



Диагностическое значение рецепторов TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках как маркера прогрессирования воспаления пародонта, ассоциированного с ключевыми пародонтопатогенными видами *F. alocis* и *P. gingivalis*

Царев В.Н.¹, Николаева Е.Н.¹, Ипполитов Е.В.¹, Царева Т.В.¹,
Подпорин М.С.¹, Балмасова И.П.^{1,2}

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия;

²Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Аннотация

Цель работы — оценка диагностического значения экспрессии TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках пародонта и периферической крови методом иммунофлуоресцентной микроскопии у больных хроническим пародонтитом (ХП), ассоциированным с ключевыми пародонтопатогенными видами *Fillifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis*.

Материалы и методы. В исследование были включены 150 пациентов — 88 (59%) женщин и 62 (41%) мужчины в возрасте 18–73 лет с ХП в фазе обострения и 32 человека без признаков ХП. Для подтверждения диагноза пародонтита использовали набор для полимеразной цепной реакции (ПЦР) «МультиДент-5» (выявление *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), а также rt-PCR — для *F. alocis* и *P. gingivalis* в содержимом пародонтального кармана. Для оценки клеток, несущих маркеры CD282 и CD284, использовали смывы десневой жидкости из пародонтального кармана раствором Хенкса. Выделенные клетки окрашивали антителами к маркерам CD282 (соответствует рецептору TLR2) или CD284 (соответствует рецептору TLR4), меченными изотиоцианатом флуоресцеина, и фиксировали параформальдегидом для последующей иммунофлуоресцентной микроскопии.

Результаты. Изучена экспрессия TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови и десневой жидкости у людей со здоровым пародонтом и больных ХП, ассоциированным с *F. alocis* и *P. gingivalis*. По результатам ПЦР частота выявления *F. alocis* и *P. gingivalis* составила 64 и 62,7% соответственно, что подтверждало их доминирование в микробной ассоциации. Установлено, что экспрессия TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках периферической крови у людей варьировала. Обсуждается возможное диагностическое значение этого феномена при оценке прогрессирования ХП.

Заключение. У больных ХП, ассоциированным с доминированием пародонтопатогенных видов *F. alocis* и *P. gingivalis*, выявлена разнонаправленная экспрессия TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови, которая может иметь диагностическое значение при оценке прогрессирования заболеваний пародонта.

Ключевые слова: TLR1, TLR2, пародонт, пародонтит, *F. alocis*, *P. gingivalis*

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Межвузовским комитетом по этике (протокол № 06-17 от 15.06.2017).

Благодарность. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк» (НИИ биологии гена РАН).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В., Царева Т.В., Подпорин М.С., Балмасова И.П. Диагностическое значение рецепторов TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках как маркера прогрессирования воспаления пародонта, ассоциированного с ключевыми пародонтопатогенными видами *F. alocis* и *P. gingivalis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(5):565–572.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-336>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-336>

Diagnostic significance of TLR2 and TLR4 receptors on lymphoid cells as a marker of the progression of periodontal inflammation associated with key periodontal pathogenic species *F. alocis* and *P. gingivalis*

Victor N. Tsarev¹✉, Elena N. Nikolaeva¹, Evgeniy V. Ippolitov¹, Tatyana V. Tsareva¹, Mikhail S. Podporin¹, Irina P. Balmasova^{1,2}

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract

The **aim** of the work was to evaluate the diagnostic value of TLR2 and TLR4 expression on periodontal and peripheral blood lymphoid cells by immunofluorescence microscopy in patients with chronic periodontitis associated with key periodontal pathogenic species *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*.

Materials and methods. The study included 150 patients — 88 (59%) women and 62 (41%) men aged 18 to 73 years with chronic periodontitis in the acute phase (CP) and 32 people without signs of chronic periodontal inflammation. To confirm the diagnosis of periodontitis, the Multident-5 PCR kit was used (detection of *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), as well as rt-PCR for *F. alocis* and *P. gingivalis* in the contents of the periodontal pocket (NPF GenLab, Russia). To evaluate cells carrying CD282 and CD284 markers, gingival fluid flushes from the periodontal pocket with Hanks' solution were used. The isolated cells were stained with antibodies to CD282 markers (corresponding to TLR2 receptor) or CD284 (corresponding to TLR4 receptor) labeled with FITC, and fixed with paraformaldehyde for subsequent immunofluorescence microscopy.

Results. The expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood and gingival fluid leukocytes was studied in individuals with healthy periodontitis and patients with chronic periodontitis associated with *F. alocis*, *P. gingivalis*. According to the results of PCR, the detection rate of *F. alocis* and *P. gingivalis* was 64 and 62.7%, respectively, which confirmed their dominance in the microbial association. It was found that the expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood lymphoid cells varied in humans. The possible diagnostic significance of this phenomenon in assessing the progression of chronic periodontitis is discussed.

Conclusion. In patients with chronic periodontitis associated with the dominance of periodontopathogenic species *F. alocis*, *P. gingivalis*, the multidirectional expression of TLR2 and TLR4 on peripheral blood cells was observed, which may have diagnostic significance in assessing the progression of periodontal diseases.

Keywords: TLR1, TLR2, periodontium, periodontitis, *F. alocis*, *P. gingivalis*

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Intercollegiate Ethics Committee (protocol No. 06-17, June 15, 2017).

Acknowledgment. The study was carried out using the unique scientific facility Transgenebank (The Institute of Gens Biology, RAN).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V., Tsareva T.V., Podporin M.S., Balmasova I.P. Diagnostic significance of TLR2 and TLR4 receptors on lymphoid cells as a marker of the progression of periodontal inflammation associated with key periodontal pathogenic species *F. alocis* and *P. gingivalis*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(5):565–572.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-336>

Введение

Хронический пародонтит (ХП) начинается с последовательной колонизации слизистой оболочки полости рта и дёсен пародонтопатогенными бактериями, индуцирующими воспалительную реакцию с привлечением факторов врождённого и адаптивного иммунитета, которые, в свою очередь, влияют на микробную биоплёнку десны [1–7]. Распознавание микробов опосредуется Toll-подобными рецепторами (Toll-like receptors — TLR), которые

взаимодействуют с консервативными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами. Установлено, что распознавая определённые паттерны, TLR, в частности TLR-2 и TLR-4, взаимодействуют с большинством пародонтопатогенных видов бактерий [2, 8–10].

В последние годы уделяется большое внимание TLR как факторам врождённого иммунитета. Универсальность механизмов, обусловленная как широким представительством данных маркеров на разнообразных

клетках организма, так и широким спектром лигандов для них, определяет включение TLR в патогенетические звенья развития многих инфекционно-воспалительных заболеваний [9, 10]. Среди основных процессов следует назвать нарушения экспрессии TLR и распознавания лигандов, трансдукции сигналов, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR [5, 11]. Дефекты молекул, участвующих в трансдукции сигнала от TLR, по-видимому, лежат в основе повышенной восприимчивости к инфекционным болезням [11].

В исследованиях роли TLR при заболеваниях пародонта, в том числе связанных с системными эффектами пародонтопатогенных бактерий [12, 13], показано проявление этих нарушений при атеросклерозе, инфекционных, аутоиммунных, аллергических и некоторых других заболеваниях [10, 14–16]. Ведущую роль в запуске системных эффектов пародонтопатогенных бактерий играет ассоциация основного возбудителя *Porphyromonas gingivalis* и нового, недавно открытого благодаря технологиям метагеномного анализа и претендующего на ключевую роль — *Filifactor alocis* [9, 17].

Значимость этих механизмов для широкой клинической практики определяет необходимость внедрения адекватных и надёжных методов оценки компонентов системы TLR, которые могут быть воспроизведены в условиях клинической лаборатории лечебно-профилактических учреждений.

Целью работы являлась оценка диагностического значения экспрессии TLR2 и TLR4 на лимфоидных клетках пародонта и периферической крови методом иммунофлюоресцентной микроскопии у больных ХП, ассоциированным с ключевыми пародонтопатогенными видами *F. alocis* и *P. gingivalis*.

Материалы и методы

В исследование были включены 150 пациентов с ХП в фазе обострения, в том числе 88 (59%) женщин и 62 (41%) мужчины, а также 32 человека без признаков ХП (условно здоровые люди). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Межвузовским комитетом по этике (протокол № 06-17 от 15.06.2017). Возраст обследованных составлял 18–73 года. Пациенты с ХП были разделены на 2 группы по пародонтальным критериям: 1-я группа — ХП средней степени тяжести, 2-я группа — ХП тяжёлой степени с тенденцией к прогрессированию. Пациенты 2-й группы имели рентгенологические признаки выраженной резорбции альвеол челюстных костей.

Для подтверждения диагноза пародонтита проводили мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием набора реагентов «МультиДент-5» (НПФ «ГенЛаб») для выявления *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, а также ПЦР с обратной транскрипцией для *F. alocis* и *P. gingivalis* в содержимом пародонтального кармана.

Клетки, несущие маркеры CD282 и CD284, выявляли в смывах десневой жидкости из пародонтального кармана или зубодесневой борозды раствором Хенкса. Выделенные клетки окрашивали антителами к маркерам CD282 (соответствует рецептору TLR2) или CD284 (соответствует рецептору TLR4), меченными FITC, и фиксировали параформальдегидом. Готовые препараты просматривали под микроскопом «ECLIPSE 50i» («Nicon») при увеличении $\times 1000$.

Фенотип лейкоцитов периферической крови определяли с помощью метода проточной лазерной цитофлуориметрии [17]. Для этого к 100 мкл крови добавляли по 10 мкл раствора антител, меченных флюоресцентными многоцветными красителями против TLR2 (TLR2 IgG1 — FITC), CD14 — PE, CD45 — PerCP, CD19 — APC, CD3 — AF700 или TLR4 (TLR4 IgG1 — FITC) и CD14 — PE, CD45 — PerCP, CD19 — APC, CD3 — AF700. В пробирки с негативным контролем добавляли мышинные антитела, меченные FITC (IgG1 — FITC), а также антитела, меченные PE, PerCP, APC и AlexaFluor 700. Инкубировали 30 мин в темноте при 4°C. Для удаления эритроцитов использовали лизирующий буфер FACSLyse («BD Bioscience») в объёме 2 мл в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Затем проводили центрифугирование при 500g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли. К осаждённым клеткам добавляли по 2 мл фосфатно-солевого буфера. Клеточную взвесь дважды отмывали центрифугированием, после чего лейкоциты ресуспендировали и добавляли 0,5 мл фиксирующего буфера FACS CellFix («BD Bioscience»). Полученные пробы исследовали на проточном цитометре «FACSCanto 2», определяя экспрессию TLR2 и TLR4 на основных субпопуляциях CD3⁺-Т-лимфоцитов, CD19⁺-В-лимфоцитов, CD14⁺-моноцитах и CD45dim-гранулоцитах.

Вероятность различия исследуемых показателей оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента. Все расчёты проводили с помощью пакета программ «Statistica 7.0».

Результаты

Результаты молекулярно-биологического исследования, проведённого с помощью ПЦР, показали, что из 150 пациентов с ХП ДНК *P. gingivalis* выявили у 94 (62,7%), *F. alocis* — у 97 (64,7%), в то время как представители других пародонтопатогенов встречались менее чем у 50% пациентов (табл. 1). У 11 (7,3%) пациентов представители данных пародонтопатогенных видов не обнаружены. В контрольной группе частота выявления пародонтопатогенных видов не превышала 8,6% для *P. intermedia* и 11,4% для *F. alocis* и *T. forsythia*. Представители *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* у пациентов с интактным пародонтом не обнаружены.

Как показали параллельные исследования десневой жидкости у здоровых обследуемых или экссудата пародонтального кармана у пациентов с ХП, проведённые с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии, большую часть клеток составляли лейкоциты, которые

Таблица 1. Частота выявления пародонтопатогенных видов бактерий в материале из биоплёнки у больных ХП и пациентов с интактным пародонтом (%)

Table 1. Frequency of detection of periodontal pathogenic bacterial species in biofilm material in patients with chronic periodontal disease and intact periodontium (%)

Виды пародонтопатогенных бактерий Types of periodontopathogenic bacteria	Группа Group		χ^2
	пациенты с ХП patients with chronic periodontal disease (n = 150)	пациенты со здоровым пародонтом patients with healthy periodontium (n = 35)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	69* (46,0)	0 (0)	25,677
<i>F. alocis</i>	97* (64,7)	4 (11,4)	32,447
<i>P. gingivalis</i>	94* (62,7)	0 (0)	44,590
<i>P. intermedia</i>	72* (48,0)	3 (8,6)	18,302
<i>T. forsythia</i>	73* (48,7)	4 (11,4)	17,256
<i>T. denticola</i>	52* (34,6)	0 (0)	16,877
Нет бактерий No germs	11* (7,3)	29 (82,9)	95,515

Примечание. * $p < 0,001$ по сравнению с пациентами со здоровым пародонтом.

Note. * $p < 0.001$ compared with the patients with healthy periodontium.

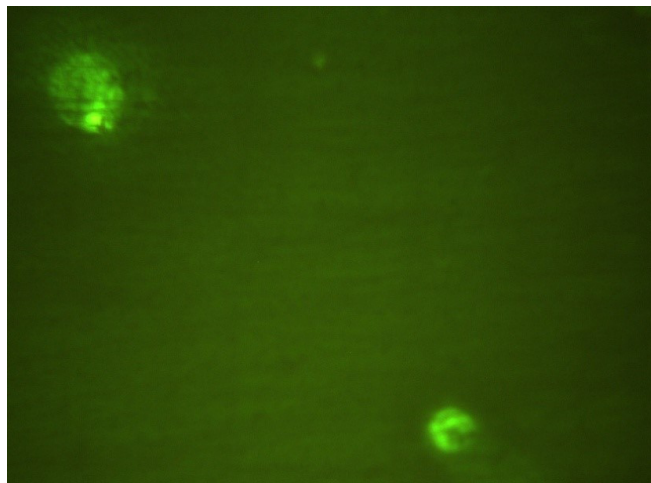


Рис. 1. Клетки десневой жидкости, экспрессирующие CD282.

Окраска FITC, $\times 1000$.

Fig. 1. Gingival fluid cells expressing CD282.

FITC stain, $\times 1000$.

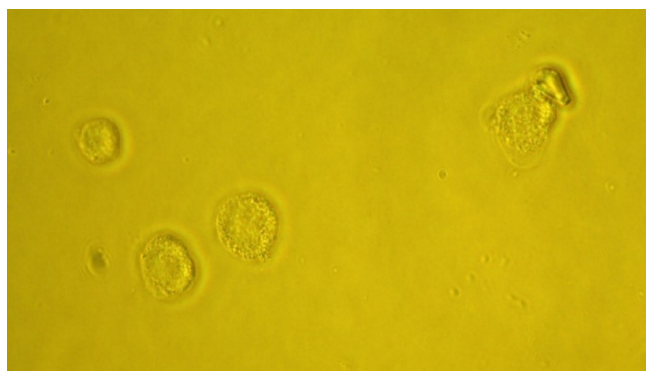


Рис. 2. Клетки десневой жидкости.

Фазовый контраст, $\times 1000$.

Fig. 2. Gingival fluid cells.

Phase contrast, $\times 1000$.

экспрессировали рецепторы врождённого иммунитета TLR2 и TLR4 с различной интенсивностью.

В контрольной группе частота выявления клеток, экспрессирующих эти маркеры, составила $12,3 \pm 3,2\%$, а в группе пациентов с ХП в фазе обострения — $4,1 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$).

На **рис. 1** в поле зрения люминесцентного микроскопа зафиксированы 2 клетки, экспрессирующие CD282 (TLR2), меченные FITC. Видны ярко окрашенные скопления в виде гранул. На **рис. 2** в фазовом контрасте видны 4 клетки, выделенные из экссудата пародонтального кармана. На **рис. 3** при люминесцентном микроскопировании представлены эти же 4 клетки с неярким диффузным окрашиванием CD284-FITC (TLR4). Таким образом, в результате данного пилотного исследования выявлена и визуализирована экспрессия рецепторов врождённого иммунитета TLR2 и TLR4 в десневой жидкости и экссудате пародонтального кармана при ХП.

К сожалению, содержание клеточных элементов в десневой жидкости было меньше, чем требуется для исследования иммунофенотипа клеток на проточном цитометре — $3,5-9,4 \times 10^6$ клеток/мл [17]. При выделе-

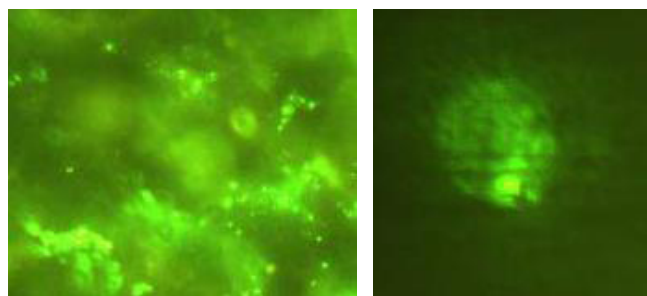


Рис. 3. Клетки десневой жидкости, экспрессирующие CD284.

Окраска FITC, $\times 1000$.

Fig. 3. Gingival fluid cells expressing CD284.

FITC stain, $\times 1000$.

нии клеток из десневой жидкости обычно используют её смывы изотоническим раствором NaCl, которые позволяют получить $5-10 \times 10^3$ клеток/мл, т.е. примерно в 2 раза меньше, чем требуется. Поэтому для получения дополнительных данных проводили исследования на клетках периферической крови.

В первой серии экспериментов определяли экспрессию TLR2 и TLR4 на лейкоцитах, выделенных из периферической крови пациентов с помощью осаждения эритроцитов на 2% желатине в фосфатно-солевом буфере, согласно стандартным методикам, применяемым для определения фенотипа иммунокомпетентных клеток [8].

Полученные данные позволяют утверждать, что экспрессия TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови у разных людей независимо от группы, к которой они принадлежали, значительно варьировала от полного отсутствия до 100% экспрессии на моноцитах крови некоторых людей. На **рис. 4** и **рис. 5** представлены примеры определения маркеров CD14/CD282 и CD3/CD284 на нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах периферической крови.

Экспрессия TLR2 на моноцитах (двойное окрашивание CD14/CD282) и TLR4 на лимфоцитах (двойное окрашивание CD3/CD284) была очень низкой и не превышала 1%.

Во второй серии экспериментов клетки цельной крови одновременно окрашивали с помощью нескольких антител против определённых популяций лейкоцитов, меченных различными флуоресцентными метками. В данной модификации иммунофенотипирования клетки субпопуляций не теряются, что обычно происходит при выделении лейкомаксы из периферической крови. Тем не менее доля клеток, экспрессирующих CD282 (TLR2), также была невысокой.

Наиболее высокий уровень экспрессии маркеров CD282 (TLR2) наблюдали на лимфоцитах людей со здоровым пародонтом (**табл. 2**). У пациентов 1-й группы относительное и абсолютное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD282, было в 3 раза ниже, чем у представителей контрольной группы. У пациентов 2-й группы относительное содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD282, было ниже в 4 раза, чем у представителей контрольной группы, а абсолютное — в 5,7 раза.

Экспрессия CD282 на моноцитах периферической крови у пациентов 2-й группы была в 1,4 раза выше, чем у людей в контрольной группе. Тем не менее у пациентов 2-й группы относительное количество моноцитов, экспрессирующих TLR2, было в 10 раз меньше, чем в контрольной группе, а абсолютное содержание — в 13,9 раза меньше.

На нейтрофилах экспрессия CD282 была ещё ниже. Так, у пациентов 1-й группы относительное и абсолютное содержание было меньше, чем в контрольной группе, в 2,8 и 3,0 раза, а у больных 2-й группы — в 4,3 и 6,8 раза.

Экспрессия CD284 (TLR4) на лейкоцитах периферической крови у обследованных пациентов имела такой

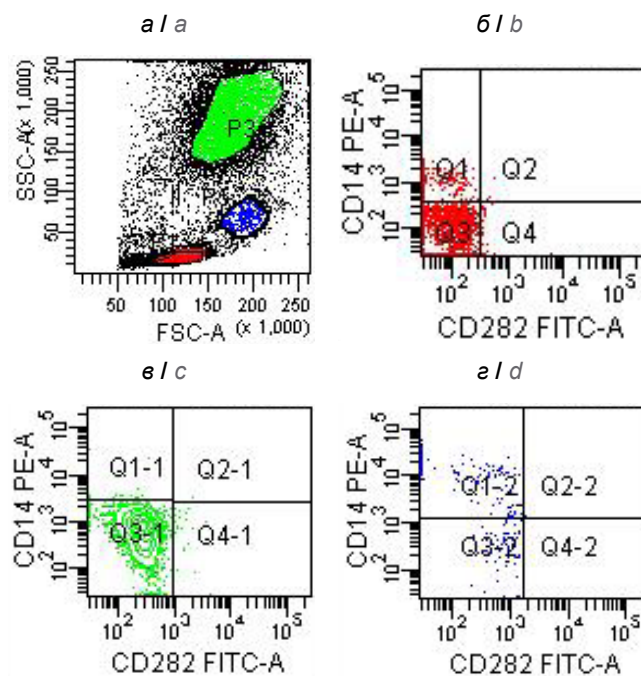


Рис. 4. Экспрессия TLR2 на лейкоцитах периферической крови.

Здесь и на рис. 5: *a* — график переднего и бокового светорассеяния: нейтрофилы — область, окрашенная в зелёный цвет, лимфоциты — участки красного цвета, моноциты — синего цвета; *b-g* — двумерный точечный график — экспрессия CD14, CD282

и CD14/CD282 на клетках разных популяций лейкоцитов.

Fig. 4. TLR2 expression on peripheral blood leukocytes.

Here and in Fig. 5: *a* — graph of front and side light scattering: neutrophils — green area, lymphocytes — red area, monocytes — blue area; *b-d* — two-dimensional dot-plot — expression of CD14, CD282, and CD14/CD282 on cells of different leukocyte populations.

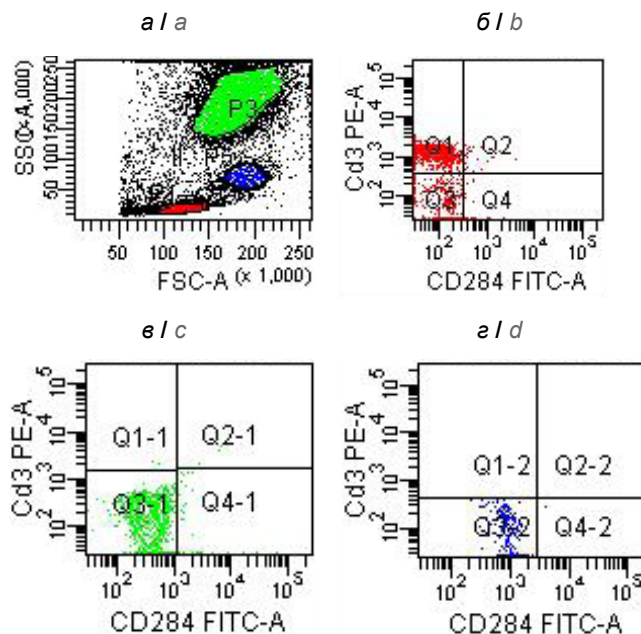


Рис. 5. Экспрессия TLR4 на лейкоцитах периферической крови.

Fig. 5. TLR4 expression on peripheral blood leukocytes.

Таблица 2. Экспрессия CD282 (TLR2) на лейкоцитах периферической крови**Table 2.** Expression of CD282 (TLR2) on peripheral blood leukocytes

Группа Group		Экспрессия CD282 (TLR2) Expression of CD282 (TLR2)		
		лимфоциты lymphocytes	моноциты monocytes	нейтрофилы neutrophils
Пациенты со здоровым пародонтом Patients with healthy periodontium	%	1,06 ± 0,45	0,65 ± 0,11	0,34 ± 0,04
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	56,24 ± 24,12	34,45 ± 5,71	18,15 ± 2,16
1-я 1 st	%	0,35 ± 0,01*	0,91 ± 0,43*	0,12 ± 0,01*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	18,82 ± 0,93*	43,72 ± 5,34*	6,13 ± 0,93*
2-я 2 nd	%	0,26 ± 0,05*	0,065 ± 0,028	0,08 ± 0,01*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	9,91 ± 1,91*	2,48 ± 1,12*	2,67 ± 3,05*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с пациентами со здоровым пародонтом.

Note. * $p < 0.05$ compared with the patients with healthy periodontium.

Таблица 3. Экспрессия CD284 (TLR4) на лейкоцитах периферической крови**Table 3.** Expression of CD284 (TLR4) on peripheral blood leukocytes

Группа Group		Экспрессия CD284 (TLR4) Expression of CD284 (TLR4)		
		лимфоциты lymphocytes	моноциты monocytes	нейтрофилы neutrophils
Пациенты со здоровым пародонтом Patients with healthy periodontium	%	0,26 ± 0,12	0,145 ± 0,003	0,35 ± 0,05
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	13,52 ± 6,50	7,63 ± 1,51	18,25 ± 3,11
1-я 1 st	%	0,73 ± 0,13*	2,17 ± 0,18*	0,275 ± 0,083*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	39,06 ± 2,79*	117,02 ± 3,8*	14,79 ± 1,78
2-я 2 nd	%	0,31 ± 0,11	0,09 ± 0,04*	0,21 ± 0,07*
	абс., 10 ⁶ /л abs. 10 ⁶ /liter	11,81 ± 4,19*	3,39 ± 2,67*	8,05 ± 2,67*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с пациентами со здоровым пародонтом.

Note. * $p < 0.05$ compared with the patients with healthy periodontium.

же характер, хотя на лимфоцитах пациентов 1-й группы этих рецепторов было в 2,8 и 2,9 раза больше, чем в контрольной группе. У пациентов 2-й группы относительное содержание CD284⁺-лимфоцитов было выше, чем у людей со здоровым пародонтом, только в 1,2 раза, а абсолютное количество — в 1,14 раза ниже (табл. 3).

На моноцитах самая высокая экспрессия CD284 была также у пациентов 1-й группы с ХП средней степени тяжести — в 15 раз больше, чем у пациентов контрольной группы. Самая низкая экспрессия — у пациентов 2-й группы с ХП тяжёлой степени и признаками резорбции челюстных костей — относительное количество в 1,7 раза меньше, а абсолютное — в 2,3 раза меньше, чем у представителей контрольной группы.

На нейтрофилах самая высокая экспрессия CD284 была в крови у людей контрольной группы; у пациентов 1-й группы относительное количество было ниже, чем в контрольной группе, в 1,3 раза, абсолютное — в 1,2 раза, а у пациентов 2-й группы относительное количество было ниже в 1,7 раза и абсолютное — в 2,3 раза (табл. 3). Следует отметить, что у пациентов 1-й группы относительное количество нейтрофилов, экспрессирующих TLR2, было в 1,5 раза выше, чем у пациентов 2-й группы, моноцитов — в 15 раз и лимфоцитов — в 1,3 раза. Разница в абсолютном содержании была ещё больше:

в 2,3, 17,6 и 1,9 раза соответственно. Относительное количество нейтрофилов, экспрессирующих TLR4, у пациентов 1-й группы было выше, чем у пациентов 2-й группы, в 1,3 раза, моноцитов — в 25,5 раза, лимфоцитов — в 2,3 раза. Разница в абсолютном содержании также была выше: в 1,84, 34,5 и 3,3 раза соответственно.

Обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что у пациентов с ХП, ассоциированным с доминированием анаэробных возбудителей *P. gingivalis* и *F. alocis*, основные популяции лейкоцитов периферической крови (нейтрофилы, моноциты и лимфоциты) отличаются по выраженности экспрессии TLR2 и TLR4. У людей со здоровым пародонтом самая высокая экспрессия TLR2 наблюдается на лимфоцитах, в меньшей степени — на моноцитах и самая низкая — на нейтрофилах периферической крови. У них больше всего было выявлено нейтрофилов с TLR4, в меньшем количестве — лимфоцитов и ещё в меньшем — моноцитов.

Напротив, у пациентов с ХП экспрессия TLR2 была выше на моноцитах, но ниже — на нейтрофилах и лимфоцитах по сравнению с контролем; экспрессия TLR4 выше на моноцитах и лимфоцитах, но ниже на нейтрофилах.

Полученные результаты свидетельствуют о возможной зависимости данного феномена от прогрессирования заболевания пародонта, на что указывает большая выраженность костно-резорбтивных процессов у пациентов с ХП тяжёлой степени. Экспрессия TLR2 на всех изучаемых популяциях лейкоцитов у пациентов с ХП, ассоциированным с выраженной резорбцией альвеолярной кости, была ниже, чем у здоровых людей, в 4–14 раз и в 1,3–15 раза, чем у больных пародонтитом, без выраженного прогрессирования. Экспрессия TLR4 у этих пациентов также была ниже в 1,2–2,3 раза, чем у здоровых людей, и в 1,3–25,5 раза ниже по сравнению с экспрессией TLR на лейкоцитах больных ХП средней степени тяжести без прогрессирования.

Выводы

1. Уровень экспрессии TLR2 и TLR4 принципиально не отличается на нестимулированных клетках периферической крови (нейтрофилах, моноцитах и лимфоцитах) и десневой жидкости у людей со здоровым пародонтом, но варьирует при развитии ХП.

2. У больных с ХП средней и тяжёлой степени в фазе обострения, ассоциированным с представителями пародонтопатогенной микробиоты, преимущественно *P. gingivalis* и *F. alocis*, выявлена разнонаправленная экспрессия рецепторов TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови — в сторону как увеличения, так и уменьшения.

3. Достоверно более низкие показатели экспрессии маркеров TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови наблюдали при ХП тяжёлой степени, который сопровождался признаками костной резорбции челюстных костей, что позволяет сделать предположение о том, что изменения в системе врождённого иммунитета, проявляющиеся на уровне экспрессии TLR, связаны с системной потерей минеральной плотности костной ткани и прогрессированием ХП.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Carrion J., Scisci E., Miles B., Sabino G.J., Zeituni A.E., Gu Y., et al. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 3178–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201053>
2. Darveau R.P., Pham T.T., Lemley K., Reife R.A., Bainbridge B.W., Coats S.R., et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5041–51. <https://doi.org/10.1128/iai.72.9.5041-5051.2004>
3. Mathews J.B., Wright H.J., Roberts A., Cooper P.R., Chapelle I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147(2): 255–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03276.x>
4. Moutsopoulos N.M., Konkel J.E. Tissue specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends Immunol.* 2018; 39(4): 276–87. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.005>
5. Murakami T. Understanding and treatment strategy of the pathogenesis of periodontal disease based on chronic inflammation. *Clin. Calcium.* 2016; 26(5): 766–72. (in Japanese)

6. Papadopoulos G., Shaik-Dasthagirisahab Y.B., Huang N., Viglianti G.A., Henderson A.J., Kantarci A., et al. Immunologic environment influences macrophage response to *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral. Microbiol.* 2017; 32(3): 250–61. <https://doi.org/10.1111/omi.12168>
7. Wilensky A., Chaushu S., Shapira L. The role of natural killer cells in periodontitis. *Periodontol.* 2000. 2015; 69(1): 128–41. <https://doi.org/10.1111/prd.12092>
8. Burns E., Bachrach G., Shapira L., Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 2006; 177(12): 8296–300. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8296>
9. Jia L., Han N., Du J., Guo L., Luo Z., Liu Y. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; (9): 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
10. Krauss J.L., Potempa J., Lambris J.D., Hajishengallis G. Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol.* 2000. 2010; 52(1): 141–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00324.x>
11. Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: a review. *Scand. J. Immunol.* 2019; 90(1): e12771. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
12. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B., Downes J., Finegold S.M., Knee E., et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016771>
13. Trejo-de la O.A., Hernández-Sancén P., Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun.* 2014; 15(4): 199–209. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.10>
14. Байракова А.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Караулов А.В. и др. Роль и биологическое значение Толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2008; (1): 45–54.
15. Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л., Лиходед В.Г. Роль инфекционного фактора в патогенезе атеросклероза. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2011; (1): 7–11.
16. Koren O., Spor A., Felin J., Fåk F., Stombaugh J., Tremaroli V., et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(Suppl. 1): 4592–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>
17. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. *Руководство по клинической иммунологии: диагностика заболеваний иммунной системы.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.

REFERENCES

1. Carrion J., Scisci E., Miles B., Sabino G.J., Zeituni A.E., Gu Y., et al. Microbial carriage state of peripheral blood dendritic cells (DCs) in chronic periodontitis influences DC differentiation, atherogenic potential. *J. Immunol.* 2012; 189(6): 3178–87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201053>
2. Darveau R.P., Pham T.T., Lemley K., Reife R.A., Bainbridge B.W., Coats S.R., et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect. Immun.* 2004; 72(9): 5041–51. <https://doi.org/10.1128/iai.72.9.5041-5051.2004>
3. Mathews J.B., Wright H.J., Roberts A., Cooper P.R., Chapelle I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147(2): 255–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03276.x>

4. Moutsopoulos N.M., Konkel J.E. Tissue specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends Immunol.* 2018; 39(4): 276–87. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.005>
5. Murakami T. Understanding and treatment strategy of the pathogenesis of periodontal disease based on chronic inflammation. *Clin. Calcium.* 2016; 26(5): 766–72. (in Japanese)
6. Papadopoulos G., Shaik-Dasthagirisahab Y.B., Huang N., Viglianti G.A., Henderson A.J., Kantarci A., et al. Immunologic environment influences macrophage response to *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral. Microbiol.* 2017; 32(3): 250–61. <https://doi.org/10.1111/omi.12168>
7. Wilensky A., Chaushu S., Shapira L. The role of natural killer cells in periodontitis. *Periodontol. 2000.* 2015; 69(1): 128–41. <https://doi.org/10.1111/prd.12092>
8. Burns E., Bachrach G., Shapira L., Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J. Immunol.* 2006; 177(12): 8296–300. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8296>
9. Jia L., Han N., Du J., Guo L., Luo Z., Liu Y. Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; (9): 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
10. Krauss J.L., Potempa J., Lambris J.D., Hajishengallis G. Complementary Tolls in the periodontium: How periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol. 2000.* 2010; 52(1): 141–62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00324.x>
11. Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand. J. Immunol.* 2019; 90(1): e12771. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>
12. Nichols F.C., Yao X., Bajrami B., Downes J., Finegold S.M., Knee E., et al. Phosphorylated dihydroceramides from common human bacteria are recovered in human tissues. *PLoS One.* 2011; 6(2): e16771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016771>
13. Trejo-de la O.A., Hernández-Sancén P., Maldonado-Bernal C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun.* 2014; 15(4): 199–209. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.10>
14. Bayrakova A.L., Voropaeva E.A., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Nesvizhskiy Yu.V., Karaulov A.V. et al. The role and biological significance of Toll-like receptors in the anti-infectious resistance of the organism. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2008; (1): 45–54. (in Russian)
15. Bondarenko V.M., Gintsburg A.L., Likhoded V.G. Implication of an infectious factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2011; (1): 7–11. (in Russian)
16. Koren O., Spor A., Felin J., Fåk F., Stombaugh J., Tremaroli V., et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(Suppl. 1): 4592–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011383107>
17. Khaitov R.M., Pinegin B.V., Yarin A.A. *Manual of Clinical Immunology: Diagnosis of Diseases of the Immune System [Rukovodstvo po klinicheskoy immunologii: diagnostika zabolevaniy immunnoy sistemy]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)

Информация об авторах

Царев Виктор Николаевич — д.м.н., профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, nikola777@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Николаева Елена Николаевна — д.м.н., профессор, г.н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7854-3262>

Ипполитов Евгений Валерьевич — д.м.н., профессор, с.н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

Царева Татьяна Викторовна — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Подпорин Михаил Сергеевич — к.м.н., н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

Балмасова Ирина Петровна — д.м.н., профессор, зав. лаб. патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний Научно-исследовательского медицинского стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.09.2022;
принята к публикации 26.10.2022;
опубликована 30.10.2022

Information about the authors

Viktor N. Tsarev — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, nikola777@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Elena N. Nikolaeva — D. Sci. (Med.), Professor, main senior researcher, Laboratory of molecular biological researches, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7854-3262>

Evgeniy V. Ippolitov — D. Sci. (Med.), Professor, senior researcher, Laboratory of molecular biological researches, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

Tatyana V. Tsareva — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of microbiology, virology, immunology, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Mikhail S. Podporin — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of molecular biological researches, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

Irina P. Balmasova — D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of pathogenesis and methods of treatment of infectious diseases, Scientific Research Medical Dental Institute, Moscow State University of Medicine and Dentistry named A.I. Evdokimov, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 09.09.2022;
accepted for publication 26.10.2022;
published 30.10.2022