

П.І.Гриценко
А.В.Самойленко
І.С.Шпонька
О.В.Пославська

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: апікальний періодонтит, запальний інфільтрат, COX-2, MMP-9, імуногістохімія.

Надійшла: 24.02.2015

Прийнята: 23.03.2015

УДК 616.314.17-036.1-008.811.9-08:615.37

ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ГРАНУЛЯЦІЙНОЇ ТКАНИНИ ПРИ ПЕРВИННОМУ ТА ВТОРИННОМУ АПІКАЛЬНОМУ ПЕРІОДОНТИТІ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Розробка і впровадження нових методів діагностики, лікування і профілактики карієсу та його ускладнень, захворювань пародонту і слизової оболонки порожнини рота» (номер державної реєстрації 0110U003018).

Реферат. Метою даної роботи було порівняння якісних та кількісних характеристик клітинного складу грануляційної тканини, що формується в ході первинного та вторинного апікального періодонтиту, співставлення морфологічних особливостей будови періапікальної гранульоми з імуногістохімічними показниками експресії маркерів кластерної диференціації CD3, CD4, CD8, CD68, CD138, CD20, а також циклооксигенази-2 та матричної металопротеїнази 9. Значущі відмінності було виявлено для фракцій CD4⁺ Т-хелперів (p=0,034, r=0,321), CD20⁺ зрілих В-лімфоцитів (p=0,001, r=0,671), CD68⁺ макрофагів і гігантських клітин (p=0,011, r=0,684) та CD138⁺ плазматичних (p=0,002, r=0,645). А також вірогідне зменшення відношення CD4⁺/CD8⁺ (p=0,002, r=0,645), за рахунок зменшення фракції CD4⁺ Т-хелперів, на тлі зменшенні кількості поліморфноядерних лейкоцитів, експресії MMP-9 (p=0,04, r=0,302) та COX-2 (p=0,013, r=0,321) при вторинному апікальному періодонтиті, порівняно з первинним.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 13-19.

© П.І.Гриценко, А.В.Самойленко, І.С.Шпонька, О.В.Пославська, 2015

✉ savdsma@yandex.ua

Gritsenko P.I., Samojlenko A.V., Shpon'ka I.S., Poslavska O.V. Immunohistochemical features of the granulation tissue structure in the primary and secondary apical periodontitis.

ABSTRACT. Background The search of criteria of differential enzymatic activity of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases immunocompetent cells of granulomas in the primary and secondary apical periodontitis (AP) provides information about the features of lesions of periodontal stromal component, and it can be used as the basis for future therapeutic intervention. **Objective.** The purpose of this study was to compare the qualitative and quantitative characteristics of the cellular composition of granulation tissue, which formed during primary and secondary apical periodontitis; comparison of morphological characteristics of the structure apical granuloma with immunohistochemical indicators of markers expression of cluster of differentiation CD3, CD4, CD8, CD68, CD138, CD20 and cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase 9. **Methods.** The study included 59 patients aged 18 to 50 years with apical periodontitis. Patients were divided into 2 clinical group: 1 – with primary periodontitis and 2 – with secondary periodontitis. For morphological studies using peryapikalnoyi granulation tissue biopsies. **Results.** Significant differences were found for the fractions of CD4⁺ T helper cells (p=0,034, r=0,321), CD20⁺ mature B lymphocytes (p=0,001, r=0,671), CD68⁺ macrophages (p=0,011, r=0,684) and CD138⁺ plasma cells (p=0,002, r=0,645). And, also likely decrease in the ratio of CD4⁺/CD8⁺ (p=0,002, r=0,645), by reducing the fraction of CD4⁺ T-helper cells, against reducing the number of leukocytes, expression of MMP-9 (p=0,04, r=0,302) and COX-2 (p=0,013, r=0,321) with secondary apical periodontitis, compared to the primary periodontitis. **Conclusion.** Disease progression and the beginning of the destruction of bone tissue with the formation of granulation tissue is the result of abnormal immune responses, III and IV type hypersensitivity reactions, with the formation of immune granulomas.

Key words: apical periodontitis, inflammatory infiltrate, COX-2, MMP-9, immunohistochemistry.

Citation:

Gritsenko PI, Samojlenko AV, Shpon'ka IS, Poslavska OV. [Immunohistochemical features of the granulation tissue structure in the primary and secondary apical periodontitis]. Morphologia. 2015;9(1):13-9. Ukrainian.

Вступ

Патогенез запальних хвороб періодонту є досить складним і вимагає глибокого розуміння мікроскопічних та біохімічних особливостей ураження опорної конструкції зубу для запобігання глибоких деструктивних процесів і рецидивів хвороби після проведення лікування (вторинний періодонтит). Але не менш важливим є з'ясування ролі місцевого імунного гомеостазу, що змінюється у відповідь на бактеріальну колонізацію у біоплівках. Здатність імунної системи відповідати на подразники для скоординованої дії імунних клітин залежить від можливості спілкування їх між собою, що може здійснюватися через клітинні контакти або шляхом секреції сигнальних білків, так званих цитокінів [1-3]. Обидва шляхи реалізуються через різні мембранозв'язані рецептори і ліганди (молекули, які зв'язуються з рецепторами, та ініціюють перехід сигналу до клітини), які експресуються на поверхні клітин в потрібний момент [4, 5]. Сотні таких рецепторів і лігандів були визначені імунологами всього світу і кожен рецептор має міжнародний номер під назвою «Кластер диференціації» (Cluster of Differentiation) або CD [1]. Всі Т-лімфоцити експресують рецептор CD3, проте, «Т-helper» лімфоцити експресують також рецептор CD4, а супресорні – CD8, що і відрізняє їх. Дисбаланс останніх фракцій відіграє важливу роль в прогресуванні хвороби [6-8], до того ж дослідження багатьох авторів показують [1, 7, 9], що реакції гіперчутливості, особливо III і IV ти-

пу, можуть бути залучені в патогенез захворювання періодонту, що викликає виникнення імунних гранулом. Пошук критеріїв диференціальної ферментативної активності циклооксигенази-2 та матриксних металопротеїназ імунокомпетентних клітин гранулом при первинному та вторинному апікальному періодонтиті (АП) надає інформацію щодо особливостей ураження стромального компонента періодонту, і це може бути покладено в основу майбутнього терапевтичного втручання.

Мета: дослідити та порівняти склад грануляційної тканини, активність циклооксигенази-2 і інтенсивність процесів стромальної деградації за рахунок визначення експресії матриксної металопротеїнази-9 при первинному та вторинному апікальному періодонтиті, для з'ясування патогенетичних механізмів розвитку запалення і можливості оптимізації лікувальних заходів.

Матеріали та методи

В дослідження було включено 59 пацієнтів (25 жінок та 34 чоловіків) у віці від 18 до 50 років (середній вік $41 \pm 2,76$) з апікальним періодонтитом, що проходили лікування на базі «Обласної стоматологічної поліклініки», м. Дніпропетровськ протягом 2010-2013 рр. В залежності від анамнезу та клінічного перебігу всі пацієнти були розділені на 2 клінічні групи: 1-я – з первинним АП (лікування проводилось вперше) і 2-я – з вторинним АП (повторне звертання через рецидив хвороби), дані занесені в таблицю 1.

Таблиця 1

Характеристика клінічних даних пацієнтів

Характеристика клінічних даних пацієнтів	Кількість випадків (n=59)	Відсотки (%)
Стать		
Жінки	25	42,4%
Чоловіки	34	57,6%
Групи порівняння:		
Первинний АП	28	47,5%
Вторинний АП	31	52,5%

Для морфологічного дослідження використовували біоптати періапікальної грануляційної тканини об'ємом 2-2,5мм. Забір біопсійного матеріалу здійснювався в момент стоматологічних маніпуляцій після ін'єкційного знеболення 4% р-ром Ubistesin forte з інформованої згоди пацієнта.

Біоптати фіксувалися у 4% розчині нейтрального формаліну протягом доби і заливалися в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4-6 мкм наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus, після депарафінізації та регідратації зрізів проводили температурне демаскування антигенів (зрізи були розміщені в цитратному буфері з рН 6.0 і підігрівалися в автоклаві при температурі +121°C 8 хвилин) та пригнічували активність ендогенної пероксидази 3% розчином

перекису водню протягом 20 хвилин. Далі проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25°C на протязі 30 хвилин. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, CD138, COX-2, MMP-9 (LabVision), титр розведення підбирався індивідуально для кожного маркера з використанням у якості розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (TermoScientific), дані занесені в таблицю 2.

Для ідентифікації реакції використовували надчутливу систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision), з хромогеном 3-діамінобензидин тетрахлорид (ДАБ) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу протягом

від 20 секунд до 3 хвилини, з проявом у вигляді коричневого забарвлення специфічних структур. Для відокремлення незабарвлених тканинних

структур зрізи додатково обробляли гематокси-ліном Майєра протягом 1-3 хвилини.

Таблиця 2

Первинні моноклональні антитіла

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Локалізація специфічної реакції
СОХ-2	SP21 (1:100)	Цитоплазма, мембрана
MMP-9	Collagenasa IV (1:50)	Цитоплазма
CD3	SP7 (1:500)	Цитоплазма
CD4	4B12 (1:500)	Цитоплазма
CD8	SP18 (1:500)	Цитоплазма
CD68	KP1 (1:500)	Цитоплазма
CD138	MI15 (1:200)	Цитоплазма, мембрана
CD20	L26 (1:500)	Мембрана, цитоплазма

Згідно рекомендаціям багатьох авторів цитоплазматичну експресію маркеру СОХ-2 розбивали за трьома градаціями: (1+) – слабкий інфільтрат, (2+) – помірний інфільтрат, (3+) – виражений запальний інфільтрат з позитивною міткою. Оцінка цитоплазматичної експресія Collagenasa IV (MMP-9) в епітеліальних, стромальних клітинах та клітинах запального інфільтрату відбувалася також за напівкількісною шкалою – негативна (0), слабка (1+), помірна (2+) та висока (3+) експресія. Кількість імуніцитів розраховувалась як відсоток імуніцитів позитивних клітин на 100 відповідних клітин інфільтрату в десяти випадково обраних полях зору під збільшенням ($\times 400$).

Дані вищенаведених морфометричних та імуністохімічних досліджень зазнавали статистичної обробки з використанням точного тесту Фішера і непараметричного коефіцієнта Манна-

Уїтні в програмі SPSS Statistica 17.0. за допомогою IBM PC сумісного комп'ютера "Pentium 4".

Результати та їх обговорення

Структурна організація періодонта при вторинному АП характеризувалася вираженою клітинною інфільтрацією з преобладанням клітин моноцитарно-макрофагального ряду і лімфоцитів, розростанням колагенових волокон, відкладенням мінеральних солей, гемодинамічними судинними порушеннями. При первинному АП навпаки значно більшим виявилось відсоткове співвідношення поліморфно-ядерних лейкоцитів (ПЯЛ) (рис. 1 А) і відповідно активність MMP-9 ($p=0,04$), що відображає процеси деградації сполучної тканини (табл. 3, рис. 1 В), знайдено прямий кореляційний зв'язок між підвищенням експресії MMP-9 і варіантом перебігу АП ($p=0,04$, $r=+0,302$).

Таблиця 3

Розподіл значень експресії маркеру MMP-9 в різних варіантах АП, n

Градації експресії MMP-9	Варіант перебігу АП		p
	Первинний (n=28)	Вторинний (n=31)	
Негативна (0)	-	-	
Слабка (1+)	-	3 (9,7%)	p=0,04
Помірна (2+)	10 (35,7%)	17 (54,8%)	
Висока (3+)	18 (64,3%)	11 (35,5%)	

Примітка: різниця вірогідна по відношенню до первинного АП при рівні значущості $p<0,05$.

Зменшення активності ферменту MMP-9 із зміною складу запального інфільтрату при вторинному АП (рис. 1 Б) говорить про «хронізацію» запалення, активацію репаративних процесів з гіпертрофією фіброblastів і підсиленням колагенотворення, порівняно з первинним АП.

Всі зразки АП підлягали також ІГХ дослідженню з маркером СОХ-2, для з'ясування активності продукції прозапальних цитокінів – простагландинів, через секрецію ферменту циклоок-

сигенази 2. Більша кількість спостережень із обох груп АП – 59,3 % (n=35) показали високу експресію СОХ-2 в цитоплазмі імунікомпетентних клітин запального інфільтрату (рис. 1 Г), але при первинному АП це складало 71,4% всіх спостережень (n=20), а при вторинному АП – лише меншу половину – 48,4% (n=15), що говорить про зниження активності запалення (табл. 4). Це є закономірним відображенням збільшення активності СОХ-2 в ПЯЛ та інших клітинах зі збільшенням цитокінової

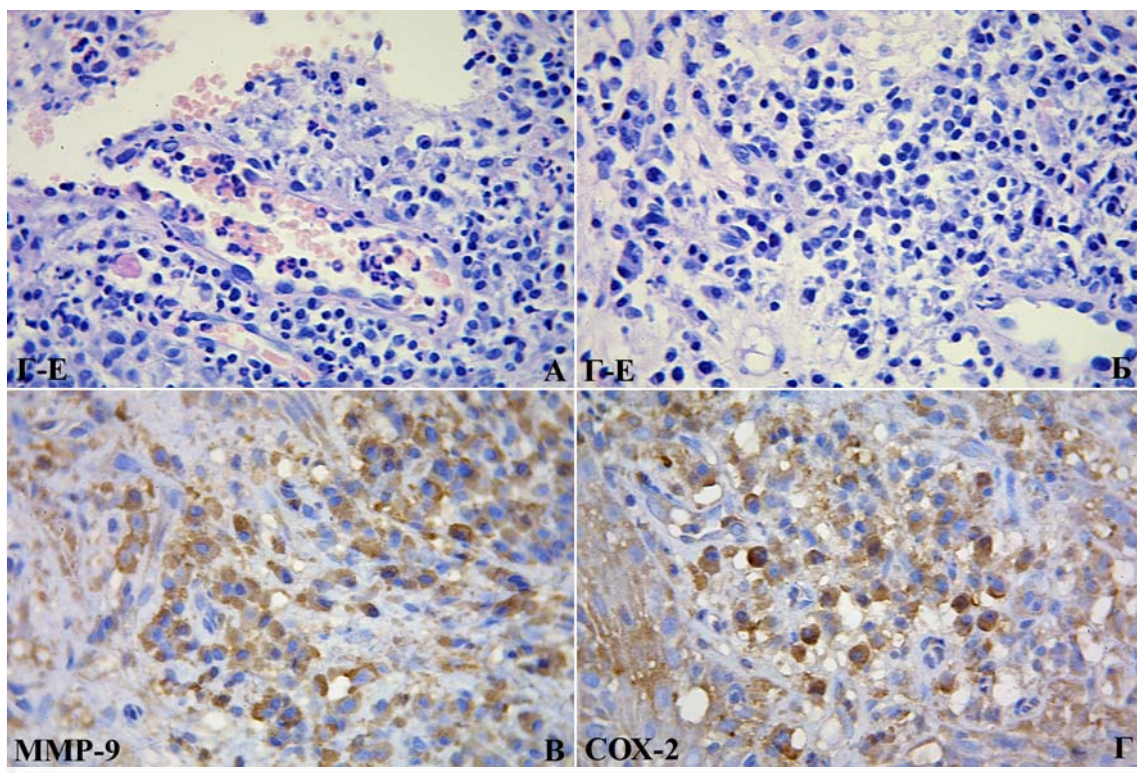


Рис. 1. А. Первинний АП: запальний інфільтрат характеризується великою кількістю ПЯЛ, що проникають в тканини ясен із паретично розширених судин, відмічається набряк строми, забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 400$. Б. Вторинний АП: склад інфільтрату інший – лімфоцити, плазмоцити, макрофаги, фібробласти, відмічається фіброз строми, забарвлення гематоксилином і еозином. $\times 400$. В. Цитоплазматична реакція високої інтенсивності (+3) з MMP-9 в запальному інфільтраті при первинному АП, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 400$. Г. Цитоплазматична реакція помірної (+2) та високої (+3) інтенсивності з COX-2 в запальному інфільтраті при вторинному АП, особливо в лімфоцитах і плазмоцитах, ІГХ, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 400$.

Таблиця 4

Розподіл значень експресії маркера COX-2 в різних варіантах АП, n

Градації експресії COX-2	Варіант перебігу АП		p
	Первинний (n=28)	Вторинний (n=31)	
Негативна (0)	-	-	
Слабка (1+)	-	-	
Помірна (2+)	8 (28,6%)	16 (51,6%)	p=0,013
Висока (3+)	20 (71,4%)	15 (48,4%)	

Примітка: різниця вірогідна по відношенню до первинного АП при рівні значущості $p < 0,05$.

При проведенні імуногістохімічного дослідження в зразках АП було також з'ясовано якісний і кількісний склад імуноцитів грануляційної тканини з маркерами кластерної диференціації: CD3⁺ (загальна популяція Т-лімфоцитів), CD4⁺ (Т-хелпери), CD8⁺ (Т-супресори), CD20⁺ (зрілі В-лімфоцити), CD68⁺ (макрофаги та гігантські клітини), CD138⁺ (плазмоцити) в тканинах ясен при первинному та вторинному АП (табл. 5, рис 2).

Значущі відмінності між групами первинно-

го та вторинного АП за кількістю імуноцитів було виявлено для фракцій CD4⁺ Т-хелперів ($p=0,034$, $r=0,321$), CD68⁺ макрофагів і гігантських клітин ($p=0,011$, $r=0,684$), CD20⁺ зрілих В-лімфоцитів ($p=0,001$, $r=0,671$) та CD138⁺ плазмоцитів ($p=0,002$, $r=0,645$). До того ж знайдено вірогідне зменшення показника відношення CD4⁺/CD8⁺ ($p=0,002$, $r=0,645$), за рахунок зменшення фракції CD4⁺ Т-хелперів при вторинному АП.

Розподіл імуноцитів в різних варіантах АП, М±m (%)

Маркер кластерної диференціації	Варіант перебігу АП		p
	Первинний (n=28)	Вторинний (n=31)	
CD3 ⁺	33,2±2,7	38,6±2,9	p=0,073
CD4 ⁺	18,4±1,4	12,4±1,6*	p=0,034
CD8 ⁺	10,9±0,9	11,2±0,7	p=0,053
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,6±0,1	1,2±0,1*	p=0,047
CD68 ⁺	10,6±1,0	28,6±2,9*	p=0,011
CD20 ⁺	17,1±1,2	37,6±2,9*	p=0,001
CD138 ⁺	18,6±1,3	35,2±2,0*	p=0,002

Примітка: різниця вірогідна по відношенню до первинного АП при рівні значущості p<0,05.

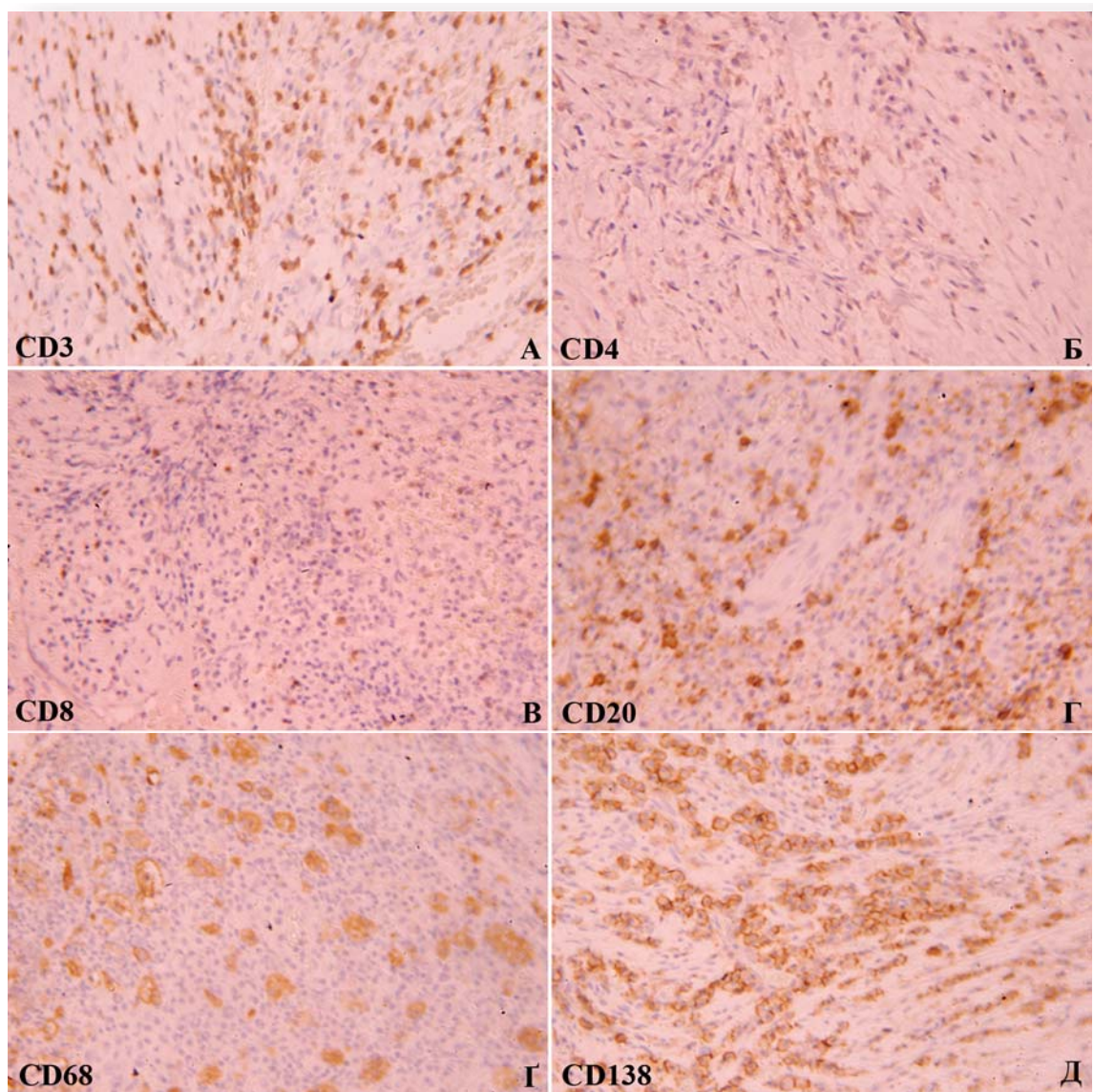


Рис. 2. Вторинний АП, ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. А. Цитоплазматична реакція Т-лімфоцитів з CD3. Б. Цитоплазматична реакція фракції Т-хелперів з CD4. В. Цитоплазматична реакція фракції Т-супресорів з CD8. Г. Цитоплазматична реакція зрілих В-лімфоцитів з CD20. Д. Цитоплазматична реакція макрофагів та гігантських клітин з CD68. Е. Цитоплазматична і мембранна реакція чисельних плазмоцидів з CD138. ×400.

Висновки

1. Аналізуючи експресію MMP-9 в різних варіантах АП, з'ясовано що при первинному АП значно більшим виявився відсоток ПЯЛ серед інших імунокомпетентних клітин, з, відповідно, більш інтенсивною експресією MMP-9, порівняно з вторинним АП. Знайдено прямий кореляційний зв'язок між підвищенням експресії MMP-9 і первинним АП, що відображає активність процесів деградації опорних тканин ясен ($p=0,04$, $r=+0,302$).

2. Експресія COX-2 в клітинах запального інфільтрату грануляційної тканини була на досить високому рівні в обох варіантах АП, але при первинному АП кількість випадків з високою експресією (3+) значно перевищувала (71,4%, порівняно з 48,4% вторинного АП), прямий кореляційний зв'язок ($p=0,014$, $r=0,321$).

3. При дослідженні кількісного складу запального інфільтрату грануляційної тканини виявилось, що CD3⁺ Т-лімфоцити відіграють значну роль не тільки в ініціації запалення при первинному АП, але і в якості постійного стимулятора резорбції опорних тканин при патологічних станах, що виникають в наслідок неефективного

лікування та тлі вторинного АП, про це говорить відсутність вірогідної різниці в кількості Т-клітин обох груп ($p=0,073$). Але динамічна рівновага окремих фракцій Т-клітин (хелпери/супресори), що порушується вже при первинному АП ($1,6\pm 0,1$), надалі тільки посилюється при вторинному ($1,2\pm 0,1$), за рахунок зменшення CD4⁺ Т-клітин ($p=0,002$, $r=0,645$).

4. Збільшення кількості активованих макрофагів ($p=0,011$, $r=0,684$), зрілих В-лімфоцитів ($p=0,001$, $r=0,671$) та плазмоцитів ($p=0,002$, $r=0,645$) при вторинному АП доводить їх активну участь у розвитку хронічних періапікальних уражень. Таким чином, прогресування захворювання і початок руйнування кісткових тканин з формуванням грануляційної тканини є наслідком аномальної імунної відповіді, реакцій гіперчутливості III і IV типів, з формуванням імунної гранульоми.

Перспективи подальших розробок. Викладені результати є частиною дослідження особливостей перебігу первинного та вторинного апікального періодонтиту. Результати, що отримані в роботі, можуть бути використані для пошуку ефективних засобів лікування.

Літературні джерела References

1. Mozgovaya LA, Zadorina II, Bykova LP, Godovalov AP. [Microflora of root canals during the treatment of chronic forms of apical periodontitis]. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2013;9(3):447-9. Russian.

2. Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. British Dental Journal. 2014;216:305-12. Cited in PubMed; PMID: 24651336.

3. Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. Endodontic Topics. 2004;8:36-54.

4. Dokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Colić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. Eur J Immunol. 2013;43:1862-72.

5. Popovska L, Zabokova-Bilbilova E, Mircheva E, Stojanovska V. Chronic periapical lesions: correlations with clinical finding. Prilozi. 2014;35(1):263-9. Cited in PubMed; PMID: 24802205.

6. Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, Sogayar M, Granjei-

ro JM. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(1):127-32. Cited in PubMed; PMID: 18926740.

7. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. Arch Oral Biol. 2009;54(8):764-71. Cited in PubMed; PMID: 19497558.

8. Lukić A, Vasilijić S, Majstorović I, Vučević D, Mojsilović S, Gazivoda D, Danilović V, Petrović R, Colić M. Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. Int Endod J. 2006;39(8):626-36. Cited in PubMed; PMID: 16872457.

9. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. Chin Med J (Engl). 2011;124(14):2162-6. Cited in PubMed; PMID: 21933620.

Гриценко П.И., Самойленко А.В., Шпонька И.С., Пославская А.В. Иммуногистохимические особенности строения грануляционной ткани при первичном и вторичном апикальном периодонтите.

Реферат. Целью данной работы было сравнение качественных и количественных характеристик клеточного состава грануляционной ткани, которая формируется при первичном и вторичном апикальном периодонтите; сопоставление морфологических особенностей строения периапикальной гранулемы с иммуногистохимическими показателями экспрессии маркеров кластерной дифференцировки CD3, CD4, CD8, CD68, CD138, CD20, а также циклооксигеназы-2 и матриксной металлопротеиназы 9. Найдена статистически достоверная разница для фракций CD4⁺ Т-хелперов (p=0,034, r=0,321), CD20⁺ зрелых В-лимфоцитов (p=0,001, r=0,671), CD68⁺ макрофагов / гигантских клеток (p=0,011, r=0,684) и CD138⁺ плазмочитов (p=0,002, r=0,645). А также достоверное уменьшение отношения CD4⁺/CD8⁺ (p=0,002, r=0,645), за счет уменьшения фракции CD4⁺ Т-хелперов, на фоне уменьшения количества полиморфноядерных лейкоцитов, экспрессии MMP-9 (p=0,04, r=0,302) и COX-2 (p=0,013, r=0,321) при вторичном апикальном периодонтите, в сравнении с первичным.

Ключевые слова: апикальный периодонтит, воспалительный инфильтрат, COX-2, MMP-9, иммуногистохимия.