

Гистологические и иммуногистохимические критерии хронического воспаления пародонта в период ремиссии

Григорович Э. Ш., к.м.н., доцент кафедры терапевтической стоматологии ГОУ ВПО «Омская Государственная Медицинская Академия Росздрава», г. Омск

Histological and immunohistochemical criteria of chronic inflammatory periodontal in remission

Grigorovich E. S.

Резюме

В статье проводится анализ изменения клинических показателей состояния пародонта пациентов на фоне проведения базового курса лечения. В биоптатах десны пациентов оценивается обновление клеточной популяции многослойного плоского эпителия при совместном применении маркеров Ki-67 и p53, степени акантоза и клеток воспалительного инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки по количеству CD68+ клеток. «Стационарная» стадия воспаления характеризуется уменьшением воспалительной инфильтрации и сопровождается нормализацией процессов клеточного обновления в эпителии, связанного с подавлением пролиферации эпителиоцитов и усилением их элиминации путем апоптоза. Количество антигенпрезентирующих клеток (CD68+) в слизистой оболочке десны значимо не изменяется по окончании курса традиционной терапии и является морфологическим субстратом рецидива воспаления. **Ключевые слова:** пародонтит, хроническое воспаление, ремиссия, Ki-67, p53, CD68 маркеры

Resume

The article analyzes the changes in clinical indicators of periodontal patients on the background of the basic course of treatment. In gingival biopsies of patients estimated to update the cell population of multilayer flat epithelium with joint use of markers Ki-67 and p53, the degree of acanthosis and inflammatory cells own plate of mucous membrane on the number of CD68 + cells. "Stationary" phase of inflammation is characterized by a decrease in inflammatory infiltration and is accompanied by a normalization process of cell renewal in the epithelium associated with the suppression of proliferation of epithelial cells and enhance their elimination through apoptosis. The number of antigen cells (CD68 +) in the mucosa of the gums was not significantly changed at the end of the course of traditional therapy and is the morphological substrate of recurrence of inflammation.

Keywords: periodontitis, chronic inflammation, remission, Ki-67, p53, CD68 markers

Согласно современным взглядам, в основе заболеваний пародонта лежит воспаление. Важнейшую роль в инициации воспаления в пародонте играет инфекционный фактор. [1]. Обнаружено, что определенные комбинации патогенов в пародонте вызывают остеолитические процессы, так как бактерии имеют разрушительный цитокиновый состав (IL-1 β , TNF α , PGE2)[2,3] В то же время, многие современные исследования доказывают, что присутствие специфической микрофлоры не всегда коррелирует с активностью воспалительного процесса. Данные факты определяют решающее значение местных и общих иммунных механизмов (клеточных и гуморальных звеньев), оказывающих влияние на взаимодействие микрофлоры с тканями пародонта, предопределяя течение воспаления в пародонте [4]. Известно, что хроническое воспаление пародонта течет волнообразно, согласно классификации имеет стадию ремиссии процесса. [5]. Период отсутствия острых клинических проявлений воспаления – «период кажущегося здоровья» пародонтологических пациентов,

по аналогии с фазами течения воспаления, часто называют периодом «ремиссии» заболевания. Патогенетические основы хронического воспаления изучаются достаточно интенсивно. В то же время иммунные механизмы повторного возникновения острой фазы воспаления пародонта исследованы недостаточно полно [6]. Для изучения клеточных механизмов активности воспалительного процесса в последнее время в клинической стоматологии используется иммуногистохимический метод (ИГХ). Преимуществом данного метода оценки индивидуальных биологических характеристик является воспроизводимость, возможность исследования антигенов на месте их прижизненной локализации. В ответ на воспаление, в многослойном плоском эпителии наблюдаются нарушения процессов пролиферации и дифференцировки, проявляющиеся явлениями паракератоза и акантоза [7]. Как и в большинстве других тканей взрослого организма, процессы пролиферации, дифференцировки и гибели, регулируемой апоптозом, являются основными механизмами обновления клеточных популяций. В этом аспекте, увеличение количества клеток может быть обусловлено повышением уровня их пролиферации или снижением темпа гибели. Ki-67 человеческий протени, экспрессия которого ассоциирована с пролиферацией клеток. В период интерфазы Ki-67 имеет исключительно внутриядерную локализацию, с последующим его перемещением в фазе митоза к поверхности хромосом. Тот факт, что Ki-67 присутствует во всех активных фазах клеточного цикла

Ответственный за ведение переписки -

Григорович Э.Ш.

644073 г. Омск, Дианова 18

корпус 1 кв 222

89059222127сотовый личный

8(3812)233228 служебный

09061966@inbox.ru

(G1,S,G2,миоз) и отсутствует в покоящихся клетках в фазе G0, делает его оптимальным маркером клеточной пролиферации. Белок P53 выступает в роли фактора транскрипции, регулирующий экспрессию большого количества генов вовлеченных в арест клеточного цикла и апоптоз в ответ на повреждение ДНК. При сублетальном повреждении ДНК происходит экспрессия гена p53 и соответствующего протеина. Последний блокирует клеточный цикл в переходе из G1 в S фазу и тем самым ингибирует дальнейшую репликацию поврежденной ДНК, создает условия для удаления поврежденного места и репарации с/э измененного участка. Если репарация не наступает, то включаются другие механизмы, обеспечивающие уничтожение клетки с поврежденной ДНК и развитием генетической программы клеточной смерти - апоптоза. Описанные выше характеристики P53 делают его удобным инструментом для характеристики клеточного повреждения, а значит и для опосредованного определения потенциала клеток к запуску апоптоза. При совместном применении маркеров Ki-67 и P53 появляется возможность охарактеризовать обновление клеточной популяции, выявить отклонения в механизмах регуляции клеточного цикла. Эти данные могут иметь значение для выявления начальных стадий патологических изменений, которые могут не проявляться клинически.[8]. Так как воспалительный процесс в десне при пародонтите характеризуется наличием инфильтрата, обязательным компонентом которого являются антигенпрезентирующие клетки, исследование экспрессии молекулы CD68, описанной как маркер моноцитов/макрофагов, осуществляющей процессинг антигенов путем постепенного ферментного расщепления фагоцитируемых клеткой объектов, является перспективной. [2,9].

Цель исследования: определить патогенетически значимые гистологические и ИГХ критерии, характерные для периода ремиссии хронического воспаления пародонта.

Материалы и методы

На базе кафедры терапевтической стоматологии ОмГМА и пародонтологического терапевтического отделения ГКСП №1 г. Омска нами обследовано и взято на лечение 45 человек, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени тяжести в возрасте от 18 до 55 лет (мужчин – 22, женщин – 23). Всем пациентам был проведен базовый курс лечения, включавший удаление зубных отложений, разработку индивидуальной гигиенической программы, санацию полости рта до достижения клинически определяемой «ремиссии» воспаления. Для характеристики состояния пародонта пациентов использовали.

Клинические методы: определяли индекс кровоточивости десневого края (по Saxer и Muhlemann), индекс РМА, патологическую подвижность зубов, глубину пародонтального кармана, индекс зубного налета, индекс зубного камня, упрощенный индекс гигиены Грина Вермиллиона – ИГР-У, пародонтальный индекс A.Rassel. [10].

Лабораторные методы: для определения стадии и характера воспаления проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследования в момент первичного обследования и по факту наступления клинически определяемой ремиссии (после лечения). Материалом исследования послужили биоптаты десны, взятые в области десневого сосочка

Гистологические методы. Кусочки ткани фиксировали в 10%-ном растворе формалина на фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) в течение 18-24 часов и заключали в парафин по общепринятой методике. Приготовленные срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином Иммуногистохимические методы. Выявляли экспрессию P53 («Novokastra», England, RTU-P53-DO7), Ki-67 («Novokastra», England, RTU-Ki-67-MM1), CD68 (DakoCytomation, «Denmark», PG-M1). Для иммуноного окрашивания использовали стрептавидин-биотинный пероксидазный метод («DAKO», Denmark, LSAB2 System, HRP). Морфометрические методы. Применяли окулярную вставку в виде квадратной сетки на 100 квадратов, шагом 0,01мм, которой проводили подсчет удельного объема многослойного плоского эпителия (Vv) каждого препарата при увеличении 140 в 10 полях зрения. Принимая узлы сетки за точки, подсчитывали количество точек попавших на акантоцитические тяжи к общему числу точек попавших на препарат. Подсчитывали количество позитивно окрашенных клеток в случайных 5 полях зрения при 300-кратном увеличении микроскопа. Полученные данные пересчитывали на 1 мм² среза.[11]

Статистические методы. Использовали непараметрические критерии для оценки достоверности различий между сравниваемыми группами (критерий Крускала-Уоллиса) с использованием программы "SPSS for Windows 11.5.0", рассчитывался коэффициент корреляции рангов Пирсона (r), Спирмана (ρ) и критерий их достоверности [12,13]

Результаты и их обсуждение

У всех больных, на момент первого посещения, зафиксированы признаки активного течения воспалительно-го процесса, которые выражались в наличии отека, гиперемии различных зон десны, выраженной кровоточивости десны при зондировании, гноетечении из пародонтальных карманов при пародонтите. Для каждого пациента нами был составлен индивидуальный план лечения, обязательным этапом в комплексе лечения пациентов явился этап механического удаления зубных отложений с последующей антисептической обработкой (растворы 3% перекиси водорода, йодинола, 0,1-0,05% хлоргексидина биглюконата), подбор средств гигиены полости рта, обучение гигиене полости рта и контроль полученных навыков. Учитывая, что нами оценивалось состояние пародонта пациентов после проведения базового противовоспалительного курса лечения, который не включал хирургического устранения пародонтальных карманов, а ортопедическое лечение заключалось в выполнении временного шинирования зубов и изготовления временных замещающих протезов, значительное улучшение состояния пародонта условно назвали «стационарной» стадией процесса (суррогатная ремиссия) и, соответственно, гистологически определяемой «стационарной» стадией воспаления. Индексная оценка состояния тканей пародонта обследованных пациентов до и после лечения представлена в таблице 1.

На основании гистологической картины все биоптаты пациентов были разделены на три группы. Первую группу (n=32) составили биоптаты пациентов с признаками выраженного или умеренного акантоза (Vv=0,82) с обязательным

наличием интраэпителиальных нейтрофильных лейкоцитов, разрушающих отдельные эпителиоциты с формированием поверхностных дефектов многослойного плоского эпителия, охарактеризованных как эрозивные. Полиморфноклеточный воспалительный инфильтрат собственной пластинки слизистой оболочки расценивался как выраженный и состоял из мононуклеарных клеток, плазмочитов и нейтрофильных лейкоцитов. При иммуногистохимическом исследовании антитела к Ki-67 выявлялись как в ядрах базальных и супрабазальных слоев эпителиоцитов, так и в ядрах клеток воспалительного инфильтрата. Экспрессия P53 в виде коричневого окрашивания ядер локализовалась преимущественно в эпителиоцитах супрабазального слоя. В воспалительном инфильтрате диффузно распределялись CD68-позитивные клетки. Биоптаты пациентов II группы (n=28) характеризовались снижением степени выраженности воспалительного инфильтрата, состоящим преимущественно из макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток с наличием единичных нейтрофиль-

ных лейкоцитов. Прлиферация эпителиальных тяжей расценивалась преимущественно как умеренная ($V_v=0,80$). Обязательным критерием явилось наличие интраэпителиальной локализации мононуклеарных клеток, что и послужило поводом выделить данные биоптаты в отдельную когорту, охарактеризовав ее, как группа с гистологическими признаками минимального прогрессирования воспалительного процесса. Локализация Ki-67 позитивных клеток так же как и в биоптатах I группы захватывала оба компартмента десны. Абсолютное значение количества позитивных клеток уменьшалось по сравнению с биоптатами пациентов в стадии прогрессирования воспалительного процесса. В то время как количество CD68-позитивных клеток увеличивалось. В III группе (n=30) воспалительный процесс расценивался как «стационарный». Воспалительный инфильтрат слабой степени выраженности локализовался исключительно в собственной пластинке слизистой оболочки десны и состоял из мононуклеарных клеток. Прлиферация эпителиальных тяжей расценивалась как уме-

Таблица 1. Индексная оценка состояния пародонта у лиц с хроническим генерализованным пародонтитом на момент первичного обследования и после лечения

Исследуемые показатели	До лечения	После лечения
ИЗН (баллы)	1.01 ± 0.48	0.31 ± 0.2*
ИЗК (баллы)	1.23 ± 0.67	0 ± 0*
ИГР-У (баллы)	2.24 ± 0.73	0.31 ± 0.2*
Индекс кровоточивости (баллы)	2.73 ± 0.51	0.7 ± 0.43*
Индекс Рассела (баллы)	5.06 ± 0.67	2.24 ± 0.99*
РМА %	56.06 ± 5.74	10.38 ± 5.4*
Подвижность зубов, (баллы)	3.77 ± 0.87	2.46 ± 1.08*

* $p < 0,05$ - при использовании критерия Крускала-Уоллиса

Таблица 2. Морфометрические показатели обновления клеточной популяции и клеток воспалительного инфильтрата в биоптатах десны пациентов ($M \pm \sigma$)

Показатель	Активное воспаление	Воспаление минимальной	«Стационарная» стадия
	I группа биоптатов	активности II группа биоптатов	воспаления III группа биоптатов
Объемная плотность эпителиальных тяжей	0,85±0,08	0,79±0,09	0,66±0,08*
Количество Ki-67-позитивных эпителиоцитов в 1мм ² среза	31,25±15,3	29,90±14,6	17,80±13,1
Количество P53-позитивных эпителиоцитов в 1мм ² среза	29,28±15,8	24,08±16,3	21,20±17,0
Количество Ki-67-позитивных клеток воспалительного инфильтрата в 1мм ² среза	15,37±7,8	7,40±6,9	2,12±0,9
Количество CD68-позитивных клеток воспалительного инфильтрата в 1мм ² среза	39,10±8,1	45,26±13,7	32,68±12,1

* $p < 0,05$ - при использовании критерия Крускала-Уоллиса

Таблица 3. Гистологически определяемая степень выраженности воспалительного инфильтрата в биоптатах десны пациентов на этапах лечения (абсолютные числа)

Степень выраженности воспалительного процесса.	До лечения (биоптатов)	После лечения (биоптатов)
Активное воспаление.	32	0
Признаки минимальной активности.	13	15
Признаки «стационарной» стадии.	0	30

ренная или слабо выраженная ($V_v=0,68$). Ki-67-позитивные эпителиоциты локализовались преимущественно в базальных слоях многослойного плоского эпителия. При статистическом анализе достоверных различий между сравниваемыми группами по уровню экспрессии Ki-67 не выявлено (критерий Крускала-Уоллиса $H=2,939$ число степеней свободы=2 $p=0,230$). Ядерная экспрессия P53 сохранялась в тех же слоях многослойного плоского эпителия, что в предыдущих группах (критерий Крускала-Уоллиса $H=0,563$ число степеней свободы=2 $P=0,755$). Обращало внимание сохранение CD68-позитивных клеток воспалительного инфильтрата и тенденции к периваскулярной локализации. Статистически достоверные отличия по количеству CD68-позитивных клеток не выявлено (Критерий Крускала-Уоллиса $H=0,629$ число степеней свободы=2 $P=0,730$). Данные представлены в таблице 2.

Изменение степени выраженности воспалительного инфильтрата в биоптатах десны пациентов к окончанию лечения представлены в таблице 3.

Возникновение очередного рецидива связано с наличием экссудативных реакций, которые имеют гнойный компонент, о чем свидетельствует нейтрофильная инфильтрация. С течением времени возникают качественные изменения, характеризующиеся выраженной мононуклеарной инфильтрацией, основная доля которой представлена антигенпрезентирующими клетками. Обращает внимание тенденция к увеличению популяции CD68-позитивных клеток в стадии минимальных признаков прогрессирования, что связано с преобладанием продуктивных процессов в участках поражения. Из вышесказанного следует, что в группах, выделенных на основании гистологической картины стадии воспаления, имеется тенденция к снижению величины удельного объема акантоэпителиальных тяжей по мере уменьшения интенсивности воспалительного процесса. Это свидетельствует о взаимном влиянии инфильтрата собственной пластинки слизистой

оболочки и многослойного плоского эпителия. Результат корреляционного анализа между экспрессией маркера Ki-67 и удельным объемом акантоэпителиальных тяжей выявил слабую положительную корреляционную связь, указывающую на роль процессов пролиферации в формировании акантоза. Наличие выявленной в исследовании отрицательной корреляционной связи между P53 и удельным объемом акантоэпителиальных тяжей свидетельствует о тенденции к снижению апоптоза на фоне усиленной пролиферации в многослойном плоском эпителии. Уменьшение воспалительной инфильтрации в биоптатах десны свидетельствует о переходе в «стационарную» стадию течения процесса и сопровождается нормализацией процессов клеточного обновления в эпителии, связанного как с подавлением пролиферации эпителиоцитов, так и с усилением их элиминации путем апоптоза. На наш взгляд, выделение гистологических признаков минимального прогрессирования воспаления при клинически определяемой «стационарной» стадии процесса, имеет высокую клиническую значимость. Данная стадия является промежуточной между прогрессивной и «стационарной», и установлен параллелизм степени акантоза, плотности воспалительного инфильтрата и показателей клеточного обновления. Сохранение мононуклеарного инфильтрата, содержащего CD68 позитивные клетки в «стационарной» стадии, свидетельствует о наличии процессинга антигенов в антигенпрезентирующих клетках слизистой оболочки десны. Количество антигенпрезентирующих клеток (CD68-позитивные) в слизистой оболочке десны статистически значимо не изменяется по окончании курса традиционной терапии. Сохранение воспалительной мононуклеарной инфильтрации является морфологическим субстратом возможного рецидива воспаления. В такой ситуации подвергается сомнению эффективность только клинических подходов в оценке тяжести воспаления, оценке эффективности терапии заболевания, прогноза заболевания. ■

Литература:

- Григорян А.С., Грудянов А.И., Рабухина Н.А., Фролова О.А. Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение. М.: Мед. Информац. Агенство 2004; 320.
- Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. М.: Медицина; 1995; 224.
- Kortmann K.S., Newman M.G. J. Periodontol. 1991; 62(5): 634-642.
- Орехова Л.Ю. Заболевания пародонта. М.: Поли Медиа Пресс; 2004; 98, 170-209, 221-254.
- Иванов В.С. Заболевания пародонта. 3-е изд., перераб. и доп. М.: МИА. 1998; 296.
- Маянский Д.Н. Хроническое воспаление АМН СССР. М.: Медицина; 1991; 272.
- Данилевский Н.Ф., Борисенко А.В. Заболевания пародонта. Киев : Здоров'я; 2000; 464.
- Bui M., Visapaa H., Seligson D. (et al). Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki 67 as predictors of survival for renal cell carcinoma. J. Urol. (Baltimore) 2004; 171 (6): 2461-2466.
- Fridman J.S., Lowe S.W. Control of apoptosis by p53. Oncogene. 2003; (22) 930-940.
- Давидович Т.П., Яковлева В.И., Трофимова Е.К., Просвяряк Г.П. Методы обследования тканей пародонта. Диагностика, лечение и профилактика стоматологических заболеваний 2-е изд., перераб. и доп. Мн.: Выш. Шк. 1994; 22-48.
- Гуцал А.А., Кондратьева Б.Ю. Практическая морфометрия органов и тканей. Под ред. Г.Г. Автондилова. Томск. 1988.
- Закс, Л.С. Статистическое оценивание. М.: Статистика. 1976; 537.
- Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. Пер. с англ. М.: Медицина Сфера; 1998; 352.