

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ ИММУНОЦИТОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА В ДИНАМИКЕ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Рева Г.В.¹, Толмачёв В.Е.¹, Кулаков А.А.², Калинин И.О.¹, Красников Ю.А.¹, Индык М.В.¹, Ким А.Р.¹, Восканян О.Г.¹, Рева И.В.^{1,3}

¹ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, e-mail: RevaGal@yandex.ru;

²ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва;

³Международный медицинский научно-образовательный центр, Ниигата, e-mail: avers2@yandex.ru

На современном этапе имеются только единичные исследования, посвященные местным факторам иммунной защиты в динамике дентальной имплантации. Нами были изучены срезы биоптатов СОР пациентов в динамике дентальной имплантации с помощью классических и иммуногистохимических методов исследования с последующим анализом на микроскопе Olympus Bx52. В результате морфологического мониторинга структур слизистой оболочки рта в контрольной группе пациентов была представлена модель, отражающая изменения локального иммунного гомеостаза у людей без сопутствующей патологии, отмечено, что с возрастом отмечается снижение регенераторного потенциала кератиноцитов и пластичности эпителия СОР, уменьшение количества эффекторных иммуноцитов, количества функционирующих капилляров и снижение плотности МЦР в собственной пластинке СОР. Предложены дополнения к стандартному алгоритму обследования пациентов в клинике челюстно-лицевой хирургии, с морфологической картиной иммунного гомеостаза СОР с помощью фазово-контрастных микроскопических исследований. При выявлении отклонений цитологических показателей иммунного гомеостаза в сравнении с предложенной моделью, отражающей среднестатистические нормальные возрастные показатели пролиферативной активности кератиноцитов и соотношение эффекторных иммуноцитов, а также плотность МЦР в собственной пластинке слизистой рта, следует планировать тактику дальнейших мероприятий с предварительной иммуномодулирующей корректировкой метода лечения.

Ключевые слова: дентальная имплантация, иммунный гомеостаз, слизистая оболочка рта, репаративная регенерация, апоптоз, ангиогенез, кератиноциты.

PHENOTYPING THE ORAL MUCOSAL IMMUNOCYTES IN THE DENTAL IMPLANTATION DYNAMICS

Reva G.V.¹, Tolmachev V.E.¹, Kulakov A.A.², Kalinin I.O.¹, Krasnikov Yu. A.¹, Indyk M.V.¹, Kim A.R.¹, Voskanyan O.G.¹, Reva I.V.^{1,3}

¹FSAEA HE Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: RevaGal@yandex.ru;

²FSBA Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow;

³International Medical Research and Education Center, Niigata, e-mail: avers2@yandex.ru.

At the present stage, there are only single studies devoted to local factors of immune defense in the dynamics of dental implantation. We have studied biopsies sections of the oral mucosa (OM) on the background dental implantation, with using the classical and immunohistochemical methods of investigation with the further held analysis on the Olympus Bx52 microscope. As a result of morphological monitoring of the structures of the oral mucosa, a model reflecting changes in local immune homeostasis in people without concomitant pathology was presented in the control group of patients, it was noted that with age, the regenerative potential of keratinocytes and ductility of the COP epithelium decreased, the number of effector immunocytes, the number of functioning capillaries and a decrease in the density of the vascular bed in in its own plate from the lining of the mouth. Offered apps for the standard analysis of patients in the clinic of maxillofacial surgery, and diagnostics of the OM local immunity homeostasis state. If cytological signs of deviation in the indices of the homeostasis are found in comparison with the proposed model, reflecting the average statistic indices, as well as the density of the MCR in its own sheet of oral mucosa, further actions should be planned with a prior immunomodulatory correction of the method of treatment.

Keywords: dental implantation, immune homeostasis, oral mucosa, reactive regeneration, apoptosis, angiogenesis, keratinocytes.

В патогенезе осложнений дентальной имплантации важную роль играет реакция на

неё иммунной системы [1]. Имплантация вызывает состояние вторичного иммунодефицита, определяемое в первую очередь на организменном уровне [2]. T.J. Giusto, D.J. Conover (2015) проведены исследования, доказывающие генерализованные нарушения функции клеточного и гуморального иммунитета при имплантации [3; 4]. Активность иммунокомпетентных клеток определяет не только предупреждение развития гнойно-некротических изменений тканей, но и процессы эпителизации, ангиогенеза, образования интимных связей имплантата с окружающими тканями [5]. Эти клетки являются регуляторами процессов регенерации. При этом имеются только единичные исследования, посвященные местным факторам иммунной защиты [6-8]. Мониторинговые исследования по изучению сравнительной характеристики местного иммунного статуса при дентальной имплантации практически отсутствуют, а имеющиеся работы выполнены преимущественно в эксперименте на животных [9-11], что определило выбор направления наших исследований.

Цель настоящего исследования заключается в мониторинге изменений локального иммунного гомеостаза слизистой оболочки рта в динамике интеграции имплантатов после дентальной имплантации.

Материал и методы. Исследование проведено в период с 1991 по 2016 год с учётом положений Хельсинкской декларации (с информированного согласия пациентов или, в случае недееспособности, опекунов (2000)), с позволения этического комитета ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет». Все пациенты осмотрены в соответствии с протоколами заполнения медицинских карт стоматологических больных формы № 043/у. По результатам клинического осмотра при необходимости по клиническим показаниям производили забор материала СОР у мужчин, распределённых с учётом возрастных групп, принятых ВОЗ от 16.01.2016. Анализ материала больных проведён с учётом возрастной динамики и длительности сопутствующего заболевания в анамнезе. В обследовании участвовали 123 мужчины в возрастных группах от 20 до 85 лет, имеющие локальные и генерализованные дефекты зубных рядов на фоне атрофии челюстей, с экстирпацией зубов, или потерявших зубы после травм челюстно-лицевой области. В контрольную группу были включены пациенты с частичной адентией без атрофии челюстей после травм (табл. 1).

Таблица 1

Распределение пациентов с патологией

Группа контроля	Молодой возраст	Средний возраст	Пожилой возраст	Старческий возраст	Долголетие
20-44 лет	18-44 года	45-59 лет	60-74 лет	75-90 лет	Старше 90 лет
11	23	45	28	14	1
Итого:	122				

В качестве контроля исследована СОР мужчин без сопутствующей патологии, утративших в результате травмы один или несколько зубов сразу после травмы, или в период проведения имплантации, так как у женщин показатели СОР имеют зависимость от циркадных ритмов [12].

Всем больным по клиническим показаниям были проведены одно и двухэтапные операции дентальной имплантации. Нами были использованы системы различных имплантатов, которые имеют регистрацию в РФ (Astra Tech, Nobel Bio Care, Vego Semados, Conmet, Alfa Bio, OnewayBiomed), с соблюдением хирургических протоколов операций, утвержденных производителем. Имплантаты применяли для классической двухэтапной и одноэтапной методики имплантации. На современном этапе согласно рекомендациям ВОЗ применяли преимущественно винтовые имплантаты. Морфологические исследования проводили непосредственно после удаления зубов или их корней, имплантации и микрохирургических пародонтологических операций, до и после установки имплантатов способом иссечения фрагментов слизистой оболочки, покрывающей десну объемом 0,5-1 мм³. Забор материала производился во время хирургической или в ранние сроки после травматической экстирпации зубов, при установке имплантатов и формирователей десны, всего изучено 362 среза. Также материал забирали во время подготовки пациента к установке имплантатов (при коррекции атрофии челюстей) и в случае отторжения имплантатов (4 случая за период с 2011 по 2015 г.) для получения полной характеристики взаимодействия эффекторных иммунцитов в слизистой оболочке рта.

Анализ биопсий проведён с использованием рутинных методик (классического окрашивания гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, Victoria blue, по Браше и толуидиновым синим), а также фазовоконтрастной микроскопии. Основными методами морфологических исследований явились иммуногистохимические, с фенотипированием иммунцитов на основе кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) - Т-лимфоцитов CD4/8, CD34, клеток Лангерганса CD68, интерстициальных макрофагов CD163, тучных клеток CD203a. Интенсивность пролиферативной активности в эпителиальной пластинке оценивалась по индексу митотических ядер с помощью выявления локализации маркера Ki-67 и подсчётом количества митозов на 100 клеток. Апоптоз изучен Tunel методом для световой микроскопии, а для изучения апоптических процессов при подготовке рта и при имплантации получена характеристика локализации p53. Также исследован ассоциированный с проапоптическими факторами маркер ранней клеточной дифференцировки p63. Для статистической обработки результатов использовали специальный пакет прилагаемых компьютерных программ к микроскопу фирмы Olympus Vx52.

Результаты и обсуждение

Мониторинг состояния локального иммунного гомеостаза и пролиферации у пациентов на фоне дентальной имплантации позволил установить, что у пациентов старших возрастных групп наблюдаются изменения характера ороговения: с одной стороны, развивался гиперкератоз, носивший, как правило, защитный характер, с другой - появлялись признаки атрофии и уменьшение рогового слоя в области жевательной поверхности десны и со стороны преддверия рта. Как и в исследованиях Woo S.B., Lin D. [13], наблюдалось нарушение гистоархитектоники слизистой оболочки при гиперкератозе у пациентов старших возрастных групп, что свидетельствовало о нарушениях процессов дифференцировки, а при развитии атрофии – процесса десквамации эпителия. При этом уменьшается пролиферативная активность кератиноцитов, уменьшается плотность микроциркуляторного русла в собственной пластинке слизистой оболочки (рис. 1).

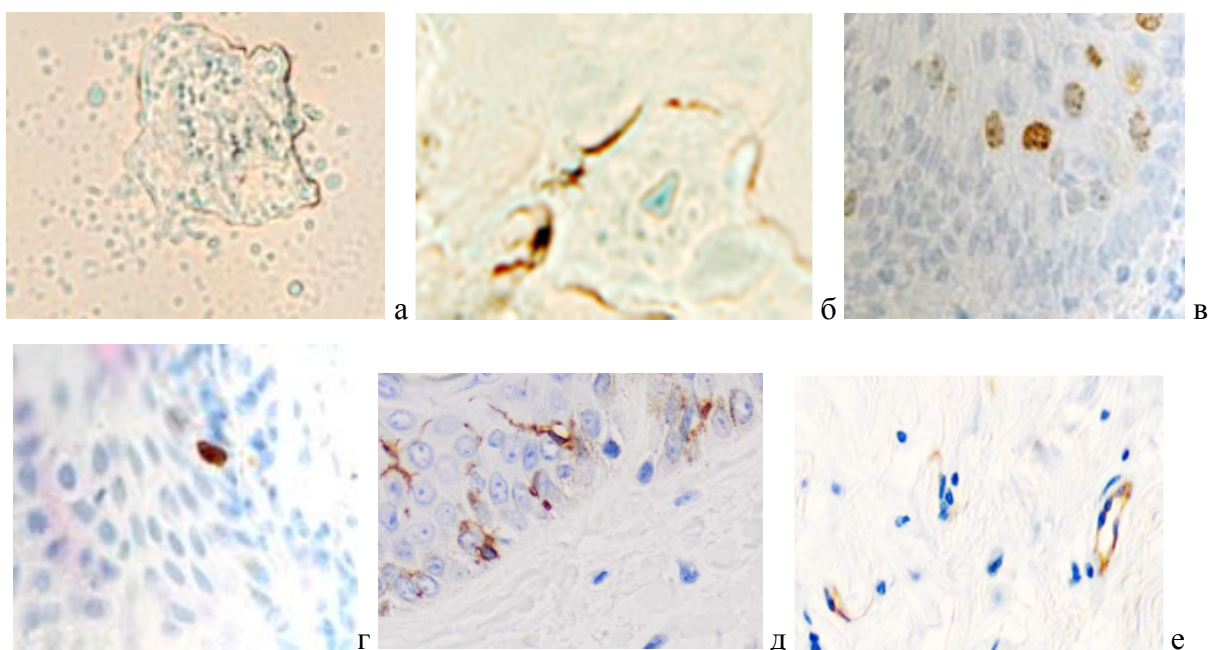


Рис. 1. Слизистая оболочка десны человека: а - безъядерные эпителиоциты у пациентов до 40 лет; б - эпителиоциты у пациентов старше 40 лет; в, г - выявление локализации Ki67; д - CD68, е - CD34. Микрофото, ув. 200

Безъядерные эпителиальные клетки, идентифицирующиеся в группах до 40 лет, свидетельствуют о нормальных процессах дифференцировки, кератинизации и слущивания. В возрастной группе старше 40 лет увеличивается количество эпителиоцитов, находящихся в состоянии паракератоза, в то время как регенераторный потенциал лучше выражен в группе до 40 лет. Он снижается с возрастом, о чём свидетельствует наличие единичных пролиферирующих клеток в базальном слое эпителия в группах у пациентов старше 40 лет. Антигенпрезентирующие клетки идентифицируются в камбиальных слоях эпителия –

базальном и шиповатом, что говорит о высоких барьерных свойствах эпителия. Локализация CD34 показала наличие кровеносных капилляров, максимальное количество которых в поле зрения достигало трёх. Вокруг сосудов отсутствовала инфильтрация лейкоцитов.

Апоптозирующие клетки идентифицируются исключительно в поверхностных слоях, в то время как проапоптотические факторы локализуются в шиповатом слое, что свидетельствует о репрессии в геноме локусов, отвечающих за пролиферацию. Макрофаги CD68 выявляются как в эпителиальном слое, преимущественно в базальном слое, так и в прилежащей к эпителию собственной пластинке соединительной ткани (рис. 2).

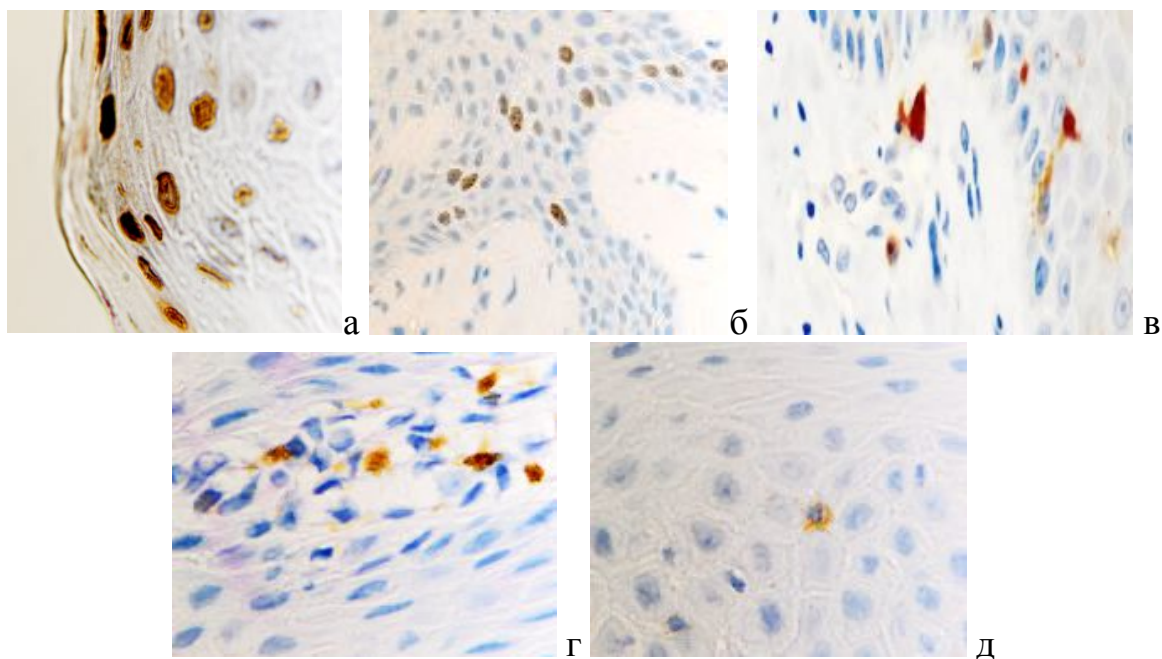


Рис. 2. Слизистая оболочка рта: а - *Tunel*-позитивные клетки, б - *p53*; в - *CD163*, г - *CD4*, д - *CD8*. Микрофото, ув. 200

Соотношение идентифицирующихся эффекторных иммунцитов CD4 и CD8 (3:1) показало, что локальный иммунный гомеостаз соответствует показателям у здоровых лиц, принятым, по данным большинства исследователей, в качестве возрастной нормы. Расположение специфических Т-супрессоров, способных подавлять иммунный ответ вне зависимости от антигена, в шиповатых слоях эпителия соответствует одной из их главных функций – регуляции клеточной пролиферации.

По анализу результатов морфологического исследования биоптатов слизистой оболочки рта у больных контрольной группы была составлена модель, отражающая нормальное состояние локального иммунного гомеостаза у пациентов без сопутствующей патологии (табл. 2).

Таблица 2

Исходные показатели иммунного гомеостаза слизистой оболочки рта в возрастном аспекте

без сопутствующей патологии при обращении и в начале лечения

Возраст, лет	Кол-во клеток в поле зрения (M±m)					МИ
	CD163 ⁺	CD4 ⁺ /8 ⁺	CD68 ⁺	CD203a ⁺	CD34	
18-34	1,59±0,45	1,51±0,12	1,09±0,22	1,37±0,11	1,13±0,07	5,47±0,21
35-59	1,39±0,12	1,50±0,14	1,47±0,08	1,34±0,11	1,41±0,10	9,95±0,51
59-74	1,31±0,07	1,31±0,12	0,81±0,05	1,56±0,14	0,91±0,07	3,57±0,23
75-90	1,15±0,09	1,26±0,05	0,75±0,03	1,42±0,06	0,76±0,03	2,89±0,17
Более 90 лет	0,71±0,03	0,92±0,07	0,65±0,02	0,96±0,06	0,55±0,03	2,61±0,15

* Различия данных в возрастных группах являются статистически значимыми ($p < 0,01$).

Примечание. Приведены исходные данные в момент обращения (над чертой) и в начале лечения (под чертой).

Данные таблицы для лучшей наглядности отражены в диаграммах для сравнения количественных показателей с единицей площади (рис. 3, 4). Указана динамика количественных и качественных изменений слизистой оболочки, отражающая мониторинг иммуноцитов и пролиферативной активности в возрастном аспекте.

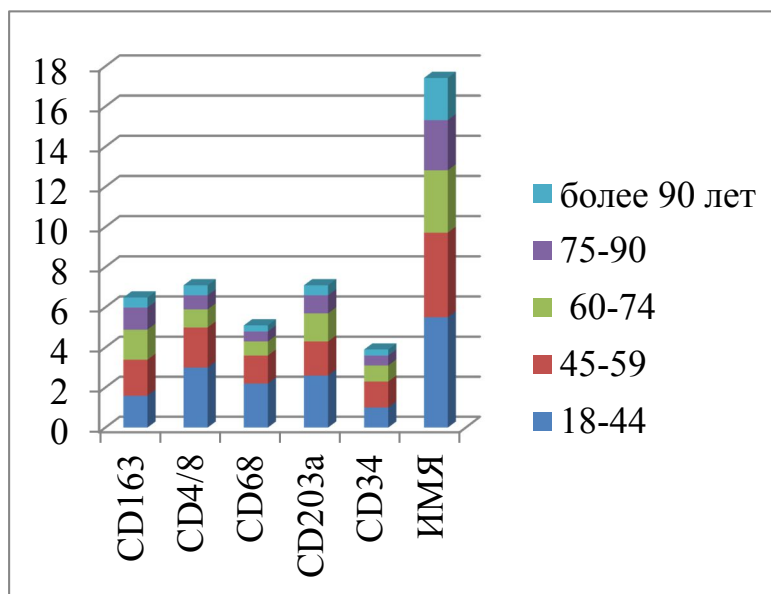


Рис. 3. Показатели иммунного гомеостаза (ИГ) слизистой оболочки рта. Различия данных в возрастных группах являются статистически значимыми ($p < 0,01$)

Как и в работах других авторов, морфологический анализ при исследовании слизистой оболочки рта показал, что у пациентов без сопутствующей соматической, онкологической, эндокринной и стоматологической патологии, в условиях сохраненных зубных рядов, пласт эпителиоцитов представлен 24–27 слоями клеток, базальная мембрана

эпителия СОР волнистая, что согласуется с данными Bodineau A., Folliguet M., Séguier S. (2009) [14]. Соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки однородная, представлена плотно скомпонованными коллагеновыми волокнами с незначительным количеством мелких капилляров и редко идентифицирующимися макрофагами и Т-лимфоцитами. В базальных и поверхностных пластах эпителия контакты между клетками плотные, не идентифицируются межклеточные щели. Микроциркуляторное русло (МЦР) представлено немногочисленными капиллярами, выстланными плоским эндотелием, с отсутствующей перикапиллярной инфильтрацией лейкоцитами. Динамика регенераторного потенциала структур слизистой оболочки в возрастном аспекте представлена на рис. 4.

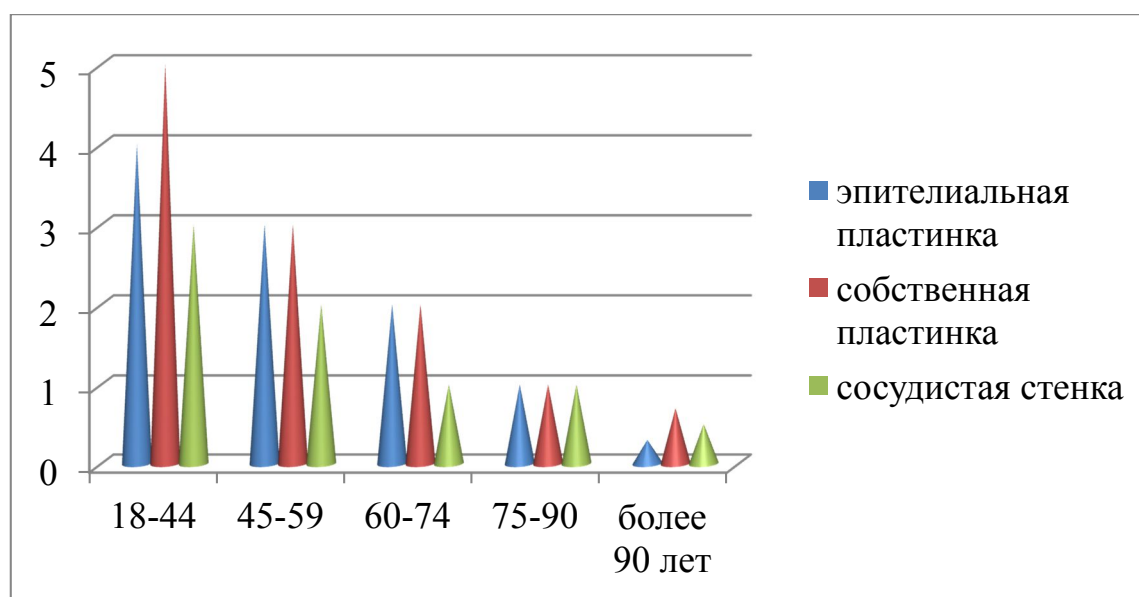


Рис. 4. Динамика регенераторного потенциала структур слизистой оболочки в возрастном аспекте. Различия данных в возрастных группах являются статистически значимыми ($p < 0,01$)

Заключение. В целом в наших наблюдениях, как и у других авторов [15; 16], у пациентов с возрастом отмечается снижение регенераторного потенциала кератиноцитов, уменьшение количества эффекторных иммунцитов, что свидетельствует об общей тенденции к снижению барьерных свойств эпителиальной пластинки слизистой оболочки рта. Уменьшение количества функционирующих капилляров и снижение плотности МЦР у пожилых и долгожителей является причиной снижения трофического обеспечения тканей пародонта, что ведёт к атрофии костной ткани челюстей [17].

Анализ полученных данных позволил составить дополнения к принятому в челюстно-лицевой хирургии алгоритму клинической диагностики и обследования пациентов. Так, стандартное обследование было дополнено диагностическими мероприятиями для выявления состояния иммунного гомеостаза слизистой оболочки на основе исследования

биоптатов слизистой оболочки рта с предварительным применением метода фазово-контрастной микроскопии. При выявлении количественных морфологических признаков изменений показателей иммунного гомеостаза в сравнении с предложенной моделью, отражающей среднестатистические нормальные возрастные показатели пролиферативной активности кератиноцитов и соотношение эффекторных иммуноцитов, а также плотность МЦР в собственной пластинке слизистой рта, следует планировать тактику дальнейших мероприятий с предварительной иммуномодулирующей корректировкой метода лечения.

Работа выполнена при поддержке научного фонда ДВФУ, в рамках государственных заданий 2014/36 от 03.02.2014 г., 17.5740/2017/6.7 и Международного гранта ДВФУ (соглашение № 13-09-0602-м от 6 ноября 2013 г.).

Список литературы

1. Small I.A., Chalmers J. Lyons memorial lecture: Metal implants and the mandibular staple bone plate // J. Oral. Surg. 1975. Aug; 33 (8): 571-585.
2. Buchanan R.M., Mertins S., Wilson H.L. Oral antigen exposure in extreme early life in lambs influences the magnitude of the immune response which can be generated in later life // BMC Vet. Res. 2013. Aug. 12; 9: 160. DOI: 10.1186/1746-6148-9-160.
3. Giusto T.J., Conover D.J. Extractions, immediate implant placement and ridge preservation utilizing alloplastic bone graft material. Report of a case // J. N. J. Dent. Assoc. 2012. Winter; 83 (1): 24-25.
4. Giusto T.J., Iacono V.J. Staged approach for treatment of a severe ridge defect with implant placement. A case report // J. N. J. Dent. Assoc. 1999. Spring; 70 (2): 38-39, 58-59.
5. Yue C., Zhao B., Ren Y. et al. The implant infection paradox: why do some succeed when others fail? Opinion and discussion paper // Eur. Cell. Mater. 2015. Jun 5; 29:303-310; discussion 310-313.
6. Preshaw P.M., Henne K., Taylor J.J. et al. Age-related changes in immune function (immune senescence) in caries and periodontal diseases: a systematic review // J. Clin. Periodontol. 2017. Mar; 44 Suppl 18: S153-S177. DOI: 10.1111/jcpe.12675.
7. Villa A., Gohel A. Oral potentially malignant disorders in a large dental population // J. Appl. Oral. Sci. 2014. Nov-Dec; 22 (6): 473-476. DOI: 10.1590/1678-775720140254.
8. Wood L.F., Chahroudi A., Chen H.L. et al. The oral mucosa immune environment and oral transmission of HIV/SIV // Immunol. Rev. 2013. Jul; 254 (1): 34-53. DOI: 10.1111/imr.12078.
9. Lerman M.A., Li C.C., Woo S.B. Dendritic cell neurofibroma with pseudorosettes: a

clinicopathologic and immunohistochemical study of 5 intraoral cases // Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. 2014. Feb; 117 (2): 221-226. DOI: 10.1016/j.oooo.2013.10.009.

10. Pasternak J.A., Ng S.H., Wilson H.L. A single, low dose oral antigen exposure in newborn piglets primes mucosal immunity if administered with CpG oligodeoxynucleotides and polyphosphazene adjuvants // Vet. Immunol. Immunopathol. 2014. Oct 15; 161 (3-4): 211-221. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.08.006.

11. Pasternak J.A., Ng S.H., Buchanan R.M. et al. Oral antigen exposure in newborn piglets circumvents induction of oral tolerance in response to intraperitoneal vaccination in later life // BMC Vet. Res. 2015. Mar 7; 11: 50. DOI: 10.1186/s12917-015-0350-8.

12. Rahman S., Rabbani R., Wachihi C. et al. Mucosal serpin A1 and A3 levels in HIV highly exposed sero-negative women are affected by the menstrual cycle and hormonal contraceptives but are independent of epidemiological confounders // Am. J. Reprod. Immunol. 2013. Jan; 69 (1): 64-72. DOI: 10.1111/aji.12014.

13. Woo S.B., Lin D. Morsicatio mucosae oris--a chronic oral frictional keratosis, not a leukoplakia // J Oral Maxillofac Surg. 2009. Jan; 67 (1): 140-146. DOI: 10.1016/j.joms.2008.08.040.

14. Mertins S., Mutwiri G.K., Gerds V., Wilson H.L. Oral antigen exposure in newborn piglets circumvents induction of oral tolerance in response to intraperitoneal vaccination in later life // BMC Vet. Res. 2015. Mar 7; 11: 50. DOI: 10.1186/s12917-015-0350-8.

15. Engeland C.G., Hugo F.N., Hilgert J.B. et al. Psychological distress and salivary secretory immunity // Brain Behav. Immun. 2016. Feb; 52: 11-17. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.08.017.

16. Bodineau A., Folliguet M., Séguier S. Tissular senescence and modifications of oral ecosystem in the elderly: risk factors for mucosalpathologies // Curr. Aging.Sci. 2009. Jul; 2 (2): 109-120.

17. Первов Ю.Ю. Иммунный гомеостаз слизистой оболочки полости рта и его значение для выбора и конструирования зубных протезов: автореф. дис. ... докт. мед. наук. - Казань, 2013. - 40 с.