

УДК 616.31
ББК 56.6

Е.М. СПЕРАНСКАЯ, Л.Р. МУХАМЕДЖАНОВА, Н.Н. ГОЛУБЦОВА

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

Ключевые слова: хронический генерализованный пародонтит, белок Ki-67, пролиферативная активность, маркеры.

Цель работы заключалась в изучении морфологических структур многослойного плоского эпителия десны при хроническом генерализованном пародонтите. Иммуногистохимическими методами была исследована ткань десневого сосочка 55 пациентов. Проллиферативная клеточная активность многослойного плоского эпителия и собственной пластинки десны определялась по уровню экспрессии маркера Ki-67. Установлено, что при воспалительно-деструктивных поражениях пролиферативная активность эпителиоцитов снижается в 1,4 раза, фибробластов собственной пластинки десны – более чем в 2 раза. При окраске гематоксилином и эозином отмечается, что у пациентов с интактным пародонтом собственная пластинка слизистой оболочки имеет нечетко выраженный сосочковый и сетчатый слой по сравнению с аналогичным показателем у пациентов,отягощенных пародонтитом: увеличивает количество соединительнотканых сосочков в 1,2 раза. Хроническое воспаление в тканях пародонта приводит к изменению цитоархитектоники и клеточной пролиферативной активности десневого сосочка.

E. SPERANSKAYA, L. MUKHAMEDZHANOVA, N. GOLUBTSOVA

MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF PROLIFERATIVE PROCESSES ACTIVITY IN PERIODONTAL TISSUES IN PATIENTS WITH CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS

Key words: chronic generalized periodontal disease, Ki-67, proliferative activity, markers.

The purpose of work consisted in studying morphological structures of multilayer flat gum epithelium in chronic generalized periodontal disease. Tissue of gingival papilla of 55 patients was studied by means of immunohistochemical methods. Proliferative cellular activity of multilayer flat epithelium and that of proper gingival plate was determined by Ki-67 marker's expression level. It is established that in inflammatory-destructive lesions proliferative activity of epitheliocytes decreases by 1,4, that of proper gingival plate fibroblasts – more than twice. When staining with hematoxylin and eosine it is noted that in patients with an intact parodontium, mucous membrane proper plate has indistinctly expressed papillary and reticular layer in comparison with patients burdened by periodontal disease: the number of connective tissue papillas increases by 1,2. Chronic inflammation in parodontal tissues leads to change in cytoarchitecture and cellular proliferative activity in gingival papilla.

Клинические проявления воспаления в пародонте при пародонтите различной тяжести схожи, несмотря на то, что связаны с различными локальными патологическими реакциями в тканях пародонта. При воспалении в многослойном плоском эпителии наблюдаются нарушения процессов пролиферации [10]. Иммуногистохимические методы, применяемые при проведении морфологических исследований, позволяют детально исследовать характер нарушений процессов клеточного обновления в эпителии десны.

Маркером пролиферации эпителиоцитов кератинизированного эпителия десны при воспалительных заболеваниях является белок Ki-67 [14]. В процессе митоза этот белок связан с хромосомами и в интерфазе выявляется преимущественно в ядрышках. Ген, кодирующий белок Ki-67, расположен на длинном плече 10-й хромосомы [7]. Данный маркер позволяет определить количество клеток, находящихся в S-, G- (кроме G₀-фазы), M-фазах клеточного цикла. Максимальный уровень белка Ki-67 в клетке фиксируется в митозе. В G₁-фазе клеточного цикла происходит падение его уровня, сменяющееся постепенным возрастанием в ходе S-фазы и достижением максимума к следующему митозу [10].

Деструкция тканей пародонта при тяжелой степени воспалительного процесса обусловлена глубокими нарушениями клеточного гомеостаза – активацией апоптоза на фоне резкого угнетения пролиферативной активности эпителия [8, 12, 13]. По уровню экспрессии Ki-67 можно судить о пролиферативной активности клеток многослойного эпителия и собственной пластинки десневого сосочка, которые находятся в пролиферативной фазе клеточного цикла (G₁, G₂ S, M) [1, 2], так как обнаружение данного маркера совпадает с вступлением клетки в митоз [7].

Маркер Ki-67 преимущественно используется в онкологической диагностике: при лимфомах, раке молочной железы, раке желудка, опухолях эндокринной системы, головного мозга. Экспрессия Ki-67 является одним из наиболее надежных индикаторов состояния пролиферативной активности раковых клеток [3–6, 15].

Результаты оценки параметров клеточной пролиферации при воспалительно-деструктивных поражениях тканей десны улучшает раннюю диагностику пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом [8, 9].

Целью исследования явилось определение влияния хронического воспаления в тканях пародонта на пролиферативную активность клеток эпителия и фибробластов соединительнотканного слоя.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 25 пациентов (10 мужчин и 15 женщин в возрасте 20–36 лет) с интактным пародонтом, обратившиеся в клинику АУ «Республиканская стоматологическая поликлиника» ЧР (г. Чебоксары) с целью оказания плановой санационной помощи (группа сравнения). Исследуемая группа представлена 30 пациентами сопоставимого гендерно-возрастного состава; пациенты исследуемой группы отягощены хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) лёгкой/средней степени тяжести. Пародонтологический диагноз верифицирован с использованием трехмерной конусно-лучевой дентальной рентгеновской компьютерной томографии. Все пациенты исследуемой группы и группы сравнения подтвердили своё согласие на участие в исследовании.

Пациентам, участвующим в исследовании, проводился забор тканей десневого сосочка в процессе проведения закрытого кюретажа. Выполнялась инфльтрационная анестезия 2%-ным раствором лидокаина. Полученный биоматериал фиксировали в 4%-ном параформальдегиде и заливали в парафин. Из блоков изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм. Применялась общая окраска гематоксилином и эозином. Маркер пролиферации Ki-67 выявляли непрямым иммуногистохимическим методом [11]. В качестве первых антител использовали моноклональные мышинные антитела к Ki-67 в разведении 1:100 (Novocastra, Великобритания) на 0,05 М трис-буфере с рН 7,4 с добавлением 0,15 М натрия хлорида. Визуализацию антигенов проводили с помощью системы EnVision, конъюгированной с пероксидазой (K 4002, DakoCytomation, Дания). Выявление пероксидазы проводили с использованием 3,3-диаминобензидина [11]. Продукт реакции окрашивался в коричневый цвет. В качестве контроля специфичности окрашивания применяли аналогичную процедуру обработки срезов, но вместо первых антител использовали нормальную сыворотку в конечной концентрации 1%. Далее проводили докрасшивание ядер гематоксилином.

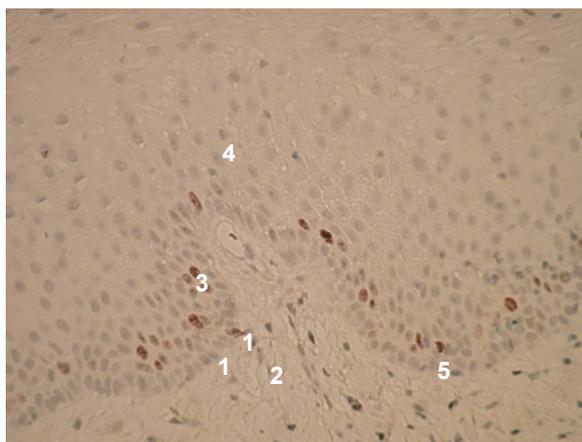
На первом этапе исследования в эпителии десны подсчитывали число Ki-67-позитивных эпителиоцитов на 100 клеток базального и шиповатого слоев. В результате определяли процент иммунопозитивных к Ki-67 эпителиоцитов. На втором этапе исследования подсчитывали общее число фибробластов в сосочковом слое десны на одно поле зрения микроскопа при 1000-

кратном увеличении и количество Ki-67-позитивных фибробластов в этом же поле зрения. Для каждого случая оценивали количество клеток в 10 полях зрения. В результате рассчитывали процент положительно окрашенных фибробластов сосочкового слоя на одно поле зрения. На третьем этапе подсчитывали общее число фибробластов в сетчатом слое на одно поле зрения микроскопа при 1000-кратном увеличении и количество Ki-67-позитивных фибробластов в этом же поле зрения. Для каждого случая оценивали количество клеток в 10 полях зрения. В результате рассчитывали процент положительно окрашенных фибробластов сетчатого слоя на одно поле зрения.

Полученные цифровые данные подвергали статистической обработке. По каждой группе данных рассчитывали средние арифметические величины (M) и их стандартные ошибки (m). При значениях переменных, соответствующих требованиям нормальности распределения, сравнение проводили с использованием критерия Стьюдента, при значениях, не соответствующих обозначенным требованиям, – с использованием критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение. При окраске гематоксилином и эозином отмечается, что у пациентов с пародонтитом собственная пластинка слизистой оболочки имеет нечетко выраженный сосочковый и сетчатый слой по сравнению с таковой у пациентов с интактным пародонтом. Увеличивается количество соединительнотканых сосочков: у пациентов с интактным пародонтом – $6,4 \pm 0,1$ на 1 мм^2 , при хроническом генерализованном пародонтите – $8,3 \pm 0,25$ на 1 мм^2 ($p < 0,05$). Количество соединительнотканых сосочков увеличивается в 1,2 раза. При хроническом воспалении тканей десны микрососуды сосочкового и сетчатого слоев расширены, эндотелий отечный, ядра эпителиоцитов и фибробластов гиперхромны.

В многослойном эпителии десны Ki-67-позитивные клетки располагались в базальном и шиповатом слоях (рисунок). В группе сравнения процент Ki-67 положительно окрашенных эпителиоцитов составил $18,5 \pm 2,9$. При ХГП доля положительно окрашенных клеток уменьшилась до $13,6 \pm 1,5\%$ ($p < 0,05$) (рисунок).



Ki-67-позитивные клетки. Хронический генерализованный пародонтит.
Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 90.

В сосочковом слое собственной пластинки десны пациентов группы сравнения процент Ki-67 положительно окрашенных фибробластов составил $10,9 \pm 2,7$. При ХГП доля положительно окрашенных клеток уменьшилась более чем в 2 раза – $4,4 \pm 0,86\%$ ($p < 0,05$) (рисунок).

В сетчатом слое собственной пластинки десны пациентов группы сравнения процент Ki-67 положительно окрашенных фибробластов составил $4,8 \pm 1,3$. При ХГП доля положительно окрашенных клеток уменьшилась до $2,2 \pm 0,4\%$ ($p < 0,05$).

В многослойном плоском эпителии десны Ki-67-позитивные клетки выявляются в базальном и шиповатом слоях, в данных структурах в отличие от тканей собственной пластинки десны определяется наибольшая степень Ki-67-позитивных клеток [13].

Процентное соотношение степени экспрессии в многослойном плоском эпителии в группе сравнения в 1,4 раза больше, чем в группе с хроническим генерализованным пародонтитом.

В группе пациентов с интактным пародонтом в сосочковом слое степень экспрессии в 2,5 раза, а в сетчатом слое – 2,2 раза больше, чем в группе пациентов с ХГП.

Выводы. Хронические воспалительно-деструктивные заболевания пародонта влияют на изменение цитоархитектоники и пролиферативную активность эпителиоцитов и фибробластов тканей десневого сосочка. Полученные результаты могут быть использованы в качестве дополнительных методов обследования пациентов с ХГП. Внедрение алгоритмов маркерной диагностики пролиферативных процессов при воспалительных заболеваниях пародонта позволит определять глубину поражения тканей десны. Полученные в ходе исследования сведения могут представлять интерес при планировании комплексного лечения пациентов,отягощенных воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта, с использованием регенеративно-репаративных технологий.

Литература

1. Бульчева Т.И., Дейнеко Н.Л., Григорьев А.А. Иммуноцитохимическая оценка стимуляции лимфоцитов фитогемагглютинином реакции бласттрансформации лимфоцитов с моноклональными антителами Ki-67 // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. Т. 59, № 7. С. 51–54.
2. Камышников В.С. Онкомаркеры: методы определения, референтные значения, интерпретация тестов. М.: МЕДпресс-информ, 2001. 128 с.
3. Карапетян В.Л., Степанова С.В., Барышников А.Б., Никогосян С.О., Кузнецов В.В. Прогностическое значение экспрессии белка Ki-67 в ткани опухоли больных раком яичников I-II стадии // Российский биотерапевтический журнал. 2010. Т. 9, № 3. С. 31–35.
4. Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Ермилова В.Д., Барышников А.Ю., Брюзгин В.В. Экспрессия Ki-67, тимидин фосфорилазы (ТФ) и PTEN в интраэпителиальных неоплазиях шейки матки // Вопросы онкологии. 2011. Т. 57, № 2. С. 199–203.
5. Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Зорькин В.Г., Бобров И.П., Авдалян А.М. Особенности маркеров Ki-67, pSNA, p53 и активности неоангиогенеза в прогнозе рака желудка // Российский биотерапевтический журнал. 2010. Т. 9, № 4. С. 117–122.
6. Лазукин А.В. Является ли фактор пролиферации Ki-67 критерием чувствительности к химиотерапии больных раком молочной железы? // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13, № 3. С. 95–100.
7. Никогосян С.О., Барышников А.Ю., Степанова Е.В., Кузнецов В.В., Карапетян В.Л. Клиническое значение индекса Ki-67 в тканях опухоли у больных раком яичников I и II стадии // Российский онкологический журнал. 2014. № 5. С. 36–41.
8. Осипова Ю.Л., Булкина Н.В., Кропотина А.Ю. Воспалительные заболевания пародонта при неэрозивной форме гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: клинические и иммуноморфологические аспекты // Фундаментальные исследования. 2012. № 2(2). С. 325–327.
9. Осипова Ю.Л. Воспалительные заболевания пародонта при гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: прогнозирование течения и тактика ведения: дис. ... д-ра мед. наук. Саратов, 2015. 260 с.
10. 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, vol. 171(6), pp. 2461–2466.
11. Gunin A.G., Petrov V.V., Golubtsova N.N. et al. Age-related changes in angiogenesis in human dermis. *Exp. Gerontol.*, 2014, vol. 55, pp. 143–151.
12. Johann A.C., Caldeira P.C., Caliani M.V., de Abreu M.H., Aguiar M.C., Mesquita R.A. Metallothionein in the radicular, dentigerous, orthokeratinized odontogenic cysts and in keratocystic odontogenic tumor. *J. Oral Pathol Med.*, 2011, Mar., vol. 40(3), pp. 270–276.

13. Martins C.A., Rivero E.R., Dufloth R.M., Figueiredo C.P., Vieira D.S. Immunohistochemical detection of factors related to cellular proliferation and apoptosis in radicular and dentigerous cysts. *J. Endod.*, 2011, Jan., vol. 37(1), pp. 36–39.
14. Preethi P.L., Rao S.R., Madapusi B.T., Narasimhan M. Immunolocalization of Ki-67 in different periodontal conditions. *J. Indian Soc. Periodontol.*, 2014, Mar., vol. 18(2), pp. 161–165.
15. Sholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.*, 2000, vol. 182, pp. 311–322.

References

1. Bulycheva T.I., Deineko N.L., Grigor'ev A.A. *Immunotsitokhimicheskaya otsenka stimulyatsii limfotsitov fitogemagglutininom reaktsii blasttransformatsii limfotsitov s monoklona'nymi antitelami Ki-67* [The immune cytochemical evaluation of reaction of phytohemagglutinin stimulation of lymphocytes with monoclonal antibodies Ki-67]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics], 2014, vol. 59, no. 7, pp. 51–54.
2. Kamyshnikov V.S. *Onkomarkery: metody opredeleniya, referentnye znacheniya, interpretatsiya testov* [Tumor markers: the methods of determining, reference values, interpretation of test]. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2001, 128 p.
3. Karapetyan V.L., Stepanova S.V., Baryshnikov A.B., Nikogosyan S.O., Kuznetsov V.V. *Prognosticheskoe znachenie ekspressii belka Ki -67 v tkani opukholi bol'nykh rakom yaichnikov I-II stadii* [Prognostic significance of protein expression of Ki -67 in cancer patients ovarian tumor tissue I-II stage]. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal* [The Russian biotherapeutic magazine], 2010, vol. 9, no. 3, pp. 31–35.
4. Korolenkova L.I., Stepanova E.V., Ermilova V.D., Baryshnikov A.Yu., Bryuzgin V.V. *Ekspressiya Ki -67, timidin fosforilazy (TF) i PTEN v intraepitelial'nykh neoplaziyakh sheiki matki* [Expression of Ki-67, the timidin fosforilaza (TF) and PTEN in the intraepithelial neoplasia of a neck of a uterus]. *Voprosy onkologii* [Oncology questions], 2011, vol. 57, no. 2, pp. 199–203.
5. Lazarev A.F., Klimachev V.V., Zor'kin V.G., Bobrov I.P., Avdalyan A.M. *Osobennosti markerov Ki-67, PSNA, p 53 i aktivnosti neoangiogeneza v prognoze raka zheludka* [Features of markers of Ki-67, PSNA, p 53 and activity of a neoangiogenesis in the forecast of stomach cancer]. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal* [The Russian biotherapeutic magazine], 2010, vol. 9, no. 4, pp. 117–122.
6. Lazukin A.V. *Yavlyaetsya li faktor proliferatsii Ki -67 kriteriem chuvstvitel'nosti k khimioterapii bol'nykh rakom molochnoi zhelezy?* [Whether the factor of a proliferation of Ki-67 is criterion of sensitivity to a chemotherapy of patients with cancer of a mammary gland?]. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal* [The Russian biotherapeutic magazine], 2014, vol. 13, no. 3, pp. 95–100.
7. Nikogosyan S.O., Baryshnikov A.Yu., Stepanova E.V., Kuznetsov V.V., Karapetyan V.L. *Klinicheskoe znachenie indeksa Ki -67 v tkanyakh opukholi u bol'nykh rakom yaichnikov I i II stadii* [Clinical value of the Ki-67 index in tumor tissues at patients suffering from cancer ovaries of I and II stages]. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal* [The Russian oncological magazine], 2014, no. 5, pp. 36–41.
8. Osipova Yu.L., Bulkina N.V., Kropotina A.Yu. *Vospalitel'nye zabolevaniya parodonta pri neerozivnoi forme gastroezofageal'noi refluksnoi bolezni: klinicheskie i immunomorfologicheskie aspekty* [Inflammatory diseases of a parodont at not erosive form of a gastroesophageal reflux disease: clinical and immunomorphological aspects]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Basic researches], 2012, no. 2(2), pp. 325–327.
9. Osipova Yu.L. *Vospalitel'nye zabolevaniya parodonta pri gastroezofageal'noi refluksnoi bolezni: prognozirovanie techeniya i taktika vedeniya: dis. ... d-ra med. nauk* [Inflammatory diseases of a parodont in case of a gastroesophageal reflux disease: forecasting of a current and tactics of maintaining. Doct. Diss.]. Saratov, 2015, 260 p.

СПЕРАНСКАЯ ЕКАТЕРИНА МИХАЙЛОВНА – ординатор по специальности стоматология терапевтическая, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (katerina_dumspirospero@mail.ru).

SPERANSKAYA EKATERINA – Resident in the Specialty Therapeutic Dentistry, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.

МУХАМЕДЖАНОВА ЛЮБОВЬ РУСТЕМОВНА – доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний и новых технологий, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (lr71@bk.ru).

MUKHAMEDZHANOVA LYUBOV – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Propaedeutics of Dental Diseases and New Technologies, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.

ГОЛУБЦОВА НАТАЛЬЯ НИКОЛАЕВНА – кандидат биологических наук, доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (golubnata@list.ru).

GOLUBTSOVA NATALYA – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, Chuvash State University, Cheboksary, Russia.
