

**Ю.В.Сидаш**

ВГУЗ Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия»

**Ключевые слова:** хронический гранулирующий периодонтит, иммуногистохимические маркеры, иммунные клетки, пролиферативная активность.

Надійшла: 04.02.2010

Прийнята: 12.03.2010

УДК: 616.314.19-002.2-08:612.017

## **ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГРАНУЛИРУЮЩЕГО ПЕРИОДОНТИТА**

*Обзор и оригинальные исследования проведены в рамках научно-исследовательской работы «Патогенетические подходы к методам лечения основных стоматологических заболеваний на основании изучения механизмов повреждения твердых тканей эндодонта, пародонта и СОПР» (номер государственной регистрации 0104U004411).*

**Резюме.** Целью исследования было установление количественной динамики клеток иммунного ряда и изучение пролиферативной активности в патологическом очаге до и после лечения хронического гранулирующего периодонтита. До лечения количество CD3+, CD4+, CD20+, CD138+, CD68+ клеток имело статистически достоверные различия по сравнению с контролем. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов составляло 0,87. Доля плазматических клеток среди всех лимфоцитов составляла 37,8%. При использовании традиционной методики лечения гранулирующего периодонтита из всех изученных показателей до величин, статистически не отличающихся от контроля, восстанавливалось только количество CD68+ клеток. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов увеличивалось на 0,02, доля плазматических клеток - до 43,8%. При использовании комплексной методики лечения к уровню, статистически не отличающемуся от контроля, приближались все изученные показатели, кроме доли клеток, позитивных на Ki67. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов возрастало на 0,05, а соотношение CD138+/CD20+ клеток увеличивалось до 0,53. Наиболее существенным изменениям в распределении внутри грануляционной ткани после лечения подвергались В-лимфоциты.

**Морфологія.** – 2010. – Т. IV, № 1. – С. 47-53.

© Ю.В.Сидаш, 2010

**Sidash Yu.V. The immunohistochemical estimation of local immune reaction in chronic granulating periodontitis.**

**Summary.** The purpose of the current study was to establish quantitative dynamics of immune cells and to study proliferative activity in pathologic foci before and after treatment of chronic granulating periodontitis. Before treatment the number of CD3+, CD4+, CD20+, CD138+, CD68+ cells had statistically reliable distinctions in comparison with the control. CD4+/CD8+ lymphocytes ratio was 0.87. The share of plasma cells among all B-lymphocytes was 37.8%. After traditional treatment of granulating periodontitis only quantity of CD68+ cells was not statistically different from the control. CD4+/CD8+ lymphocytes ratio increased on 0.02, the share of plasma cells - to 43.8%. After original complex treatment all studied parameters, excepting Ki67+ cells, reached the level, statistically not different from the control. CD4+/CD8+ lymphocytes ratio increased on 0.05, and CD138+/CD20+ lymphocytes ratio increased to 0.53. The most prominent changes within granular tissue after treatment occurred in distribution of B-lymphocytes.

**Key words:** chronic granulating periodontitis, immunohistochemical markers, immune cells, proliferative activity.

### **Введение**

Нарушения местной иммунной защиты играют первостепенную роль при развитии хронических заболеваний пародонта. Клетки иммунного ряда в последние годы активно исследуются при различных формах периодонтитов. Так, А.М.Алави с соавторами (1998) показали, что при нелеченной периапикальной патологии изменяется количество клеток воспалительного инфильтрата по сравнению с образцами, взятыми после лечения. Это относилось к В-лимфоцитам, популяции Т-лимфоцитов и субпопуляции Т-хелперов. Также изменялись соотношения: Т-

хелперы/Т-супрессоры и Т-лимфоциты/все лимфоциты. А.Лукич с сотрудниками (2008) при иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании широкого спектра клеток у пациентов с хроническим периапикальным воспалением выявили, что большая часть клеток, участвующих в иммунном ответе, это CD4+ и CD8+ субпопуляции Т-лимфоцитов, В-лимфоциты, CD14+ клетки и, в меньшей степени, CD80+, CD86+, CD83+, CD1a+ клетки. М.Донати с соавторами (2009) отмечают, что среди всех клеток иммунного ряда при хронических периодонтитах преобладают В-лимфоциты. В то же время I.Márton с сотрудни-

ками (1999) при периапикальных гранулемах обнаружил, что CD3+ Т-лимфоциты составляют 50% всех мононуклеарных клеток, а А.П.Педорец с соавторами (2002) указывают на преобладание Т-лимфоцитов при хронических верхушечных периодонтитах.

Таким образом, существует необходимость уточнения количественной динамики клеток иммунного ряда до и после лечения хронических периодонтитов.

**Целью** работы была морфологическая и количественная оценка популяций Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-супрессоров, В-лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов, оценка пролиферативной активности в патологическом очаге при хроническом гранулирующем периодонтите до и после лечения.

#### Материалы и методы

Для морфологического и иммуногистохимического исследования использовали парафиновые блоки биопсийного материала грануляционной ткани, взятой у 7 больных хроническим гранулирующим периодонтитом до лечения, у 7 – после традиционного лечения и у 7 – после лечения по разработанной нами методике с применением фотоактивированной дезинфекции корневых каналов и иммуномодулирующих препаратов. Для контроля использовали 5 образцов материала здоровых десен при удалении зубов с участками десны по ортопедическим и ортодонтическим показаниям. После стандартных гистологических процедур срезы толщиной 4-6 мкм наносили на адгезивные стекла SuperFrost Plus и депарафинизировали. Затем проводили нагрева-

ние в цитратном буфере с pH=6,0 в автоклаве (8 минут при температуре +121<sup>0</sup>C). С целью определения экспрессии ИГХ маркеров использовали спектр антител, которые включали маркеры: CD3 (клон SP7, LabVision), CD4 (клон 4B12, LabVision) CD8 (клон SP16, LabVision), CD20 (клон L26, LabVision), CD138 (клон MI15, LabVision), CD68 (клон KP1, LabVision), Ki67(клон SP6, LabVision). Инкубацию срезов с первичными антителами проводили во влажных камерах при температуре 23-25<sup>0</sup>C в течение 30 минут. Титр антител подбирался индивидуально. Следующий этап ИГХ исследования проводили с использованием систем визуализации UltraVision LP (LabVision), идентификация реакций проводилась с помощью хромогена DAB под контролем микроскопа от 20 секунд до 3 минут. Срезы докрашивали гематоксилином Майера. Для количественной оценки подсчитывали клетки каждой группы в 10 полях зрения в одном образце при увеличении ×400, а затем определяли среднее значение для всех случаев группы. Определение достоверности разницы между выборками проводили с учетом t-критерия Стьюдента. Оценку пролиферативной активности проводили из расчета на 100 клеток. Количество Ki67+ клеток выражали в процентах.

#### Результаты и их обсуждение

При гранулирующем периодонтите обнаруживалось несколько меньшее число Т-лимфоцитов (CD3+) клеток в грануляционной ткани, чем в окружающих ее тканях десны (79,2% от контроля, p<0,05) (табл. 1).

Таблица 1

Количественные изменения клеточного состава пораженных тканей при хроническом гранулирующем периодонтите

Клетки	До лечения	После традиционного лечения	После лечения по предложенной методике	В тканях десны (контроль)
CD3+ клетки, %	51,70±7,21*	53,60±5,43*	60,70±7,44	65,30±5,27
CD4+ клетки, %	23,60±1,74*	25,30±1,93*	28,4±2,5	32,50±3,08
CD8+ клетки, %	27,10±3,32	28,30±3,06	30,90±4,31	32,60±2,83
CD4+/CD8+	0,87	0,89	0,92	1,10
CD20+ клетки, %	21,40±3,49*	23,30±5,11*	25,80±2,14	31,20±2,88
CD68+ клетки, %	61,40±7,64*	63,60±7,85	67,40±6,92	77,60±6,42
CD138+ клетки, %	8,11±2,18*	10,20±1,13*	13,60±2,03	17,70±1,29
Ki67+ клетки, %	12,30±0,93*	11,00±0,72*	10,60±0,78*	6,21±0,50

Примечание: \* разница с контролем достоверна при 5% уровне значимости (p<0,05).

В грануляционной ткани распределение CD3+ клеток демонстрировало несколько паттернов внутри одного образца. Периваскулярные скопления могли быть выраженными, в этих случаях Т-лимфоциты составляли до 80% всех клеток инфильтрата (рис. 1). Вокруг групп мелких сосудов CD3+ клетки распределялись рав-

номерно, образуя вместе с сосудами регулярные образования (рис. 2). Также наблюдались участки, где CD3+ клетки практически отсутствовали. В среднем, количество CD3+ клеток составляло 52 на 10 полей зрения. CD8+ клетки составляли более половины от всех Т-лимфоцитов в участках периваскулярных скоплений вокруг мелких

сосудов, но их было меньше в более крупных скоплениях (в среднем 52,4% от всех Т-лимфоцитов). Наблюдалось незначительное ко-

личество единичных CD8+ клеток. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов составляло 0,87.

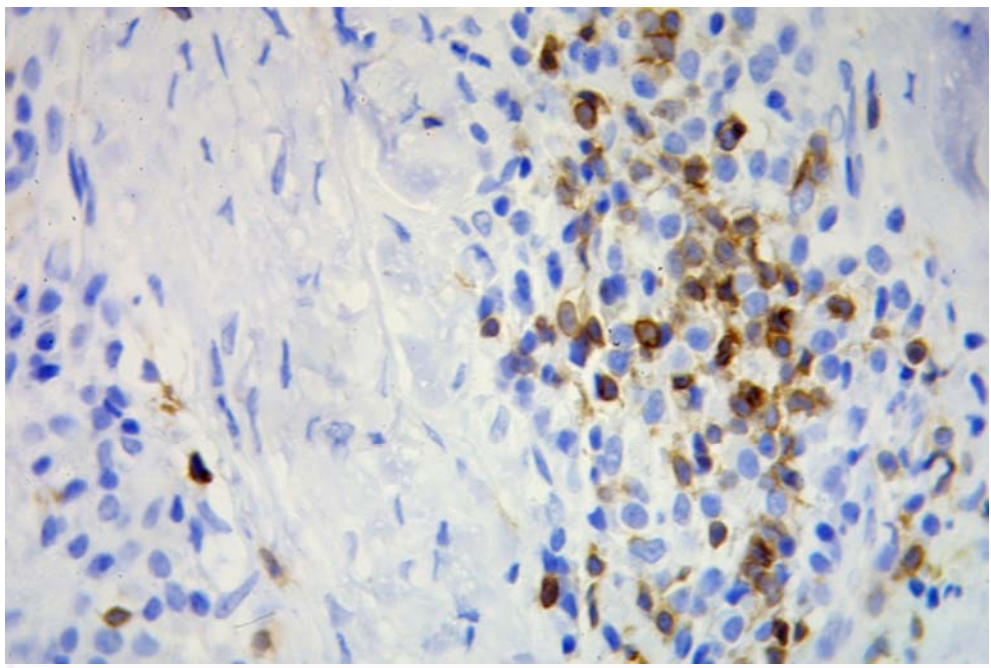


Рис. 1. Т-лимфоциты в периваскулярных инфильтратах при гранулирующем периодонтите. Иммуногистохимическая реакция с CD3.  $\times 1000$ .

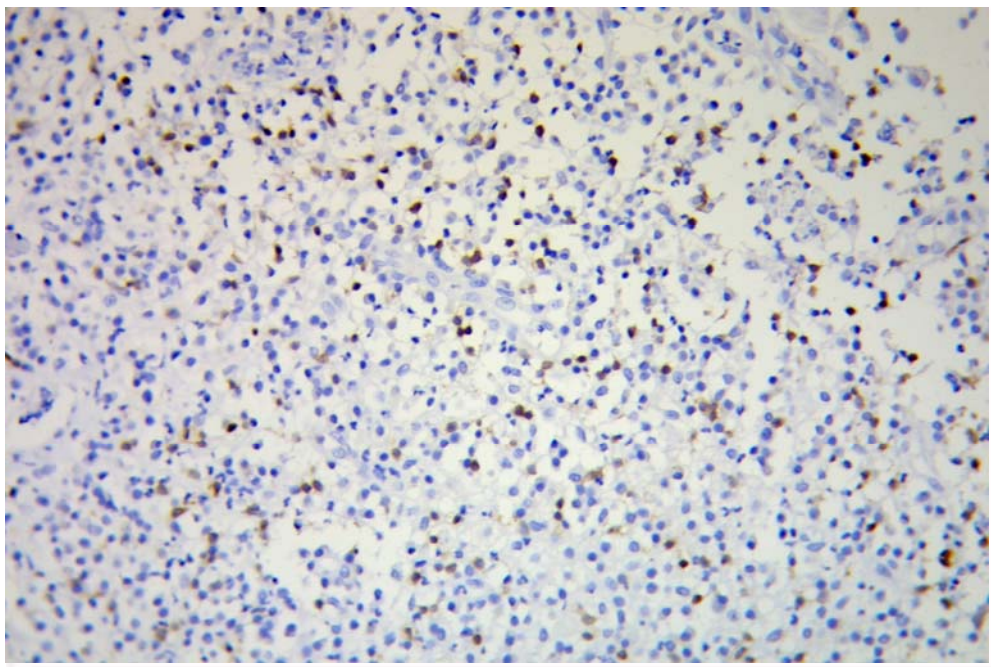


Рис. 2. Распределение Т-лимфоцитов при гранулирующем периодонтите. Иммуногистохимическая реакция с CD3.  $\times 200$ .

Распределение CD4+ клеток мало отличалось от распределения CD8+ лимфоцитов.

CD20+ клетки составляли относительно меньшую долю от всех воспалительных элементов.

При этом в тканях десны наблюдалось большее количество этих клеток, чем в патологических очагах. В грануляционной ткани количество В-

лимфоцитов составило 68,6% от контроля (табл. 1). В-лимфоциты чаще, чем другие иммунные клетки, формировали скопления (рис. 3).

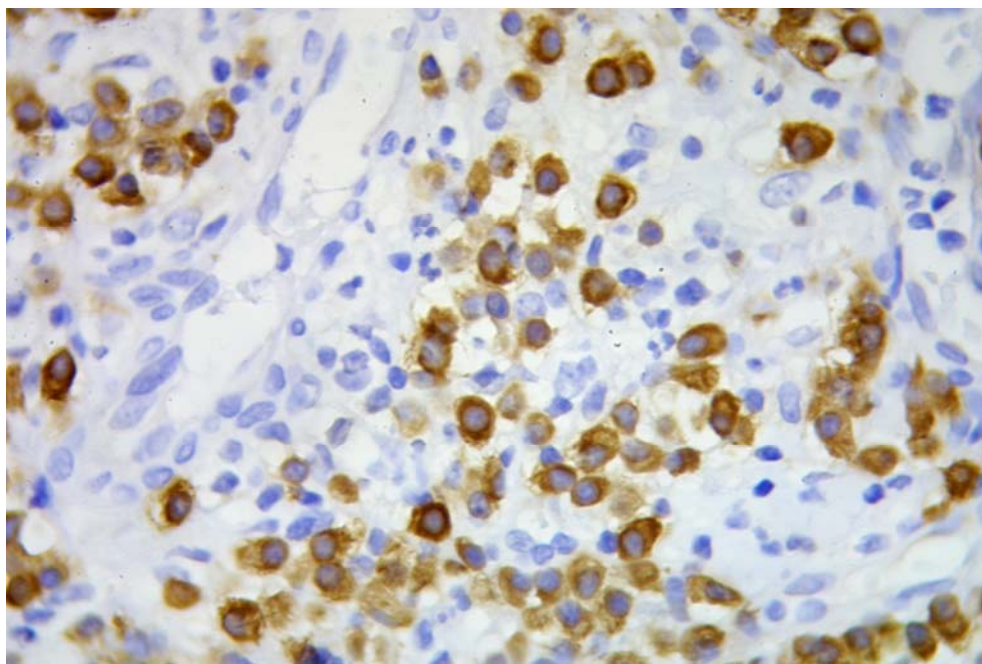


Рис. 3. Скопление В-лимфоцитов в грануляционной ткани при гранулирующем периодонтите. Иммуногистохимическая реакция с CD20.  $\times 1000$ .

При сравнении доли CD68+, CD3+ и CD20+ клеток в очагах хронического воспаления выяснилось, что последние составляют около 15%. CD20+ клетки в грануляционной ткани распределялись вокруг сосудов. Скопления этих клеток, не связанные с сосудами, были менее плотными.

Распределение CD138+ клеток имело такие же черты, как и CD20+ клеток. Основная локализация плазматических клеток свидетельствовала об их активной миграции от микрососудов в периферические части грануляционной ткани (рис. 4). При гранулирующем периодонтите CD138+ клетки не демонстрировали тенденцию к формированию скоплений. Их распределение было относительно равномерным.

Ткани десны, изученные около очагов поражения, демонстрировали значительное количество макрофагов. Количество макрофагов отличалось от контроля более чем на 20% ( $p < 0,05$ ). CD68+ клетки были распределены более равномерно по сравнению с другими видами клеток иммунного ряда, как внутри, так и вне периваскулярных инфильтратов.

В результате лечения по разработанной методике мы наблюдали увеличение количества клеток иммунного ряда в очагах хронического воспаления. При лечении гранулирующего периодонтита по традиционной методике увеличилось количество CD3+ клеток на 3,7%, CD20+ клеток на 8,9%, CD68+ клеток на 3,6%. При этом

относительная доля Т-супрессоров в популяции Т-лимфоцитов сохранялась на том же уровне, среди В-лимфоцитов до 43,8% увеличивалась доля CD138+ плазмоцитов. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов увеличивалось до 0,89. В распределении Т-лимфоцитов после лечения по традиционной методике в основном сохранялись тенденции, наблюдаемые до начала лечения. Существенная доля CD3+ клеток оставалась в составе периваскулярных инфильтратов, где накопление этой группы лимфоцитов было наиболее выраженным (до 70% от всех мононуклеарных клеток). Также наблюдалась и описанная до лечения периодичность в распределении сосудистых и иммунных элементов в грануляционной ткани. По сравнению с морфологической картиной, наблюдаемой до лечения, мало изменялось распределение В-лимфоцитов и внутри этой популяции CD138+ клеток, а также CD68+ клеток.

После лечения хронического гранулирующего периодонтита по разработанной нами методике с применением фотоактивированной медико-инструментальной обработки корневых каналов и иммуномодулирующих препаратов популяция CD3+ клеток возростала на 17,4%. Также происходили перестройки внутри популяции CD3+ клеток: наблюдалось уменьшение относительной доли CD8+ Т-лимфоцитов до 50,9%, соотношение CD4+/CD8+ изменялось до 0,92.

Количество CD20+ клеток увеличивалось на 20,6%, а CD68+ клеток – на 9,8%. Доля плазмо-

цитов увеличивалась до 52,7% среди всех В-лимфоцитов.

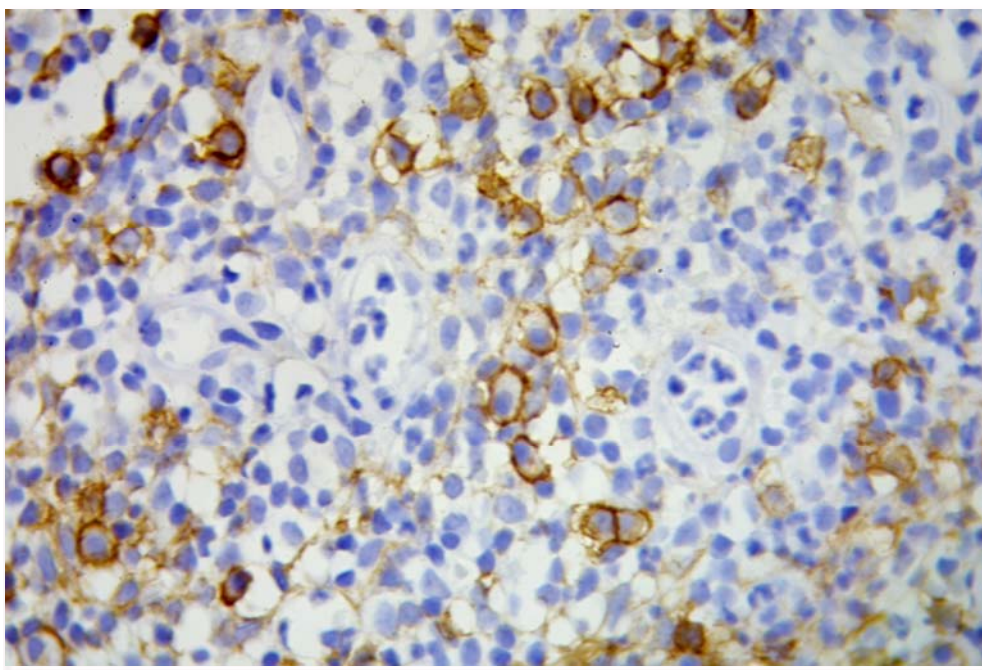


Рис. 4. Плазмоциты в грануляционной ткани при гранулирующем периодонтите. Иммуногистохимическая реакция с CD138.  $\times 1000$ .

В отличие от морфологической картины, наблюдаемой после лечения по традиционной методике, происходили существенные изменения в распределении клеток иммунного ряда. Так, в периваскулярных инфильтратах количество Т-лимфоцитов уменьшалось, наряду с сокращением размеров инфильтрата. При этом в грануляционной ткани большую часть составляли единичные Т-лимфоциты, а также CD3+ клетки, образующие небольшие группы около сосудов. В распределении В-лимфоцитов и плазмоцитов, как и Т-лимфоцитов, наблюдалась тенденция к более диффузному распределению. В расположении макрофагов существенных изменений не происходило.

Таким образом, независимо от выбранной методики при лечении гранулирующего периодонтита наблюдается увеличение количества иммунных клеток. Эта тенденция была выражена слабее при использовании традиционной методики так же, как и изменения в соотношении CD8+/CD3+ лимфоцитов, CD4+/CD8+ лимфоцитов и CD138+/CD20+ лимфоцитов.

В грануляционной ткани существенно повышалось число Ki67+ клеток в основном за счет фибробластов (табл. 1). Незначительно повышался уровень Ki67+ клеток в эпителии десны, прилежащих к очагам грануляционной ткани, по сравнению с интактной тканью десен (рис. 5). Пролиферативная активность клеток иммунного ряда занимала промежуточное положение.

В результате лечения по разработанной и традиционной методике мы наблюдали снижение количества Ki67+ клеток, что относилось в большей степени к клеткам фибробластического ряда в очагах хронического воспаления и в окружающих тканях десны. Использование разработанной методики давало лучший результат по сравнению с традиционной. Так, сдвиги в количестве Ki67 клеток при гранулирующем периодонтите составили 10,6% при лечении по традиционной методике и 13,8% – при использовании предложенной методики.

При статистическом анализе количественных показателей выяснилось, что до лечения количество CD3+, CD4+, CD20+, CD138+, CD68+ клеток имело достоверные различия по сравнению с контролем. Исключение составили только CD8+ лимфоциты. Возможно, что это звено иммунитета находится в меньшей зависимости от иммунодепрессии, развивающейся при хроническом воспалении. При использовании традиционной методики лечения хронического гранулирующего периодонтита изменялось только количество макрофагов, а при использовании разработанной нами методики к уровню, статистически не отличающемуся от контроля, приближались все изученные показатели, кроме доли клеток, позитивных на Ki67.

При хроническом гранулирующем периодонтите доля Т-супрессоров составляла 52,4%. В тканях десны это соотношение составляло 0,49-

0,50. В результате лечения хронического гранулирующего периодонтита по традиционной методике соотношение практически не изменялось, а при лечении по предложенной нами методике – снижалось до 50,9%. Необходимо отметить, что при лечении хронического гранулирующего периодонтита по традиционной методике, при увеличении общего количества Т-лимфоцитов соотношение CD8+/CD3+ лимфоцитов не изменялось. Динамика соотношения CD138+/CD20+

лимфоцитов была более активной после лечения по комплексной методике. При гранулирующей форме периодонтита восстановление этого показателя было более выраженным при использовании обоих видов лечения. Таким образом, показателем результативности лечения может быть не только увеличение относительного количества клеток, но и изменения соотношений в составе разных типов клеток.

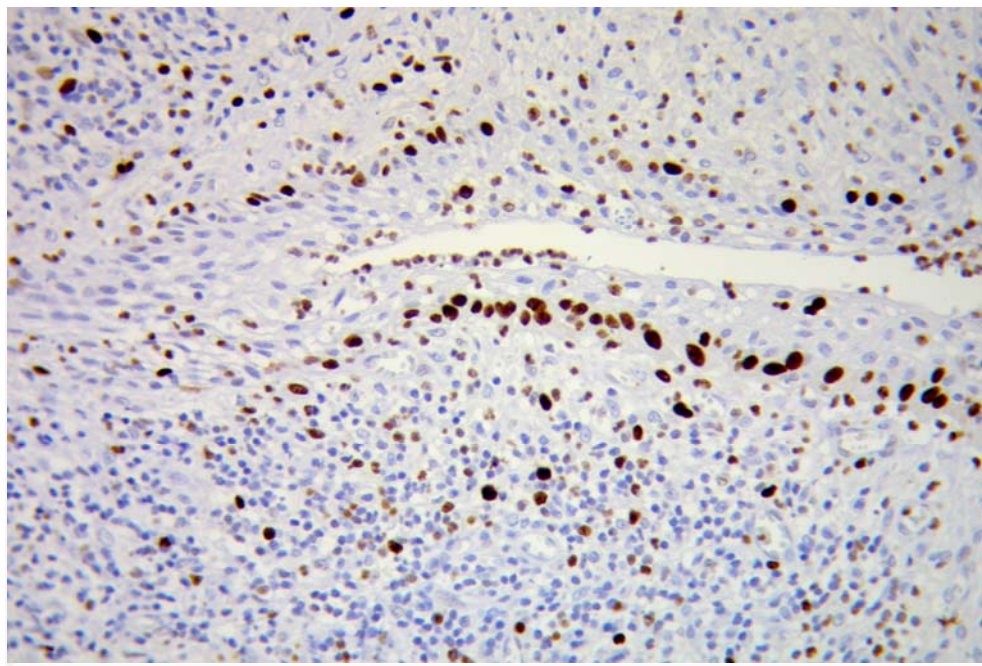


Рис. 5. Пролиферирующие клетки в эпителии десны и в инфильтратах в грануляционной ткани при гранулирующем периодонтите. Иммуногистохимическая реакция с Ki67.  $\times 400$ .

Увеличение количества клеток иммунного ряда наряду с уменьшением пролиферативной активности не зависимо от выбранной методики свидетельствует об усилении миграции лимфоцитов в очаги поражения при снижении выраженности фиброзных изменений. Полученные результаты указывают на наличие как местной, так и общей реакции на проведенное лечение.

#### Заключение

При гранулирующем периодонтите показатели местного иммунитета – количество CD3+, CD4+, CD20+, CD138+, CD68+ клеток имели статистически достоверные различия по сравнению с контролем. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов составляло 0,87. Доля плазмочитов среди всех лимфоцитов составила 37,8%. При использовании традиционной методики лечения гранулирующего периодонтита из всех изученных показателей до величин, статистически не

отличающихся от контроля, восстанавливалось только количество CD68+ клеток. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов увеличивалось на 0,02, доля плазмочитов – до 43,8%. При использовании комплексной методики лечения гранулирующего периодонтита к уровню, статистически не отличающемуся от контроля, приближались все изученные показатели, кроме доли клеток, позитивных на Ki67. Соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов возрастало на 0,05, а соотношение CD138+/CD20+ клеток увеличивалось до 0,53.

#### Перспективы дальнейших разработок

Дальнейшие исследования в области патогенеза хронических заболеваний периодонта должны включать более широкий спектр компонентов иммунной системы, их взаимодействия с клетками иммунной системы и патологически измененными тканями.

## Литературные источники

Внутриканальная медикаментозная терапия при хронических и обострившихся периодонти-тах / А. П. Педорец, С. И. Максютенко, В. Н. Шабанов [и др.] // Вісник стоматології. – 2002. – № 1. – С. 18-22.

Alavi A. M. Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions / Alavi A. M., Gulabivala K., Speight P. M. // Int. Endod. J. – 1998. – Vol. 31, № 4. – P. 233-241.

Analysis of activated cells in apical granuloma / Márton I., Radics T., Szakáll S., Kiss C. // Fogorv.

Sz. – 1999. – Vol. 92, № 12. – P. 379-385.

B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions / Donati M., Liljenberg B., Zitzmann N. U., Berglundh T. // J. Periodontal Res. – 2009. – Vol. 44, № 5. – P. 683-688.

Lukić A. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions / Lukić A., Danilović V., Petrović R. // Vojnosanit. Pregl. – 2008. – Vol. 65, № 6. – P. 435-440.

### **Сідаш Ю.В. Імуногістохімічна оцінка місцевого імунітету при хронічному гранулюючому періодонтиті.**

**Резюме.** Метою дослідження було встановлення кількісної динаміки клітин імунного ряду й вивчення проліферативної активності в патологічному осередку до і після лікування хронічного гранулюючого періодонтита. До лікування кількість CD3+, CD4+, CD20+, CD138+, CD68+ клітин мала статистично достовірні відмінності у порівнянні з контролем. Співвідношення CD4+/CD8+ лімфоцитів становило 0,87. Частка плазмоцитів серед усіх лімфоцитів складала 37,8%. При використанні традиційної методики лікування гранулюючого періодонтита із усіх вивчених показників до величин, що статистично не відрізнялися від контролю, відновлювалася тільки кількість CD68+ клітин. Співвідношення CD4+/CD8+ лімфоцитів збільшувалося на 0,02, частка плазмоцитів – до 43,8%. При використанні комплексної методики лікування до рівня, що статистично не відрізняється від контролю, наближалися всі вивчені показники, крім частки клітин, позитивних на Ki67. Співвідношення CD4+/CD8+ лімфоцитів зростало на 0,05, а співвідношення CD138+/CD20+ клітини збільшувалося до 0,53. Найбільш істотних змін у розподілі в грануляційній тканині після лікування зазнавали В-лімфоцити.

**Ключові слова:** хронічний гранулюючий періодонтит, імуногістохімічні маркери, імунні клітини, проліферативна активність.