

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Базарный В.В., Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПОЛОСТИ РТА

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620028, г. Екатеринбург, Россия

Различные механизмы клеточной гибели играют определённую роль в патогенезе заболеваний полости рта, ассоциированных со старением, такими как хронический генерализованный пародонтит (ХГП) и красный плоский лишай (КПЛ). Маркёры апоптоза, определяемые в ротовой жидкости (РЖ), могут быть ценным инструментом в диагностике этих заболеваний, представляют интерес в качестве биомаркёров старения. Цель - оценить взаимосвязь механизмов апоптоза с возраст-ассоциированными стоматологическими заболеваниями - ХГП и КПЛ. Обследованы 78 человек. Контрольная группа представлена здоровыми добровольцами молодого возраста (n=22), группа сравнения - относительно здоровыми лицами пожилого возраста (n=10). Выделена группа пациентов пожилого возраста с ХГП средней степени тяжести (n=10) и группу пожилого возраста с КПЛ (n=10). Пациенты зрелого возраста сформировали группу с ХГП лёгкой (n=16) и с ХГП средней степени тяжести (n=10). В РЖ определяли белок bcl-2, цитохром c (cyt-c), фермент глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) методом мультипараметрического флуорисцентного анализа с магнитными микросферами (xMAP, Luminex 200, USA), тест-система ProcartaPlex Human Apoptosis Panel 6-Plex (Invitrogen, USA). Установлено, что пациенты пожилого возраста с КПЛ отличались наиболее высоким содержанием cyt-c в РЖ. Пациенты пожилого возраста с ХГП имели концентрацию cyt-c выше, чем группы пациентов зрелого возраста с ХГП лёгкой и средней степени тяжести. Пациенты зрелого возраста с ХГП отличались от контрольной группы более низким уровнем cyt-c и GAPDH в РЖ. Уровень слюварного cyt-c представляет интерес в выявлении пациентов зрелого возраста с ХГП. Предполагаем, что cyt-c может являться биомаркёром ускоренного патологического старения тканей полости рта.

Ключевые слова: ротовая жидкость; bcl-2; цитохром c; глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; апоптоз; старение; биомаркеры.

Для цитирования: Базарный В.В., Копенкин М.А., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В. Диагностическая эффективность определения некоторых белков митохондриального пути апоптоза в ротовой жидкости при возраст-ассоциированных заболеваниях полости рта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (9):518-526

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-518-526>

Для корреспонденции: Копенкин Максим Александрович, аспирант; e-mail: maximkopenkin@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств государственного задания на научно-исследовательскую работу «Предикторы старения в полости рта и возможность их использования для персонализации стоматологического лечения». Регистрационный номер 121032300110-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.06.2023
Принята к печати 05.07.2023
Опубликовано 08.09.2023

Bazarnyi V.V., Kopenkin M.A., Polushina L.G., Sementsova E.A., Mandra Yu.V.

THE DIAGNOSTIC EFFICACY OF DETERMINATION SOME PROTEINS OF APOPTOSIS MITOCHONDRIAL PATHWAY IN SALIVA AT AGE-RELATED ORAL DISEASES

Ural State Medical University, 620109, Yekaterinburg, Russia

Cell death plays a significant role in the pathogenesis of oral age-related disease, such as chronic periodontitis (CP) and oral lichen planus (OLP). Apoptosis biomarkers in saliva can be a useful method of these diseases diagnostic, and are also interesting as biomarkers of aging. The aim of the study was to evaluate the relationship of apoptosis mechanisms with oral age-related diseases - CP and OLP. The study included 78 people. The control group included 22 healthy young volunteers. The comparison group included 10 healthy elderly people. A group of elderly patients with moderate CP (n=10) and an elderly patients group with OLP (n=10) were formed. Mature patients formed a group with mild CP (n=16) and moderate CP (n=10). Bcl-2 protein, cytochrome c (cyt-c) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were determined in saliva samples by multiparametric fluorescence analysis with magnetic microspheres (xMAP, Luminex 200, USA), the ProcartaPlex Human Apoptosis Panel 6-Plex (Invitrogen, USA) test system. It was found that salivary cyt-c content was highest in OLP elderly patients. Salivary concentration of cyt-c in elderly patients with CP was higher than in the mature patients with mild and moderate CP. Salivary levels of cyt-c and GAPDH in mature patients with CP were lower than in the control group. Thus, the concentration of salivary cyt-c is interesting in OLP diagnostic of elderly patients. Salivary cyt-c and GAPDH may be useful in mature patients with CP identifying. We believe that cyt-c in saliva may be a potential biomarker of accelerated pathological aging of oral tissues.

Key words: saliva; bcl-2; cytochrome c; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; apoptosis; aging; biomarkers.

For citation: Bazarnyi V.V., Kopenkin M.A., Polushina L.G., Sementsova E.A., Mandra Yu.V. The diagnostic efficacy of determination some proteins of apoptosis mitochondrial pathway in saliva at age-related oral diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (9): (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-518-526>

org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-

For correspondence: *Kopenkin M.A.*, postgraduate student; e-mail: maximkopenkin@yandex.ru

Information about authors:

Bazarnyi V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>;

Kopenkin M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6092-3734>;

Polushina L.G., <https://orcid.org/0000-0002-4921-7222>;

Sementsova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0296-8723>;

Mandra Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-8439-3272>.

Acknowledgment. *The work were carries out at the expense of the state task for the research work «Predictors of aging in the oral cavity and the possibility of their use for personification of dental treatment». Registration number 121032300110-4 dated 03/23/2021.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 09.06.2023

Accepted 05.07.2023

Published 08.09.2023

Введение. Старение населения, увеличение числа лиц пожилого и старческого возраста, остаётся актуальной проблемой здравоохранения. В результате увеличивается встречаемость заболеваний, ассоциированных со старением, в том числе заболеваний полости рта [1]. К ним относится и хронический генерализованный пародонтит (ХГП) – распространённое заболевание полости рта, заключающееся в хроническом воспалении тканей пародонта. Развитию данной патологии способствует возрастная дисфункция иммунной системы. Срыв иммунного ответа на воздействие микробиома полости рта способствует поражению тканей пародонта и ведёт к ХГП [2]. Другим заболеванием, оказывающим влияние на качество жизни пациентов пожилого возраста, является красный плоский лишай полости рта (КПЛ), поражающий преимущественно слизистую оболочку полости рта (СОПР). Хотя этиология и патогенез данного заболевания остаются не до конца расшифрованными, существуют различные гипотезы. Общим является то, что КПЛ - хроническое воспалительное заболевание, при котором различные иммунные или аутоиммунные механизмы индуцируют апоптоз базальных кератиноцитов [3]. Считают, что ХГП и КПЛ, возникая как самостоятельные заболевания, могут протекать одновременно, усугубляя своё течение и тяжесть [4].

Связанное со старением организма в целом, так называемое клеточное старение (cellular senescence) - реакция клеток на повреждение ДНК в виде угнетения/блокады клеточного цикла. Однако клетка остается метаболически активной и претерпевает фенотипические изменения, приобретая ассоциированный со старением секреторный фенотип (senescence-associated secretory phenotype - SASP), включающий в себя выработку сложного набора провоспалительных цитокинов (хемокинов/ интерлейкинов), факторов роста и протеиназ (матриксные металлопротеиназы). Другой особенностью этого процесса является устойчивость данных клеток к апоптозу. SASP клетки могут накапливаться в тканях по мере старения, играя значимую роль в развитии возраст-ассоциированных заболеваний. В патогенезе ХГП у пациентов пожилого возраста определённое значение могут иметь SASP клетки, невосприимчивые к апоптозу [5].

Изучение механизмов клеточной гибели при воспалительных заболеваниях полости рта представляет определённый интерес. Ряд авторов рассматривают апоптоз и клеточное старение как антагонистические процессы [6]. Мы рассматриваем показатели, являющиеся полифункциональными, но их вклад в апоптоз значителен, по мнению Т.Н. Ward и соавт. [7]. В частности, особую роль играет белок регулятор апоптоза bcl-2 (bcl-2), участвующий в BCL2-регулируемом, или митохондриальном пути апоптоза. Данный механизм клеточной гибели обусловлен нарушением баланса белков семейства BCL2, взаимодействие которых протекает на поверхности митохондриальной мембраны. Смещение баланса в сторону апоптоза происходит путём инактивации противоапоптотических белков, в частности bcl-2, подгруппами проапоптотических белков семейства, которые вызывают пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий. В результате повышения её проницаемости происходит высвобождение цитохрома c (cyt-c) в цитоплазму клетки, что обуславливает дальнейшие апоптотические превращения [8]. Невосприимчивость «стареющих» клеток к апоптозу связывают с устойчивостью bcl-2 к проапоптотическим сигналам [9]. Поэтому уровень экспрессии bcl-2 при клеточном «старении» или клеточной гибели может существенно отличаться [10].

В реализации внутреннего пути апоптоза важнейшее место отводится cyt-c. Это белок межмембранного пространства митохондрий, который, кроме участия в апоптозе, выполняет множество функций и является важным компонентом цепи переноса электронов. Изменения митохондриальной мембраны, описанные выше, ведут к переходу cyt-c в цитоплазму клетки, где он образует апоптосому, которая, связываясь с иницирующим белком, запускает цепь превращений протеолитических ферментов - каспаз, расщепляющих клеточные пептиды. Это закономерно ведёт к гибели клетки [11]. Однако высвобождение cyt-c из межмембранного пространства митохондрий частично регулируется морфологическими преобразованиями митохондриальной мембраны. Выживанию клетки может способствовать активация метаболических путей с усиленной продукцией АТФ.

Поддержание высокого уровня метаболической

активности может быть одним из механизмов выживания клетки. Ингибирование каспаз или действие сублетальных апоптотических стрессов ведёт к тому, что вместе с пермеабилizированными митохондриями сохраняется часть интактных митохондрий, которые, имея высокий уровень гликолитической активности, поддерживают синтез АТФ, что способствует устойчивости клеточного гомеостаза [12]. Важным ферментом гликолиза является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Это фермент, катализирующий превращение глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бифосфоглицерат в присутствии NAD^+ и неорганического фосфата. GAPDH участвует в аутофагии пермеабилizированных митохондрий. Наличие интактных митохондрий одновременно с достаточным содержанием компонентов гликолитического пути образования АТФ, в том числе GAPDH, способствует восстановлению митохондриальной сети и выживанию клетки. Уникальность GAPDH заключается в многообразии выполняемых им функций, таких как репарация ДНК, регулирование проницаемости мембран, поддержание цитоскелета и др. [13]. GAPDH, находясь в ядре клетки, может поддерживать проапоптотические стимулы [14]. Активно применяется этот фермент в протеомном анализе для стандартизации исследований [15].

Возможное синергическое действие ХГП и КПЛ в особенности возрастных метаморфоз у пациентов пожилого возраста формирует интерес к изучению механизмов клеточной гибели. Вероятная устойчивость к апоптозу при ХГП, обусловленная SASP, и, напротив, преимущественно апоптотическая гибель базальных кератиноцитов при КПЛ позволяет использовать маркёры апоптоза в диагностике этих заболеваний. Возможное накопление SASP клеток в тканях пациентов пожилого возраста даёт возможность использования маркёров апоптоза в качестве биомаркёров старения - параметров, по которым в отсутствие болезни можно предсказать функциональное состояние организма лучше, чем по хронологическому возрасту, и спрогнозировать развитие заболеваний. Ценным источником информации в изучении данных проблем является ротовая жидкость (РЖ), представляющая смесь секретов слюнных желез, продуктов СОПР, десневой жидкости, фильтрата плазмы крови, иногда с примесью назального и бронхиального секретов, и являющаяся органоспецифическим компонентом полости рта. Вышесказанное обуславливает цель данного исследования - оценить взаимосвязь механизмов апоптоза с возраст-ассоциированными стоматологическими заболеваниями, а именно с ХГП и КПЛ.

Материал и методы. Проведено одноцентровое нерандомизированное одномоментное исследование, в котором приняло участие 78 человек. В контрольную группу вошли 22 здоровых добровольца молодого возраста (от 18 до 44 лет). Группу сравнения сформировали относительно здоровые лица пожилого возраста (от 60 до 74 лет) с благополучным стоматологическим статусом ($n=10$). Выделена группа пациентов пожилого возраста с ХГП средней степени тяжести ($n=10$). Следующая группа представлена пациентами пожилого

возраста с КПЛ ($n=10$). Пациенты зрелого возраста (от 45 до 59 лет) составили группу с ХГП лёгкой степени тяжести ($n=16$). Выделена группа пациентов зрелого возраста с ХГП средней степени тяжести ($n=10$).

Все испытуемые прошли обследование в стоматологической клинике Уральского государственного медицинского университета. Проведено стоматологическое обследование по протоколу, принятому в клинике. Для верификации диагноза использовано рентгенологическое (2D- и 3D-) исследование. В процессе обследования определены следующие индексы: индексы интенсивности кариеса зубов (индекс КПУ), папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА) для оценки состояния тканей пародонта. Для лиц пожилого возраста характерна полиморбидность - сочетание 2-3-х соматических заболеваний. Критерии включения пациентов: согласие пациента на участие в исследовании, соответствие возрастной периодизации, клиническое подтверждение диагноза. Критерии исключения пациентов: отказ от участия в исследовании, несоответствие возрастной периодизации - возраст менее 18 лет/более 74 лет, наличие острых травм лицевого скелета, сахарный диабет 1, 2-го типа в стадии суб- и декомпенсации, наличие тяжёлой соматической патологии в стадии суб- и декомпенсации. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (Helsinki, 2000). От всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Дизайн исследования, его новизна, допустимость и приемлемость одобрены на заседании локального этического комитета ФГБУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ (протокол № 8 от 21.10.2022).

В качестве материала для исследования использована нестимулированная РЖ, сбор которой проведён методом пассивного слюноистечения в пробирку типа «эппендорф». Получена РЖ не ранее чем через 2 часа после приёма пищи или чистки зубов и после ополаскивания полости рта кипячёной водой. Материал замораживался и хранился при температуре ниже $-20^{\circ}C$ до выполнения исследования. В РЖ определяли bcl-2, cyt-c, GAPDH методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, США) [16]. Использована тест-система ProcartaPlex Human Apoptosis Panel 6-Plex (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя.

Статистическая обработка результатов основана на принципах вариационной статистики. Критический уровень значимости установлен на уровне 0,05 ($p=0,05$). Оценена близость полученных данных к нормальному закону распределения с помощью одновыборочного двустороннего теста Колмогорова-Смирнова. Данные распределены по закону, отличному от нормального, поэтому использованы непараметрические статистические критерии. Результаты представлены как медиана, 25-й; 75-й квартиль - Ме (Q_1-Q_3). Для сравнения групп независимых выборок использован критерий Краскела-Уоллиса (непараметрическая альтернатива ANOVA). Для оценки нали-

чия различий между отдельными группами использован тест Данна с поправкой Холма-Бонферрони. Качество бинарной классификации оценено с помощью ROC-анализа. Для оценки диагностической эффективности теста определена площадь под ROC-кривой (AUC), диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС). Статистический анализ проведён с использованием языка программирования Python (версия 3.9.12), открытых библиотек SciPy (версия 1.7.3), scikit-posthocs (версия 0.7.0), Scikitlearn (версия 1.0.2).

Результаты. В исследовании приняли участие испытуемые трёх возрастных групп: молодого, зрелого и пожилого возраста. Характеристика стоматологического статуса основана на определении индексов, отражающих состояние тканей полости рта: КПУ - твёрдых тканей зубов, РМА - состояние пародонта.

Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в табл. 1. Данные свидетельствуют о корректном формировании групп по клиническим признакам и возрасту.

Оценили уровень bcl-2, cyt-c, GAPDH в РЖ у пациентов пожилого возраста с возраст-ассоциированными стоматологическими заболеваниями (табл. 2) с последующими множественными сравнениями отдельных групп (табл. 3). Установлено, что пациенты с КПЛ отличались от группы сравнения и контрольной группы по концентрации cyt-c. Различия в содержании bcl-2 между группами отсутствуют, хотя наименьшее медианное значение наблюдалось у пациентов группы сравнения. Уровни GAPDH изменялись в широких пределах между группами, хотя отличия не были значимыми.

Высокая распространённость ХГП в популяции

Таблица 1

Стоматологическая характеристика пациентов

Показатели	Группа сравнения (n=10)	Пациенты пожилого возраста с ХГП (n=10)	Пациенты с КПЛ (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП (n=26)	Контрольная группа (n=22)	p
Возраст, годы	65,0 (61,0-66,0)	67,0 (61,0-71,0)	67,0 (65,0-68,0)	48,0 (45,0-53,0)	28,0 (25,0-31,0)	<0,001
КПУ	10,0 (9,0-14,0)	20,0 (19,0-24,0)	21,0 (21,5-23,5)	16,0 (15,0-20,0)	11,5 (10,0-15,0)	<0,001
РМА	27,0 (23,5-31,0)	83,0 (72,0-86,0)	57,0 (51,7-67,5)	32,0 (28,0-37,0)	15,0 (12,2-19,7)	<0,001

Таблица 2

Содержание bcl-2, cyt-c, GAPDH в РЖ у пациентов пожилого возраста

Показатели	Группа сравнения (n=10)	Пациенты пожилого возраста с ХГП (n=10)	Пациенты пожилого возраста с КПЛ (n=10)	Контрольная группа (n=22)	p
bcl-2, пг/мл	35,60 (35,60-147,10)	207,44 (180,72-380,57)	204,67 (35,60-373,75)	167,42 (35,60-537,41)	0,293
cyt-c, пг/мл	953,45 (712,30-2944,17)	2557,80 (2016,60-4728,64)	7550,95 (5436,89-9665,01)	1530,52 (511,24-3460,54)	<0,001
GAPDH, пг/мл	2900,14 (2221,40-3602,29)	5922,45 (2882,90-37362,88)	11657,12 (852,73-22461,51)	3243,72 (2114,34-7364,18)	0,698

Таблица 3

Множественные сравнения групп пациентов пожилого возраста по содержанию cyt-c в РЖ

Пациенты	Группа сравнения (n=10)	Пациенты пожилого возраста с ХГП (n=10)	Пациенты пожилого возраста с КПЛ (n=10)	Контрольная группа (n=22)
Группа сравнения	-	0,267	0,004	0,743
Пациенты пожилого возраста с ХГП	0,267	-	0,119	0,267
Пациенты пожилого возраста с КПЛ	0,004	0,119	-	<0,001
Контрольная группа	0,743	0,267	<0,001	-

формирует особый интерес к изучению данного заболевания [17]. Проанализирован уровень bcl-2, cyp-c, GAPDH у пациентов пожилого возраста с ХГП в сравнении с пациентами зрелого возраста с ХГП лёгкой и средней степени тяжести (табл. 4) с последующими сравнениями отдельных групп по отличающимся параметрам (табл. 5 и 6). Уровень bcl-2 не отличался в указанных группах. Содержание cyp-c у пациентов пожилого возраста выше, чем у пациентов зрелого возраста с ХГП лёгкой и средней степени. Концентрация GAPDH варьировала в широком диапазоне в обследованных группах. По данному показателю значимо отличались пациенты с ХГП лёгкой степени тяжести и контрольная группа.

Чтобы оценить диагностические характеристики исследованных биомаркёров, проведён ROC-анализ,

закрывающийся в построении ROC-кривой и определении площади под ней - AUC, отражающей точность диагностического теста, с определением ДЧ и ДС. Для выбора оптимальной точки cut-off применён индекс Юдена (J). Тест на определение cyp-c позволил с высокой точностью выявлять пациентов с КПЛ по сравнению с группой сравнения и контролем. Высокой точностью характеризовался тест на cyp-c при выявлении группы с ХГП пожилого возраста по сравнению с группой зрелого возраста с ХГП средней и лёгкой степени тяжести. Умеренной точностью отличался тест на GAPDH, определение которого позволило выявлять пациентов с ХГП средней и лёгкой степени при сравнении со здоровыми людьми. Указанные группы можно различать по уровню cyp-c с несколько меньшей точностью (табл. 7).

Таблица 4

Содержание bcl-2, cyp-c, GAPDH в РЖ у пациентов с ХГП лёгкой и средней степени тяжести

Показатели	Пациенты пожилого возраста с ХГП (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП средней степени (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП лёгкой степени (n=16)	Контрольная группа (n=22)	p
bcl-2, пг/мл	207,44 (180,72-380,57)	211,92 (160,66-227,52)	218,08 (164,73-289,07)	167,42 (35,60-537,41)	0,905
cyp-c, пг/мл	2557,80 (2016,60-4728,64)	395,53 (355,26-439,19)	476,52 (274,49-805,32)	1530,52 (511,24-3460,54)	<0,001
GAPDH, пг/мл	5922,45 (2882,90-37362,88)	11998,05 (10310,24-15211,91)	14540,67 (11431,81-18689,46)	3243,72 (2114,34-7364,18)	0,011

Таблица 5

Множественные сравнения групп пациентов с ХГП по содержанию cyp-c в РЖ

Пациенты	Пациенты пожилого возраста с ХГП (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП средней степени (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП лёгкой степени (n=16)	Контрольная группа (n=22)
Пациенты пожилого возраста с ХГП	-	<0,001	<0,001	0,097
Пациенты зрелого возраста с ХГП средней степени	<0,001	-	0,636	0,042
Пациенты зрелого возраста с ХГП лёгкой степени	<0,001	0,636	-	0,051
Контрольная группа	0,097	0,042	0,051	-

Таблица 6

Множественные сравнения групп пациентов с ХГП по содержанию GAPDH в РЖ

Пациенты	Пациенты пожилого возраста с ХГП (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП средней степени (n=10)	Пациенты зрелого возраста с ХГП лёгкой степени (n=16)	Контрольная группа (n=22)
Пациенты пожилого возраста с ХГП	-	0,854	0,739	0,739
Пациенты зрелого возраста с ХГП средней степени	0,854	-	0,854	0,135
Пациенты зрелого возраста с ХГП легкой степени	0,739	0,854	-	0,011
Контрольная группа	0,739	0,135	0,011	-

Чтобы оценить диагностические характеристики исследованных биомаркёров, проведён ROC-анализ, заключающийся в построении ROC-кривой и определении площади под ней - AUC, отражающей точность диагностического теста, с определением ДЧ и ДС. Для выбора оптимальной точки cut-off применён индекс Юдена (J). Тест на определение cut-c позволил с высокой точностью выявлять пациентов с КПЛ по сравнению с группой сравнения и контролем.

Высокой точностью характеризовался тест на cut-c при выявлении группы с ХГП пожилого возраста по сравнению с группой зрелого возраста с ХГП средней и лёгкой степени тяжести. Умеренной точностью отличался тест на GAPDH, определение которого позволило выявлять пациентов с ХГП средней и лёгкой степени при сравнении со здоровыми людьми. Указанные группы можно различать по уровню cut-c с несколько меньшей точностью (табл. 7).

Таблица 7

Клиническая ценность определения cut-c и GAPDH в РЖ у пациентов с возраст-ассоциированными заболеваниями тканей полости рта

Показатели	cut-off, пг/мл	AUC	ДЧ, %	ДС, %	J
Группа сравнения и пациенты с КПЛ					
cut-c	≥5436,89	1,00	100,00	100,00	1,00
Контрольная группа и пациенты с КПЛ					
cut-c	≥5436,89	1,00	100,00	100,00	1,00
Пациенты пожилого возраста с ХГП и зрелого возраста с ХГП средней степени					
cut-c	≥1126,51	1,00	100,00	100,00	1,00
Пациенты пожилого возраста с ХГП и зрелого возраста с ХГП лёгкой степени					
cut-c	>1032,49	0,96	100,00	89,10	0,89
Контрольная группа и пациенты зрелого возраста с ХГП лёгкой степени					
cut-c	≤974,24	0,74	60,00	90,91	0,51
GAPDH	>7477,09	0,83	100,00	80,60	0,80
Контрольная группа и пациенты зрелого возраста с ХГП средней степени					
cut-c	≤562,61	0,76	91,66	68,43	0,60
GAPDH	≥9369,26	0,79	85,71	78,95	0,65

Обсуждение. Описанные выше особенности патогенеза ХГП и КПЛ у пациентов пожилого возраста обуславливают особый интерес к изучению маркёров апоптоза в РЖ в качестве инструментов ранней неинвазивной диагностики, способа оценки течения заболевания и ответа на терапию. Ряд авторов рассматривают данные параметры как потенциальные биомаркёры старения. В последние годы сформировались определённые представления о маркёрах апоптоза, к которым традиционно относят Fas лиганд (CD₉₅), разрушаемый каспазой цитокератин 18 и каспазы [18]. Данные маркёры ранее изучались при возраст-ассоциированной патологии [19, 20]. Их изучение в стоматологии продолжается в целях разработки персонализированных подходов к лечению [21]. Ранее нами проведено исследование по оценке диагностической значимости поли-АДФ-рибоза полимеразы и каспазы-3 в РЖ, в котором установлено, что пациенты с воспалительными заболеваниями СОПР отличались наиболее высокой активностью апоптоза. Напротив, условно здоровые люди того же возрастного периода отличались наименьшим уровнем маркёров апоптоза [22].

В этом исследовании нам не удалось выявить различий в содержании противапоптотического пептида bcl-2 между исследованными группами. Среди лиц пожилого возраста наименьший уровень bcl-2 отмечен у пациентов группы сравнения, в то время как группы с ХГП, КПЛ и контрольная группа прак-

тически не отличались. В группах пациентов зрелого возраста с ХГП разница в содержании bcl-2 отсутствовала. Считают, что bcl-2 имеет значение в поддержании баланса между апоптозом и клеточным старением. Сверхэкспрессия данного пептида может наблюдаться в стареющих клетках, отличающихся блокадой клеточного цикла, и препятствовать апоптозу [23]. В литературе описано, что экспрессия bcl-2 в тканях пародонта у пациентов с ХГП не отличается от контрольной группы, однако пациенты с более лёгкой патологией, а именно с гингивитом, характеризуются несколько более высокой экспрессией данного пептида [24]. При КПЛ экспрессия bcl-2 в тканях СОПР не обнаружена, либо ниже, чем у здоровых людей при иммуногистохимическом исследовании, что указывает на преобладание проапоптотических сигналов с инактивацией bcl-2 при КПЛ [25, 26]. Следует отметить, что в проведённом исследовании у многих испытуемых концентрация bcl-2 в РЖ близка к нижнему пределу чувствительности метода. Чаще такой результат встречался у относительно здоровых пациентов пожилого возраста. В нашем исследовании определение bcl-2 в РЖ у пациентов с ХГП и КПЛ не имеет диагностической значимости.

Известно значение cut c, белка межмембранного пространства митохондрий, в индукции апоптоза через активацию внутриклеточных протеаз (каспаз), вызывающих деградацию клеточных компонентов. Разрушение клеток может вести к высвобождению

сут-с из цитоплазмы клетки. Поэтому количественное определение сут-с в РЖ, органоспецифическом субстрате при заболеваниях полости рта, может иметь ценность в диагностике ХГП и КПЛ [27]. В нашем исследовании установлено, что наибольший уровень сут-с в РЖ наблюдался у пациентов пожилого возраста с КПЛ. В развитии КПЛ важное значение имеет апоптоз базальных кератиноцитов [28]. Поэтому увеличение сут-с в РЖ у пациентов пожилого возраста с КПЛ подтверждает принятые представления о патогенезе данного заболевания. Уровень сут-с у пациентов пожилого возраста с ХГП характеризовался промежуточными значениями по сравнению с пациентами с КПЛ и группой сравнения, хотя отличия не были статистически значимыми. Можно предположить, что активность апоптоза при ХГП ниже, чем при КПЛ, что может быть связано с остановкой клеточного цикла при клеточном старении [29]. Установлено, что пациенты пожилого возраста с ХГП отличались от пациентов зрелого возраста с ХГП лёгкой и средней степени тяжести более высокими уровнями сут-с. Сложные механизмы иммунного ответа при ХГП в пожилом возрасте могут способствовать более агрессивному течению заболевания [30]. В патогенезе ХГП признают всё большее значение такой формы клеточной гибели как пироптоз, который, кроме индукции провоспалительных цитокинов, может способствовать запуску апоптоза через высвобождение сут-с [31].

Множество внутриклеточных обменных процессов сопряжено с использованием фермента GARDH. Он содержится в цитоплазме, митохондриях, ядре и участвует в сложном механизме поддержания клеточного и тканевого гомеостаза [32]. В нашем исследовании не выявлено различий в содержании GARDH в РЖ у пациентов пожилого возраста с ХГП и КПЛ. Только группа пациентов зрелого возраста с ХГП значимо отличалась от здоровых молодых людей по данному параметру. Уровень GARDH отличался высокой вариабельностью при сравнении обследованных групп. Этот белок является структурным компонентом клетки и секретируется во всех тканях организма, в связи с чем активно применяется в протеомных исследованиях [33]. Распространённостью GARDH в тканях и особенностями образования РЖ можно объяснить большую изменчивость данного показателя в нашей работе.

Вышеизложенное обуславливает интерес к использованию сут-с и GARDH в качестве диагностических маркёров РЖ. Высокую точность показало использование белка сут-с в выявлении пациентов пожилого возраста с КПЛ. Использование теста на уровень слюварного сут-с позволило эффективно выявлять пациентов пожилого возраста с ХГП при сравнении с пациентами зрелого возраста с ХГП лёгкой и средней степени тяжести. Поэтому сут-с может являться с одной стороны маркёром КПЛ у пожилых пациентов, с другой стороны маркёром ускоренного патологического старения. С помощью оценки содержания слюварного GARDH и сут-с можно различать пациентов зрелого возраста с ХГП лёгкой и средней

степени и здоровых молодых людей с умеренной точностью. Можно рассматривать GARDH и сут-с в качестве потенциальных маркёров ХГП.

Заключение. Актуальность проблемы старения вместе с распространённостью ХГП и КПЛ, оказывающих влияние на здоровье человека в широких пределах, сформировало интерес к изучению данных проблем. Ценным инструментом в этом может стать исследование РЖ - информативного биоматериала, органоспецифического для возраст-ассоциированных заболеваний полости рта. В данном исследовании оценено содержание маркёров апоптоза в РЖ у пациентов с ХГП и КПЛ. Установлено, что оценка содержания bcl-2 в РЖ не имеет диагностической значимости. Определение уровня слюварного сут-с отличается высокой диагностической эффективностью при выявлении пациентов пожилого возраста с КПЛ. Испытуемые с ХГП пожилого возраста характеризуются более высоким содержанием сут-с в РЖ по сравнению с пациентами зрелого возраста, тест отличается высокой диагностической эффективностью. Считаем, что измерение концентрации сут-с в РЖ может представлять интерес в лабораторном мониторинге КПЛ и ХГП у пожилых людей. Предполагаем, что слюварный сут-с может являться потенциальным биомаркёром ускоренного патологического старения тканей полости рта. Использование сут-с и GARDH РЖ для выявления пациентов с ХГП зрелого возраста отличается несколько худшими диагностическими характеристиками, тесты отличаются умеренной диагностической эффективностью. Можно рассматривать данные показатели в качестве инструмента неинвазивной диагностики возраст-ассоциированных заболеваний полости рта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Raphael C. Oral Health and Aging. *Am. J. Public Health.* 2017; 107(S1): S44-S45.
2. Ebersole J.L., Dawson D.A. 3rd, Emecen Huja P., Pandravadra S., Basu A., Nguyen L. et al. Age and Periodontal Health - Immunological View. *Curr. Oral. Health Rep.* 2018; 5(4): 229-41.
3. Mutafchieva M.Z., Draganova-Filipova M.N., Zagorchev P.I., Tomov G.T. Oral Lichen Planus - Known and Unknown: a Review. *Folia Med. (Plovdiv).* 2018; 60(4): 528-35.
4. Ide M., Karimova M., Setterfield J. Oral Health, Antimicrobials and Care for Patients With Chronic Oral Diseases - A Review of Knowledge and Treatment Strategies. *Front. Oral Health.* 2022; 3: 866695.
5. Chen S., Zhou D., Liu O., Chen H., Wang Y., Zhou Y. Cellular Senescence and Periodontitis: Mechanisms and Therapeutics. *Biology (Basel).* 2022; 11(10): 1419.
6. Childs B.G., Baker D.J., Kirkland J.L., Campisi J., van Deursen J.M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 2014; 15(11): 1139-53.
7. Ward T.H., Cummings J., Dean E., Greystoke A., Hou J.M., Backen A. et al. Biomarkers of apoptosis. *Br. J. Cancer.* 2008. 99(6): 841-6.
8. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15(1): 49-63.
9. Ryu S.J., Oh Y.S., Park S.C. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death. Differ.* 2007; 14(5): 1020-8.
10. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. Cellular se-

- nescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 2015; 21(12): 1424-35.
11. Santucci R., Sinibaldi F., Cozza P., Polticelli F., Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International journal of biological macromolecules.* 2019; 136: 1237-46.
 12. Bock F.J., Tait S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2020; 21(2): 85-100.
 13. Tristan C., Shahani N., Sedlak T.W., Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal.* 2011; 23(2): 317-23.
 14. Nicholls C., Li H., Liu J.-P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2012; 39(8): 674-9.
 15. Moritz C.P. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics.* 2017; 17(20): 1600189.
 16. Базарный В.В., Мандра Ю.В., Копенкин М.А., Абдулкеримов Т.Х., Максимова А.Ю., Полушина Л.Г. Нарушение баланса ангиогенных и нейрогенных полипептидов ротовой жидкости при переломах верхней челюсти. *Уральский медицинский журнал.* 2023; 22(1): 57-62.
 17. Eke P.I., Dye B.A., Wei L., Thornton-Evans G.O., Genco R.J. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J. Dent. Res.* 2012; 91(10): 914-20.
 18. Greystoke A., Hughes A., Ranson M., Dive C., Cummings J., Ward T. Serum biomarkers of apoptosis. *European Journal of Cancer Supplements.* 2007; 5(5): 115-27.
 19. Jiang S., Moriarty-Craige S.E., Li C., Lynn M.J., Cai J., Jones D.P. et al. Associations of plasma-soluble fas ligand with aging and age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(4): 1345-9.
 20. Li J., Verhaar A.P., Pan Q., de Knecht R.J., Peppelenbosch M.P. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) predict severity of liver disease in chronic hepatitis B. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2017; 10: 203-9.
 21. Pradeep A.R., Suke D.K., Prasad M.V., Singh S.P., Martande S.S., Nagpal K. et al. Expression of key executioner of apoptosis caspase-3 in periodontal health and disease. *J. Investig. Clin. Dent.* 2016; 7(2): 174-9.
 22. Базарный, В. В., Копенкин, М. А., Полушина, Л. Г., Максимова, А. Ю., Семенцова, Е. А., Мандра, Ю. В. Значение саливарной поли (ADP-рибоза)-полимеразы в оценке возрастзависимых патологических процессов в полости рта. *Биомедицинская химия.* 2023; 69(2): 125-32.
 23. Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2022; 230: 107943.
 24. Figueredo C.M., Alves J.C., de Souza Breves Beiler T.F.C., Fischer R.G. Anti-apoptotic traits in gingival tissue from patients with severe generalized chronic periodontitis. *J. Investig. Clin. Dent.* 2019; 10(3): e12422.
 25. Leyva-Huerta E.R., Ledesma-Montes C., Rojo-Botello R.E., Vega-Memije E. P53 and bcl-2 immunoprotein expression in patients with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2012; 17(5): e745-50.
 26. Pigatti F.M., Taveira L.A., Soares C.T. Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Ki-67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Int. J. Dermatol.* 2015; 54(2): 150-5.
 27. Pessoa J. Cytochrome c in cancer therapy and prognosis. *Biosci. Rep.* 2022; 42(12): BSR20222171.
 28. Roopashree M.R., Gondhalekar R.V., Shashikanth M.C., George J., Thippeswamy S.H., Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus—a review. *J. Oral Pathol. Med.* 2010; 39(10): 729-34.
 29. Ikegami K., Yamashita M., Suzuki M., Nakamura T., Hashimoto K., Kitagaki J. et al. Cellular senescence with SASP in periodontal ligament cells triggers inflammation in aging periodontal tissue. *Aging (Albany NY).* 2023; 15(5): 1279-1305.
 30. Kebschull M., Guarnieri P., Demmer R.T., Boulesteix A.L., Pavlidis P., Papapanou P. N. Molecular differences between chronic and aggressive periodontitis. *Journal of dental research.* 2013; 92(12): 1081-8.
 31. Xu X., Zhang T., Xia X., Yin Y., Yang S., Ai D. et al. Pyroptosis in periodontitis: From the intricate interaction with apoptosis, NETosis, and necroptosis to the therapeutic prospects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 12: 953277.
 32. Tristan C., Shahani N., Sedlak T.W., Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal.* 2011; 23(2): 317-23.
 33. Fortes M.A.S., Marzuca-Nassar G.N., Vitzel K.F., da Justa Pinheiro C.H., Newsholme P., Curi R. Housekeeping proteins: How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? *Analytical Biochemistry.* 2016; 504: 38-40.

REFERENCES

1. Raphael C. Oral Health and Aging. *Am. J. Public Health.* 2017; 107(S1): S44-S45.
2. Ebersole J.L., Dawson D.A. 3rd, Emecen Huja P., Pandravadia S., Basu A., Nguyen L. et al. Age and Periodontal Health - Immunological View. *Curr. Oral. Health Rep.* 2018; 5(4): 229-41.
3. Mutafchieva M.Z., Draganova-Filipova M.N., Zagorchev P.I., Tomov G.T. Oral Lichen Planus - Known and Unknown: a Review. *Folia Med. (Plovdiv).* 2018; 60(4): 528-35.
4. Ide M., Karimova M., Setterfield J. Oral Health, Antimicrobials and Care for Patients With Chronic Oral Diseases - A Review of Knowledge and Treatment Strategies. *Front. Oral Health.* 2022; 3: 866695.
5. Chen S., Zhou D., Liu O., Chen H., Wang Y., Zhou Y. Cellular Senescence and Periodontitis: Mechanisms and Therapeutics. *Biology (Basel).* 2022; 11(10): 1419.
6. Childs B.G., Baker D.J., Kirkland J.L., Campisi J., van Deursen J.M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* 2014; 15(11): 1139-53.
7. Ward T.H., Cummings J., Dean E., Greystoke A., Hou J.M., Backen A. et al. Biomarkers of apoptosis. *Br. J. Cancer.* 2008. 99(6): 841-6.
8. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15(1): 49-63.
9. Ryu S.J., Oh Y.S., Park S.C. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death. Differ.* 2007; 14(5): 1020-8.
10. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 2015; 21(12): 1424-35.
11. Santucci R., Sinibaldi F., Cozza P., Polticelli F., Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International journal of biological macromolecules.* 2019; 136: 1237-46.
12. Bock F.J., Tait S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2020; 21(2): 85-100.
13. Tristan C., Shahani N., Sedlak T.W., Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal.* 2011; 23(2): 317-23.
14. Nicholls C., Li H., Liu J.-P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2012; 39(8): 674-9.
15. Moritz C.P. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics.* 2017; 17(20): 1600189.
16. Bazarnyi V.V., Mandra Yu.V., Kopenkin M.A., Abdulkirimov T.K., Maximova A.Yu., Polushina L.G. Impairment of the balance of angiogenic and neurogenic polypeptides of the oral fluid in fractures of the maxilla. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal.* 2023; 22(1):57-62. (in Russian)
17. Eke P.I., Dye B.A., Wei L., Thornton-Evans G.O., Genco R.J. et al. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J. Dent. Res.* 2012; 91(10): 914-20.
18. Greystoke A., Hughes A., Ranson M., Dive C., Cummings J., Ward

- T. Serum biomarkers of apoptosis. *European Journal of Cancer Supplements*. 2007; 5(5): 115-27.
19. Jiang S., Moriarty-Craige S.E., Li C., Lynn M.J., Cai J., Jones DP et al. Associations of plasma-soluble fas ligand with aging and age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(4): 1345-9.
 20. Li J., Verhaar A.P., Pan Q., de Knecht R.J., Peppelenbosch M.P. Serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) predict severity of liver disease in chronic hepatitis B. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2017; 10: 203-9.
 21. Pradeep A.R., Suke D.K., Prasad M.V., Singh S.P., Martande S.S., Nagpal K. et al. Expression of key executioner of apoptosis caspase-3 in periodontal health and disease. *J. Investig. Clin. Dent.* 2016; 7(2): 174-9.
 22. Bazamyi V.V., Kopenkin M.A., Polushina L.G., Maximova A.Yu., Sementsova E.A., Mandra Yu.V. Significance of salivary poly (ADP-ribose)-polymerase in the assessment of age-dependent pathological processes in the oral cavity. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2023; 69(2): 125-32.
 23. Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 2022, 230: 107943.
 24. Figueredo C.M., Alves J.C., de Souza Breves Beiler T.F.C., Fischer R.G. Anti-apoptotic traits in gingival tissue from patients with severe generalized chronic periodontitis. *J. Investig. Clin. Dent.* 2019, 10(3): e12422.
 25. Leyva-Huerta E.R., Ledesma-Montes C., Rojo-Botello R.E., Vega-Memije E. P53 and bcl-2 immunoexpression in patients with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2012; 17(5): e745-50.
 26. Pigatti F.M., Taveira L.A., Soares C.T. Immunohistochemical expression of Bcl-2 and Ki-67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Int. J. Dermatol.* 2015; 54(2): 150-5.
 27. Pessoa J. Cytochrome c in cancer therapy and prognosis. *Biosci. Rep.* 2022; 42(12): BSR20222171.
 28. Roopashree M.R., Gondhalekar R.V., Shashikanth M.C., George J., Thippeswamy S.H., Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J. Oral Pathol. Med.* 2010; 39(10): 729-34.
 29. Ikegami K., Yamashita M., Suzuki M., Nakamura T., Hashimoto K., Kitagaki J. et al. Cellular senescence with SASP in periodontal ligament cells triggers inflammation in aging periodontal tissue. *Aging (Albany NY).* 2023; 15(5): 1279-305.
 30. Kebschull M., Guarnieri P., Demmer R.T., Boulesteix A.L., Pavlidis P., Papananou P. N. Molecular differences between chronic and aggressive periodontitis. *Journal of dental research.* 2013; 92(12): 1081-8.
 31. Xu X., Zhang T., Xia X., Yin Y., Yang S., Ai D. et al. Pyroptosis in periodontitis: From the intricate interaction with apoptosis, NETosis, and necroptosis to the therapeutic prospects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022; 12: 953277.
 32. Tristan C., Shahani N., Sedlak T.W., Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell. Signal.* 2011; 23(2): 317-23.
 33. Fortes M.A.S., Marzuca-Nassr G.N., Vitzel K.F., da Justa Pinheiro C.H., Newsholme P., Curi R. Housekeeping proteins: How useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? *Analytical Biochemistry.* 2016; 504: 38-40.