и при средней степени тяжести ХГП у пациентов 1 группы PI был статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем во 2 группе (Таблица 28).

Таблица 28

Динамика пародонтального индекса у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	Через 14 дней	Через 3 мес.	Через 6 мес.
1	Легкая	1,1±0,07	0,91±0,04	0,73±0,02	1,3±0,04
	Средняя	2,7±0,15	1,8±0,06	1,9±0,04	2,0±0,05
2	Легкая	1,1±0,08	0,99±0,05	1,4±0,07*	2,7±0,08*
	Средняя	2,8±0,14	2,0±0,07	2,6±0,13*	2,8±0,07*

Примечание: * - доверительная вероятность различия 1 и 2 групп при $p < 0,05$ (по критерию Манна Уитни).

В 1 группе во все периоды наблюдения PI был ниже исходного уровня, а во 2 группе статистически значимое снижение установлено только через 14 дней (Рисунок 25).

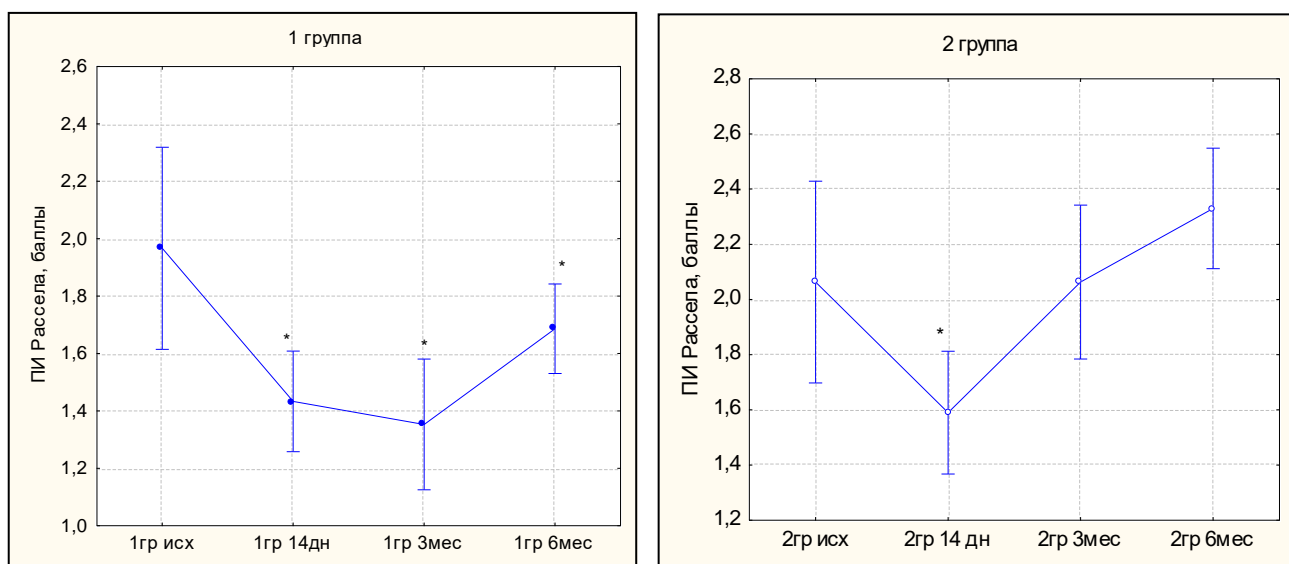


Рисунок 25. Динамика PI у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

Итак, в работе была доказана клиническая эффективность дополнительного применения НАД в комплексе со стандартной терапией ХГП. При использовании НАД с большей эффективностью купировались воспалительные изменения десны, улучшалось гигиеническое состояние полости рта, сокращался объем остеодеструкции – ограничивались ПК по глубине, снижался пародонтальный индекс.

3.4. Патогенетическая значимость кофермента никотинамидадениндинуклеотида в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита для коррекции нарушений гипоксия-зависимых иммунных реакций

Хемотаксис лейкоцитов в очаг воспаления приводит к высвобождению антимикробных защитных пептидов и активных форм кислорода – перекиси водорода и хлорноватистой кислоты [22]. Активные формы кислорода образуются с помощью системы НАДФН-оксидазы (никотинамиадениндинуклеотид фосфат-оксидаза), представляющей собой клеточный комплекс ферментов, связанный с мембранами клеток и ее органеллами. НАДФН-оксидаза особенно активна в макрофагах и участвует в противомикробной защитной системе, а также в клеточной пролиферации, дифференцировке и регуляции экспрессии ряда генов, в том числе гена *HIF1A* [154]. Респираторный взрыв, обуславливающий высвобождение НАДФН-оксидазы сопровождается снижением тканевого напряжения кислорода в регионе воспаления. Очевидно, локальная гипоксия вызывает накопление фактора HIF-1 α клетками тканей, активацию кислород-зависимых антибактериальных систем.

Нами было изучено, как использование антиоксиданта кофермента НАД, нейтрализующего свободные радикалы кислорода, сказывается на гипоксия-зависимых и иммунорегуляторных защитных факторах при

лечении ХГП. Как известно, токсические свойства свободных радикалов, направленные на бактерии, к сожалению, ведут к деструкции нормальных функционирующих клеток в ткани.

В результате исследования было установлено, что в 1 группе по сравнению со 2 группой дополнительное терапевтическое воздействие кофермента НАД привело к снижению синтеза и накопления ИИФ-1 α в воспалительном экссудате у пациентов со средней тяжестью заболевания через 3 мес. и у больных с легкой и средней степенью тяжести ХГП через 6 мес. наблюдения (Таблица 29).

Таблица 29

Динамика концентрации ИИФ-1 α (пг/мкл) в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	3 мес	6 мес.
1	Легкая	87,8 \pm 2,67	82,1 \pm 1,54	78,6 \pm 0,72
	Средняя	278,1 \pm 14,31	161,2 \pm 8,68	146,9 \pm 7,23
2	Легкая	92,1 \pm 1,94	78,8 \pm 0,78	91,1 \pm 1,59*
	Средняя	288,8 \pm 16,32	198,7 \pm 13,39*	235,7 \pm 9,95*

Примечание: * - доверительная вероятность различия 1 и 2 групп при $p < 0,05$ (по критерию Манна Уитни).

В 1 группе по сравнению с исходным уровнем наблюдалось последовательное снижение концентрации ИИФ-1 α в содержимом пародонтальных карманов (Рисунок 26): исходно 189,3 \pm 19,2 пг/мкл, через 3 мес. 124,3 \pm 7,5 пг/мкл, через 6 мес. 115,1 \pm 6,6 пг/мкл. Между тем, во 2 группе снижение концентрации ИИФ-1 α наблюдалось только через 3 мес. (с 203,6 \pm 20,2 пг/мкл до 146,7 \pm 11,2 пг/мкл), а через 6 мес. концентрация ИИФ-1 α повышалась до 173,0 \pm 14,4 пг/мкл (Рисунок 26).

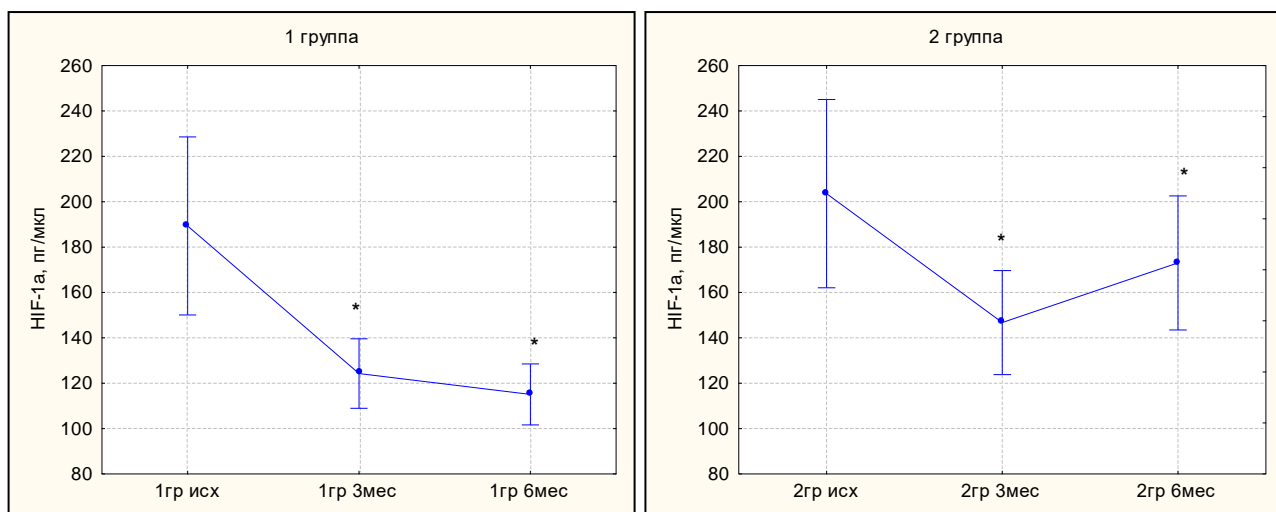


Рисунок 26. Динамика концентрации ИЛ-1α в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

В 1 группе по сравнению со 2 группой лечение НАД привело к снижению концентрации ИЛ-6 в воспалительном экссудате у пациентов только со средней тяжестью заболевания через 3 мес. и у больных с легкой и средней степенью тяжести ХГП через 6 мес. наблюдения (Таблица 30).

Таблица 30

Динамика концентрации ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	3 мес	6 мес.
1	Легкая	26,2±0,79	4,6±0,42	3,2±0,16
	Средняя	31,0±1,06	8,7±0,21	5,1±0,35
2	Легкая	26,4±0,85	4,6±0,45	7,6±0,42*
	Средняя	31,7±0,80	10,3±0,46*	13,8±0,59*

Примечание: * - доверительная вероятность различия 1 и 2 групп при $p < 0,05$ (по критерию Манна Уитни).

В 1 группе по сравнению с исходным уровнем наблюдалось последовательное снижение концентрации ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов (Рисунок 27): с исходной концентрации 28,8±0,79 пг/мл до 6,7±0,43 через 3 мес. и до 4,2±0,27 пг/мл через 6 мес. Во 2 группе снижение концентрации ИЛ-6 наблюдалось только через 3 мес. (с 29,4±0,75

пг/мл до $7,8 \pm 0,61$ пг/мл), а через 6 мес. концентрация повышалась до $11,1 \pm 0,68$ пг/мл (Рисунок 27).

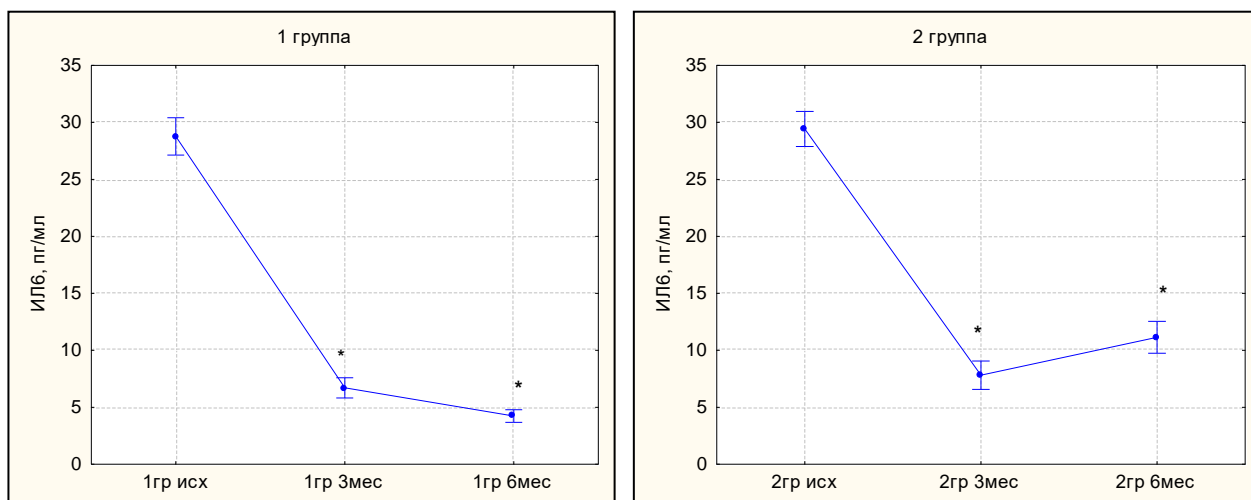


Рисунок 27. Динамика концентрации ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

После лечения у пациентов 1 и 2 групп различия концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов сформировались только через 6 мес. наблюдения (Таблица 31). У пациентов 1 группы через 6 мес. как при легкой, так и при средней тяжести заболевания содержание кателицидина LL37 в воспалительном экссудате было ниже ($p < 0,05$) по сравнению со 2 группой.

Таблица 31

Динамика концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП с учетом тяжести заболевания

Группа	Степень тяжести	Исходно	3 мес	6 мес.
1	Легкая	$12,3 \pm 0,76$	$10,4 \pm 0,39$	$9,1 \pm 0,55$
	Средняя	$27,0 \pm 0,63$	$11,3 \pm 0,49$	$10,0 \pm 0,49$
2	Легкая	$11,6 \pm 0,66$	$10,5 \pm 0,41$	$12,4 \pm 0,57^*$
	Средняя	$28,4 \pm 0,72$	$12,1 \pm 0,48$	$14,9 \pm 0,78^*$

Примечание: * - доверительная вероятность различия 1 и 2 групп при $p < 0,05$ (по критерию Манна Уитни).

В 1 группе по сравнению с исходным уровнем наблюдалось последовательное снижение концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов: с исходной концентрации $20,2 \pm 1,44$ пг/мл до $10,9 \pm 0,32$ через 3 мес. и до $9,6 \pm 0,37$ пг/мл через 6 мес. (Рисунок 28).

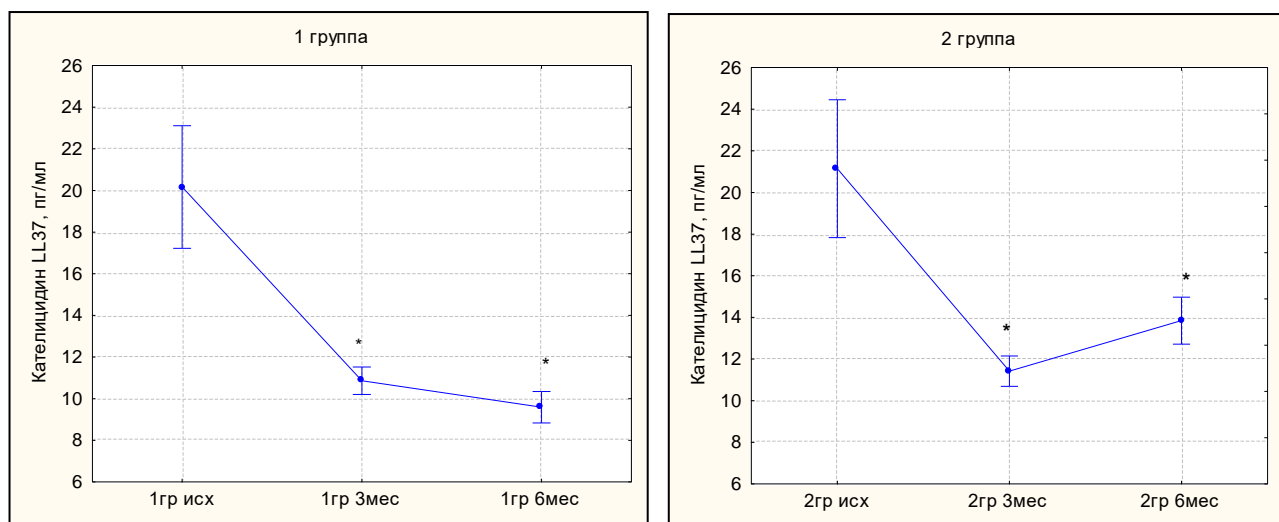


Рисунок 28. Динамика концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп с различной тактикой лечения ХГП. * - статистически значимые отклонения от исходного уровня при $p < 0,05$.

Во 2 группе снижение концентрации кателицидина LL37 наблюдалось только через 3 мес. (с $21,1 \pm 1,62$ пг/мл до $11,4 \pm 0,36$ пг/мл), а через 6 мес. концентрация кателицидина LL37 повышалась до $13,8 \pm 0,55$ пг/мл (Рисунок 28).

Таким образом, дополнительное назначение дентального геля с коферментом НАД в составе комплексного лечения ХГП сопровождается повышением клинической эффективности терапии за счет активации гипоксия-зависимых и иммунорегуляторных защитных механизмов, ограничения воспаления и деструкции тканей пародонта.

ГЛАВА 4

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пародонт представляет собой уникальную среду для размножения патогенных микроорганизмов, поскольку поверхность твердых тканей зубов позволяет микроорганизмам, оставаясь на месте, размножаться, создавать биопленки и устойчиво прикрепляться. Чтобы противостоять вторжению бактериальных патогенов, эпителиальные ткани создают эффективный барьер против колонизирующих микробов [92]. Так, слизистая оболочка полости рта продуцирует ряд антимикробных пептидов, обладающих широким спектром активности в отношении колонизации как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, оболочечных вирусов, грибов [50]. Такие антимикробные пептиды как дефензины и кателицидин LL-37 играют важную роль в поддержании здоровья полости рта, включая антимикробные эффекты и обеспечивая хемотаксис иммунокомпетентных клеток [89].

В одном из исследований было установлено, что дефицит кателицидина LL-37 позволил посредством размножения усиленного размножения *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* развиться тяжелой степени ХГП за короткий срок [75]. При воспалительной инфильтрации пародонта иммунокомпетентными клетками и активации резидентных Т-лимфоцитов наблюдается повышенное потребление кислорода [110]. Кроме того, повреждение эндотелия микрососудов и отек ткани при воспалении пародонта приводят к нарушению микроциркуляции и снижению кислородного обеспечения ткани [20]. Низкий уровень кислорода в тканях пародонта может быть также мощным иммуномодулирующим сигналом. Так, в условиях гипоксии клетки периодонтальных связок у человека экспрессируют гены провоспалительных цитокинов - интерлейкина-1 β , интерлейкина-6, простагландина E₂, рецептор-активатора ядерного фактора-

каппа В [85]. Гипоксия-зависимые реакции регуляции защитных механизмов эпителиальных барьерных клеток, слизистой полости рта и тканей пародонта могут внести дополнительный вклад в защиту пародонта от воспалительных заболеваний.

Защитные иммунные клетки для получения энергии и синтеза АТФ преимущественно используют гликолиз, что компенсирует ограниченный окислительный обмен при гипоксии. Отсутствие фактора HIF-1 α , как критического модулятора экспрессии ферментов гликолиза, приводило к значительному снижению доступности АТФ в миелоидных клетках [84]. Использование в лечении ХГП дентального геля с коферментом НАД, который, проникая через клеточную и митохондриальную мембрану, вступает в цикл Кребса, повышает выработку АТФ клеткой, нейтрализует свободные радикалы [53], может сказаться на протекании гипоксия-зависимых иммунных реакций и улучшить энергетический метаболизм клеточных структур пародонта.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось повышение эффективности диагностики, лечения и прогноза развития хронического пародонтита на основе современных методов исследования гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов.

Диссертационное исследование проводили на клинической базе ФГБОУ ВО «КБГУ им. Х.М.Бербекова» Институт стоматологии и челюстно - лицевой хирургии, ГБУЗ «Республиканский стоматологический центр имени Т.Х.Тхазаплижева» Минздрава КБР. На первом этапе исследования в общей клинической группе из 60 пациентов с ХГП (МКБ К 05.3) легкой и средней степени тяжести на фоне аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств и дисбактериоза III-IV степени исходно характеризовали пародонтологический статус, в содержимом пародонтальных карманов осуществляли анализ концентрации пародонтогенных микроорганизмов и определяли содержание HIF-1 α , интерлейкина-6 и кателицидина-LL37.

В зависимости от тактики лечения были выделены две группы: 1 группа (n=30) – в состав комплексного лечения пациентов дополнительно к стандартному лечению включена обработка пародонтальных карманов дентальным гелем с коферментом НАД (экспозиция по 20 мин 1 раз в день в течение 10 дней). 2 группа (n=30) - пациенты получали стандартное лечение ХГП, включающее устранение микробного налета и удаление зубных минерализованных отложений ультразвуковым способом, полирование поверхностей зубов, антисептическую обработку.

На заключительном этапе оценивали эффективность дентального геля с коферментом НАД в составе комплексного лечения ХГП для коррекции нарушений гипоксия-зависимых иммунных реакций по динамике HIF-1 α , кателицидина LL37 и ИЛ-6 в содержимом пародонтального кармана.

В контрольную группу для иммунологических показателей вошли 15 практически здоровых лиц возраста 30-40 лет без патологии пародонта, у которых определяли значения изучаемых иммунологических показателей в норме.

В 1 группе число пациентов с легкой степенью тяжести ХГП было 14 (46,7%), а со средней степенью тяжести ХГП - 16 (53,3%). Во 2 группе число пациентов с легкой степенью тяжести ХГП было 13 (43,3%), а со средней степенью тяжести ХГП - 17 (56,7%). Исходно у пациентов с ХГП отмечено удовлетворительное состояние гигиенического статуса полости рта. Индекс РМА у пациентов общей клинической группы имел величину в среднем $42,6 \pm 1,58\%$ с колебанием в межквартильном диапазоне от 22 до 50%. Глубина пародонтальных карманов у пациентов с ХГП соответствовала тяжести воспалительных изменений пародонта: при легкой степени - $2,85 \pm 0,17$ мм и средней степени тяжести заболевания - $4,97 \pm 0,14$ мм. У пациентов с ХГП легкой степени пародонтальный индекс имел величину $1,12 \pm 0,05$ баллов, а при ХГП средней степени - $2,75 \pm 0,11$ баллов. Таким образом, в общем по клинической группе у пациентов были установлены удовлетворительный уровень гигиенического статуса полости рта, средняя

степень интенсивности гингивита и средняя степень выраженности воспалительных изменений пародонта по индексу Рассела.

По сравнению со здоровыми донорами содержание HIF-1 α в пародонтальных карманах у пациентов с ХГП в общем по группе было выше в 2,4 раза ($p < 0,001$). Концентрация HIF-1 α в воспалительном экссудате при ХГП зависела от тяжести заболевания: по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров при ХГП легкой степени не отличалась, а при ХГП средней степени была выше в 3,5 раза ($p < 0,001$). Следовательно, накопление HIF-1 α , контролирующего транскрипционные процессы в клетках, при ХГП имело место только при средней степени тяжести заболевания при формировании костной деструкции крестальной кости.

Нами был выявлен факт повышения HIF-1 α в десневой жидкости, активирующего транскрипционные процессы в клетках пародонта при ХГП. Наличие усиленной экспрессии белка HIF-1 α в биоптатах десневой ткани у пациентов с ХГП было установлено ранее в молекулярно-генетических исследованиях [142, 175] при оценке экспрессии генов и самого изучаемого фактора в биоптатах ткани. Нами обнаружено повышение концентрации HIF-1 α в биологических жидкостях полости рта, что имело диагностически значимую информационную ценность. Определение уровней HIF-1 α , VEGF и ФНО- α в десневой жидкости у пациентов с гингивитом и ХГП ранее было проведено только в единственном исследовании В. Afacan с соавт. (2018) [43]. В данном труде было отмечено повышение содержания HIF-1 α , VEGF и ФНО- α в десневой жидкости при ХГП. Однако, акцент сделан на агрессивном протекающем воспалительном процессе в периодонте. В нашем исследовании актуальной задачей явилась оценка информативности определения фактора HIF-1 α в воспалительном экссудате пародонтальных карманов при средней степени тяжести ХГП в отличие от легкой степени и здоровых, когда ключевым клиническим признаком становится наличие остеодеструкции.

Обнаруженные данные указывают на роль гипоксия-зависимых механизмов в регуляции иммунных реакций в ответ на бактериальное воспаление тканей пародонта и последующую деструкцию костных тканей пародонта. Значительный прирост уровня HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов был установлен у пациентов со средней степенью тяжести ХГП, что явилось новым постулатом, имеющим диагностическую информативность.

У пациентов с ХГП в общей клинической группе концентрация ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов в 12,6 раз ($p < 0,001$) превышала уровень цитокина в десневой жидкости у здоровых лиц. Повышение провоспалительного цитокина ИЛ-6 в экссудате ПК при ХГП было выраженным как при легкой степени воспалительных изменений пародонта (в 11,4 раза), так и при средней степени тяжести (13,6 раза) по сравнению с уровнем ИЛ-6 в десневой жидкости у здоровых лиц.

У пациентов с ХГП в общей клинической группе концентрация кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов в 2,9 раз ($p < 0,001$) превышала уровень антимикробного пептида в десневой жидкости у здоровых лиц ($7,2 \pm 0,07$ пг/мл). Уровень кателицидина LL37 в экссудате пародонтальных карманов у пациентов при ХГП легкой степени составлял $12,0 \pm 0,5$ пг/мл, а при ХГП средней степени тяжести был в 2,3 раза выше ($27,7 \pm 0,49$ пг/мл). Таким образом, выраженное повышение кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов имело место при средней степени тяжести ХГП.

Итак, основной прирост в воспалительном экссудате пародонтальных карманов при переходе от легкой степени воспалительного поражения пародонта к средней был установлен для концентрации HIF-1 α , а также кателицидина LL37, уровень ИЛ-6 был значительно повышен уже при начальных признаках заболевания. Следовательно, содержание HIF-1 α и кателицидина LL37 в экссудате лучше отражало тяжесть протекания ХГП.

Методом ROC анализа были найдены дифференциально-диагностические точки разделения для концентрации биомаркеров, помогающие разграничить при ХГП поражение пародонта легкой и средней степени тяжести.

Повышение концентрации HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов у пациентов с ХГП более 103 пг/мкл было ассоциировано с развитием средней степени поражения пародонта с диагностической чувствительностью 87,1% и специфичностью 79,3% (Рисунок 29).

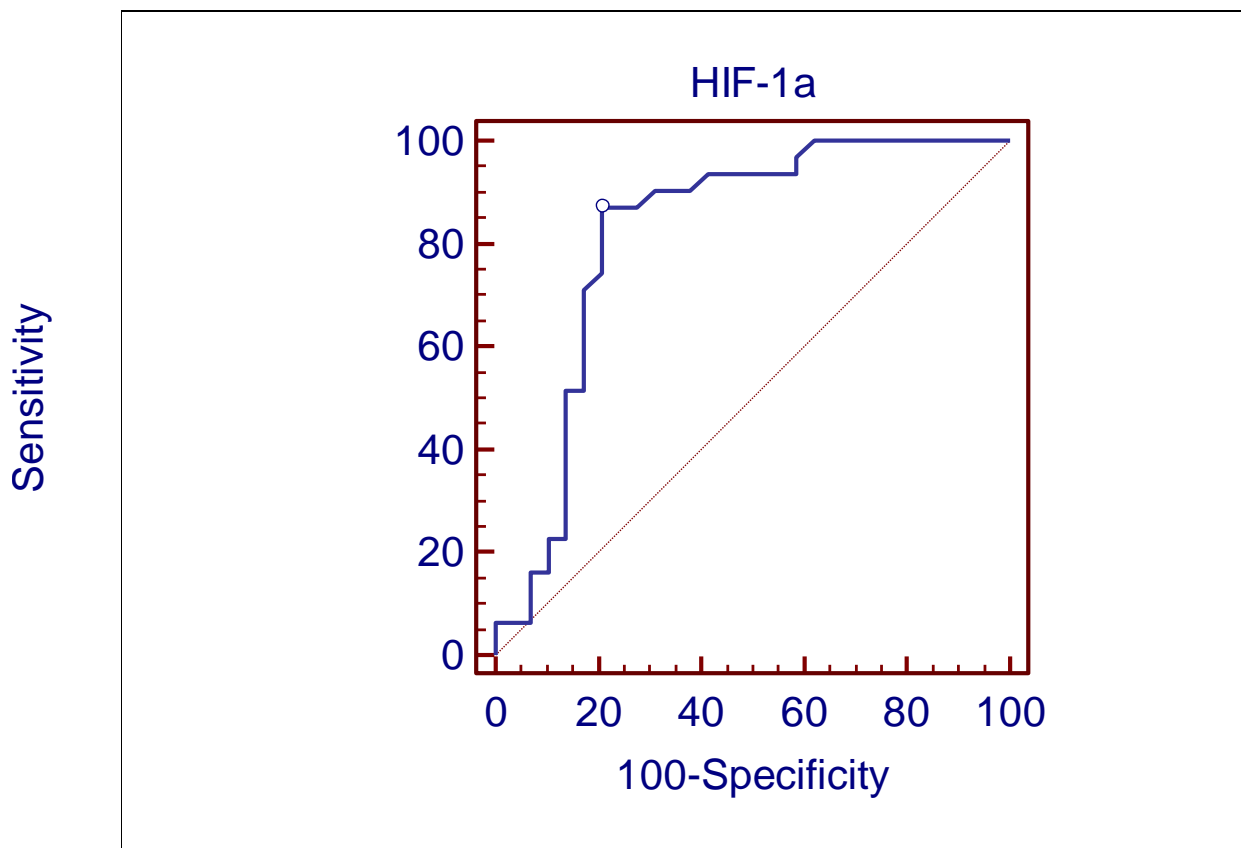


Рис. 29. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности при определении точки разделения между ХГП легкой и средней степени тяжести по концентрации HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов

Площадь под ROC кривой составила $0,820 \pm 0,06$ (доверительный интервал 0,701-0,939), что свидетельствовало о высоком качестве разделения двух клинических состояний. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила $p < 0,0001$ ($z = 5,277$).

При повышении уровня HIF-1 α выше 103 пг/мкл, риск развития ХГП средней степени тяжести возрастал в 4,2 раза (Таблица 32).

Таблица 32

Соотношение диагностической чувствительности и специфичности для уровней HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов при утяжелении патологии пародонта при ХГП от легкой к средней степени тяжести

Критерий	ДЧ	ДИ ДЧ	ДС	ДИ ДС	ОШ
>89	96,77	83,3 - 99,9	41,38	23,5 - 61,1	1,65
>90	93,55	78,6 - 99,2	41,38	23,5 - 61,1	1,60
>92	93,55	78,6 - 99,2	44,83	26,4 - 64,3	1,70
>93	93,55	78,6 - 99,2	48,28	29,4 - 67,5	1,81
>94	93,55	78,6 - 99,2	51,72	32,5 - 70,6	1,94
>95	93,55	78,6 - 99,2	58,62	38,9 - 76,5	2,26
>97	90,32	74,2 - 98,0	62,07	42,3 - 79,3	2,38
>99	90,32	74,2 - 98,0	65,52	45,7 - 82,1	2,62
>100	90,32	74,2 - 98,0	68,97	49,2 - 84,7	2,91
>101	87,10	70,2 - 96,4	72,41	52,8 - 87,3	3,16
>102	87,10	70,2 - 96,4	75,86	56,5 - 89,7	3,61
>103 *	87,10	70,2 - 96,4	79,31	60,3 - 92,0	4,21
>146	83,87	66,3 - 94,5	79,31	60,3 - 92,0	4,05
>154	80,65	62,5 - 92,5	79,31	60,3 - 92,0	3,90
>176	74,19	55,4 - 88,1	79,31	60,3 - 92,0	3,59
>189	70,97	52,0 - 85,8	82,76	64,2 - 94,2	4,12
>245	67,74	48,6 - 83,3	82,76	64,2 - 94,2	3,93
>250	64,52	45,4 - 80,8	82,76	64,2 - 94,2	3,74
>264	61,29	42,2 - 78,2	82,76	64,2 - 94,2	3,55
>270	54,84	36,0 - 72,7	82,76	64,2 - 94,2	3,18
>276	51,61	33,1 - 69,8	82,76	64,2 - 94,2	2,99
>283	51,61	33,1 - 69,8	86,21	68,3 - 96,1	3,74
>294	48,39	30,2 - 66,9	86,21	68,3 - 96,1	3,51
>299	45,16	27,3 - 64,0	86,21	68,3 - 96,1	3,27
>301	38,71	21,8 - 57,8	86,21	68,3 - 96,1	2,81
>302	35,48	19,2 - 54,6	86,21	68,3 - 96,1	2,57
>303	32,26	16,7 - 51,4	86,21	68,3 - 96,1	2,34
>310	25,81	11,9 - 44,6	86,21	68,3 - 96,1	1,87
>312	22,58	9,6 - 41,1	86,21	68,3 - 96,1	1,64
>315	22,58	9,6 - 41,1	89,66	72,6 - 97,8	2,18
>324	16,13	5,5 - 33,7	89,66	72,6 - 97,8	1,56
>330	16,13	5,5 - 33,7	93,10	77,2 - 99,2	2,34
>338	12,90	3,6 - 29,8	93,10	77,2 - 99,2	1,87
>340	9,68	2,0 - 25,8	93,10	77,2 - 99,2	1,40

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОШ – отношение шансов, * - точка cut-off

С развитием средней степени поражения пародонта при ХГП было сопряжено повышение концентрации кателицидина LL37 в содержимом

пародонтальных карманов у пациентов с ХГП более 17,2 пг/мл с диагностической чувствительностью 88% и специфичностью 65,7% (Рисунок 30).

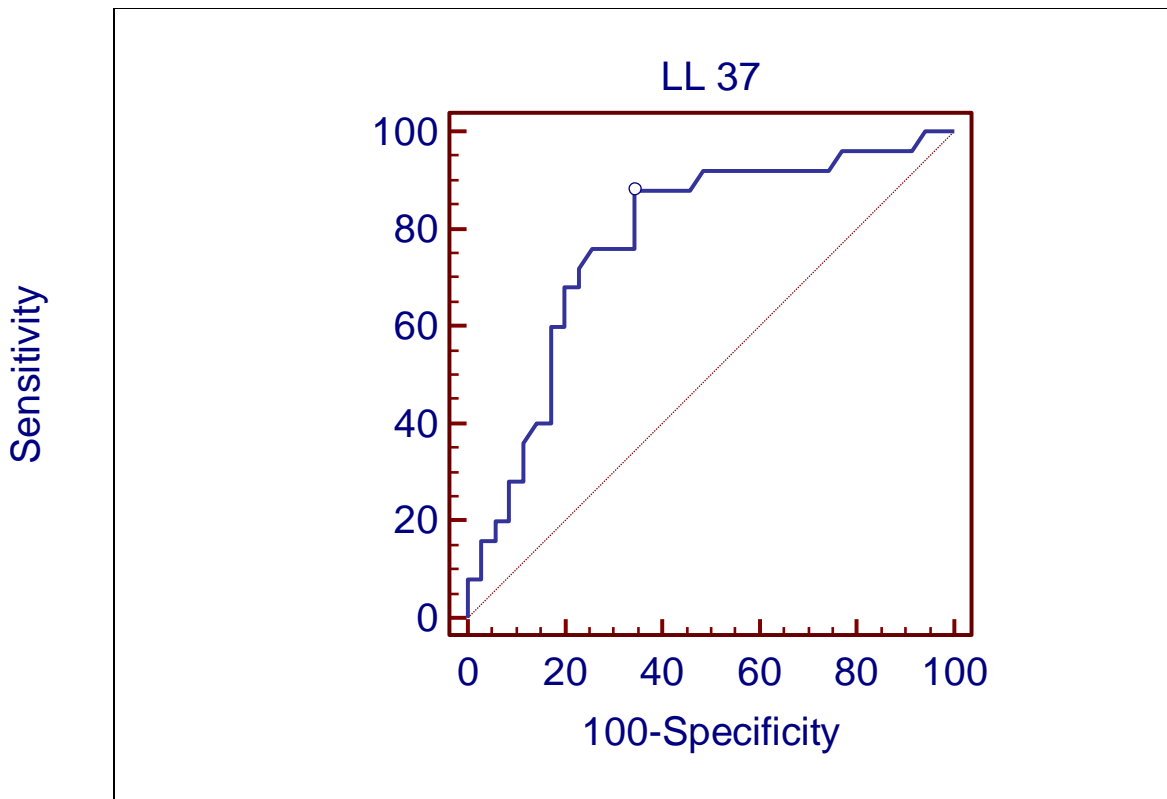


Рисунок 30. ROC-кривая соотношения чувствительности и специфичности при определении точки разделения между ХГП легкой и средней степени тяжести по концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов

Площадь под ROC кривой составила $0,778 \pm 0,063$ (доверительный интервал 0,655-0,901), что свидетельствовало о хорошем качестве разделения бинарных состояний. Доверительная вероятность отклонения ROC кривой от диагональной линии была высокой и составила $p < 0,0001$ ($z=4,42$). При повышении уровня кателицидина LL37 выше 17,2 пг/мл, риск развития ХГП средней степени тяжести возрастал в 2,6 раза (Таблица 33).

Таблица 33

Соотношение диагностической чувствительности и специфичности для уровней HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов при утяжелении патологии пародонта при ХГП от легкой к средней степени тяжести

Критерий	ДЧ	ДИ ДЧ	ДС	ДИ ДС	ОШ
>10,71	94,76	73,11 - 99,13	26,48	12,45 - 43,23	1,28
>10,82	94,76	73,11 - 99,13	29,43	14,63 - 46,31	1,33
>10,92	94,76	73,11 - 99,13	32,37	16,89 - 49,23	1,38
>11,33	94,76	73,11 - 99,13	35,32	19,11 - 52,32	1,44
>11,85	94,76	73,11 - 99,13	38,25	21,57 - 55,14	1,50
>11,95	94,76	73,11 - 99,13	41,20	23,91 - 57,69	1,58
>12,05	94,76	73,11 - 99,13	44,15	26,23 - 60,64	1,66
>12,26	94,76	73,11 - 99,13	47,08	28,83 - 63,46	1,74
>12,77	94,76	73,11 - 99,13	50,03	31,49 - 66,07	1,84
>13,60	94,76	73,11 - 99,13	52,97	34,05 - 68,63	1,95
>15,24	90,64	68,92 - 97,46	55,92	36,63 - 71,22	1,98
>15,55	90,64	68,92 - 97,46	58,85	39,45 - 73,76	2,11
>16,07	90,64	68,92 - 97,46	61,80	42,11 - 76,31	2,27
>17,00	90,64	68,92 - 97,46	64,75	44,29 - 78,53	2,44
> 17,22 *	88,00	68,92 - 97,46	65,71	47,87 - 80,94	2,57
>18,03	86,52	63,88 - 95,46	67,68	47,83 - 80,95	2,52
>23,59	82,40	59,29 - 93,21	67,68	47,84 - 80,93	2,40
>24,21	78,28	54,87 - 90,58	67,68	47,81 - 80,94	2,29
>24,41	78,28	54,87 - 90,58	73,57	53,73 - 85,42	2,74
>24,62	78,28	54,87 - 90,58	76,52	56,71 - 87,53	3,05
>24,82	74,16	50,57 - 87,87	79,45	59,95 - 89,67	3,24
>25,34	70,04	46,49 - 85,09	79,45	59,93 - 89,63	3,07
>25,54	70,04	46,49 - 85,09	82,40	63,71 - 91,46	3,50
>27,30	61,80	38,56 - 78,87	82,40	63,71 - 91,46	3,09
>27,60	61,80	38,56 - 78,87	85,35	66,34 - 93,64	3,61
>27,91	57,68	34,85 - 75,59	85,35	66,34 - 93,64	3,37
>28,63	53,56	31,22 - 72,17	85,35	66,34 - 93,64	3,12
>28,74	45,32	24,374 - 65,05	85,35	66,34 - 93,64	2,65
>28,84	41,20	21,07 - 61,26	85,35	66,34 - 93,64	2,40
>29,15	41,20	21,07 - 61,26	88,28	69,72 - 95,62	2,88
>29,36	37,08	18,11 - 57,47	91,23	73,23 - 96,58	3,24
>29,66	32,96	14,75 - 53,44	91,23	73,23 - 96,58	2,88
>29,77	28,84	12,03 - 49,37	91,23	73,23 - 96,58	2,52

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДИ – доверительный интервал, ОШ – отношение шансов, * - точка cut-off

При проведении корреляционного анализа была выявлена очень тесная взаимосвязь между концентрацией HIF-1 α и антимикробного пептида кателицидина LL37 ($R=0,88$; $p<0,001$), тесная связь между антимикробным защитным фактором и провоспалительным цитокином ИЛ-6 ($R=0,70$; $p<0,001$) и умеренная связь между концентрацией HIF-1 α и провоспалительным медиатором ИЛ-6 ($R=0,56$; $p<0,001$).

Следовательно, HIF-1 α в большей степени контролирует синтез антимикробного пептида кателицидина LL37, способствуя его накоплению. Весомое влияние, но меньшее по выраженности, HIF-1 α оказывает на синтез провоспалительного медиатора ИЛ-6.

Исходно до лечения пародонтальный статус, концентрация гипоксия-зависимых антимикробных иммунных комплексов в содержимом пародонтальных карманов у пациентов 1 и 2 групп не различались ($p>0,05$). Все изучаемые пародонтопатогенные бактерии, включенные в панель «Дентоскрин», с высокой частотой выявлялись в 1 и 2 группах. Межгрупповых различий не наблюдалось. Частота качественного обнаружения *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* была несколько выше по сравнению с другими возбудителями в спектре определяемых микроорганизмов. В двух группах имела место высокая частота встречаемости патогенных бактерий в концентрациях, превышающих клинически значимую.

Проведение корреляционного анализа позволило выявить, что все изучаемые биомаркеры в воспалительном экссудате имели статистически значимую прямую корреляционную связь с количеством пародонтопатогенных бактерий. Однако, с большей теснотой бактериальная обсемененность была связана с концентрацией кателицидина LL37 ($R=0,913$; $p<0,001$) и HIF-1 α ($R=0,728$; $p=0,004$).

Помимо физического барьера от внешнего проникновения микробов, кожа и слизистая оболочка продуцируют ряд антимикробных пептидов,

которые обладают широким спектром активности в отношении колонизации как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, оболочечных вирусов, грибов [26]. Стало ясно, что антимикробные пептиды дефензины, кателицидин LL-37 играют важную роль в поддержании здоровья полости рта, включая антимикробные эффекты и опосредованный хемотаксис иммунных клеток [91, 181]. В другой работе была выявлена связь между дефицитом кателицидина и персистенцией *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, что, в свою очередь, привело к развитию тяжелого периодонтита [75].

При хорошем гигиеническом состоянии полости рта, взаимодействие бактерий и тканей пародонта человека находится в регулируемом равновесии, пародонтальные ткани здоровы либо имеет место слабо выраженное субклиническое воспаление [147]. Толл-рецепторы на эпителиальных клетках пародонта и/или десны распознают молекулярные структуры от патогенных бактерий и ограничивают их проникновение, что поддерживает здоровье полости рта [94, 95]. У людей с неудовлетворительной гигиеной полости рта равновесие сдвигается в сторону провоспалительного состояния, что клинически приводит к гингивиту [28, 143]. NIF-1 α не только опосредует иммунный ответ хозяина на патогенную микрофлору, но и обеспечивает защиту от микробов. Однако, NIF-1 α посредством стимуляции выброса лейкоцитами провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6) может способствовать разрушению тканей, поддерживающих пародонт, и, следовательно, к пролонгированию либо развитию агрессивности пародонтита [142]. Объединяя всю имеющуюся в настоящее время информацию, можно сказать, что гипоксия может привести как к благотворному, так и к вредному воздействию на здоровье пародонта. Слабо выраженная гипоксия через NIF-1 α обеспечивает базовый уровень защиты пародонта для «надзора» за количественными показателями собственной микрофлоры и защиту от вторжения чужеродных микробов [37]. При выраженной гипоксии тканей NIF-1 α обеспечивает

адаптивный ответ для выживания клеток главным образом через стимуляцию выброса VEGF, способствующих неоангиогенезу [22]. Ангиогенез и медиатор сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF всегда задействованы при воспалении, заживлении повреждения и ремоделировании костной ткани при ХГП. Увеличение уровня VEGF в десневой жидкости было продемонстрировано у пациентов с ХГП по сравнению с пациентами с гингивитом и здоровыми людьми [157, 158].

Если связь количественных показателей, характеризующих микробиоценоз полости рта с концентрацией антимикробных пептидов, факт доказанный, то относительно HIF-1 α - факт новый. Объяснение установленной корреляционной связи между количеством пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов и HIF-1 α при ХГП видится в следующем. Местная гипоксия при ХГП повышает выживаемость анаэробных грамотрицательных патогенов и еще больше снижает кислородное напряжение в тканях в непосредственной близости от колоний. Клеточные линии мышечной, лишенные гена *HIF1A*, имели ослабленные иммунные эффекторные молекулы и сниженную бактерицидную способность биологических жидкостей [68, 69]. Таким образом, способность адаптироваться к снижению тканевого напряжения кислорода через синтез и стабилизацию HIF-1 α , поддерживает контроль за иммунными клетками во всех тканевых средах, необходимый для успешной ликвидации патогенов.

Использование кофермента НАД в комплексном лечении пациентов с ХГП сопровождалось улучшением гигиенического состояния полости рта в течение 3 мес. от начала терапии. При стандартной терапии ХГП во 2 группе период выраженного снижения ИГ отмечался в более сжатые сроки с формированием тенденции к повышению ИГ уже через 3 месяца наблюдения. Снижение индекса РМА относительно исходного уровня в 1 группе наблюдалось в большей мере по сравнению со 2 группой.

Следовательно, при использовании НАД воспалительные изменения десны в 1 группе купировались лучше, особенно при легкой степени тяжести ХГП.

Через 14 дней в 1 группе глубина ПК по сравнению со 2 группой была меньше ($3,7 \pm 0,17$ мм против $4,2 \pm 0,12$ мм) ($p < 0,05$) при средней степени тяжести ХГП. Аналогичная ситуация отмечалась и через 3 мес. наблюдения. Через 6 мес. глубина ПК была меньше в 1 группе по сравнению со 2 группой как при легкой ($1,6 \pm 0,05$ мм против $2,2 \pm 0,09$ мм), так и при средней степени тяжести ($2,3 \pm 0,04$ мм против $3,0 \pm 0,08$ мм). По сравнению с исходным уровнем глубина ПК сокращалась с более выраженным градиентом в 1 группе по сравнению со 2 группой. Следовательно, ограничение деструкции мягких и твердых тканей пародонта с сокращением глубины ПК было более эффективным в 1 группе.

Анализ динамики пародонтального индекса у пациентов 1 и 2 групп позволил установить эффективный отдаленный эффект лечения в 1 группе: как при легкой, так и при средней степени тяжести ХГП у пациентов 1 группы PI был статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем во 2 группе. В 1 группе во все периоды наблюдения PI был ниже исходного уровня, а во 2 группе статистически значимое снижение установлено только через 14 дней.

Итак, в работе была доказана клиническая эффективность дополнительного применения НАД к стандартной терапии ХГП. При использовании НАД с большей эффективностью купировались воспалительные изменения десны, улучшалось гигиеническое состояние полости рта, сокращался объем остеодеструкции – ограничивались ПК по глубине, снижался пародонтальный индекс.

НАД представляет собой коэнзим 1, биологически активную форму никотинамидадениндинуклеотида в восстановленной форме после присоединения атома водорода. Теряя электрон, НАДХ поставляет энергию, отдавая этот водород. НАД играет важную роль в получении клеточной энергии при метаболизме глюкозы и липидов. Поэтому чем больше НАД в клетках, тем больше энергии она вырабатывает с оптимальной

эффективностью. Под воздействием НАД в виде дентального геля заживление ран и реэпителизация в десневой ткани происходит с большей скоростью [54, 133]. НАД доставляется в эпителиальные клетки ротовой полости в лецитиновых липосомах и обладает хорошим восстановительным потенциалом в сравнении с препаратами родственных групп [199]. Из положительных свойств, НАД обладает антиоксидантными свойствами, нейтрализуя свободные радикалы, стимулирует синтез оксида азота NO, обладающего дезагрегантным и сосудорасширяющим действием, что несомненно оптимизирует кровообращение органов и тканей.

В 1 группе по сравнению со 2 группой дополнительное терапевтическое воздействие НАД привело к снижению синтеза и накоплению HIF-1 α в воспалительном экссудате у пациентов со средней тяжестью заболевания через 3 мес. и у больных с легкой и средней степенью тяжести ХГП через 6 мес. наблюдения. В 1 группе в динамике наблюдения по сравнению с исходным уровнем наблюдалось последовательное снижение концентрации HIF-1 α в содержимом пародонтальных карманов: исходно $189,3 \pm 19,2$ пг/мкл, через 3 мес. $124,3 \pm 7,5$ пг/мкл, через 6 мес. $115,1 \pm 6,6$ пг/мкл. Между тем, во 2 группе снижение концентрации HIF-1 α наблюдалось только через 3 мес. (с $203,6 \pm 20,2$ пг/мкл до $146,7 \pm 11,2$ пг/мкл), а через 6 мес. концентрация HIF-1 α повышалась до $173,0 \pm 14,4$ пг/мкл.

В 1 группе по сравнению со 2 группой лечение НАД привело к снижению концентрации ИЛ-6 в воспалительном экссудате у пациентов только со средней тяжестью заболевания через 3 мес. и у больных с легкой и средней степенью тяжести ХГП через 6 мес. наблюдения.

После лечения у пациентов 1 и 2 групп различия концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов сформировались только через 6 мес. наблюдения. У пациентов 1 группы через 6 мес. как при легкой, так и при средней тяжести заболевания содержание кателицидина LL37 в воспалительном экссудате было ниже ($p < 0,05$) по сравнению со 2 группой.

Эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта и лейкоциты для производства АТФ преимущественно используют гликолиз, что позволяет компенсировать снижение окислительного обмена при локальной гипоксии [84]. HIF-1 α способствует активации гликолитических ферментов и повышению доступности АТФ [63]. Применение дентального геля с коферментом НАД предотвращает истощение АТФ, что важно для протекания защитных иммунных реакций. Использование субстратной формы АТФ сопровождается снижением гипоксии в тканях, а следовательно снижением уровня HIF-1 α . Кроме того, при снижении уровня HIF-1 α происходило сочетанное ограничение синтеза ИЛ-6 и кателицидина LL37, что по совокупности свидетельствовало о снижении воспалительного повреждения тканей пародонта.

Таким образом, дополнительное назначение дентального геля с коферментом НАД в составе комплексного лечения ХГП сопровождалось повышением клинической эффективности терапии за счет активации гипоксия-зависимых и иммунорегуляторных защитных механизмов, ограничения воспаления и деструкции тканей пародонта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом по сравнению со здоровыми лицами, а также при повышении степени тяжести хронического генерализованного пародонтита от легкой к средней установлено повышение в содержимом пародонтальных карманов гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α), антимикробного пептида кателицидина LL37 и интерлейкина-6. Гипоксия-зависимый фактор -1α (HIF- 1α) в большей степени контролировал синтез антимикробного пептида кателицидина LL37, способствуя его накоплению в воспалительном экссудате зубо-десневого желобка. Все изучаемые медиаторы отражали тяжесть клинических проявлений хронического генерализованного пародонтита, а, следовательно, были информативны для контроля течения заболевания. Однако дифференциально-разделительная значимость между легкой и средней степенью поражения пародонта при хроническом генерализованном пародонтите отмечена для гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) и кателицидина LL37.

Проведение корреляционного анализа позволило выявить, что все изучаемые биомаркеры в воспалительном экссудате имели статистически значимую прямую корреляционную связь с количеством пародонтопатогенных бактерий. Однако большая теснота связи бактериальной обсемененности установлена с концентрацией кателицидина LL37 ($R=0,913$; $p<0,001$) и гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) ($R=0,728$; $p=0,004$).

У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при средней степени тяжести, а также при легкой степени поражения пародонта, но при повышении концентрации гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) в содержимом пародонтальных карманов более 103 пг/мкл, на фоне аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств, к

антибиотикам дополнительно к стандартным мерам для повышения клинической эффективности лечения рекомендуется введение в пародонтальные карманы дентального геля никотинамидадениндинуклеотида (экспозиция по 20 мин 1 раз в день в течение 10 дней).

Дополнительное назначение дентального геля с коферментом НАД в составе комплексного лечения хронического генерализованного пародонтита сопровождается повышением клинической эффективности терапии за счет активации гипоксия-зависимых и иммунорегуляторных защитных механизмов, ограничения воспаления и деструкции тканей пародонта.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при средней степени тяжести заболевания в отличие от легкой степени поражения пародонта наиболее выраженное повышение ($p < 0,05$) концентрации в экссудате пародонтальных карманов отмечается для HIF-1 α (в 3,15 раз) и кателицидина LL37 (в 2,9 раз). При легкой степени тяжести хронического генерализованного пародонтита концентрация гипоксия-зависимого фактора -1 α (HIF-1 α) в десневой жидкости не отличается от контрольного уровня у здоровых лиц. Концентрация ИЛ-6 в содержимом пародонтальных карманов значительно превышает ($p < 0,05$) контрольное значение как при легкой (в 11,4 раз), так и при средней (в 13,6 раз) степени тяжести заболевания. Таким образом, диагностическая информативность определения клинико-лабораторных показателей в экссудате пародонтальных карманов определено и установлено, что при мониторинге степени патологии пародонта выше для гипоксия-зависимого фактора -1 α (HIF-1 α) и кателицидина LL37.

2. С характеристиками микробиоценоза содержимого пародонтального кармана тесно связаны колебания концентрации в экссудате

кателицидина LL37 и гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α). Наиболее выраженная тесная корреляционная зависимость с содержанием пародонтопатогенных бактерий в пародонтальных карманах у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом установлено для концентрации кателицидина LL37 ($R=0,913$; $p<0,001$) и гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) ($R=0,728$; $p=0,004$), для концентрации ИЛ-6 связь значимая, но умеренная ($R=0,497$; $p=0,02$).

3. Использование дентального геля с коферментом НАД в комплексном лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени тяжести по сравнению со стандартной терапией сопровождается улучшением гигиенического состояния полости рта в течение 3 мес. от начала терапии, более эффективным купированием воспалительных изменений десны со снижением индекса РМА, ограничением деструкции мягких и твердых тканей пародонта с сокращением глубины ПК и снижением пародонтального индекса, начиная с 14 дня наблюдения.

4. Дополнительное терапевтическое воздействие кофермента НАД приводит к более выраженному снижению синтеза и накоплению гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) и ИЛ-6 в воспалительном экссудате у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом со средней тяжестью заболевания через 3 мес. После лечения у пациентов 1 и 2 групп различия концентрации кателицидина LL37 в содержимом пародонтальных карманов формируются только через 6 мес. наблюдения. Дополнительное терапевтическое воздействие кофермента НАД сопровождается наиболее эффективным и последовательным снижением в экссудате пародонтальных карманов гипоксия - зависимого фактора -1α (HIF- 1α).

5. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой и средней степени тяжести при повышении уровня гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) в содержимом пародонтальных карманов

выше 103 пг/мкл, риск развития остеодеструкции возрастает в 4,2 раза ($p < 0,05$), при повышении концентрации кателицидина LL37 более 17,2 пг/мл – в 2,6 раза ($p < 0,05$), что требует дополнительного курсового использования дентального геля с коферментом НАД в комплексе стандартных мер лечения для повышения клинической эффективности терапии. Следовательно, данный алгоритм лечения может быть применён, как один из эффективных методов лечения хронического генерализованного пародонтита.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести на фоне аллергии на компоненты стандартных противовоспалительных средств, к антибиотикам и антимикробным средствам, дисбактериоза кишечника III-IV степени для повышения клинической эффективности лечения рекомендуется дополнительно к стандартной терапии обрабатывать пародонтальные карманы дентальным гелем с коферментом никотинамидадениндинуклеотид в течение 10 дней 1 раз в день с экспозицией по 20 мин.

2. Для оценки прогноза развития среднетяжелой степени хронического генерализованного пародонтита у пациентов при легкой степени поражения пародонта целесообразно рекомендовать в содержимом зубо-десневого желобка определять концентрацию гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) иммуноферментным методом. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при легкой степени поражения пародонта повышение концентрации гипоксия-зависимого фактора -1α (HIF- 1α) в экссудате пародонтальных карманов более 103 пг/мкл свидетельствует о высоком риске дальнейшего развития среднетяжелой формы заболевания с диагностической чувствительностью 87,1% и специфичностью 79,3%.

3. При высоком риске развития среднетяжелой степени хронического генерализованного пародонтита рекомендуется к стандартному лечению

дополнительно назначать курсовое применение дентального геля с коферментом никотинамид-адениндинуклеотидом в течение 10 дней 1 раз в день с экспозицией по 20 мин. при обработке пародонтальных карманов, несмотря на легкую тяжесть заболевания.

4. Дентальный гель с коферментом НАД может быть рекомендован как лечебный препарат при хроническом генерализованном пародонтите средней степени тяжести и профилактическое средство для предотвращения среднетяжелой формы заболевания ввиду активации факторов врожденной иммунной защиты полости рта за счет коррекции его гипоксия-зависимых механизмов.

Список сокращений и условных обозначений

АМП - антимикробные пептиды

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

ИГ ОНІ-S - индекс гигиены по Грин-Вермиллиону

ИЛ - интерлейкин

ИЛ-6R - рецепторы к интерлейкину-6

ИФА - иммуноферментный анализ

КОЕ - колониеобразующие единицы

НАД - никотинамидадениндинуклеотид

НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотида фосфат-оксидаза

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ФНО- α - фактор некроза опухоли- α

ХГП - хронический генерализованный пародонтит

НIF - гипоксия-зависимый фактор

NF- κ B - транскрипционный ядерный фактор каппа легкой цепи-энхансер активированных В-клеток

PI - пародонтальный индекс

PMA - папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс

RANKL - рецепторный активатор ядерного фактор- κ B-лиганд

TFF - трефоиловые пептиды

VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

O₂ - кислород

pO₂ - парциальное напряжение кислорода

Список литературы

1. Базарный, В.В. Значение некоторых интерлейкинов в патогенезе пародонтита / В.В. Базарный, Л.Г. Полушина, Е.А. Семенова, Е.Н. Светлакова с соавт. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2017. – № 14(1). – С. 35 – 39.
2. Бахлыкова, Е.А. Роль эндогенного антимикробного пептида кателицидина LL-37 в развитии воспалительного процесса при псориазе / Е.А. Бахлыкова, С.Л. Матусевич, Н.Н. Филимонкова, Ю.С. Спирина // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10. – №2(1). – С. 55 – 75.
3. Баяхметова, А.А. Цитокиновый профиль периферической крови больных с пародонтитом / А.А. Баяхметова, А.А. Екешева // Путь науки. – 2017. – № 4(38). – С. 91 – 93.
4. Бондаренко, В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса / В.М. Бондаренко // ЖМЭИ. – 1999. – № 5. – С. 34 – 39.
5. Борисевич, С.А. Особенности микроциркуляции и транскутанного парциального давления кислорода у спортсменов с разной направленностью физических нагрузок / С.А. Борисевич // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – С. 305.
6. Быкова, Н.И. Показатели клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном воспалении тканей пародонта / Н.И. Быкова, А.В. Одольский, В.А. Григорян // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 6 (161). – С. 20 – 26.
7. Ганковская, Л.В. Роль факторов врожденного иммунитета в патогенезе пародонтита / Л.В. Ганковская, Н.М. Хелминская, Е.А. Молчанова, О.А. Свитич // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 2. – С. 100 – 107.

8. Грачёв, В.И. Гипоксия и гипоксемия, их причины и последствия для человека / В.И. Грачёв, И.Т. Севрюков // *Norwegian Journal of Development of the International Science*. – 2018. – № 4–2(17). – С. 12 – 30.
9. Грачёв, В.И., Гипоксия животного организма, причины и следствия / В.И. Грачёв, И.Т. Севрюков, И.О. Маринкин // *Экология промышленного производства*. – 2018а. – № 2(102). – С. 42 – 57.
10. Григорович, Э.Ш. Характер распределения TLR–2, TLR–4, CD68, CD45RO, взаимодействующих с антигенами пародонтопатогенов в клетках слизистой оболочки десны у больных хроническим генерализованным пародонтитом / Э.Ш. Григорович, К.И. Арсентьева, Р.В. Городилов, Е.А. Заблоцкая // *Уральский медицинский журнал*. – 2011. – № 5(83). – С. 28 – 32.
11. Губайдуллин, А.Г. Особенности патогенеза заболеваний пародонта, вызванных *Porphyromonas gingivalis* / А.Г. Губайдуллин, М.М. Туйгунов, А.К. Булгаков, Т.А. Савченко // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2015. – Т. 10. – № 5. – С. 108 – 110.
12. Дмитриева, Л.А. Toll–like рецепторы и их роль в развитии пародонтита / Л.А. Дмитриева, К.Г. Гуревич, Л.М. Теблосева, С.С. Григорян // *Стоматология для всех*. – 2012. – № 3. – С. 8 – 10.
13. Дмитриева, Л.А. Современные представления о роли микрофлоры в патогенезе заболеваний пародонта / Л.А. Дмитриева, А.Г. Крайнова // *Пародонтология*. – 2013. – № 1. – С. 8 – 15.
14. Зорина, О.А. Результаты исследования эффективности применения фитопрепарата Alfa Nectar у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом / О.А. Зорина, Ф.К. Мустафина, О.А. Борискина, И.С. Беркутова // *Фарматека*. – 2016. – №10(323). – С. 50 – 57.
15. Зорина, О.А. Эффективность применения «ПРОФ. ГЕОРГ БИРКМАЙЕР НАДХ ДЕНТАЛ ГЕЛЬ» в составе комплексного лечения у пациентов с хроническим пародонтитом / О.А. Зорина, Ф.К. Мустафина, О.А. Борискина, И.С. Беркутова, О.А. Серебрякова // *Стоматология для всех*. – 2018. – №3. – С. 12 – 17.

16. Зорина, О.А. Диагностическая информативность определения остеомаркеров в сыворотке крови при хроническом генерализованном пародонтите средней и тяжелой степени / О.А. Зорина, З.М. Абаев, Р.Н. Магомедов, В.А. Проходная, Е.С. Максюкова // *Стоматология*. 2019;98(1):17-20.
17. Зорина, О.А. Гипоксия - зависимый транскрипционный контроль активности деструктивных изменений пародонта воспалительного и злокачественного генеза / Амхадова М.А., Абаев, З.М., Хамукова А.А., Демидова А.А. // *Стоматология*. 2020. - Т.99.- №3. - С.32-36.
18. Зорина О.А. Особенности остеоиммунологических аспектов остеорезорбции при периимплантите, хроническом пародонтите и раке альвеолярного отростка и альвеолярной части челюстей / Амхадова М.А., Алескеров Э.Ш., Айрапетов Г.А., Хамукова А.А., Демидова А.А. // *Стоматология*. 2020. - Т. 99. - №4. - С.27-32
19. Зурочка, А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (ТН1, ТН2, ТREG, ТН17, Т-хелперы активированные) / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков // *Медицинская иммунология*. – 2011. – Т. 13. – № 1. – С. 7 – 16.
20. Кирова, Ю.И., Ранние изменения экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора-1А (HIF-1A) в неокортексе крыс с разной толерантностью к острой гипоксии, перенесших фокальный ишемический инсульт префронтальной коры / Ю.И. Кирова, Ф.М. Шакова, Э.Л. Германова, А.А. Пальцын с соавт. // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2014. – Т. 58. – № 3. – С. 9 – 16.
21. Кит, О.И. Экспрессия транскрипционных факторов в тканях рака слизистой оболочки полости рта / О.И. Кит, Е.Ф. Комарова, В.И. Кононенко с соавт. // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2016. – Т. 11. – № 4. – С. 517 – 520.
22. Кречина, О.А. Нарушение микроциркуляции в тканях пародонта у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом в сочетании с

- метаболическим синдромом. / О.А. Кречина, О.А. Зорина, А.М. Молчанов, А.М. Шилов // *Стоматология*. – 2016. – Т.95(1). – С.27-30.
23. Кулаков, В.В. Цитотоксический эффект пептида LL-37 на перевиваемые миело- и лимфобластоидные клетки человека / В.В. Кулаков, Е.А. Макаров, М.В. Пащенко, С.В. Климова, Б.В. Пинегин // *Иммунология*. – 2011. – № 32(2). – С. 75 – 77.
24. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2011. – № 1. – С. 3 – 19.
25. Манак, Т.Н. Микробиологические аспекты заболеваний пульпы и тканей периодонта / Т.Н. Манак // *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. – 2019. – № 1. – С. 21 – 27.
26. Масумова, В.В. Динамика морфометрических показателей дендритных клеток слизистой оболочки десны при воспалительных заболеваниях пародонта и в отдаленные сроки после лечения / В.В. Масумова, Н.В. Булкина // *Современные наукоемкие технологии*. – 2009. – № 6. – С. 49 – 50.
27. Мащенко, И.С. Интерлейкины при генерализованном пародонтите / И.С. Мащенко // *Вісн. стоматології*. – 2002. – № 1. – С. 15 – 18.
28. Мелехов, С.В. Состояние местного иммунитета и микробиоценоза полости рта у больных хроническим генерализованным пародонтитом / С.В. Мелехов, Н.В. Колесникова, Е.С. Овчаренко // *Пародонтология*. – 2013. – Т. 18. – № 1(66). – С. 3 – 9.
29. Мустафина, Ф.К. Метод компьютерной капилляроскопии в оценке эффективности применения «ПРОФ. ГЕОРГ БИРКМАЙЕР НАДХ ДЕНТАЛ ГЕЛЬ®» при хирургических вмешательствах / Ф.К. Мустафина, С.Л. Чернова, О.А. Зорина, А.В. Лазук // Available from: <https://nadh.ru/metod-kompyuternoj-kapillyaroskopii-v-otsenke-effektivnosti-primeneniya-prof-georg-birkmajer-nadh-dental-gel-v-stomatologii/>. 2018. [Accessed: 21 February 2020].

30. Мустафаев, М. Ш. Комплексное лечение хронического пародонтита легкой и средней степени тяжести с использованием никотин аденин динуклеотид гидрида / Амхадова М. А., Амхадов И. С., Хамукова А.А., Алескеров Э. Ш - О. // Медицинский алфавит. - 2020;(12) – С.19 - 23.
31. Овчаренко, Е.С. Иммунологическая и микробиологическая оценка эффективности гигиены полости рта в комплексном лечении больных с воспалительными заболеваниями пародонта / Е.С. Овчаренко, В.В. Еричев, Т.В. Аксенова, С.В. Мелехов // Медицинский алфавит. – 2017. – Т. 3. – № 24(321). – С. 38 – 41.
32. Орехова, Л.Ю. Современные технологии бактериологического исследования пародонтальных пространств / Л.Ю. Орехова, М.Д. Жаворонкова, Т.Н. Суборова // Пародонтология. – 2013. – Т. 18. – № 2. – С. 9 – 13.
33. Островская, Л.Ю. Влияние изменения гормональной регуляции у женщин в периоде репродуктивного старения на состояние тканей пародонта / Л.Ю. Островская, Н.Б. Захарова, А.П. Могила, Л.С. Катханова с соавт. // Клиническая геронтология. – 2016. – Т. 22. – № 1–2. – С. 59 – 63.
34. Ошноков, А.К. Роль провоспалительных цитокинов в развитии хронического пародонтита / А.К. Ошноков, Е.А. Брагин, Л.Ю. Барычева, З.Ф. Хараева // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2014. – Т. 9. – № 4. – С. 380 – 381.
35. Петрова, Т.Г. Соотношение патоморфологических изменений ткани пародонта с уровнем про- и противовоспалительных цитокинов ротовой жидкости при хроническом генерализованном пародонтите / Т.Г. Петрова, Д.Д. Цырендоржиев, А.А. Ильин, И.В. Соловьева с соавт. // Институт стоматологии. – 2007. – № 1(34). – С. 98 – 99.
36. Петрухина, Н.Б. Нарушение микробиоценоза рта у пациентов с метаболическим синдромом / Н.Б. Петрухина, И.М. Рабинович, О.А. Зорина // Институт стоматологии. – 2014. – №1(62). – С. 54 – 56.

37. Рузаева, В.А. Трансляционные и посттрансляционные механизмы регуляции активности NF- κ B при гипоксии и ишемии / Рузаева В.А., Бойцова Е.Б., Салмина А.Б. // Молекулярная медицина. – 2016. – Т. 14. – № 2. – С. 13 – 19.
38. Соснин Д.Ю. Содержание васкулоэндотелиального фактора роста в слюне и сыворотке крови больных пародонтитом / Д.Ю. Соснин, О.С. Гилева, Е.Ю. Сивак, Ф.Ю. Даурова с соавт. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64. – № 11. – С. 663 – 668.
39. Теблоева, Л.М. Цитокины, способствующие разрушению тканей пародонта / Л.М. Теблоева, Л.А. Дмитриева, К.Г. Гуревич // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2011. – Т. 10. – № 1. – С. 120 – 122.
40. Ушницкий, И.Д. Современные этиологические и патогенетические аспекты воспалительно–деструктивных процессов тканей пародонта / И.Д. Ушницкий, А.А. Иванова, И.С. Пинелис, А.В. Юркевич // Эндодонтия Today. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 46 – 49.
41. Хайдар, Д.А. Гипоксия тканей пародонта при хроническом пародонтите / Д.А. Хайдар, А.Г. Кульченко // Электронный научно–образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». – 2017. – Т. 19. – № 12. – С. 292 – 294.
42. Хайдуков, С.В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, А.А. Тотолян, В.А. Черешнев // Медицинская Иммунология. – 2009. – Т. 11(2–3). – С. 227 – 238.
43. Цепов, Л.М. Роль микрофлоры в возникновении воспалительных заболеваний пародонта / Л.М. Цепов, Н.А. Голева // Пародонтология. – 2009. – № 1(50). – С. 7 – 12.
44. Чайковская, И.В. Состояние местного иммунитета у инсулинзависимых пациентов с генерализованным пародонтитом / И.В. Чайковская, В.К.

- Забродняя // Торсуевские чтения: научно–практический журнал по дерматологии, венерологии и косметологии. – 2018. – № 1(19). – С. 6 – 12.
45. Шустов, Е.Б. Экспрессия гипоксия–индуцибельного фактора HIF–1 α как критерий развития гипоксии тканей / Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, М.С. Дуля, Х.Х. Семенов с соавт. // Биомедицина. – 2015. – № 4. – С. 4 – 15.
46. Afacan, B. Gingival crevicular fluid and salivary HIF–1 α , VEGF, and TNF– α levels in periodontal health and disease / B. Afacan, V.Ö. Öztürk, Ç. Paşalı, E. Bozkurt et al. // J. Periodontol. – 2018. – Vol. 12. – P. 1 – 10.
47. Al Batran, R. In–vivo effect of andrographolide on alveolar bone resorption induced by Porphyromonas gingivalis and its relation with antioxidant enzymes / R. Al Batran, F.H. Al Bayaty, M.M. Al Obaidi // Bio Med. Res. Int. – 2013. doi: 10.1155/2013/276329.
48. Alvarez, M.E. Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation / M.E. Alvarez, J.I. Fuxman Bass, J.R. Geffner, M. Costas et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177(6). – P. 4037 – 4046.
49. Anand, R.J. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF–1 α – dependent manner / R.J. Anand // J. Leukoc. Biol. – 2007. – Vol. 82(5). – P. 1257 – 1265.
50. Bachrach, G. Salivary LL–37 secretion in individuals with down syndrome is normal / G. Bachrach, G. Chaushu, M. Zigmond et al. // Journal of dental research. – 2006. – Vol. 85. – N.10. – P. 933 – 936.
51. Bartold, P.M. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis / P.M. Bartold, M.D. Cantley, D.R. Haynes // Periodontology 2000. – 2010. – Vol. 53. – P. 55 – 69.
52. Belaiba, R.S. Hypoxia upregulates hypoxia–inducible factor–1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3–kinase and nuclear factor kappa B in pulmonary artery smooth muscle cells / R.S. Belaiba, S. Bonello, C. Zahringer S. Schmidt et al. // Mol. Biol. Cell. – 2007. – Vol. 18(12). – P. 4691 – 4697.

53. Beverly, A.D. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease / A.D. Beverly, P. Fredericks // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2012. – N 7. – P. 119 – 134.
54. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger / M.E. Bianchi // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 81(1). – P. 1 – 5.
55. Biddlestone J, Bandarra D, Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease (review). // *Int. J Mol Med.* 2015;35:859–869.
56. Birkmayer, J.G.D. On the safety of reduced nicotinamide adenine nucleotide (NADH) / J.G.D. Birkmayer, K. Nadlinger, S. Hallström // *Journal environmental pathology, toxicology and oncology.* – 2004. – Vol. 23. – P. 179 – 194.
57. Birkmayer, J.G.D. Safety of stabilized, orally absorbable, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH): a 26-week oral tablet administration of ENADA®/NADH for chronic toxicity study in rats / J.G.D. Birkmayer, K. Nadlinger // *Drugs experimental clinical research.* – 2002. – Vol. 28. – P. 182 – 185.
58. Birkmayer, J.G.D. Stickstoffmonoxid (NO) und seine Wirkungen an Auge, Herz, Hirn und Lunge Univ. Prof. / J.G.D. Birkmayer // *Nutrition press. magazine.* – 2019. – P. 33 – 35.
59. Boman, H.G. Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts / H.G. Boman // *J. Intern. med.* – 2003. – Vol. 254. – P. 197 – 215.
60. Bonello, S. Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappa B site / S. Bonello, C. Zahringer, R.S. BelAiba, T. Djordjevic et al. // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27(4). – P. 755 – 761.
61. Boronat – Catala, M. Salivary and crevicular fluid interleukins in gingivitis / M. Boronat–Catala, M. Catala–Pizarro, J.V. Bagan Sebastian // *J. Clin. Exp. Dent.* – 2014. – Vol. 6(2). – P. 175 – 179.
62. Bouman, A. Sex hormones and the immune response in humans / A. Bouman, M.J. Heineman, M.M. Faas // *Hum. reprod. update.* – 2005. – Vol. 11. – P. 411 – 423.

63. Braun, R.D. Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents / R.D. Braun, J.L. Lanzen, S.A. Snyder, M.W. Dewhirst // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – Vol. 280(6). – P. 2533 – 2544.
64. Chaiyarit, P. Trefoil factors in saliva and gingival tissues of patients with chronic periodontitis / P. Chaiyarit, A. Chayasodom, N. Wara-Aswapati et al. // *J. Periodontol.* – 2012. – Vol. 83(9). – P. 1129 – 1138.
65. Chen, Y. Hypoxia and E. coli LPS-induced periodontal resident cells PAMP expressions: implication for periodontitis pathogenesis / Y. Chen // Ph. D. Dissertation. The University of Hong Kong. 2015. – 23 – 36 p.
66. Choi, H. Hypoxia promotes CEMP1 expression and induces cementoblastic differentiation of human dental stem cells in an HIF-1- dependent manner / H. Choi, H. Jin, J.Y. Kim, K.T. Lim et al. // *Tissue Eng. Part A.* – 2014. – Vol. 20(1–2). – P. 410 – 423.
67. Choudhary, A. Trefoils: an unexplored natural protective shield of oral cavity / A. Choudhary, C.N. Smitha, D.K. Suresh // *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* – 2015. – Vol. 5(3). – P. 226 – 231.
68. Colgan, S.P. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation / S.P. Colgan, C.T. Taylor // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2010. – Vol. 7(5). – P. 281 – 287.
69. Costa, P.P. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes / P.P. Costa, G.L. Trevisan, G.O. Macedo, D.B. Palioto et al. // *The journal of periodontology.* – 2010. – Vol. 81(3). – P. 384 – 391.
70. Dandajena, T.C. Hypoxia triggers a HIF-mediated differentiation of peripheral blood mononuclear cells into osteoclasts / T.C. Dandajena, M.A. Ihnat, B. Disch, J. Thorpe et al. // *Orthod. Craniofac. Res.* – 2012. – Vol. 15(1). – P. 1 – 9.
71. Dehne, N. HIF-1 in the inflammatory microenvironment / N. Dehne, B. Brune // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315(11). – P. 1791 – 1797.

72. Dehne, N. Hypoxia-inducible factor (HIF) in hormone signaling during health and disease / N. Dehne, D. Fuhrmann, B. Brüne // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* – 2013. – Vol. 11(2). – P. 125 – 135.
73. Devlin, R. IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)₂D₃, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures / R. Devlin, S. Reddy, R. Savino et al. // *J. Bone Miner. Res.* – 1998. – Vol. 13. – № 3. – P. 393 – 399.
74. Ding, H. Dimethyloxaloylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential / H. Ding, Y.S. Gao, Y. Wang, C. Hu et al. // *Stem. Cells Dev.* – 2014. – Vol. 23(9). – P. 990 – 1000.
75. Dorschner, R.A. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A. *Streptococcus* / R.A. Dorschner, V.K. Pestoniasp, S. Tamakuwala, T. Ohtake et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2001. – Vol. 117(1). – P. 91 – 97.
76. Duscher, D. Fibroblast specific deletion of hypoxia inducible factor-1 critically impairs murine cutaneous neovascularization and wound healing / D. Duscher, Z.N. Maan, A.J. Whittam, M. Sorkin et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2015. – Vol. 136(5). – P. 1004 – 1013.
77. Dyke Van, T.E., Dave S. Risk factors for periodontitis / T.E. Dyke Van, S. Dave // *J. Int. Acad. Periodontol.* – 2005. – Vol.7. – №1. – P. 3 – 7.
78. Eick, S. Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefevre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis / S. Eick, M. Puklo, K. Adamowicz, T. Kantyka et al. // *Orphanet. J. Rare Dis.* – 2014. – Vol. 9. – P. 148.
79. Eltzschig H.K., Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. // *N Engl J Med.* 2011;364:656–665.
80. Erecinska, M. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia / M. Erecinska, I.A. Silver // *Respir. Physiol.* – 2001. – Vol. 128(3). – P. 263 – 276.

81. Fliesser, M. Hypoxia attenuates anti-*Aspergillus fumigatus* immune responses initiated by human dendritic cells / M. Fliesser, M. Wallstein, O. Kurzai, H. Einsele et al. // *Mycoses*. – 2016. – Vol. 59(8). – P. 503 – 508.
82. Fluck, K. Hypoxia-inducible factor-1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T-cells in murine colitis / K. Fluck, G. Breves, J. Fandrey, S. Wining // *Mucosal Immunol.* – 2016. – Vol. 9(2). – P. 379 – 390.
83. Fong, G.H. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia / G.H. Fong // *Angiogenesis*. – 2008. – Vol. 11(2). – P. 121 – 140.
84. Frede, S. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappa B / S. Frede, C. Stockmann, P. Freitag, J. Fandrey // *Biochem. J.* – 2006. – Vol. 396(3). – P. 517 – 527.
85. Frede, S. Hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha accumulation and HIF target gene expression are impaired after induction of endotoxin tolerance / S. Frede, C. Stockmann, S. Wining, P. Freitag et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182(10). – P. 6470 – 6476.
86. Furuta, G.T. Hypoxia-inducible factor-1 – dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia / G.T. Furuta, J.R. Turner, C.T. Taylor, R.M. Hershberg et al. // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193(9). – P. 1027 – 1034.
87. Gale, D.P. The role of HIF in immunity / D.P. Gale, P.H. Maxwell // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 42(4). – P. 486 – 494.
88. Ghallab N.A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: review of the current evidence. // *Arch Oral Biol.* 2018;87:115–124.
89. Gennaro, R. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides / R. Gennaro, M. Zanetti // *Biopolymers*. – 2000. – Vol. 55. – P. 31 – 49.
90. Golz, L. Hypoxia and *P. gingivalis* synergistically induce HIF-1 and NF-kappa B activation in PDL cells and periodontal diseases / L. Golz, S. Memmert,

- B. Rath–Deschner, A. Jager et al. // *Mediators Inflamm.* – 2015. doi: 10.1155/2015/438085.
91. Golz, L. LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis / L. Golz, S. Memmert, B. Rath–Deschner, A. Jager et al. // *Mediators Inflamm.* – 2014. doi.org/10.1155/2014/986264.
92. Gorr, S.U. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense / S.U. Gorr // *Front. Oral Biology.* – 2012. – Vol. 15. – P. 84 – 98.
93. Graves, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction / D. Graves // *The journal of periodontology.* – 2008. – Vol. 79(8 Suppl). – P. 1585 – 1591.
94. Greer, A. Defensins and LL–37: a review of function in the gingival epithelium / A. Greer, C. Zenobia, R.P. Darveau // *Periodontol.* 2000. – 2013. – Vol. 63(1). – P. 67 – 79.
95. Groeger, S.E. Epithelial barrier and oral bacterial infection / S.E. Groeger, J. Meyle // *Periodontol.* 2000. – 2015. – Vol. 69(1). – P. 46 – 67.
96. Hajishengallis, G. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis / G. Hajishengallis, T. Chavakis, E. Hajishengallis, J.D. Lambris // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – Vol. 98(4). – P. 539 – 548.
97. Hans, M. Toll–like receptors and their dual role in periodontitis: a review / M. Hans, V.M. Hans // *J. Oral. Sci.* – 2011. – Vol. 53(3). – P. 263 – 271.
98. Hans M., Hans V. Epithelial Antimicrobial Peptides: Guardian of the Oral Cavity // *International Journal of Peptides.* -2014. Vol.2014. Article ID 370297. 13 p.
99. Hedgpeth, D.C. Periodontal CD14 mRNA expression is downregulated in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes / D.C. Hedgpeth, X. Zhang, J. Jin, R.S. Leite et al. // *BMC Oral Health.* – 2015. – Vol. 15. – P. 145.
100. Heilborn, J.D. The cathelicidin anti–microbial peptide LL–37 is involved in re–epithelization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium

/ J.D. Heilborn, M.F. Nilsson, G. Kratz, G. Weber et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2003. – Vol. 120(3). – P. 379 – 389.

101. Hernandez, C. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing / C. Hernandez, E. Santamatilde, K.J. McCreath, A.M. Cervera et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 156(2). – P. 262 – 272.

102. Hosokawa, I. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue / I. Hosokawa, Y. Hosokawa, H. Komatsuzawa, R.B. Goncalves et al. // *Clinical and experimental immunology.* – 2006. – Vol. 146(2). – P. 218 – 225.

103. Huang, X. Macrophages play a key role in the obesity induced periodontal innate immune dysfunction via NLRP3 pathway / X. Huang, T. Yu, C. Ma, Y. Wang et al. // *J. Periodontol.* – 2016. – Vol. 23. – P. 1 – 18.

104. Hurtado, P. LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells / P. Hurtado, C.A. Peh // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184(3). – P. 1425 – 1435.

105. Hyun, S.W. Hypoxia induces FoxO3a – mediated dysfunction of blood – brain barrier / S.W. Hyun, Y.S. Jung // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 450(4). – P. 1638 – 1642.

106. Ido, Y. NADH: sensor of blood flow in brain, muscle and other tissues / Y. Ido, K. Chang, T.A. Woosley, J.R. Willimanson // *FASEB.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1419 – 1421.

107. IL6, Interleukin 6 [Homo sapiens (Human)]. IL10, Interleukin 10 [Homo Sapiens (Human)] // Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586>. 2017. [Accessed: 06 February 2020].

108. Inomata, M. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by porphyromonas gingivalis cells and extracts in human gingival fibroblasts / M. Inomata, T. Into, Y. Murakami // *European journal of oral sciences.* – 2010. – Vol. 118(6). – P. 574 – 581.

109. Jantsch, J. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide – induced dendritic cell activation and function / J. Jantsch, D. Chakravorty, N. Turza, A.T. Prechtel et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180(7). – P. 4697 – 4705.
110. Jian, C. Hypoxia augments lipopolysaccharide – induced cytokine expression in periodontal ligament cells / C. Jian, C. Li, Y. Ren, Y. He et al. // *Inflammation.* – 2014. – Vol. 37(5). – P. 1413 – 1423.
111. Jin, S.H. TLR4 polymorphism and periodontitis susceptibility: A meta-analysis / S.H. Jin, X.Y. Guan, W.H. Liang, G.H. Bai et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2016. – Vol. 95(36). – P. 4845.
112. Jovanovic, D.V. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages / D.V. Jovanovic, J.A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F.C. Jolicoeur et al. // *Journal of Immunology.* – 1998. – Vol. 160(7). – P. 3513 – 3521.
113. Karhausen J., Haase V.H., Colgan S.P. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. // *Cell Cycle.* 2005;4:256–258
114. Katayama, K. Hypoxia attenuates cardiopulmonary reflex control of sympathetic nerve activity during mild dynamic leg exercise / K. Katayama, K. Ishida, M. Saito, T. Koike et al. // *Exp. Physiol.* – 2016. 101(3). 377 – 386.
115. Kejriwal, S. Estimation of levels of salivary mucin, amylase and total protein in gingivitis and chronic periodontitis patients / S. Kejriwal, R. Bhandary, B. Thomas, S. Kumari // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2014. – Vol. 8(10). – P. 56 – 60.
116. Kim, J.W. HIF-1 – mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia / J.W. Kim, I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, C.V. Dang // *Cell. Metab.* – 2006. – Vol. 3(3). – P. 177 – 185.
117. Kim, Y.S. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E2 by hypoxia-inducible factor-1alpha up-regulation in human periodontal ligament cells / Y.S. Kim, S.I. Shin, K.L. Kang, J.H. Chung et al. // *J. Periodontal Res.* – 2012. – Vol. 47(6). – P. 719 – 728.

118. Kojima, H. Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1 alpha-deficient chimeric mice / H. Kojima, H. Gu, S. Nomura, C.C. Caldwell et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99(4). – P. 2170 – 2174.
119. Kojima, H. Differentiation stage-specific requirement in hypoxia-inducible factor-1alpha – regulated glycolytic pathway during murine B-cell development in bone marrow / H. Kojima, A. Kobayashi, D. Sakurai, Y. Kanno et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184(1). – P. 154 – 163.
120. Kong, T. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1 – dependent induction of beta 2 integrin gene expression / T. Kong, H.K. Eltzschig, J. Karhausen, S.P. Colgan et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101(28). – P. 10440 – 10445.
121. Kuhn, D.M. Reduced nicotinamide nucleotides prevent nitration of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite / D.M. Kuhn, T.J. Geddes // *Brain Res.* – 2002. – Vol. 933(1). – P. 85 – 89.
122. Lall, H. HIF-1alpha protein is an essential factor for protection of myeloid cells against LPS-induced depletion of ATP and apoptosis that supports toll-like receptor 4 – mediated production of IL-6 / H. Lall, K. Coughlan, V.V. Sumbayev // *Mol. Immunol.* – 2008. – Vol. 45(11). – P. 3045 – 3049.
123. Lee PHA, Ohtake T, Zaiou M et al. Expression of an additional cathelicidin antimicrobial peptide protects against bacterial skin infection. *PNAS*, 2005; 102: 37503755.
124. Li, J.P. Differential expression of toll – like receptor 4 in healthy and diseased human gingiva / J.P. Li, Y. Chen, C.H. Ng, M.L. Fung et al. // *J. Periodontal. Res.* – 2014. – Vol. 49(6). – P. 845 – 854.
125. Li, J.P. Lipopolysaccharide and hypoxia-induced HIF – 1 activation in human gingival fibroblasts / J.P. Li, F.Y. Li, A. Xu, B. Cheng et al. // *J. Periodontol.* – 2012. – Vol. 83(6). – P. 816 – 824.

126. Li, W. Association of common variants in MMPs with periodontitis risk / W. Li, Y. Zhu, P. Singh, D.H. Ajmera et al. // *Dis. Markers*. – 2016. doi: 10.1155/2016/1545974.
127. Li, X. Enhancement of glucose metabolism via PGC-1 α participates in the cardioprotection of chronic intermittent hypobaric hypoxia / X. Li, Y. Liu, H. Ma, Y. Guan et al. // *Front. Physiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 219.
128. Lin, Y. The protective effect of HIF-1 α in T-lymphocytes on cardiac damage in diabetic mice / Y. Lin, Y. Tang, F. Wang // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2016. – Vol. 46(1). – P. 32 – 43.
129. Ling, M.R. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis / M.R. Ling, I.L. Chapple, J.B. Matthews // *Innate Immunity*. – 2015. – Vol. 21(7). – P. 714 – 725.
130. Liu, D. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction / D. Liu, J.K. Xu, L. Figliomeni, L. Huang et al. // *International journal of molecular medicine*. – 2003. – Vol. 11(1). – P. 17 – 21.
131. Liu, Y.C. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles / Y.C. Liu, U.H. Lerner, Y.T. Teng // *Periodontology 2000*. – 2010. – Vol. 52(1). – P. 163 – 206.
132. Mahanonda, R. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease / R. Mahanonda, S. Pichyangkul // *Periodontol. 2000*. – 2007. – Vol. 43. – P. 41 – 55.
133. Mamalis, A.A. The therapeutic potential of oxygen tension manipulation via hypoxia inducible factors and mimicking agents in guided bone regeneration. A review / A.A. Mamalis, D.L. Cochran // *Arch. Oral. Biol.* – 2011. – Vol. 56(12). – P. 1466 – 1475.
134. Mancino, A. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions / A. Mancino, T. Schioppa, P. Larghi, F. Pasqualini et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 112(9). – P. 3723 – 3734.

135. Massena, S. Identification and characterization of VEGF-A – responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans / S. Massena, G. Christoffersson, E. Vagesjo, C. Seignez et al. // *Blood*. – 2015. – Vol. 126(17). – P. 2016 – 2026.
136. Mattern, C.Ph.D. Zur entwicklung von stabilen arzneiformen des coenzym NADH für die perorale und parenterale applikation / C.Ph.D. Mattern // *Dissertation Humboldt Universität. Berlin*. – 1996.
137. McDonald, P.C. Overcoming hypoxia-mediated tumor progression: combinatorial approaches targeting pH regulation, angiogenesis and immune dysfunction / P.C. McDonald, S.C. Chafe, S. Dedhar // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 4. – P. 27.
138. Meng, X. The cytoprotection of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by the mitochondrial regulation mechanism / X. Meng, J.R. Hang, S.S.C. J. Hui // *Tumor marker oncol.* – 1998. – Vol. 17. – P. 167 – 174.
139. Mettraux G.R. Oxygen Tension (pO₂) in Untreated Human Periodontal Pockets. // *Journal of Periodontology*. 1984. 55(9):516-21.
140. Mona, D. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity / D. Mona, R.M. White, T. Tesfaldet et al. // *Journal of leukocyte biology*. – 2010. – Vol. 1. – P. 231 – 245.
141. Motohira H, Hayashi J, Tatsumi J, Tajima M, Sakagami H, Shin K. Hypoxia and reoxygenation augment bone-resorbing factor production from human periodontal ligament cells. // *J Periodontol*. 2007;78:1803–1809.
142. Mori, G. Alteration of activity and survival of osteoblasts obtained from human periodontitis patients: role of TRAIL / G. Mori, G. Brunetti, S. Colucci, F. Ciccolella et al. // *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. – 2007. – Vol. 21(3–4). – P. 105 – 114.
143. Morizane, S. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands / S. Morizane, K. Yamasaki, B. Mühleisen, P.F. Kotol et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2012. – Vol. 132(1). – P. 135 – 143.

144. Nadlinger, K. Influence of reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) on the production of Interleukin-6 by peripheral human blood leucocytes / K. Nadlinger, J. Birkmayer, F. Gebauer, R. Kunze // *Neuroimmunomodulation*. – 2002. – Vol. 9. – P. 203 – 208.
145. Ng, K.T. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human periodontal tissue / K.T. Ng, J.P. Li, K.M. Ng, G.L. Tipoe et al. // *J. Periodontol.* – 2011. – Vol. 82(1). – P. 136 – 141.
146. Ng, S.K.S. A community study on the relationship between stress, coping, affective dispositions and periodontal attachment loss / S.K.S. Ng, W.K. Leung // *Community Dent. Oral. Epidemiol.* – 2006. – Vol. 34(4). – P. 252 – 266.
147. Nibali, L. Interleukin-6 in oral diseases: a review / L. Nibali, S. Fedele, F. D'Aiuto, N. Donos // *Oral Diseases*. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 236 – 243.
148. Nizet, V. Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection / V. Nizet, R.L. Gallo // *Scandinavian journal of infectious diseases*. – 2003. – Vol. 35. – N. 9. – P. 670 – 676.
149. O'Neill, L.A. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function / L.A. O'Neill, E.J. Pearce // *J. Exp. Med.* – 2016. – Vol. 213(1). – P. 15 – 23.
150. Ostaff, M.J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology / M.J. Ostaff, E.F. Stange, J. Wehkamp // *EMBO Mol. Med.* – 2013. – Vol. 5(10). – P. 1465 – 1483.
151. Ouhara K., H. Komatsuzawa, S. Yamada et al. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. -2005. vol. 55, no. 6, pp. 888–896.
152. Ozcan, E. Non-surgical periodontal therapy reduces saliva adipokines and matrix metalloproteinases levels in periodontitis / E. Ozcan, N.I. Saygun, M.A. Serdar, V.U. Bengi et al. // *J. Periodontol.* – 2016. – Vol. 87(8). – P. 934 – 943.

153. Papandreou, I. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption / I. Papandreou, R.A. Cairns, L. Fontana, A.L. Lim et al. // *Cell. Metab.* – 2006. – Vol. 3. – P. 187 – 197.
154. Park, H.J. Hypoxia inducible factor-1 α directly induces the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in periodontal ligament fibroblasts / H.J. Park, K.H. Baek, H.L. Lee, A. Kwon et al. // *Mol. Cells.* – 2011. – Vol. 31(6). – P. 573 – 578.
155. Peyssonnaud, C. HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes / C. Peyssonnaud, V. Datta, T. Cramer, A. Doedens et al. // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115(7). – P. 1806 – 1815.
156. Phan, A.T. Hypoxia-inducible factors regulate T-cell metabolism and function / A.T. Phan, A.W. Goldrath // *Mol. Immunol.* – 2015. – Vol. 68(2 Pt C). – P. 527 – 535.
157. Peyssonnaud C, Boutin AT, Zinkernagel AS, Datta V, Nizet V, Johnson RS. Critical role of HIF-1 α in keratinocyte defense against bacterial infection. // *J Invest Dermatol.* 2008;128(8):1964–8.
158. Pirim, G.E. IL-6 and IL-10 gene polymorphisms in patients with aggressive periodontitis: effects on GCF, serum and clinic parameters / G.E. Pirim, H. Toker, E.M. Korkmaz et al. // *Braz. Oral Res.* – 2017. – Vol. 31. – P. 12.
159. Piruat, J.I. Oxygen tension regulates mitochondrial DNA-encoded complex I gene expression / J.I. Piruat, J. López-Barneo // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280(52). – P. 42676 – 42684.
160. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. // *J Periodontol.* 2007; 78: 1783–1787.
161. Pradeep AR, Prapulla DV, Sharma A, Sujatha PB. Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment. // *Cytokine.* 2011; 54: 200–204.
162. Pugh, C.W. Modulation of the hypoxic response / C.W. Pugh // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 903. – P. 259 – 271.

163. Pumklin, J. Hypoxia enhances the effect of lipopolysaccharide stimulated IL-1 β expression in human periodontal ligament cells / J. Pumklin, K. Bhalang, P. Pavasant // *Odontology*. – 2016. – Vol. 104(3). – P. 338 – 346.
164. Ramakrishnan, S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation / S. Ramakrishnan, V. Anand, S. Roy // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2014. – Vol. 9(2). – P. 142 – 160.
165. Ramanathan, B. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity / B. Ramanathan, E.G. Davis, C.R. Ross, F. Blecha // *Microbes and infection*. – 2002. – Vol. 4. – N. 3. – P. 361 – 372.
166. Reibnegger, G. The antioxidative capacity of ENADA[®]-NADH in humans / G. Reibnegger, J. Greilberger, G. Juergens, K. Oetl // *J. tumor marker oncol.* – 2003. – Vol. 18. – P. 37 – 41.
167. Rius, J. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α / J. Rius, M. Guma, C. Schachtrup, K. Akassoglou et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 453(7196). – P. 807 – 811.
168. Salminen, A. Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis / A. Salminen, U.K. Gursoy, S. Paju, K. Hyvärinen et al. // *J. Clin. Periodontol.* – 2014. – Vol. 41(5). – P. 442 – 450.
169. Sanchez, G.A. Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status / G.A. Sanchez, V.A. Miozza, A. Delgado, L. Busch // *Oral. Dis.* – 2013. – Vol. 19(6). – P. 585 – 591.
170. Sandgren, S. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid in nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis / S. Sandgren, A. Wittrup, F. Cheng, M. Jönsson et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279(17). – P. 17951– 17956.
171. Satoh, M.S. NAD⁺ dependent repair of damaged DNA by human cell extracts / M.S. Satoh, G.G. Pirier, T. Lindahl // *Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268(8). – P. 5480 – 5487.

172. Scott, D.A. Neutrophils in periodontal inflammation / D.A. Scott, J. Krauss // *Frontiers of oral biology*. – 2012. – Vol. 15. – P. 56 – 83.
173. Semba, H. HIF-1 α – PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity / H. Semba, N. Takeda, T. Isagawa, Y. Sugiura et al. // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 11635.
174. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology / G.L. Semenza // *Trends Mol. Med.* – 2001. – Vol. 7(8). – P. 345 – 350.
175. Semenza, G.L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology / G.L. Semenza // *Annu Rev. Pathol.* – 2014. – Vol. 9. – P. 47 – 71.
176. Shengwei, H. Crosstalk between the HIF-1 and Toll-like receptor/nuclear factor- κ B pathways in the oral squamous cell carcinoma microenvironment / H. Shengwei, X. Wenguang, W. Zhiyong, Q. Xiaofeng et al. // *Oncotarget*. – 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9329.
177. Sitkovsky, M. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 α and adenosine receptors / M. Sitkovsky, D. Lukashev // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5(9). – P. 712 – 721.
178. Shi Q-Y, Huang S-G, Zeng J-H, X-G. Expression of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor-C in human chronic periodontitis. // *J Dent Sci*. 2015;10:323–333.
179. Song, Z.C. Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 α pathway / Z.C. Song, W. Zhou, R. Shu, J. Ni // *Cell. Prolif.* – 2012. – Vol. 45(3). – P. 239 – 248.
180. Tanaka M, Hanioka T, Takaya K, Shizukuishi S. Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation. // *J Periodontol*. 1998;69:1127–1130
181. Teppo, S. The hypoxic tumor microenvironment regulates invasion of aggressive oral carcinoma cells / S. Teppo, E. Sundquist, M. Vered, H. Holappa et al. // *Exp. Cell. Res.* – 2013. – Vol. 319(4). – P. 376 – 389.

182. Theoleyre, S. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling / S. Theoleyre, Y. Wittrant, S.K. Tat, Y. Fortun et al. // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2004. – Vol. 15(6). – P. 457 – 475.
183. Tong, C. Hypoxia pretreatment of bone marrow derived mesenchymal stem cells seeded in a collagen – chitosan sponge scaffold promotes skin wound healing in diabetic rats with hind limb ischemia / C. Tong, H. Hao, L. Xia, J. Liu et al. // *Wound Repair Regen*. – 2016. – Vol. 24(1). – P. 45 – 56.
184. Turkoglu, O. Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis / O. Turkoglu, G. Emingil, N. Kutukculer, G. Atilla // *J. Periodontol*. – 2009. – Vol. 80(6). – P. 969 – 976.
185. Uden, P. Regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha by NF-kappaB / P. Uden, N.S. Kenneth, S. Rocha // *Biochem. J*. – 2008. – Vol. 412(3). – P. 477 – 484.
186. Uriarte, S.M. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence / S.M. Uriarte, J.S. Edmisson, E. Jimenez-Flores // *Immunological reviews*. – 2016. – Vol. 273(1). – P. 282 – 298.
187. Vasconcelos, R.C. Immunoexpression of HIF-1alpha and VEGF in periodontal disease and healthy gingival tissues / R.C. Vasconcelos, L. Costa Ade, A. Freitas Rde, B.A. Bezerra et al. // *Braz. Dent. J*. – 2016. – Vol. 27(2). – P. 117 – 122.
188. Walmsley, S.R. Hypoxia induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha – dependent NF-kappa B activity / S.R. Walmsley, C. Print, N. Farahi, C. Peyssonnaud et al. // *J. Ex.p Med*. – 2005. – Vol. 201(1). – P. 105 – 115.
189. Walmsley, S.R. The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation / S.R. Walmsley, K.A. Cadwallader, E.R. Chilvers // *Trends Immunol*. – 2005. – Vol. 26(8). – P. 434 – 439.

190. Wang J., Qi J., Zhao H. et al. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease // *Scientific Reports*. - 2013. - Vol. 31843. - P. 168-174.
191. Ward, J.P. Oxygen sensors in context / J.P. Ward // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – Vol. 1777(1). – P. 1 – 14.
192. Wu, D. Hypoxia-induced microRNA-301b regulates apoptosis by targeting Bim in lung cancer / D. Wu, B. Chen, F. Cui, X. He et al. // *Cell. Prolif.* – 2016. – Vol. 49(4). – P. 476 – 483.
193. Wu, Y. Effects of vascular endothelial cells on osteogenic differentiation of noncontact co-cultured periodontal ligament stem cells under hypoxia / Y. Wu, H. Cao, Y. Yang, Y. Zhou et al. // *J. Periodontal Res.* – 2013a. – Vol. 48(1). – P. 52 – 65.
194. Wu, Y. The osteogenic differentiation of PDLSCs is mediated through MEK/ERK and p38 MAPK signalling under hypoxia / Y. Wu, Y. Yang, P. Yang, Y. Gu et al. // *Arch. Oral. Biol.* – 2013. – Vol. 58(10). – P. 1357 – 1368.
195. Yang, D. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense / D. Yang, A. Biragyn, D.M. Hoover, J. Lubkowski // *Annual review of immunology*. – 2004. – Vol. 22. – P. 181 – 215.
196. Yeramian, A. Nuclear factor-kappa B2/p100 promotes endometrial carcinoma cell survival under hypoxia in a HIF-1alpha independent manner / A. Yeramian, M. Santacana, A. Sorolla, D. Llobet et al. // *Lab. Invest.* – 2011. – Vol. 91(6). – P. 859 – 871.
197. Yu, D.Y. Retinal degeneration and local oxygen metabolism / D.Y. Yu, S.J. Cringle // *Exp. Eye Res.* – 2005. – Vol. 80(6). – P. 745 – 751.
198. Yu, X.J. Effect of hypoxia on the expression of RANKL/OPG in human periodontal ligament cells in vitro / X.J. Yu, C.J. Xiao, Y.M. Du, S. Liu et al. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8(10). – P. 12929 – 12935.
199. Yuan, C. Co-culture of stem cells from apical papilla and human umbilical vein endothelial cell under hypoxia increases the formation of three – dimensional

- vessel-like structures in vitro / C. Yuan, P. Wang, L. Zhu, W.L. Dissanayaka et al. // *Tissue Eng. Part A*. – 2015. – Vol. 21(5–6). – P. 1163 – 1172.
200. Zanetti, M. Structure and biology of cathelicidins / M. Zanetti, R. Gennaro, M. Scocchi, B. Skerlavaj // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2000. – Vol. 479. – P. 203 – 218.
201. Zarembek, K.A. HIF-1 α : a master regulator of innate host defenses? / K.A. Zarembek, H.L. Malech // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 1702 – 1704.
202. Zhang, J.R. The reduced coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) repairs DNA damage of PC12 cells induced by doxorubicin / J.R. Zhang, K. Vrecko, K. Nadlinger, D. Storga et al. // *Tumor marker oncol.* – 1998. – Vol. 13. – P. 5 – 17.
203. Zhang, Y. Application of HIF-1 α by gene therapy enhances angiogenesis and osteogenesis in alveolar bone defect regeneration / Y. Zhang, J. Huang, C. Wang, C. Hu et al. // *J. Gene Med.* – 2016. – Vol. 18(4–6). – P. 57 – 64.
204. Zhao, L. Coculture with endothelial cells enhances osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via cyclooxygenase-2/prostaglandin E2/vascular endothelial growth factor signaling under hypoxia / L. Zhao, Y. Wu, L. Tan, Z. Xu et al. // *J. Periodontol.* – 2013. – Vol. 84(12). – P. 1847 – 1857.
205. Zhou, X. Hypoxia induces mucin expression and secretion in human bronchial epithelial cells / X. Zhou, J. Tu, Q. Li, V.P. Kolosov et al. // *Transl. Res.* – 2012. – Vol. 160(6). – P. 419 – 427.
206. Zhu, H. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes / H. Zhu, H.F. Bunn // *Respir. Physiol.* – 1999. – Vol. 115(2). – P. 239 – 247.
207. Zhu, T. Effects of dimethyloxalylglycine on wound healing of palatal mucosa in a rat model / T. Zhu, H.C. Park, K.M. Son, H.C. Yang // *BMC Oral Health*. – 2015. – Vol. 15. – P. 60.