

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Лукова О.А.¹, Заславская М.И.¹, Махрова Т.В.¹, Кропотов В.С.¹, Китаева Е.В.²

ЭКСПРЕССИЯ TOLL-ПОДОБНЫХ И АДГЕЗИВНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ РТА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия;

²ООО «Клиника современной стоматологии», 603155, Нижний Новгород, Россия

Экспрессия toll-подобных и адгезивных рецепторов на эпителиальных клетках слизистой рта меняется при различных патологических состояниях, как местного, так и системного уровня, в частности, при хроническом пародонтите. Длительное присутствие пародонтопатогенных микроорганизмов в десневой борозде стимулирует и поддерживает воспалительный процесс. Взаимодействие пародонтопатогенов с эпителиальными клетками слизистых оболочек рта является первым этапом развития пародонтита. Патологический процесс влияет на функции эпителиоцитов, в частности на их способность взаимодействовать с представителями микробиоценоза. Поэтому, естественная колонизация нормальной микробиоты полости рта на буккальных клетках, отражающая способность эпителиоцитов к микробной адгезии, является чувствительным индикатором различных дестабилизирующих процессов. Определение уровня экспрессии toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 на эпителиоцитах также позволяет оценить функциональное состояние клеток и выраженность воспалительного процесса на уровне слизистых полости рта, в частности, при хроническом пародонтите. В данной работе исследовали рецептор-зависимые реакции буккальных эпителиоцитов при хроническом пародонтите методом проточной цитофлуориметрии и путем определения уровня естественной (микробной) колонизации. Также авторами проведено сравнение этих способов определения функционального состояния мукозальных клеток при хроническом пародонтите. Результаты показали, что у пациентов с пародонтитом активность рецепторов, участвующих в адгезивных реакциях с микробиотой полости рта менялась незначительно и была несколько выше, чем у здоровых доноров. В то же время, экспрессия TLRs на эпителиальных клетках при пародонтите менялась существенно. Так, процент клеток, экспрессирующих TLR2 достоверно увеличился, а TLR4 – уменьшился. Одновременно, при патологии полости рта значительно возросла процент мукозальных клеток, не имеющих TLRs. Таким образом, исследование экспрессии TLR2- и TLR4- на буккальных эпителиоцитах является более показательным тестом в оценке выраженности воспалительного процесса при хроническом пародонтите, чем определение уровня естественной колонизации.

Ключевые слова: toll-подобные рецепторы; TLRs; естественная микробная колонизация, буккальные эпителиоциты; пародонтит.

Для цитирования: Лукова О.А., Заславская М.И., Махрова Т.В., Кропотов В.С., Китаева Е.В. Экспрессия toll-подобных и адгезивных рецепторов на эпителиальных клетках слизистой рта при пародонтите. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 645-648. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-645-648>

Lukova O.A.¹, Zaslavskaya M.I.¹, Makhrova T.V.¹, Kropotov V.S.¹, Kitaeva E.V.²

EXPRESSION OF TOLL-LIKE AND ADHESIVE RECEPTORS ON EPITHELIAL CELLS OF THE ORAL MUCOSA IN PERIODONTITIS

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

²«Clinic of Modern Dentistry», 603155, Nizhny Novgorod, Russia

The expression of toll-like and adhesive receptors on epithelial cells of the oral mucosa changes in different pathological conditions, both local and systemic levels, in particular, in chronic periodontitis. The long-term presence of periodontal pathogenic microorganisms in the gingival furrow stimulates and supports the inflammatory process. The interaction of periodontal pathogens with epithelial cells of the oral mucosa is the first stage of the development of periodontitis. The pathological process affects the function of epithelial cells, in particular their ability to interact with representatives of microbiocenosis. Therefore, the natural colonization of normal oral microbiota on buccal epitheliocytes, reflecting the ability of epithelial cells to microbial adhesion, is a sensitive indicator of various destabilizing processes. Determining the level of expression of toll-like TLR2 and TLR4 receptors on epithelial cells also allows us to assess the functional state of cells and the severity of the inflammatory process at the level of the oral mucosa, in particular, in chronic periodontitis. In this paper, we studied the receptor-dependent reactions of buccal epithelial cells in chronic periodontitis using flow cytometry and by determining the level of natural (microbial) colonization. The authors also compared these methods for determining the functional state of mucosal cells in chronic periodontitis. The results showed that in patients with periodontitis, the activity of receptors involved in adhesive reactions with the oral microbiota changed slightly and was little higher than in healthy donors. At the same time, the expression of TLRs on epithelial cells in periodontitis changed significantly. Thus, the percentage of cells expressing TLR2 significantly increased, while TLR4 decreased. Concurrently, the percentage of mucosal cells that do not have TLRs increased significantly in oral pathology. Thus, the study of TLR2 – and TLR4-expression on buccal epithelial cells is a more representative test in assessing the severity of the inflammatory process in chronic periodontitis than determining the level of natural colonization.

Key words: toll-like receptors; TLRs natural microbial colonization; buccal epithelial cells; periodontitis.

For citation: Lukova O.A., Zaslavskaya M.I., Makhrova T.V., Kropotov V.S., Kitaeva E.V. Expression of toll-like and adhesive receptors on epithelial cells of the oral mucosa in periodontitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 645-648 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-645-648>

For correspondence: Lukova O.A., PhD, senior lecturer, Department of epidemiology, Microbiology and evidence-based medicine; e-mail: olga_domracheva@bk.ru

Information about authors:

Lukova O. A., <https://orcid.org/0000-0001-7552-9994>;
Zaslavskaya M.I., <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>;
Makhrova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-6469-8987>;
Kropotov V.S., <https://orcid.org/0000-0002-6903-962X>;
Kitaeva E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6704-1825>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 18.06.2020
Accepted 23.06.2020

Введение. Болезни пародонта широко представлены среди воспалительных заболеваний полости рта [1,2]. Известно, что пародонтит – заболевание воспалительно-деструктивного характера [2]. Длительное присутствие пародонтопатогенных микроорганизмов в десневой борозде стимулирует и поддерживает воспалительный процесс. При этом вовлекаются клеточные и гуморальные факторы иммунитета, что способствует разрушению эпителия и соединительнотканной структуры пародонта, а также усиливает резорбцию костной ткани [3,4].

Взаимодействие пародонтопатогенов с эпителиальными клетками слизистых оболочек рта является первым этапом развития пародонтита [2]. Развитие патологического процесса влияет на функции эпителиоцитов [5], в частности, на их способность взаимодействовать с представителями микробиоценоза. Поэтому, естественная колонизация нормальной микробиоты полости рта на буккальных клетках, отражающая способность эпителиоцитов к микробной адгезии, является чувствительным индикатором различных патологических состояний, как местного, так и системного уровня, в частности, при хроническом пародонтите [6].

Способность эпителиоцитов распознавать молекулярные структуры патогенов осуществляется особым классом клеточных рецепторов – toll-подобными рецепторами (TLRs) [7,8]. Различные варианты TLRs нацелены на распознавание определенных молекулярных мотивов – PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) бактериального, грибкового, вирусного или иного происхождения [9]. При этом для эпителиоцитов слизистых оболочек наиболее значимую роль играют TLR2 и TLR4 [10,11].

В зависимости от типа и продолжительности TLR-зависимого воздействия микробных компонентов на эпителиоциты, наблюдается различный спектр и уровень продукции медиаторов воспаления, что определяет характер и интенсивность TLR- опосредуемого иммунного ответа [12,13].

Наличие toll-подобных рецепторов и их генов у клеток слизистых оболочек можно оценивать при помощи различных методов, например, иммуногистохимии и ПЦР [5]. Для выполнения настоящей работы нами был разработан оригинальный способ оценки экспрессии TLRs на поверхности буккальных эпителиоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Цель исследования – сравнительная оценка рецептор-зависимых реакций буккальных эпителиоцитов при

пародонтите, основанная на определении способности мукозальных клеток к экспрессии toll-подобных рецепторов (TLR2 и TLR4) и уровня адгезии нормальной микробиоты (естественная колонизация) полости рта.

Материал и методы. Исследовали буккальные эпителиоциты, полученные от здоровых некурящих доноров ($n=14$) и больных пародонтитом ($n=15$) (мужчины и женщины 21-38 лет). Клетки собирали с внутренней поверхности щеки с утра, натошак, дважды отмывали (40g, 5 мин) забуференным физиологическим раствором (ЗФР) и подготавливали взвесь с концентрацией 10^8 кл/мл. Концентрацию эпителиоцитов определяли на денситометре DEN-1 (ООО «Biosan», Латвия) путем измерения оптической плотности суспензии.

Уровень естественной (микробной) колонизации оценивали путем подсчета количества бактериальных клеток, адгезированных на эпителиоците. Мазки готовили из взвеси буккальных эпителиоцитов, фиксировали метанолом (10 мин) и окрашивали 0,25% водным раствором азура А (“Sigma”, США). Индекс естественной колонизации оценивали по числу бактериальных клеток в пересчете на один эпителиоцит (бакт/эп). Учитывали средний уровень микробной колонизации после подсчета 100 эпителиоцитов.

Жизнеспособность и уровень экспрессии toll-подобных рецепторов буккальных эпителиоцитов определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II SystemwithFluidicsCart (6-color, blue/red, USA) по собственной оригинальной методике [14].

Эксперименты каждой серии ставили в трех повторениях. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы FacsDiva 4.1. и вычисляли в процентах, как отношение числа буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR2 и/или TLR4 к общему количеству жизнеспособных клеток в популяции.

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерных программ Stadia и Excel. Определяли среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего арифметического (m). Применяли критерий Стьюдента, статистически достоверными различиями между выборками считали уровень значимости $p < 0,05$. Если распределение данных в выборках не могло характеризоваться как нормальное, использовали критерий Манна-Уитни и рассчитывали медиану показателя (Me). Силу корреляционной связи определяли по значению коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s): ни-

Процент эпителиальных клеток в популяции, способных к экспрессии TLR2, TLR4 среди здоровых людей и при пародонтите полости рта

Показатели Субпопуляции эпителиоцитов	Доля субпопуляции клеток в общей популяции эпителиоцитов, %		Кратность изменения субпопуляции клеток (количество раз)
	Здоровые доноры (контроль)	Пациенты с пародонтитом	
TLR2- субпопуляция: общее количество клеток, способных экспрессировать TLR2	11,8 ± 5,2	29,3 ± 10,3* ↑	2,5 ± 0,2*↑
TLR4- субпопуляция: общее количество клеток, способных экспрессировать TLR4	75,6 ± 15,5	54,1 ± 17,3* ↓	1,4 ± 0,1*↓
TLR2/4-негативные клетки	24,1 ± 4,1	44,0 ± 4,7* ↑	1,8 ± 0,2*↑

Примечание. * - достоверность различий относительно здоровых доноров ($p < 0,05$). ↑ – увеличение показателя относительно здоровых доноров, ↓ – снижение показателя относительно здоровых доноров.

же 0,3 считали слабой, от 0,3 до 0,7 – средней и от 0,7 до 1,0 – сильной.

Результаты. Жизнеспособность эпителиальных клеток полости рта, полученных от больных с воспалением пародонта, не отличалась от соответствующего показателя у здоровых людей. Так, процент живых клеток в пуле мукозальных эпителиоцитов у больных с пародонтитом составлял $99,7 \pm 0,2$, а у здоровых пациентов – $99,1 \pm 0,5$ ($p > 0,05$).

Уровень естественной колонизации буккальных эпителиоцитов при пародонтите составлял $36,4 \pm 27,1$ бакт/эп, что было несколько больше, чем у здоровых людей – $14,3 \pm 8,9$ бакт/эп ($p > 0,05$). При этом медиана показателя естественной колонизации у больных соответственно выше, чем у здоровых ($Me = 31,7$ и $Me = 15,3$).

На следующем этапе исследовали экспрессию TLR2 и TLR4 на поверхности буккальных эпителиоцитов, которую оценивали только среди жизнеспособных клеток пула. В общей популяции эпителиоцитов определяли процент (долю) клеток, принадлежащих к следующим субпопуляциям:

- 1) экспрессирующие только TLR2;
- 2) экспрессирующие только TLR4;
- 3) экспрессирующие одновременно TLR2 и TLR4 (TLR2/4-позитивные клетки);
- 4) TLR2-субпопуляция/TLR2-позитивные клетки – общее количество клеток, способных экспрессировать TLR2 (сумма субпопуляций 1 и 3);
- 5) TLR4-субпопуляция/TLR4-позитивные клетки – общее количество клеток, способных экспрессировать TLR4 (сумма субпопуляций 2 и 3);
- 6) TLR2/4-негативные клетки – группа клеток, не экспрессирующие ни одного вышеуказанного рецептора.

Было отмечено, что на фоне патологического процесса – хронического пародонтита – наблюдали значительные изменения уровня экспрессии TLR2 и TLR4 среди эпителиоцитов, при этом сдвиг в субпопуляции TLR2-позитивных эпителиоцитов был наиболее выражен. Среди здоровых доноров процент буккальных эпителиоцитов, имеющих TLR2, был небольшим: чуть более, чем 1/10 от общей популяции, а процент эпителиоцитов, способных экспрессировать TLR4 был изначально довольно высок – более 3/4 популяции.

Количество эпителиоцитов, экспрессирующих TLR2 у больных с хроническим пародонтитом увеличивалось в $2,5 \pm 0,2$ ($p < 0,05$), а TLR4 – уменьшалось в $1,4 \pm 0,1$ раза ($p < 0,05$). Также увеличивалось общее число клеток, не экспрессирующих ни один из указанных рецепторов в $1,8 \pm 0,2$ раза ($p < 0,05$) (см. таблицу). Анализ данных показал отсутствие корреляции между изменениями в активности адгезивного рецепторного аппарата эпите-

лиоцитов (уровень естественной колонизации) и изменениями экспрессии TLR2 и TLR4 на буккальных клетках при пародонтите ($r = 0,22$ и $r_s = -0,17$ соответственно).

Обсуждение. При расчете показателя центральной тенденции – медианы – было выявлено, что воспаление пародонта усиливает адгезивные свойства эпителия полости рта, что выражается в повышении уровня естественной микробной колонизации буккальных клеток у большинства пациентов ($p > 0,05$). В то же время, способность мукозальных эпителиоцитов экспрессировать TLR2 и TLR4 при пародонтите изменялась очень существенно: достоверно увеличивалось количество TLR2-позитивных клеток ($p < 0,05$) и снижалось количество TLR4-позитивных клеток в популяции ($p < 0,05$). При этом, изменения адгезивной активности эпителиальных клеток и их способности к экспрессии различных TLRs не имели корреляции.

Изменение уровня экспрессии TLR2 и TLR4 на клетках могло быть, предположительно, связано со следующими событиями. В норме, у эпителиальных клеток полости рта сравнительно низкая экспрессия гена, ответственного за синтез TLR2. При пародонтите, медиаторы воспаления и антигены пародонтопатогенных микроорганизмов активируют эпителиальные клетки, что вызывает усиление экспрессии TLR2 и соответствующее увеличение общего числа TLR2-позитивных эпителиоцитов. В то же время, экспрессия гена TLR4 у мукозальных эпителиоцитов, в норме, довольно высока. Дополнительная стимуляция клеток в ходе воспаления может привести к синтезу избыточного количества рецепторов и их последующего шеддинга (сбрасывания) с поверхности клеток, что характеризуется в уменьшении процента TLR4 – позитивных эпителиоцитов в популяции. Таким образом, изменение пейзажа TLR2 и TLR4 на поверхности клеток является отражением способности клетки отвечать на стимулы. На потерю мембранных рецепторов TLRs эпителиоцитами при пародонтите указывает также и то, что количество TLR2/4-негативных клеток (не способных экспрессировать данные TLRs) резко увеличивается при патологии, причем за счет субпопуляций, ранее способных к экспрессии данных рецепторов. Это показывает, что при воспалении возрастает пул «функционально старых» (ареактивных) клеток, не способных более отвечать на стимулы. Таким образом, исследование эпителиоцитов, экспрессирующих TLR2 и/или TLR4 позволяет оценить функциональное состояние клеток слизистых оболочек, а также влияние на них воспалительного процесса, в частности при хроническом пародонтите.

Таким, образом, было проведено сравнение двух способов оценки функционального состояния мукозальных

клеток при хроническом пародонтите. Было отмечено, что, по данным исследования естественной колонизации, изменение активности адгезивного аппарата эпителиоцитов, участвующего в рецептор-зависимых взаимодействиях с нормальной микробиотой, было незначительным ($p>0,05$), хотя и имело тенденцию к увеличению. В то же время, изменение экспрессии TLR-2 и TLR-4 на эпителиальных клетках всегда было статистически-значимым ($p<0,05$), что делает данный способ определения функционального состояния эпителиоцитов при воспалении полости рта более предпочтительным.

Выводы:

1. Уровень естественной колонизации эпителиоцитов у большинства пациентов с хроническим пародонтитом увеличивается по сравнению с тем же показателем у здоровых.

2. При пародонтите существенно меняется соотношение эпителиальных клеток, способных к экспрессии TLR2 и TLR4. При этом процент клеток, экспрессирующих TLR2, достоверно увеличивается, а TLR4 – уменьшается; одновременно возрастает число буккальных эпителиоцитов, не имеющих TLR2 и TLR4.

3. Определение экспрессии TLRs на буккальных эпителиоцитах является более чувствительным способом оценки функционального состояния мукозальных клеток и микроб-зависимого воспаления в полости рта при пародонтите, чем исследование естественной микробной колонизации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4, 7, 8, 10-13
см. REFERENCES)

2. Цепов Л.М., Михеева Е.А., Голева Н.А., Нестерова М.М. Хронический генерализованный пародонтит: Ремарки к современным представлениям. *Пародонтология*. 2010; 15.1(54): 3-7.
3. Лепеева Н.А., Ермолаева Л.А., Шишкин А.Н. Состояние тканей пародонта у больных метаболическим синдромом. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2012;(3): 145-52.
5. Полякова В.О., Пальцева Е.М., Крулевский В.А. Буккальный эпителий. Новые подходы к молекулярной диагностике социально значимой патологии. *СПб.: Н-Л*; 2015.
6. Лукова О.А., Пышкина Е.И., Клеменова И.А., Шебашова Н.В., Махрова Т.В., Заславская М.И. Способ оценки эффективности комплексной терапии с использованием иммуномодуляторов при хронических дерматологических заболеваниях. *Современные технологии в медицине*. 2017; 9(1): 98-102. doi.org/10.17691/stm2017.9.1.12
9. Шабашова Н. В., Данилова Е.Ю. Местный иммунитет и микробиота ротовой полости (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17 (4): 4-13.

14. Заславская М.И., Александрова Н.А., Китаева Е.В., Лукова О.А., Махрова Т.В., Кротопов В.С. Экспрессия toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах при кандидозе ротовой полости. *Проблемы медицинской микологии*. 2019; 21(3): 24-6.

REFERENCES

1. Dahlen G., Basic A., Bylund J. Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevices and in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J. Clin. Med.* 2019;(8):1339. doi.org/10.3390/jcm8091339.
2. Tsepov L.M., Mikheeva E.A., Goleva N.A., Nesterova M.M. Chronic generalized periodontitis: Remarks to modern ideas. *Parodontologiya*. 2010; 15.1(54): 3-7. (in Russian)
3. Leppeeva N.A., Ermolaeva L.A., Shishkin A.N. The condition of periodontal tissues in patients with metabolic syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina*. 2012;(3): 145-52. (in Russian)
4. Ross K. F., Herzberg M.C. Autonomous immunity in mucosal epithelial cells: fortifying the barrier against infection. *Microbes Infect.* 2016; 18(6):387-98. doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.008.
5. Polyakova V.O., Pal'tseva E.M., Krulevskiy V.A. Buccal epithelium. New approaches to molecular diagnostics of socially significant pathology. St. Petersburg: N-L; 2015. (in Russian)
6. Lukova O.A., Pyshkina E.I., Klemenova I.A., Shebashova N.V., Makhrova T.V., Zaslavskaya M.I. A method for evaluating the effectiveness of complex therapy using immunomodulators in chronic dermatological diseases. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2017; 9(1): 98-102. doi.org/10.17691/stm2017.9.1.12. (in Russian)
7. McClure R., Massari P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2014;12(5): 386. doi.org/10.3389/fimmu.2014.00386.
8. Fernández A., Cárdenas A.M., Astorga J., Veloso P., Alvarado A., Merino P. et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Clinical Oral Investigations*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02861-9>
9. Shabashova N.V., Danilova E.Yu. Local immunity and oral microbiota (review). *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2015; 17 (4): 4-13. (in Russian)
10. Sasai M., Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by toll-like receptors. *Int. Rev. Immunol.* 2013;32 (2): 116–33. doi.org/10.3109/08830185.2013.774391.
11. AlQallaf H., Hamada Y., Blanchard S., Shin D., Gregory R. Srinivasan M. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. *PLOS ONE*. 2018;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200231>.
12. González-Rascón A., Mata-Haro V. MicroRNAs: Regulators of TLR2-mediated probiotic immune responses. *MicroRNA*. 2015;4(3):168-74. <https://doi.org/10.2174/2211536605666151208123209>.
13. Botos I., Segal D. M., Davis D.R. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011; 19 (4): 447-59. doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004.
14. Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., Kitaeva E.V., Lukova O.A., Makhrova T.V., Kropotov V.S. Expression of toll-like receptors on buccal epithelial cells in oral candidiasis. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2019; 21(3): 24-6. (in Russian)

Поступила 18.06.20

Принята к печати 23.06.20