



Uporedna imunohistohemijska i kvantitativna analiza ćelija zapaljenskog infiltrata kod simptomatskih i asimptomatskih hroničnih periapeksnih lezija

Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions

Aleksandra Lukić*, Vesna Danilović*, Renata Petrović†

Stomatološki fakultet, *Klinika za bolesti zuba, †Institut za histologiju i embriologiju, Beograd

Apstrakt

Uvod/Cilj. Rezultati ranijih imunohistohemijskih studija pokazali su da su najbrojnije ćelije u hroničnim periapeksnim lezijama limfociti, plazmociti, makrofagi i neutrofilni granulociti, dok ostale ćelije, pre svega mastociti, eozinofilni granulociti i dendritske ćelije predstavljaju manje, ali funkcionalno značajne ćelijske populacije. Cilj ovog rada bio je da se korišćenjem relevantne imunohistohemijske metode determiniše fenotipski profil ćelija zapaljenskog infiltrata dentalnih granuloma, kao i da se odrede razlike u kvantitativnim odnosima i distribuciji ćelija između simptomatskih i asimptomatskih hroničnih periapeksnih lezija. **Metode.** Materijal za analizu dobijen je od 42 bolesnika sa kliničkom i radiografskom dijagnozom hronične periapeksne lezije. Tkivo je uzeto tokom periradikalne hirurške intervencije ili ekstrakcije zuba. Metoda primenjena na smrznutim isečcima bila je alkalna fosfataza-antialkalna fosfataza (APAAP). Korišćen je panel monoklonskih antitela: CD3, CD4, CD8, CD19, CD38, CD14, CD1a, CD83, CD80, CD86, CD45 i CD123. **Rezultati.** Rezultati analize pokazali su da nije postojalo homogeno područje zapaljenja, predodređeno da bude infiltrisano određenim tipom zapaljenskih ćelija. Utvrdili smo da su najbrojnije ćelije zapaljenskog infiltrata bili limfociti i plazmociti, zatim CD4⁺, CD8⁺ i CD14⁺, dok je broj CD80⁺, CD86⁺ i CD83⁺ i CD1a⁺ ćelija bio znatno manji. Srednje vrednosti broja zapaljenskih ćelija nisu pokazivale statistički značajne razlike između grupe simptomatskih i asimptomatskih periapeksnih lezija, osim CD86⁺ ćelija, čiji je broj bio statistički značajno veći u grupi simptomatskih lezija. **Zaključak.** Među ćelijama zapaljenskog infiltrata u dentalnim granulomima dominiraju T i B limfociti. To ukazuje na kompleksnost imunopatogenetskih zbivanja u inicijalnoj fazi i progresiji dentalnih granuloma u koje su uključeni mehanizmi celularnog i humoralnog imuniteta. U pogledu kvantitativne zastupljenosti imunokompetentnih ćelija u simptomatskim i asimptomatskim lezijama nije ustanovljena statistički značajna razlika, osim u pogledu zrelih dendritskih ćelija koje su bile zastupljenije kod simptomatskih lezija.

Ključne reči:

periapeksni granulom; imunohistohemija; evaluaciona studija.

Abstract

Background/Aim. It has been demonstrated that lymphocytes, plasma cells, macrophages and neutrophil granulocytes represent the predominant cells of the inflammatory lesion of the dental granulomas. Other cells, such as mast cells, eosinophils, dendritic cells comprise minor, but functionally important cell populations. Most of the data considering cells that take part in these processes have been derived from immunohistological studies. This study was undertaken with the aim to determine the phenotype profile of inflammatory cells of dental granulomas using immunohistochemical method in order to study the differences of their quantitative properties and distribution between symptomatic and asymptomatic lesions. **Methods.** The material for the analysis originated from 42 individuals with clinic and radiographic diagnosis of chronic periapical lesions. The tissue was taken either during the periradicular surgery, or tooth extraction. Cryostat tissue sections were stained using the alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase assay (APAAP). This method is highly valid and sensitive using a panel of specific monoclonal antibodies: CD3, CD4, CD8, CD19, CD38, CD14, CD1a, CD83, CD80, CD86, CD45 and CD123. **Results.** The composition of the cell population revealed that there was no homogenous and site-specific pattern of the distribution of inflammatory cells. The results of our investigation revealed that the majority of inflammatory cells comprised lymphocytes and plasma cells, followed by subpopulations CD4⁺, CD8⁺ and CD14⁺ cells. Much lower in number were CD80⁺, CD86⁺ and CD83⁺ and CD1a⁺ cells. There were no statistically significant differences in mean values of inflammatory cells number between symptomatic and asymptomatic lesions, with the exception of CD86⁺ cells, the number of which was statistically higher in symptomatic lesions. **Conclusion.** Inflammatory infiltrate cells in dental granulomas are dominated by T- and B-lymphocytes. It points out the complexity of immunopathogenic events in initiating and progressing of dental granulomas that involve mechanisms of both cellular and humoral immunity. Regarding the quantitative presence of immunocompetent cells in symptomatic and asymptomatic lesions no statistically significant difference was determined unless in mature dendritic cells present in symptomatic lesions.

Key words:

periapical granuloma; immunohistochemistry; evaluation studies.

Uvod

Hronični periodontitis karakteriše prisustvo zapaljenske lezije koja je nastala najčešće kao posledica infekcije kanala korena. Tokom razvoja bolesti uspostavlja se dinamička ravnoteža između egzogenih štetnih noksi, najčešće bakterija i njihovih produkata i odbrambenih mehanizama domaćina¹. Budući da odbrambeni mehanizmi kojima domaćin raspolaže često ne mogu da eliminišu štetnu noksu u potpunosti, vremenom će se uspostaviti morfološka i funkcionalna barijera, koja će uspešno sprečavati dalju bakterijsku invaziju dubljih parodontnih tkiva². Periradikulni granulom čini jasno inkapsulirano granulozno tkivo, infiltrirano zapaljenskim ćelijama, fibroblastima, malim krvnim sudovima, a često i trakama inflamiranog epitelnog tkiva³. Na osnovu patohistoloških kriterijuma, dentalni granulomi mogu biti klasifikovani kao ekzudativni, granulomatozni, granulomatozno-fibrozni i nekrotični⁴. Većina podataka o ćelijama zapaljenskog infiltrata potiče iz prethodnih imunohistohemijskih studija⁵⁻⁸. Rezultati ovih studija pokazali su da limfociti, plazmociti, makrofagi i neutrofilni granulociti predstavljaju predominantne ćelije u zapaljenskom infiltratu. Ostale ćelije, naročito mastociti, eozinofilni granulociti, dendritske ćelije i *natural killer* (NK) limfociti prisutne su u manjem broju, ali predstavljaju funkcionalno važne ćelijske populacije^{9,10}. Rezultati prethodnih studija koji se odnose na broj, međusobni odnos i distribuciju inflamacijskih ćelija razlikuju se u velikoj meri, što se može posmatrati u svetlu velikog polimorfizma osnovnih histoloških karakteristika periapeksnih granuloma, koji je posledica različite dužine razvoja procesa i specifičnosti odbrambenog odgovora domaćina. Uloga ćelija zapaljenskog infiltrata i njihovih produkata, posebno citokina u imunopatogenezi periapeksnih lezija u velikoj meri je još uvek nejasna⁷.

Cilj ovog rada bio je da se pomoću relevantnih imunohistohemijskih metoda utvrde razlike u fenotipskom profilu ćelija zapaljenskog infiltrata, njihove brojčane zastupljenosti i distribucije između simptomatskih i asimptomatskih hroničnih inflamacijskih lezija kod dentalnih granuloma.

Metode

Materijal za analizu dobijen je od 42 bolesnika, oba pola, starosti 18–56 godina, sa kliničkom i radiografskom dijagnozom hronične periapeksne lezije. Izabrani bolesnici nisu imali sistemsko oboljenje koje bi moglo imati uticaja na razvoj periapeksne lezije, niti su u poslednja tri meseca primali antibiotsku terapiju. Kod 23 bolesnika bolest se razvijala asimptomatski, dok su kod 19 bolesnika bili prisutni određeni klinički simptomi u smislu bola i osetljivosti zuba na zagrižaj i perkusiju, lokalnog otoka, fistule i supuracije, kao i umerenog lokalnog limfadenita. U skladu sa prisutnim kliničkim nalazom uzorci su podeljeni na hronične asimptomatske i hronične simptomatske. Tkivo za analizu dobijeno je prilikom ekstrakcije zuba (19) ili apikotomije (23 uzorka), koje su bile indikovane u cilju terapije periapeksne lezije.

Tkivo je odmah postavljeno u transportni medijum koji se sastojao od RPMI 1640 medijuma (Sigma, Munich, Germany), antibiotika i antifungicida i smrznuto u tečnom

azotu na temperaturi -70°C . Tkivo je fiksirano u hladnom acetonu na temperaturi -20°C u trajanju 10 min, osušeno na sobnoj temperaturi i sečeno pomoću mikrotoma, pri čemu su dobijeni isečci debljine $5\ \mu\text{m}$. Na fiksirane preparate naneto je primarno monoklonsko antitelo (mAb) – 20% inaktivisani kuničev serum u odgovarajućem razblaženju u *Tris-buffered saline* (TBS) $\text{pH} = 7,6$. Nakon toga, preparati su isprani u TBS i inkubirani sa kunič anti-mišijim imunoglobulinom (Ig) (DAKO LTD Glostrup, Denmark) u prisustvu 10% humanog AB seruma, prethodno inaktivisanog na 56°C u toku 45 minuta. Preparati su zatim isprani u TBS i inkubirani 30 minuta u rastvoru alkalna fosfatasa-antialkalna fosfatasa (APAAP, DAKO LTD Glostrup, Denmark), razblaženim 1 : 50 u TBS. Po isteku inkubacije i ispiranja, preparatima je, u trajanju od 20 minuta, dodat supstrat alkalne fosfatase (*Fast Red Substrate System*, DAKO A/S Denmark). U završnoj fazi tehnike, preparati su isprani od supstrata u destilovanoj vodi ili TBS i kontrastirani nekoliko sekundi sa hematoksilinom (Alaun Hg hematoksilin, Apoteka VMA) koji je razblažen 1 : 3 u destilovanoj vodi. Posle kontrastiranja preparati su isprani u tekućoj vodi i montirani u Kajzer gelu.

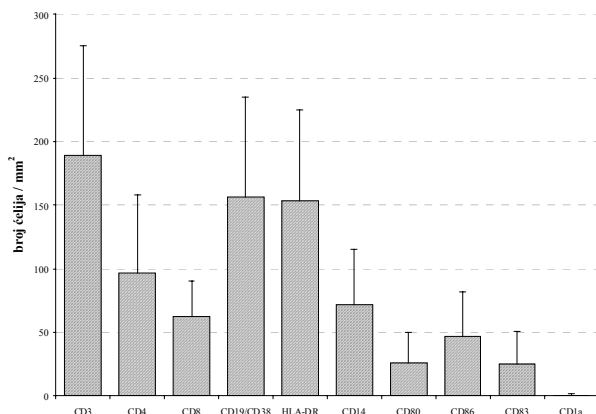
Kriostatski preseći periapeksnih lezija obojeni su monoklonskim antitelima (mAb) specifičnim za ukupne T limfocite (CD3), ukupne B limfocite i plazma ćelije (kombinacija CD19 i CD38) subpopulacije T limfocita (CD4 i CD8), monocite/makrofage (CD14) i MHC molekule II klase ispoljenih na antigen prezentujućim ćelijama (APC). Za identifikaciju subpopulacija dendritskih ćelija (DC) korišćena su monoklonska antitela prema CD1a antigenu (marker Langerhansovog tipa DC) i CD83 (marker zrelih DC). Antitelima prema CD80 i CD86 identifikovane su APC koje ispoljavaju kostimulatorne molekule. Korišćena mAb CD45, CD3, CD19, CD14, CD123, CD83 bila su obeležena *fluorescein isothiocyanatom* (FITC), dok je HLA-DR mAb konjugovano *phycoerythrinom* (Serotec, Oxford, UK). Antitelo CD1a -FITC bilo je poreklom iz Caltag Laboratorije; CD45, CD3, CD19, CD14 su ankonjugovana mAbs poreklom iz DAKO, Denmark, dok je CD123 ankonjugovano mAbs bilo od RD Systems. Zečiji anti-mišiji Ig ankonjugovan i peroksidaza – konjugovana antitela, kao i alkalna fosfatasa anti alkalna fosfatasa (APAAP) bili su dobavljeni iz firme DAKO, dok je streptavidin – alkalna fosfatasa dobavljena iz firme Serotec.

Ovako pripremljeni preparati analizirani su svetlosnim mikroskopom Laica, Germany. Stereološka analiza napravljena je pomoću Weiblovog mnogonamenskog testnog sistema. Broj imunopozitivnih ćelija izražavan je u odnosu na ukupan broj inflamacijskih ćelija. Brojanje ćelija izvršeno je u 10 različitih vidnih polja, pri uveličanju $100\times$, na reprezentativnom isečku svakog uzorka¹¹.

Dobijeni rezultati obrađeni su pomoću relevantnih statističkih metoda, koje su uključivale izračunavanje srednje vrednosti, standardne greške i standardne devijacije. Komparacija dobijenih rezultata izvršena je upotrebom Studentovog *t* testa za male uzorke. Razlike predstavljene sa $p < 0,05$ nisu smatrane značajnim. Korelacija između gustine ćelija zapaljenskog infiltrata izražena je pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije (*r*).

Rezultati

Histološkom analizom isečaka obojenih hematoksilin-eozinom (HE) utvrdili smo da su sve analizirane zapaljenske lezije bile hroničnog, granulomatoznog tipa. Utvrdili smo da su najbrojnije ćelije zapaljenskog infiltrata u svim analiziranim uzorcima bile mononuklearne ćelije, organizovane u obliku difuznih infiltrata ili fokalnih agregata. U 11 ispitivanih uzoraka uočili smo trake proliferišućeg epitela. Rezultati kvantitativne analize prikazani su na slici 1.



Sl. 1 – Rezultati fenotipske analize inflamacijskih ćelija u periapikalnim lezijama. Stubići predstavljaju srednji broj ćelija/mm² preseka tkiva ±SD za periapikalne lezije

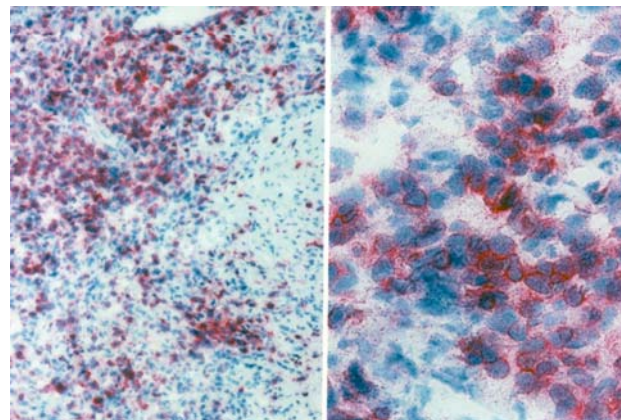
Uočava se da dominantnu populaciju inflamacijskih ćelija čine T limfociti, B limfociti / plazmociti, nakon toga subpopulacije CD4⁺, CD8⁺ i CD14⁺ ćelija, a zatim po broju slede ćelije koje ispoljavaju CD80⁺, CD86⁺ i CD83⁺. Broj CD1a⁺ ćelija bio je najmanji.

Rezultati kvantitativne analize i distribucije ćelija zapaljenskog infiltrata u periapikalnoj leziji

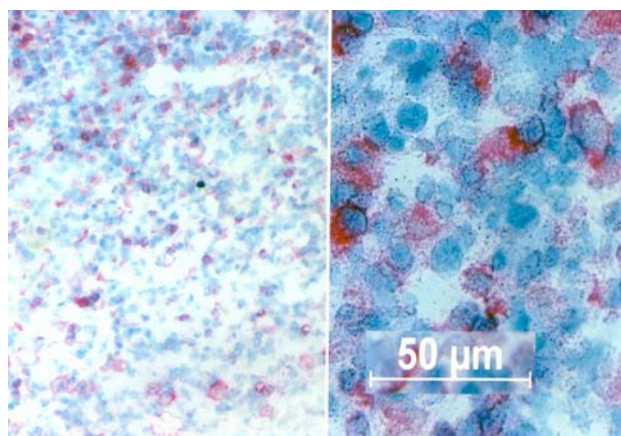
Rezultati kvantitativne analize pokazali su da su CD3⁺ ćelije (T limfociti) činile najbrojniju populaciju inflamacijskih ćelija u svim ispitivanim uzorcima, sa prosečno 189,0±86,6 ćelija po mm² tkiva. Analizom preparata ustanovili smo da su T limfociti u najvećem broju uzoraka bili difuzno raspoređeni po čitavom preseku tkiva, dok je kod jednog manjeg broja uzoraka uočena fokalna distribucija u obliku limfnih agregata. Broj T limfocita bio je znatno veći u fokalnim nego difuznim infiltratima. Uočili smo da u pojedinim manjim fokalnim infiltratima, koji su bili raspoređeni u blizini krvnih sudova sa visokim endotelom, CD3⁺ su činili preko 90% ćelijskog infiltrata. Pojedinačne CD3⁺ ćelije bile su prisutne i unutar proliferišućeg epitela, najčešće između epitelnih ćelija (slika 2).

Rezultati naših istraživanja pokazali su da je raspored CD4⁺ ćelija bio sličan rasporedu CD3⁺ ćelija, ali je njihov broj bio znatno manji i iznosio je 96,5±61,6 ćelija/mm² tkiva. Međutim, za razliku od tipične limfocitne morfologije CD3⁺ ćelija, izvestan broj CD4⁺ ćelija imao je karakteristike izduženih, vretenastih ili zvezdastih ćelija koje po svojim morfološkim

odlikama podsećaju na dendritske ćelije (DC). Ovakve ćelije bile su najčešće lokalizovane u blizini proliferišućeg epitela, organizovane u obliku limfnih agregata ili difuzno rasute u tkivu. Takođe, neke CD4⁺ ćelije bile su krupnije u odnosu na tipične limfocite i po izgledu su podsećale ili na limfoblaste, monocitima slične ćelije ili na makrofage (slika 3).



Sl. 2 – Fokalni infiltrati CD3⁺ ćelija u blizini proliferišućeg epitela (HE, × 100)

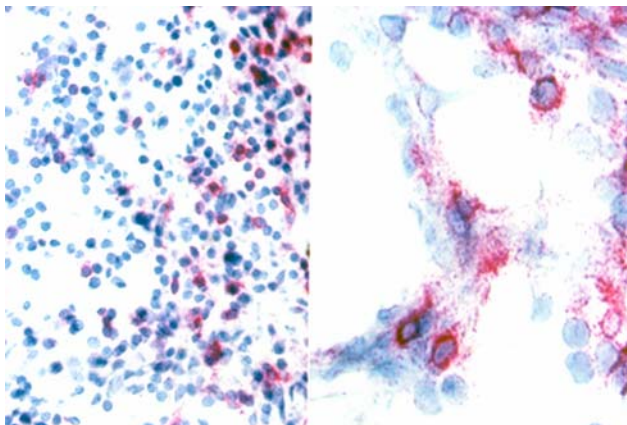


Sl. 3 – Ćelije CD4⁺ u zapaljenskom infiltratu hronične periapikalne lezije (HE, × 100)

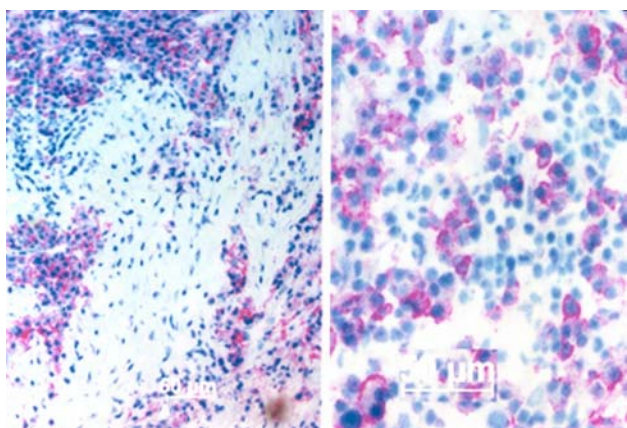
Kvantitativnom analizom uočili smo da je broj CD8⁺ ćelija bio znatno manji u odnosu na CD3⁺ i CD4⁺ i iznosio je u proseku 62,2±28,2 ćelija/mm² tkiva. Za razliku od CD4⁺ koje su uglavnom bile organizovane u obliku limfnih agregata, CD8⁺ ćelije bile su najčešće difuzno raspoređene u vezivnom tkivu zapaljenske lezije. Kod manjeg broja uzoraka uočili smo da su CD8⁺ limfociti bili raspoređeni u grupama u perifernim područjima B limfocitnih/plazmocitnih infiltrata. Ćelije CD8⁺ bile su posebno brojne u nekim lezijama sa proliferišućim epitelom, uključujući i njihovu intraepitelnu lokalizaciju (slika 4).

Za identifikaciju B limfocita i njihovih efektoru korišćena je kombinacija anti-CD19/CD38 antitela. Analizom isečaka ustanovili smo da su B limfociti i plazmociti bili prisutni u svim ispitivanim lezijama, ali postojale su značajne varijacije u broju ćelija između različitih uzoraka. U najvećem broju uzoraka, B limfociti bili su organizovani u obliku ćelij-

skih agregata, dok je kod manjeg broja uzoraka uočena njihova difuzna distribucija. Neki limfoidni agregati, koji su imali izgled folikula, bili su preko 90% sastavljeni od plazmocita i plazmoblasta (krupne ćelije ekscentrično postavljenog jedra intenzivne membranske pozitivnosti) (slika 5). Prosečan broj $CD19^+/CD38^+$ ćelija bio je $156,1 \pm 79,0$ ćelija/ mm^2 preseka tkiva.



Sl. 4 – Ćelije $CD8^+$ u zapaljenskom infiltratu hronične periapske lezije (HE, $\times 100$)



Sl. 5 – Ćelija $CD19^+/38^+$ u zapaljenskom infiltratu hronične periapske lezije (HE, $\times 100$)

Ćelije $HLA-DR^+$ (APC) činile su veoma brojnu populaciju infiltrišućih ćelija, ali i značajnu komponentnu tkivne strome u svim ispitivanim uzorcima. Raspored pozitivnih ćelija bio je difuzni ili u obliku fokalnih agregata. Prosečan broj APC bio je $153,4 \pm 71,6$ ćelija/ mm^2 tkiva. U agregatima $HLA-DR^+$ ćelije imale su izgled limfocita ili makrofaga sa velikim brojem kraćih ili dužih dendritskih nastavaka (morfologija dendritskih ćelija). Ove druge bile su krupnije i pokazivale su jaku pozitivnost. U granulomima sa proliferišućim epitelom bile su zapažene $HLA-DR^+$ ćelije unutar epitela (Langerhasov tip dendritskih ćelija), ali i u tkivu između epitelnih traka.

Ćelije $CD14^+$ činile su značajnu populaciju infiltrišućih ćelija u svim ispitivanim lezijama. Prosečan broj iznosio je $71,6 \pm 43,9$ ćelija/ mm^2 preseka tkiva. Uočili smo podjednak

broj fokalnih i difuznih infiltrata. Najveći broj ćelija imao je karakteristike krupnih monojedarnih ćelija izgleda monocita/makrofaga. Međutim, u difuznim ćelijskim infiltratima bile su zapažene i ćelije izduženog fibroblastoidnog izgleda. Na nekim tkivnim presecima blaga pozitivnost identifikovana je i na nekim endotelnim ćelijama.

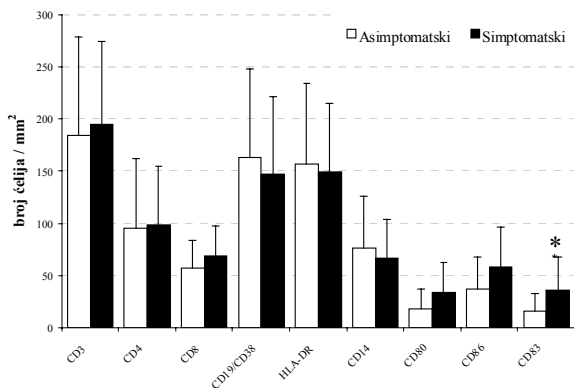
Analizom ekspresije $CD80$ i $CD86$ markera identifikovane su APC koje ispoljavaju kostimulatorne molekule. Njihova ekspresija značajno je varirala ne samo između različitih lezija, već i na presecima u okviru individualnih lezija. Broj $CD80^+$ ćelija iznosio je u proseku $25,5 \pm 24,6$ ćelija/ mm^2 tkiva, dok je broj $CD86^+$ ćelija bio nešto veći i u proseku iznosio $46,3 \pm 35,3$ ćelija/ mm^2 tkiva. Distribucija pozitivnih ćelija uglavnom je bila difuzna, ali su se uočavali i manje grupe pozitivnih ćelija, uglavnom u limfoidnim agregatima. Jako pozitivne ćelije su najčešće posedovale morfološke karakteristike dendritskih ćelija.

Broj $CD83^+$ ćelija značajno je varirao od skoro jedva detektabilne pozitivnosti ($1-2$ ćelije/ mm^2 tkiva), pa do maksimalnog broja od $80-90$ ćelija/ mm^2 tkiva. U proseku, broj $CD83^+$ ćelija iznosio je $25,0 \pm 26,0$ ćelija/ mm^2 tkiva i bio je sličan broju $CD80^+$ ćelija. Ćelije $CD83^+$ bile su najzastupljenije u fokalnim limfocitnim infiltratima. Uočili smo da je broj $CD83^+$ ćelija bio značajno veći kod simptomatskih nego kod asimptomatskih periapskih lezija. Najveći broj ćelija bio je izduženog ili zvezdastog izgleda, i posedovao je morfološke karakteristike dendritskih ćelija. Serijski preseki bojeni sa $HLA-DR$ i $CD83$ pokazali su visok stepen korelacije ova dva ćelijska tipa, tako da je najveći broj $CD83^+$ ćelija bio prisutan u zonama u kojima su dominirale jako pozitivne $HLA-DR$ ćelije. U nekim simptomatskim lezijama u kojima su identifikovane fokalne nakupine granulocita zapažena je i slabija pozitivnost granulocita. Međutim, ove ćelije nisu obuhvaćene analizom. Takođe, neke endotelne ćelije postkapilarnih venula bile su slabo $CD83$ pozitivne.

Ćelije $CD1a^+$ pokazivale su tipičnu intraepitelnu lokalizaciju. Na ispitivanim uzorcima njihova gustina varirala je od jedva detektabilne do nekoliko $CD1a^+$ ćelija na 100 epitelnih ćelija. Po svojim morfološkim karakteristikama (izdužene ili zvezdaste ćelije) pripadale su tipičnim Langerhansovim ćelijama. Serijski preseki bojeni sa $HLA-DR$ i $CD1a$ su jasno pokazivali da su $CD1a^+$ ćelije istovremeno $HLA-DR^+$. Samo retke $CD1a^+$ pozitivne ćelije identifikovane su u tkivu van epitela (najčešće u blizini epitelne strukture). Najveći broj periapskih lezija bez epitela nije sadržavao $CD1a^+$ ćelije.

Poređenje rezultata fenotipske analize između simptomatskih i asimptomatskih lezija

Rezultati uporedne fenotipske analize inflamacijskih ćelija u simptomatskim ($n = 19$) i asimptomatskim lezijama ($n = 23$) prikazani su na slici 6. Zapažaju se značajne varijacije u broju svih ispitivanih subpopulacija inflamacijskih ćelija u obe grupe lezija, ali su srednje vrednosti vrlo slične tako da za najveći broj markera razlike nisu statistički značajne. Jedina razlika nađena je u zastupljenosti $CD83^+$ ćelija čija je brojnost bila veća u grupi simptomatskih lezija ($p < 0,05$).



Sl. 6 – Usporedna fenotipska analiza inflamacijskih ćelija između simptomatskih i asimptomatskih lezija
* < 0,05 u odnosu na asimptomatske lezije

Diskusija

Prikazana studija usmerena je na razlike u fenotipskom profilu ćelija zapaljenskog infiltrata hroničnih periapikalnih lezija, njihovih kvantitativnih odnosa i distribucije između simptomatskih i asimptomatskih hroničnih periapikalnih lezija. Primljena imunohistohemijska metoda, APAAP, predstavlja osetljivu i pouzdanu metodu i pogodna je za identifikaciju imunokompetentnih ćelija u zapaljenskoj leziji^{12,13}. Rezultati studije pokazali su visok stepen heterogenosti zapaljenskih infiltrata, kao i stalnu sklonost ka promeni njihovog sastava i strukture, što se dovodi u vezu sa progresijom bolesti. Takođe, utvrdili smo da ne postoje homogena područja zapaljenja predodređena da budu infiltrirana određenom vrstom ćelija. Rezultati naše studije pokazali su da CD3⁺ predstavljaju najbrojniju ćelijsku populaciju u najvećem broju ispitivanih uzoraka, bez statističke razlike između simptomatskih i asimptomatskih lezija, što je u skladu sa podacima Liapatas i sar.⁷, kao i rezultatima naših ranijih studija koje su pokazale predominaciju T limfocita u odnosu na B limfocite^{14,15}. Ovakav nalaz ukazuje da mehanizmi kojima ćelularni imunitet raspoložuje imaju ključnu ulogu u hroničnim zapaljenskim reakcijama koje se odvijaju kod periapikalnih lezija^{16,17}.

Odnos između CD4⁺ i CD8⁺ ćelija indikator je imunoregulatornog statusa domaćina i menja se tokom razvoja hronične inflamacijske lezije⁷. Rezultati naše studije pokazali su da je srednja vrednost CD4⁺ ćelija iznosila 96,5±61,6 ćelija/mm² tkiva, dok je srednja vrednost CD8⁺ ćelija iznosila 62,2±28,2 ćelija/mm² tkiva. Rezultati ranijih studija pokazali su da u ranim fazama razvoja dentalnih granuloma postoji dominacija CD4⁺ ćelija u odnosu na CD8⁺ ćelije, kao i da postoji tendencija da tokom razvoja bolesti dođe do inverzije tog odnosa¹⁸. Ovi rezultati ukazuju da je prisustvo CD4⁺ ćelija povezano sa progresijom inflamacijske lezije i destrukcijom kosti koja karakteriše rane faze bolesti, dok je nalaz CD8⁺ ćelija povezan sa stabilizacijom hronične inflamacijske lezije, što se dovodi u vezu sa imunosupresivnim efektima koje ove ćelije ispoljavaju. Rodini i Lara⁶ povezuju odnos između CD4⁺ i CD8⁺ ćelija sa tipom hronične periapikalne lezije. Oni su u svojoj studiji pokazali razliku u strukturi ćelija zapaljenskog infiltrata između

periradikalnih cista i dentalnih granuloma, i ukazali na značajno veći broj CD4⁺ u cistama nego u dentalnim granulomima. Akamine i sar.¹⁹ u svojoj studiji pokazali su da u inicijalnim fazama razvoja bolesti postoji dominacija T limfocita, dok kod manifestne periapikalne lezije postoji dominacija B limfocita, ukazujući da reakcije humoralnog imuniteta imaju ključnu ulogu u kasnijim fazama razvoja bolesti, koje karakteriše tendencija ka stabilizaciji. Rezultati naše studije pokazali su da nije postojala statistička značajnost u broju CD4⁺ i CD8⁺ ćelija između simptomatskih i asimptomatskih lezija.

Rezultati naše studije pokazali su da je broj makrofaga bio veći u simptomatskim, nego u asimptomatskim lezijama, ali bez statističke značajnosti. Ovakav nalaz u saglasnosti je sa rezultatima naših ranijih studija, koje su pokazale da se broj makrofaga kretao od 15% do 30% u odnosu na ukupan broj zapaljenskih ćelija, i da je 40–70% ovih ćelija bilo aktivisano (HLA-DR⁺, CD14⁺), kao i da je broj ovih ćelija bio značajno veći u lezijama u kojima su dominirali T limfociti u odnosu na B limfocite¹⁵. Metzger²⁰ u svojoj studiji ukazao je da aktivisani makrofagi predstavljaju izvor citokina odgovornih za resorpciju kosti. Rezultati ranijih studija pokazali su da se kod eksperimentalnih životinja sa odstranjenim timusom, hronični periodontit razvija nezavisno od T limfocita, sugerišući ključnu ulogu makrofaga u inicijaciji i progresiji ove bolesti. Ma i sar.²¹ u svom radu pokazali su da je prisustvo makrofaga izuzetno važno u zaštitnim reakcijama tokom inicijacije, progresije i akutne egzacerbacije hronične zapaljenske lezije. Oni predstavljaju ćelije prve linije odbrane, učestvujući u fagocitozi, sekreciji prostaglandina, enzima i citokina. Pojedini citokini, posebno IL-1 i TNF- α doprinose resorpciji kosti i ispoljavaju inhibitorne efekte u odnosu na reparativne procese u apikalnom parodonticijumu⁹. Makrofagi, takođe, ispoljavaju antigen-predstavljajuću ulogu i imaju značaja u inicijaciji imunskih reakcija²².

Rezultati naše analize imunokompetentnih ćelija pokazali su da je broj HLA-DR⁺, CD3⁺, CD14⁺ i CD1a bio značajno veći u lezijama u kojima je uočeno prisustvo proliferišućeg, inflamacijskog epitela. Stiče se utisak da je distribucija Langerhansovih ćelija u vezi sa proliferacijom i stepenom diferencijacije epitelnog tkiva, prisutnog u periapikalnoj leziji, što je u saglasnosti sa nalazima drugih autora²³. Cury i sar.²⁴ u svojoj studiji pokazali su da promene u strukturi epitelnog tkiva mogu imati uticaja na razvoj zapaljenske lezije u apikalnom parodonticijumu.

Zaključak

Rezultati naših istraživanja potvrdili su da među ćelijama zapaljenskog infiltrata u dentalnim granulomima dominiraju T i B limfociti i makrofagi. Ovakav nalaz upućuje na kompleksnost imunopatogenetskih zbivanja u inicijaciji i progresiji dentalnih granuloma u koja su uključeni mehanizmi kako ćelularnog, tako i humoralnog imuniteta. Usporedna analiza kvantitativne zastupljenosti imunokompetentnih ćelija u simptomatskim i asimptomatskim lezijama pokazala je da između ove dve grupe ne postoje statistički značajne razlike, osim u pogledu zrelih dendritskih ćelija, čiji je broj bio signifikantno veći kod simptomatskih lezija, ukazujući na značaj ovih ćelija u inicijaciji i progresiji periapikalnih lezija.

L I T E R A T U R A

1. *Kiss C.* Cell-to-cell interactions. *Endodontic Topics* 2004; 8(1): 88–103.
2. *Nair PN.* Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000 1997; 13: 121–48.
3. *Nair PN.* Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(6): 348–81.
4. *Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE.* Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81(1): 93–102.
5. *Piattelli A, Artese L, Rosini S, Quaranta M, Musiani P.* Immune cells in periapical granuloma: morphological and immunohistochemical characterization. *J Endod* 1991; 17(1): 26–9.
6. *Rodini CO, Lara VS.* Study of the expression of CD68+ macrophages and CD8+ T cells in human granulomas and periapical cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92(2): 221–7.
7. *Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D.* Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003; 36(7): 464–71.
8. *de Oliveira Rodini C, Batista AC, Lara VS.* Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1): 59–63.
9. *Márton IJ, Kiss C.* Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15(3): 139–50.
10. *Kaneko T, Okiji T, Kan L, Takagi M, Suda H.* Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. *J Endod* 2001; 27(5): 337–42.
11. *Alavi AM, Gulabivala K, Speight PM.* Quantitative analysis of lymphocytes and their subsets in periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31(4): 233–41.
12. *Tani N, Osada T, Watanabe Y, Umemoto T.* Comparative immunohistochemical identification and relative distribution of immunocompetent cells in sections of frozen or formalin-fixed tissue from human periapical inflammatory lesions. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8(4): 163–9.
13. *Tani-Ishii N, Osada T, Watanabe Y, Umemoto T.* Histological findings of human leprosy periapical granulomas. *J Endod* 1996; 22(3): 120–2.
14. *Lukić A, Arsenijević N, Vujanović G, Ramić Z.* Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: correlation with the histological characteristics of the lesions. *J Endod* 1990; 16(3): 119–22.
15. *Lukić A, Vasilijević S, Majstorović I, Vučević D, Mojsilović S, Gaživoda D, et al.* Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. *Int Endod J* 2006; 39(8): 626–36.
16. *Nilsen R, Johannessen AC, Skaug N, Matre R.* In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58(2): 160–5.
17. *Torabinejad M, Kettering JD.* Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 1985; 11(3): 122–5.
18. *Stasbenko P, Yu SM, Wang CY.* Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 1992; 18(9): 422–6.
19. *Akamine A, Hashiguchi I, Toriya Y, Maeda K.* Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10(3): 121–8.
20. *Metzger Z.* Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(1): 1–8.
21. *Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, et al.* Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(11): 2334–46.
22. *Suzuki N, Okiji T, Suda H.* Enhanced expression of activation-associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. *Arch Oral Biol* 1999; 44(1): 67–79.
23. *Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K.* Immunohistochemical analysis of CD1a-labeled Langerhans cells in human dental periapical inflammatory lesions – correlation with inflammatory cells and epithelial cells. *Oral Dis* 2001; 7(6): 336–43.
24. *Cury VC, Sette PS, da Silva JV, de Araújo VC, Gomez RS.* Immunohistochemical study of apical periodontal cysts. *J Endod* 1998; 24(1): 36–7.

Rad je primljen 26. XI 2007.

Zahvalnica:

Autori se zahvaljuju akedmiku prof. dr Miodragu Čoliću i njegovim saradnicima iz Instituta za medicinska istraživanja VMA na pomoći u imunohistohemijskim analizama preparata. Ova istraživanja su deo projekta koji je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj.