

**А.В.Самойленко
І.С.Шпонька
Л.М.Бабенко
О.В.Пославська
Ши Юнін**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Ключові слова: генералізований парадонтит, запальна клітинна інфільтрація, дендритні клітини, ангіогенез, матриксні металопротеїнази, iNOS.

*Надійшла: 16.04.2013
Прийнята: 23.05.2013*

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2013.2.66-74>
УДК: 616.314.19-02.2-08:612.017

ІМУНОМОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РІЗНИХ ВАРІАНТІВ ПЕРЕБІГУ ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ПАРОДОНТИТУ

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

Резюме. Стаття присвячена вивченню прогностичного значення імуногістохімічних маркерів локального імунного гомеостазу пародонту з визначенням CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, CD138+ клітин імунного ряду і S100+ дендритних клітин, ангіогенезу CD34 та VEGF, репаративної проліферації Ki-67, стромальної деградації ММП-1 та індукбельної синтази оксиду азоту iNOS при запальних процесах пародонту з визначенням клініко-морфологічних зв'язків між значеннями імуногістохімічних показників і агресивністю перебігу генералізованого пародонтиту.

Морфологія. – 2013. – Т. VII, № 2. – С. 66-74.

© А.В.Самойленко, І.С.Шпонька, Л.М.Бабенко, О.В.Пославська, Ши Юнін, 2013

Samoilenko A.V., Shpon'ka I.S., Babenko L.M., Poslavs'ka O.V., Shi Unin. Immunemorphological aspects of different variants of generalized parodontitis.

Summary. This article is devoted to the study of the prognostic value of immunohistochemical markers of local immune homeostasis of parodontal with definition of CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, CD138+ cells of the immune series and S100 + dendritic cells, angiogenesis CD34 and VEGF, reparative proliferation Ki-67, stromal degradation MMP-1 and inducible nitric oxide synthase iNOS in inflammatory processes periodontal definition of morphological relations between the values of immunohistochemical indices and aggressiveness of generalized parodontitis.

Key words: generalized parodontitis, inflammatory cell infiltration, dendritic cells, angiogenesis, matrix metalloproteinases, iNOS.

Вступ

Серед актуальних проблем стоматології запальні захворювання пародонту займають одне з провідних місць. Цьому сприяє характер перебігу пародонтитів, який обумовлений, в першу чергу, складом мікрофлори порожнини рота. Головною особливістю виникнення та перебігу прогресуючих форм генералізованих пародонтитів (ГП) є те, що вони майже не залежать від рівня гігієни порожнини рота, зате багато в чому залежать від імунного статусу пацієнтів (Русакова Е.Ю. и соавт., 2011). На підставі даних імуногістохімічних досліджень було висунуто гіпотезу про можливість поділу запальних захворювань пародонту на "стабільні" і "прогресуючі" вогнища ураження в залежності від переважного складу Т-, В-лімфоцитів, макрофагів та дендритних клітин у периваскулярних інфільтраціях (Вольф Г.Ф. и соавт., 2008; Масумова В.В., Булкина Н.В., 2009).

Запальна відповідь на пошкоджуючу дію мікроорганізмів регулюється головним чином станом місцевих захисних механізмів, що здійснюють захист пародонтальних тканин від бактеріаль-

ної агресії, але, з іншої сторони вони стають медіаторами деструкції самого пародонту (Безрукова І.В., Грудянов А.І., 2002; Грудянов А.І., Зорина О.А., 2009). Ферменти, що продукують лейкоцити, здатні робити літичні ефекти не тільки на мікроорганізми, але і на сполучнотканинний волоконний каркас пародонту (колагеназа, протеаза), епітеліальні структури (кератаза). Ці ферменти відносяться до групи матриксних металопротеїназ (ММП), оскільки вони відповідальні за руйнування екстрацелюлярних молекул основної речовини (матриксу). В даний час відомо близько 15-18 представників цього сімейства (Баяр У. и соавт., 2011; Гринин В.М. и соавт., 2011). Головна роль в патогенезі запальних захворювань серед них відводиться ММП-1 та ММП-8. ММП-1 виділяється фібробластами, епітеліальними клітинами і клітинами моноцитарно-макрофагального ряду (Янушевич О.О. и соавт., 2011), ММП-8 – в основному нейтрофілами. Активність ММП в клітці регулюється на різних рівнях, включаючи транскрипцію, активацію білку і взаємодію з ендogenousними інгібіторами, такими як тканинні інгібітори металопротеї-

наз (TIMP) (Кулаков А.А. и соавт., 2010).

Оксид азоту бере участь в різних аспектах функціонування багатьох органів і тканин. Ферменти - синтази оксиду азоту (NOS) мають 3 основні форми нейрональну NOS1, що локалізується в нервовій тканині і регулює клітину передачу сигналу, NOS2 або iNOS – індукцибельну, що несе функцію захисту від патогенів, та NOS3 або eNOS, яка обумовлює вазодилатацію через вплив на ендотелій (Artese L. et al., 2010; Ford P.J. et al., 2010). Багато публікацій останніх років говорять про значне підвищення рівнів експресії маркерів iNOS та eNOS при запальних захворюваннях різних локалізацій, що здається цікавим при дослідженні запальних процесів пародонту.

Для підтримання здорових тканин пародонту важливу роль також відіграє ангиогенез, який в свою чергу регулюється за допомогою складної взаємодії молекулярних сигналів, опосередкованих через фактори росту ендотелію судин (VEGF), що впливають на реконструкцію позаклітинного матриксу, міграцію ендотеліальних клітин, їх проліферацію (Nadalin M.R. et al., 2011), диференціювання та утворення капілярних анастомозів (Booth V. et al., 1998; Prapulla D.V. et al., 2007; Matarese G. et al., 2012). Але вплив ангиогенезу на розвиток, прогресію та загоєння ушкоджень пародонту вивчено не достатньо.

Важливо відзначити, підступність захворювань пародонту полягає в відсутності значних

більшових відчуттів, що при тривалому перебігу хронічних запально-деструктивних процесів в пародонті призводить до атрофії кістки альвеолярних відростків, рухливості зубів з їх подальшої втратою. Тому запальні захворювання пародонту мають серйозне загальномедичне і соціальне значення, а вибір тактики їх успішного лікування має саме безпосереднє практичне значення (Rai B. et al., 2008; Anjana R. et al., 2012).

Мета дослідження: дослідити стан локального імунного гомеостазу пародонту та ангиогенезу, активність індукцибельної синтази оксиду азоту, наявність стромальної деградації та репаративної проліферації при запальних процесах пародонту для визначення клініко-морфологічних зв'язків між значенням імуногістохімічних показників і агресивністю перебігу генералізованого пародонтиту.

Матеріали та методи

В дослідження було включено 98 пацієнтів (52 чоловіків та 46 жінок) віком від 27 до 45 років, що проходили лікування на базі «Обласної стоматологічної поліклініки», м. Дніпропетровськ протягом 2008-2010 рр. 78 пацієнтів з діагнозом генералізований пародонтит (ГП) і 20 контрольної групи з інтактним пародонтом. В залежності від стану клінічного перебігу пародонтиту було відокремлено 2 підгрупи – з хронічним та прогресуючим перебігом (табл. 1).

Характеристика клінічних даних пацієнтів

Таблиця 1

Характеристика клінічних даних пацієнтів	Кількість випадків (n=98)	Відсотки
Стать		
Чоловіки	52	53,1%
Жінки	46	46,9%
Основна група:		
Хронічний перебіг ГП	40	40,1%
Прогресуючий перебіг ГП	38	38,8%
Контрольна група (інтактний пародонт)	20	20,4%

Для морфологічного дослідження використовували біоптати слизової оболонки ясен об'ємом 2-2,5мм. Забір біопсійного матеріалу здійснювався в момент стоматологічних маніпуляцій (видалення зубного каменю, кюретаж) після ін'єкційного знеболення 4%-ним розчином Ubistesin forte після інформованої згоди пацієнта.

Біоптати ясен фіксувалися у 4%-ному 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 – heat induction of epitope retrieval (зрізи були розміщені в цитратному буфері з рН 6.0 і підігрівалися в автоклаві при температурі +121°C 8 хвилин) та пригнічували акти-

вність ендогенної пероксидази 3%-ним 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 Ki-67, CD3, CD20, CD68, CD138, S100 (LabVision), VEGF, CD34, iNOS (DakoCytomation) та поліклональне до MMP-1 (DakoCytomation). Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера з використанням у якості розчинника спеціального розчину Antibody Diluent (DakoCytomation). Для ідентифікації реакції використовували надчутливу систему візуалізації UltraVision Quanto (LabVision), з нанесенням в якості хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу

протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення специфічних структур. Для відокремлення неспецифічних тканинних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини.

Кожен зразок був розділений на три області, щоб дозволити оцінити кількісний розподіл відзначених клітин із забарвленням: (1) сполучний епітелій, (2) власна пластинка; (3) епітелій ротової порожнини (РП). Оцінка була виконана в десяти випадково обраних полях мікроскопу під збільшенням $\times 400$. Дані вищенаведених морфометричних та імуногістохімічних досліджень зазнавали статистичної обробки за допомогою IBM PC сумісного комп'ютера "Pentium 4" з використанням програми SPSS Statistica 17.0.

Результати та їх обговорення

В ході імуногістохімічного дослідження було оцінено запальний інфільтрат з маркерами кластерної диференціації CD3⁺ (загальна популяція Т-лімфоцитів), CD4⁺ (Т-хелпери), CD8⁺ (Т-супресори), CD20⁺ (В-лімфоцити), CD68⁺ (макрофаги), CD138⁺ (плазматичні клітини) та S100⁺ (дендритні клітини) в тканинах ясен при різних варіантах перебігу пародонтиту з метою виявлення розподілу цих клітин.

В інтактному пародонті від здорових осіб спостерігався незначний запальний інфільтрат з CD3⁺ Т-лімфоцитами, що були представлені більшим чином CD4⁺ Т-хелперами, та поодинокими CD20⁺ В-лімфоцитами, що частіше локалізувалися в сполучному епітелії, ніж в ділянці власної пластинки та тим більше епітелій РП (табл. 2).

Таблиця 2
Розподіл імуноцитів в біоптатах ясен в залежності від форми перебігу ГП, M \pm m (%)

Маркер	Інтактний пародонт (n=20)	Форма перебігу пародонтиту	
		Хронічний (n=40)	Прогресуючий (n=38)
CD3⁺			
Сполучний епітелій	16,60 \pm 1,28	35,12 \pm 2,43*	41,32 \pm 3,09**
Власна пластинка	14,32 \pm 1,22	17,56 \pm 2,08*	34,12 \pm 2,35**
Епітелій РП	10,11 \pm 1,13	12,24 \pm 1,55*	30,78 \pm 2,17**
CD4⁺			
Сполучний епітелій	12,20 \pm 1,15	11,12 \pm 2,43	9,32 \pm 2,50*
Власна пластинка	10,10 \pm 1,10	9,03 \pm 2,08	9,12 \pm 2,32
Епітелій РП	8,03 \pm 0,44	8,25 \pm 1,15	8,78 \pm 1,12
CD8⁺			
Сполучний епітелій	3,32 \pm 1,09	22,30 \pm 2,05*	32,32 \pm 2,41**
Власна пластинка	3,12 \pm 1,07	8,91 \pm 1,76*	24,12 \pm 2,36**
Епітелій РП	1,78 \pm 0,48	4,78 \pm 0,89*	22,78 \pm 2,74**
CD68⁺			
Сполучний епітелій	4,15 \pm 0,74	6,87 \pm 0,81*	6,90 \pm 0,72*
Власна пластинка	2,06 \pm 0,54	7,34 \pm 0,52*	8,33 \pm 1,24*
Епітелій РП	0,97 \pm 0,34	5,94 \pm 0,43*	6,50 \pm 1,15*
CD20⁺			
Сполучний епітелій	11,97 \pm 1,33	19,75 \pm 2,56*	34,78 \pm 2,39**
Власна пластинка	3,82 \pm 0,87	6,18 \pm 0,84*	29,43 \pm 1,56**
Епітелій РП	2,54 \pm 0,98	5,47 \pm 0,93*	29,60 \pm 1,23**
CD138⁺			
Сполучний епітелій	7,76 \pm 1,22	15,64 \pm 2,06*	29,56 \pm 2,23**
Власна пластинка	1,89 \pm 0,96	3,02 \pm 0,43*	22,23 \pm 1,65**
Епітелій РП	1,43 \pm 0,54	3,14 \pm 0,98*	23,42 \pm 1,65**
S100⁺			
Сполучний епітелій	4,78 \pm 0,82	8,21 \pm 0,70*	8,86 \pm 1,54* 7,73 \pm 1,23*
Власна пластинка	3,86 \pm 0,61	6,36 \pm 0,63*	7,50 \pm 1,05*
Епітелій РП	1,92 \pm 0,53	6,93 \pm 0,62*	

Примітки: * – різниця вірогідна по відношенню до інтактного пародонту при 5%-ному рівні значущості (p<0,05); ** – різниця вірогідна по відношенню до хронічного пародонтиту при 5%-ному рівні значущості (p<0,05).

У підтримці здорового стану пародонту сполучний епітелій відіграє ключову роль: він створює епітеліальне прикріплення, утворюючи

щільне з'єднання м'яких тканин з поверхнею зуба, але він проникний і забезпечує виведення метаболічних продуктів бактерій зубного нальо-

ту. Навіть за відсутності клінічних ознак запалення через сполучний епітелій в ясеневу борозну постійно мігрують поліморфноядерні лейкоцити (ПМЯЛ) та інші імунокомпетентні клітини, що виявляються навіть при стандартному забарвленні гематоксилін-еозином.

При порівнянні розподілу клітинного інфільтрату в зразках з генералізованим пародонтитом на себе привертає увагу рівномірність інфільтрації всіх ділянок дослідження (сполучного епітелію, власної пластинки і епітелію РП) при прогресивному перебігу, на відміну від хроніч-

ного, де найбільше запалення спостерігається в сполучному епітелії, що схоже на стратифікацію інтактного пародонту контрольної групи (табл. 2). Аналізуючи тенденцію збільшення/зменшення кількості клітин з експресією маркерів, треба відзначити, що кількість $CD3^+$ Т-лімфоцитів, $CD8^+$ Т-супресорів, $CD20^+$ В-лімфоцитів, $CD68^+$ макрофагів (рис. 1), $S100^+$ дендритних клітин, $CD138^+$ плазматичних клітин (рис. 2Г) збільшувалась з підвищенням активності пародонтиту і максимальних значень набула при прогресивному варіанті перебігу (табл. 2).

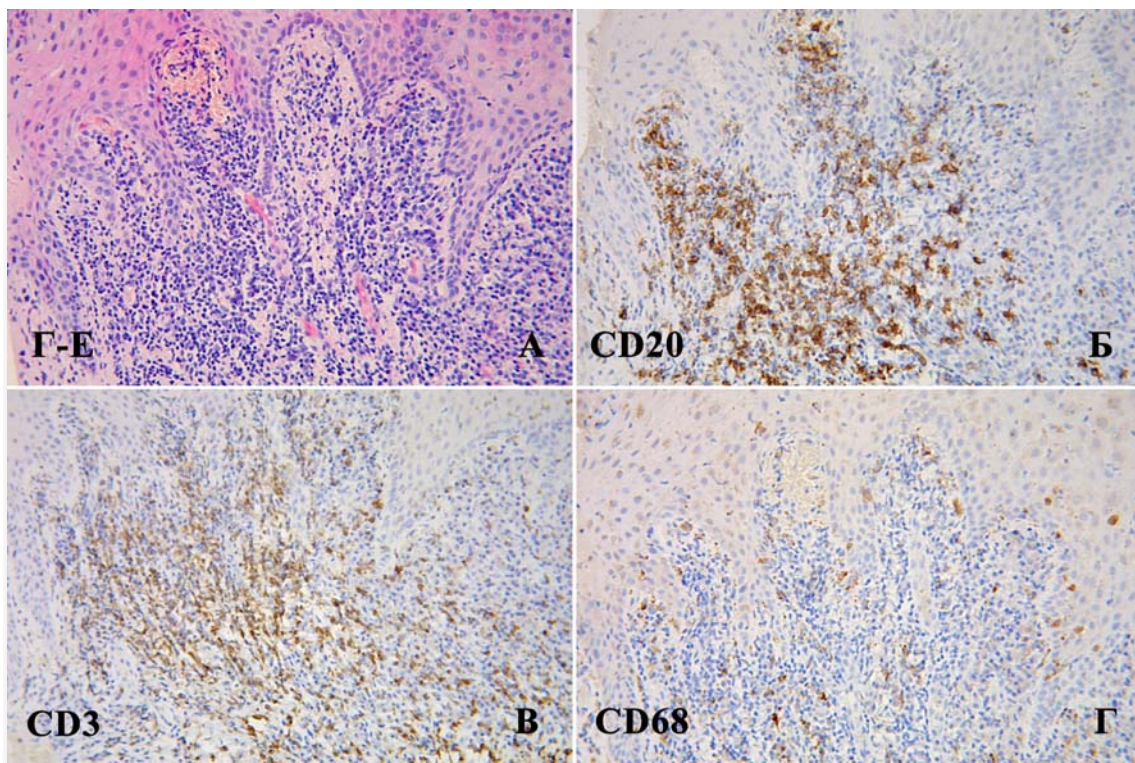


Рис. 1. Прогресуючий генералізований пародонтит. А. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Б. Мембранна реакція з маркером $CD20^+$ в скупченні В-лімфоцитів серед акантотичних тяжів багатошарового плоского епітелію. В. Мембранна реакція з маркером $CD3^+$ в скупченні Т-лімфоцитів. Г. Змішана реакція з маркером $CD68^+$ в міжепітеліальних та стромальних макрофагів, ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра. $\times 400$.

Статистично достовірні відмінності між контрольною групою і хронічним пародонтитом на всіх ділянках дослідження було знайдено в експресії маркерів, $CD8^+$, $CD20^+$, $CD68^+$ та $S100^+$ ($p < 0,05$), особливо такі маркери як $CD3^+$ та $CD138^+$ збільшення клітин з імунопозитивною міткою показали в сполучному епітелії з високою вірогідністю ($p < 0,001$). Тільки маркер $CD4^+$, що відповідає за кількісну характеристику Т-хелперів, статистично вірогідної різниці не показав ($p > 0,05$), і визначилась тенденція до зменшення кількості цих клітин при хронічному пародонтиті, порівняно з контрольною групою.

При прогресивному перебігу ГП маркери $CD3^+$, $CD8^+$, $CD20^+$, $CD68^+$ $CD138^+$ та $S100^+$ згід-

но непараметричному тесту Манна-Уитні показали статистично достовірну різницю в експресії порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Стосовно маркеру $CD4^+$, середні показники кількості клітин Т-хелперів також були нижчими, ніж в контрольній групі, але статистично значуща різниця зменшення $CD4^+$ -клітин визначилась тільки в ділянці сполучного епітелію ($p < 0,05$), стосовно інших локалізацій (власна пластинка, епітелій РП) зменшення було не вірогідним ($p > 0,05$). Також маркер $CD4^+$ не показав різниці в експресії порівняно з хронічним пародонтитом ($p > 0,05$), як і маркери $CD68^+$ та $S100^+$, що не виявилися показовими порівняно з групою пацієнтів з хронічним перебігом ГП ($p > 0,05$). Натомість експресія

CD3⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD138⁺ переконливо збільшилась при прогресивному перебігу пародонти-

ту, ніж при хронічному ($p < 0,05$).

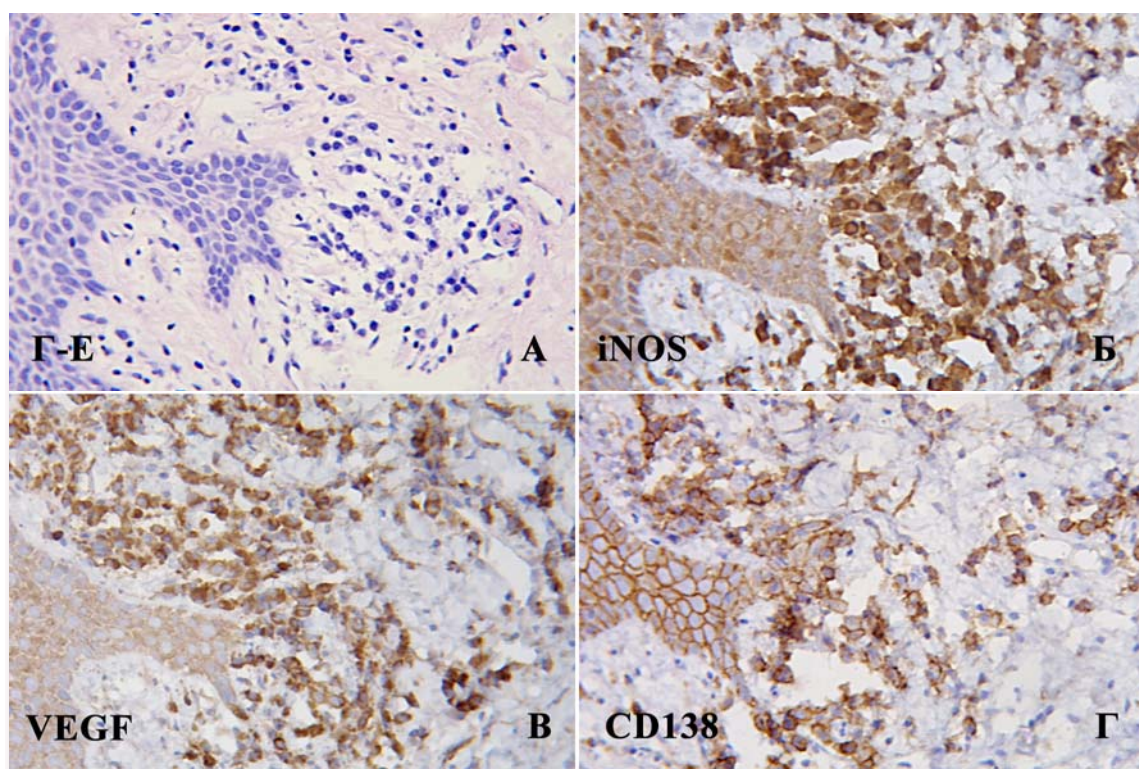


Рис. 2. Прогресуючий генералізований пародонтит. А. Забарвлення гематоксилином-еозином. Б. Змішана мембранно-цитоплазматична реакція з маркером iNOS в епітелії та запальному інфільтраті. В. Цитоплазматична реакція з маркером VEGF високої інтенсивності в запальному інфільтраті, порівняно з епітелієм. Г. Специфічна мембранна реакція з маркером CD138⁺ в плазмоцидах та неспецифічна в багатошаровому плоскому епітелії ясни, ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 400$.

Перераховані фактори переконливо показують, що неспецифічний клітинний місцевий імунітет і бактеріальна колонізація в процесі формування запально-деструктивного процесу в пародонті перебувають у складних взаємодіях з активізацією Т-супресорних механізмів і деяким пригніченням Т-хелперного звена. Стосовно гуморального імунітету – підвищення CD20⁺ В-лімфоцитів та CD138⁺ плазмоцидів з активністю запалення говорить про напруження гуморального імунітету та його безперечне значення при пародонтизах. Те ж відноситься і до поліморфоядерних лейкоцитів, кількість яких значно збільшується при прогресивній формі перебігу ГП, що має відображення в посиленні їх взаємодії з клітинними елементами - бактеріями, запальними клітинами (макрофагами, лімфоцитами), клітинами уражених тканин (ендотеліоцитів, клітинним епітелієм, фібробластами і дендритними клітинами).

Очевидно, що бактеріальна колонізація запускає процеси пошкодження і репарації пародонту, але ефект цього впливу залежить від реактивних процесів в організмі. Маркер Ki-67 показує активність процесів репаративної проліферації, що корелює з ступенем активності запалення.

Ми оцінювали інтрануклеарну експресію цього маркера в епітеліоцитах сполучного епітелію та багатошарового плоского епітелію ротової порожнини і в стромальних клітинах власної пластинки (проліферація клітин запального інфільтрату не враховувалась). Дані розподілу занесені в таблицю 3.

Результати морфометричного аналізу свідчать про значне підвищення рівня клітинного оновлення при прогресуючому ГП, порівняно з інтактним пародонтом, особливо в ділянці епітелію ротової порожнини ($p < 0,05$) (де показники проліферативної активності в окремих випадках досягають значень 60-70%) і також порівняно з хронічним ГП ($p < 0,05$) на всіх ділянках дослідження (табл. 3). Як результат цього, епітеліоцити не встигають пройти повноцінну диференціацію і на місці зрілих спеціалізованих клітин залишаються молоді і анаплазовані форми, що морфологічно верифікується як дисплазія того чи іншого ступеню важкості.

При зниженні імунного статусу, наявності факторів ризику і медіаторів запалення, а також при зростанні кількості пародонтопатогенних бактерій запалення ясен поширюється на більш глибокі структури утримуючого апарату зуба. Це

призводить до дезінтеграції колагену і атрофії кісткової тканини (втрати прикріплення). З'єднувальний епітелій перетворюється в епітелій кишені, який проліферують в апікальному і латеральному напрямках. Виникають справжні пародо-

нтальні кишені. Це – свого роду резервуар для опортуністичних патогенних бактерій, які підтримують пародонтит і можуть сприяти прогресуванню захворювання.

Таблиця 3
Розподіл значень експресії маркеру Ki-67 в залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптатів, M±m (%)

Експресія маркеру Ki-67	Інтактний пародонт (n=20)	Форма перебігу пародонтиту	
		Хронічний (n=40)	Прогресуючий (n=38)
Сполучний епітелій	6,21±0,30	8,08±0,14 *	10,03±0,93 **
Власна пластинка	3,04±0,15	5,67±0,25 *	10,60±0,70 **
Епітелій РП	7,27±1,20	15,30±1,08 *	58,30±1,34 **

Примітки: * – різниця вірогідна по відношенню до інтактного пародонту при 5% рівні значущості (p<0,05); ** – різниця вірогідна по відношенню до хронічного пародонтиту при 5% рівні значущості (p<0,05).

Дослідження колагенази 1 типу із родини ММП показує ступінь стромальної деградації при різних варіантах перебігу ГП. Оцінювалась цитоплазматична експресія цього маркеру і в

епітеліальних і в стромальних клітинах за шкалою негативна, слабка, помірна та висока експресія (табл. 4).

Таблиця 4
Розподіл значень експресії маркеру ММП-1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптатів, n

Експресія маркеру ММП-1	Інтактний пародонт (n=20)	Форма перебігу пародонтиту	
		Хронічний (n=40)	Прогресуючий (n=38)
Негативна	7	-	-
Слабка	12	6 *	2 *
Помірна	1	29 *	13 **
Висока		5 *	23 **

Примітки: * – різниця вірогідна по відношенню до інтактного пародонту при 5% рівні значущості (p<0,05); ** – різниця вірогідна по відношенню до хронічного пародонтиту при 5% рівні значущості (p<0,05).

Аналізуючи варіанти експресії маркеру стромальної деградації ММП-1, треба відзначити, що в інтактному пародонті 19 із 20 випадків показали низьку та слабку експресію ММП-1 (95%). При хронічному пародонтиті 72,5% випадків (29 із 40) продемонстрували помірну експресію (рис. 3 В), що згідно точному тесту Фішера статистично достовірно відрізняється від контрольної групи (p<0,05). Прогресуючий ГП в 23 із 38 (60,5%) дав високу експресію маркеру ММП-1, що вірогідно мало значущу різницю порівняно з хронічним ГП (p<0,05) і інтактним пародонтом (p<0,05) (табл. 4). Таким чином, збільшення активності матричної металопротеїнази 1 співпадає з підвищенням агресивності перебігу генералізованого пародонтиту, що відображає процес ремоделювання екстрацелюлярного матрикса і деградації колагенових фібрил.

Розподіл варіантів експресії маркеру iNOS

за шкалою від негативної до високої інтенсивності (табл. 5) в тканинах пародонту показав значне підвищення інтенсивності забарвлення в зразках з запаленням, порівняно з інтактним пародонтом (p<0,05). При ГП компоненти та запальний інфільтрат характеризувалися завжди реакціями з помірною та високою інтенсивністю забарвлення, таким чином експресія iNOS відбувається у відповідь на стимуляцію цитокінами або/і ендотоксинами, натомість сполучний епітелій і епітелій РП реагував в межах слабкої реакції (рис. 2Б).

Також треба відзначити, що статистично достовірної різниці між хронічним і прогресуючим перебігом ГП виявлено не було (p>0,05), що говорить про універсальність забезпечення імунної реакції і головна роль NO, що продукується за таких умов, це його токсична дія на бактерії та інші патогенні організми.

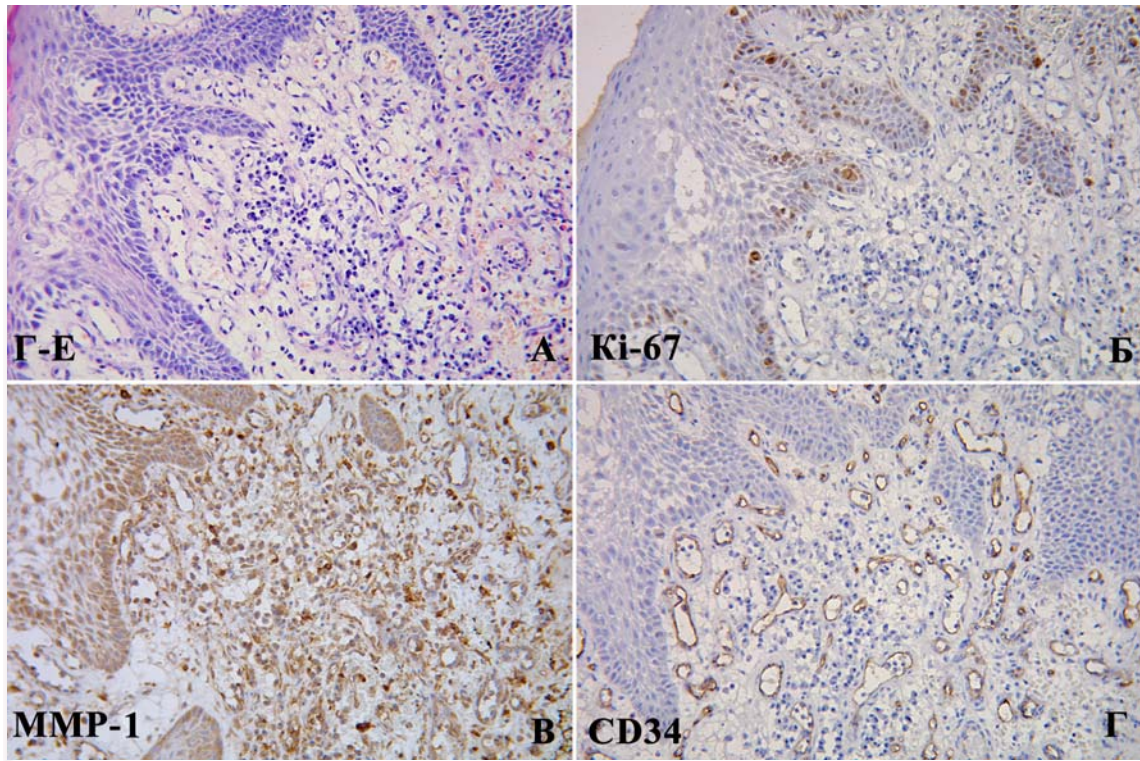


Рис. 3. Хронічний генералізований пародонтит. А. Забарвлення гематоксилином-еозином. Б. Ядерна реакція з маркером Ki-67 в базальному шарі епітелію РП (ІП біля 13%). В. Змішана ядерно-цитоплазматична реакція з маркером стромальної деградації MMP-1 в запальному інфільтраті і навколишніх епітеліальних клітинах на рівні помірної експресії. Г. Субмембранна реакція з маркером CD34 ендотелію судин в ділянці хронічного запалення, ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра. $\times 400$.

Таблиця 5

Розподіл значень експресії маркеру iNOS в залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптатів, n

Експресія маркеру MMP-1	Інтактний пародонт (n=20)	Форма перебігу пародонтиту	
		Хронічний (n=40)	Прогресуючий (n=38)
Негативна	9	-	-
Слабка	11	-	-
Помірна	-	23*	18*
Висока	-	17*	20*

Примітки: * – різниця вірогідна по відношенню до інтактного пародонту при 5% рівні значущості ($p < 0,05$); ** – різниця вірогідна по відношенню до групи порівняння при 5% рівні значущості ($p < 0,05$).

Таблиця 6

Розподіл значень експресії маркеру CD34 в залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптатів, n

Експресія маркеру CD34	Інтактний пародонт (n=20)	Форма перебігу пародонтиту	
		Хронічний (n=40)	Прогресуючий (n=38)
ЩМС < 30 судин на 1 мм^2	20	19	2**
ЩМС ≥ 30 судин на 1 мм^2		21*	36**

Примітки: * – різниця вірогідна по відношенню до інтактного пародонту при 5% рівні значущості ($p < 0,05$); ** – різниця вірогідна по відношенню до групи порівняння при 5% рівні значущості ($p < 0,05$).

Для більш детальної оцінки взаємозв'язку між експресією маркеру CD34 (рис. 3Г) і варіантом перебігу пародонтиту був використаний статистичний метод оцінки медіан (Me). Для цього було визначено, що медіанне значення показнику щільності мікросудин (ЩМС) на 1 мм² в біоптатах ясен становило 30 судин/мм². Враховуючи значення медіани, були використані наступні критерії оцінки ступеня експресії маркеру CD34: при ЩМС < 30 судин на 1 мм² експресію вважали низькою, а при ЩМС ≥ 30 – високою.

Аналіз показників ангиогенезу, що включав щільність мікросудин пародонту (маркер CD34) (табл. 6) та фактор росту ендотелію (VEGF) (табл. 7) показав значно більш високий рівень експресії цих маркерів у пацієнтів з прогресивним перебігом ГП, ніж з хронічним (p<0,05) та інтактним пародонтом контрольної групи (p<0,05). Ці дані корелюють з експресією MMP-1, що доведено має активуючий вплив на ангиогенез.

Таблиця 7

Розподіл значень експресії маркеру VEGF в залежності від клініко-морфологічних характеристик біоптатів, n

Експресія маркеру MMP-1	Інтактний пародонт (n=20)	Форма перебігу пародонтиту	
		Хронічний (n=40)	Прогресуючий (n=38)
Негативна	4		
Слабка	16	4*	2*
Помірна	-	32*	6**
Висока	-	4*	30**

Примітка * – різниця вірогідна по відношенню до інтактного пародонту при 5% рівні значущості (p<0,05); ** – різниця вірогідна по відношенню до хронічного пародонтиту при 5% рівні значущості (p<0,05).

Підсумок

Таким чином, перебіг прогресивного ГП характеризувався більш вираженою інфільтрацією CD3⁺ Т-лімфоцитами, CD8⁺ Т-супресорами, CD20⁺ В-лімфоцитами, CD138⁺ плазматичними клітинами, порівняно з хронічним ГП (p<0,05) та контрольною групою (p<0,05) у всіх відділах маргінального пародонту, натомість кількість CD68⁺ макрофагів та S100⁺ дендритних клітин однаково збільшувалася і при хронічному, і при прогресивному ГП без вірогідної різниці між цими групами. Кількість CD4⁺ Т-хелперів поступово зменшувалась від контрольної групи до прогресуючого ГП, але статистично вірогідну різницю вдалося установити тільки в ділянці сполучного епітелію при прогресивному ГП порівняно з нормальним пародонтом. Індекс проліферації значно підвищувався з активністю запалення і найбільших значень набув у ділянках дисплазії епітелію РП при прогресивному ГП. Експресія MMP-1 виявлялася більшим чином в

клітинах строми власної пластинки і запальному інфільтраті пародонту з високою інтенсивністю забарвлення вірогідно частіше при прогресивному перебігу ГП, ніж в групах порівняння. Аналіз експресії маркеру iNOS показав значне підвищення інтенсивності забарвлення в зразках з запаленням порівняно з інтактним пародонтом (p<0,05), але різниці між хронічним і прогресуючим перебігом ГП виявлено не було. До того ж, показники ангиогенезу CD34 та VEGF показали значно більш високі рівні експресії у пацієнтів з прогресивним перебігом ГП, ніж з хронічним (p<0,05) та контрольною групою (p<0,05), що доводить важливу роль васкуляризації в підтримці активності запалення пародонту.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з подальшим визначенням клініко-морфологічних зв'язків між імуногістохімічними характеристиками і агресивністю перебігу генералізованого пародонтиту.

Літературні джерела

Баяр У. Перспективы использования матриксных металлопротеиназ (ММП) в клинической диагностике пародонта. ММП-мишени в терапии пародонта / У. Баяр, В. М. Гринин, Т. Б. Караогланова // Стоматология для всех. – 2011. – № 1. – С. 34-36.

Безрукова И. В. Агрессивные формы пародонтита / И. В. Безрукова, А. И. Грудянов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2002. – 127 с.

Вольф Г. Ф. Пародонтология / Г. Ф. Вольф, Э. М. Ратейцхак, К. Ратейцхак. – М. : МЕДпресс-информ, 2008. – 548 с.

Гринин В. М. Матриксные металлопротеи-

донтита / И. В. Безрукова, А. И. Грудянов. – М. : Медицинское информационное агентство, 2002. – 127 с.

назы при пародонтите / Гринин В. М., Баяр У., Караогланова Т. Б. // *Стоматология*. – 2011. – № 6. – С. 80-84.

Грудянов А. И. Методы диагностики воспалительных заболеваний пародонта / А. И. Грудянов, О. А. Зорина. – М. : Медицинское информационное агентство, 2009. – 112 с.

Иммуногистохимический мониторинг тучных клеток при патологии пародонта у детей / Е. Ю. Русакова, Г. В. Рева, С. Е. Акимова, Л. П. Савинова // *Стоматология детского возраста и профилактика*. – 2011. – № 4. – С. 18-20.

Кулаков А. А. Роль защитных факторов организма в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта / А. А. Кулаков, О. А. Зорина, О. А. Борискина // *Стоматология*. – 2010. – № 6. – С. 72-77.

Масумова В. В. Динамика морфометрических показателей дендритных клеток слизистой оболочки десны при воспалительных заболеваниях пародонта и в отдельные сроки после лечения / В. В. Масумова, Н. В. Булкина // *Современные наукоемкие технологии* – 2009. – № 6. – С. 49-50.

Янушевич О. О. Матриксные металлопротеиназы и пародонтит: состояние проблемы и перспективы / О. О. Янушевич, В. А. Почтаренко, Н. С. Борзикова // *Клиническая стоматология*. – 2011. – № 3. – С. 80-82.

Anjana R. Immunohistochemical localization of CD1a and S100 in gingival tissues of healthy and chronic periodontitis subjects / R. Anjana, L. Joseph, R. Suresh // *Oral Dis.* – 2012. – Vol. 18, № 8. – P. 778-785.

Biomarkers of periodontitis in oral fluids / Balwant Rai, Simmi Kharb, Rajniish Jain, Suresh C. Anand // *J. of Oral Science*. – 2008. – Vol. 50, № 1. – P. 53-56.

Ford P. J. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis / P. J. Ford, J. Gamonal, G. J. Seymour // *Periodontology* 2000. – 2010. – Vol. 53. – P. 111-123.

Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis / L. Artese, A. Piattelli, L.A. de Gouveia Cardoso [et al.] // *J. Periodontol.* – 2010. – Vol. 81, № 5. – P. 718-726.

Immunohistochemical analysis of TGF- β 1 and VEGF in gingival and periodontal tissues: a role of these biomarkers in the pathogenesis of scleroderma and periodontal disease / G. Matarese, G. Isola, G. P. Anastasi [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 30, № 3. – P. 502-508.

Prapulla D. V. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease / D. V. Prapulla, P. B. Sujatha, A. R. Pradeep // *J. Periodontol.* – 2007. – Vol. 78, № 9. – P. 1783-1787.

Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in odontogenic cystic lesions / M. R. Nadalin, E. R. Fregnani, Y. T. Silva-Sousa, D. E. Perez. // *Braz. Dent. J.* – 2011. – Vol. 22, № 3. – P. 223-229.

Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease / V. Booth, S. Young, A. Cruchley [et al.] // *J. Periodontal Res.* – 1998. – Vol. 33, № 8. – P. 491-499.

Самойленко А.В., Шпонька И.С., Бабенко Л.М., Пославская О.В., Ши Юнин. Иммуноморфологические аспекты различных вариантов течения генерализованного пародонтита.

Резюме. Статья посвящена изучению прогностического значения иммуногистохимических маркеров локального иммунного гомеостаза пародонта с определением CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, CD138+ клеток иммунного ряда и S100+ дендритных клеток, ангиогенеза CD34 и VEGF, репаративной пролиферации Ki-67, стромальной дегенерации MMP-1 и индуцибельной синтазы оксида азота iNOS при воспалительных процессах пародонта с определением клинико-морфологических связей между значениями иммуногистохимических показателей и агрессивностью течения генерализованного пародонтита.

Ключевые слова: генерализованный пародонтит, воспалительная клеточная инфильтрация, дендритные клетки, ангиогенез, матриксных металлопротеиназы, iNOS.