

© Н.І. Жеро¹, В.С. Усенко, 2013

УДК 616.314.17-008.1-091.8:577.175.1

Н.І. ЖЕРО¹, В.С. УСЕНКО²

¹Ужгородський національний університет, стоматологічний факультет, кафедра стоматології післядипломної освіти, Ужгород; ²Морфологічна лабораторія БІОНТЕК, Дніпропетровськ

ЕКСПРЕСІЯ ЦИТОКЕРАТИНУ 18 ЯК МАРКЕР КІСТОУТВОРЕННЯ У ВЕРХІВКОВОМУ ПЕРІОДОНТІ

Проведено імуногістохімічне дослідження зубів, видалених із приводу деструктивних форм верхівкового періодонтиту в 34 хворих. За морфологічними характеристиками періапикальні утворення охарактеризовані як гранульоми – 27, кістогранульоми – 3 та кісти – 4. Вивчена наявність та локалізація позитивної реакції на маркер простого епітелію – цитокератин 18. Показані переваги методу над стандартним патогістологічним дослідженням. Імуногістохімічне виявлення певних маркерів дозволяє виявляти на початкових стадіях і достовірно прогнозувати кістозну трансформацію періапикальних утворень.

Ключові слова: верхівковий періодонт, радикулярна кіста, гранульома, кістогранульома, цитокератин 18, імуногістохімічне дослідження

Вступ. Діагностика патологічних процесів у верхівковому періодонті має певні особливості. Помилковий диференційно-діагностичний висновок (абсцес, гранульома, кістогранульома, радикулярна кіста, доброякісна або злоякісна пухлина) призводить до хибної лікувальної тактики, зокрема, звуження або невинновданого розширення показань до хірургічного втручання, що може мати важкі наслідки. Зокрема, наявність кісти або кістогранульоми вимагає активної лікувальної тактики (хірургічної, консервативно-хірургічної), водночас, при гранульомах консервативна тактика є адекватною.

Об'єктивну оцінку характеру патологічного процесу в клінічній практиці дає рентгенографія, але остаточним критерієм діагнозу є результат патогістологічного дослідження матеріалу, одержаного при хірургічному видаленні патологічного вогнища [12]. За морфологічною картиною характерне таке співвідношення: кісти – 25,9%, гранульоми – 53,7% уражень, кістогранульоми – 16,7% [10]. Певні труднощі існують також у морфологічній діагностиці періапикальних уражень. Наявність епітеліального шару у кістозній порожнині, яку можна визначити макро- або мікроскопічно при стандартних гістологічних фарбуваннях не викликає сумніву. З іншого боку, присутність окремих епітеліальних елементів у гранульомах рутинними методами практично не діагностується, важливий чинник прогнозу захворювання (загроза рецидиву) залишається поза увагою як патоморфолога, так і клініциста-стоматолога.

Сучасні методи імуногістохімічного дослідження дозволяють, використовуючи панель тканеспецифічних маркерів, виявити навіть поодинокі епітеліальні клітини. Маркерами для ідентифікації епітеліальних елементів є цитокератини (СК) – група білків, що формують проміжні філаменти цитоскелету, яка репрезентова-

на цитокератинами 1, 4, 5, 8, 10, 11, 14, 18, 19 та ін. Молекулярна маса цитокератину 18 (СК 18) становить 45 кД [11]. В нормі СК 18 експресується у більшості епітеліальних тканин, в тому числі, в тканинах щелепно-лицевої ділянки [3]. Однак в пухлинах епітеліального походження та у вторинних (метастатичних) проліфератах також стійко зберігається експресія СК 18 [6]. Особливо цікавим є той факт, що деструкція СК 18 є маркером апоптозу – програмованої клітинної смерті і виникає під впливом різноманітних фізичних і хімічних факторів. Морфологічною ознакою деградації цитоскелету при апоптозі є поява гранулярних структур, що корелює з підвищенням активності протеолітичних ферментів – каспаз 3, 6 і 7 та появою продуктів деградації СК 18 молекулярною масою 19, 22 і 26 кД. [4].

Дані про експресію білків цитоскелету – цитокератинів – у кістозних утвореннях щелепно-лицевої ділянки обговорювались в публікаціях D.P. Lu et al. [5,7]. Експресія цитокератинів в епітеліальній вистилці максиллярних (неодонтогенних) кіст досліджена імуногістохімічним методом, а також за наявності відповідної інформаційної РНК методом *in situ* гібридації та полімеразної ланцюгової реакції із зворотньою транскриптазою (RT-PCR). Виявлено зменшення експресії СК 18 як прояв плоскоклітинної метоплазії циліндричного епітелію дихального типу при кістозній трансформації. При цьому збільшується експресія СК 13, характерного для плоскоклітинного епітелію. Одонтогенні кератокісти мають тенденцію до кератинізації епітеліального шару, що обумовлює погіршення клінічного прогнозу захворювання з високою схильністю до рецидивування [8]. При імуногістохімічному та гістохімічному дослідженні виявлена експресія низькомолекулярних цитокератинів 10 та 11, зменшення рівня яких збігалось із втратою мор-

фологічних ознак кератинізації епітеліального шару та зменшення кістозних порожнин у результаті відповідних лікувальних заходів (декомпресія та довготривала ірригація порожнин) [9].

Дискусійним є питання про гістогенетичне походження епітеліального шару капсули кістозних утворень щелепно-лицевої ділянки. Епітеліальне вистелення фолікулярних кіст походить з редукованого емалевого епітелію зубного фолікула, звичайно, після формування коронки зуба. Навпаки, одонтогенні кератокісти походять з зубної пластинки або первинного (премордіального) одонтогенного епітелію і, відповідно, часто діагностуються в зонах агенезу зубів. Генез кістозних утворень, локалізованих у верхівковому періодонті, інший. В літературі дискутується питання про роль епітеліального компоненту періодонту (епітеліальних острівців Малассе) в нормі та при різних патологічних станах. Продовжується обговорення питання про доцільність використання сучасних імуногістохімічних методик для диференціації епітеліальних елементів у перірадікулярних утвореннях в якості прогностичного фактора.

Мета дослідження. З'ясувати наявність та вивчити локалізацію цитокератину 18 у періапикальних утвореннях і елементах періодонтальної зв'язки, морфологічно ідентифікувати структури, які його вміщують. Оцінити можливість використання визначення цитокератину 18 в клінічній практиці як маркера кістозної трансформації періапикальних утворень та несприятливого клінічного прогнозу.

Матеріали та методи. Нами досліджені 34 видалені зуби із перірадікулярними утвореннями (гранульоми – 27, кістогранульоми – 3, радікулярні кісти – 4). За рентгенологічними даними 30 утворень на доопераційному етапі діагностовані як гранульоми, 4 – як кісти. Матеріал фіксували упродовж 24 годин у рідині Буена при кімнатній температурі. Декальцинування проводили з використанням насиченого розчину пікринової кислоти [2]. Декальцинування проводили упродовж трьох тижнів, розчин замінювали кожні 3 дні. Зразки промивали 1 добу 70⁰ етиловим спиртом, Панель спиртів для зневоднення зразка включала 80⁰, 90⁰, 96⁰ і абсолютний спирт. Спирт видаляли за допомогою метилбензоата, насичення парафіном проводили при температурі 57⁰ у термостаті протягом 48 годин. Виготовляли парафінові зрізи товщиною 5 мкм на ротаційному мікротомі (Autocut, Reichert-Jung, Germany) із використанням одноразових ножів (Blade disp microtome 60/РК, Japan). Зрізи тканини приклеювали на предметне скло, вкрите хроматожелатином, висушували зрізи при температурі 37⁰

протягом 72 годин. Після депарафінування у двох змінах ксилолу і наступного відмивання в спиртах зрізи фарбували гематоксиліном та еозіном. Імуногістохімічне виявлення антигенів проводили відповідно до стандартних протоколів [1]. Використовували мишачі моноклональні антитіла до цитокератину 18 (Sigma, USA), у розведенні 1:12000. Як другий шар, використовували антимишачі антитіла до повної молекули імуноглобулінів (Sigma, USA) у розведенні 1:400 та авідин-біотинову систему Vectastain ABC Kit (Vector Lab., USA) із пероксидазною міткою. Пероксидазу виявляли за допомогою субстрату, який містив тетрагідрохлорид 3,3-діамінобензидину (ДАБ) (Sigma, USA). Фарбовані зрізи просвітлювали в спиртах, ксилолі і заключали в канадський бальзам. Висушували препарати не менше 2 тижнів при температурі 37⁰. Дослідження препаратів проводили на мікроскопі AXIOPLAN (Zeiss, Germany), оснащену системою аналізу зображення з програмним забезпеченням ImagePro Plus. Враховували наявність та розподіл позитивного фарбування в структурах досліджуваного матеріалу, а також його інтенсивність. Для патогістологічного дослідження препарати фарбували гематоксиліном і еозіном.

Результати досліджень та їх обговорення. При імуногістохімічному дослідженні СК 18 виявлений лише в 7 випадках із 34. При патогістологічному дослідженні операційного матеріалу зроблено висновок про наявність трьох кістогранульом. У серійних зрізах, пофарбованих гематоксиліном та еозіном, виявлені окремі епітеліальні структури. Відзначено повний збіг ділянок експресії СК 18 та локалізації епітеліальних елементів у мікрокістозних структурах кістогранульом (рис. 1А, В). СК 18 містився в цитоплазмі епітеліальних клітин у вигляді різного за інтенсивністю забарвлення коричневого кольору, контуруючи поверхневий шар призматичного епітелію. У базальному шарі епітеліоцитів вміст СК 18 був низьким або імуногістохімічна реакція була негативною. У поверхневих шарах епітелію СК 18 розміщувався, переважно, на периферії клітин та в апікальній зоні. Інших структур, пофарбованих на СК 18, у дослідженому матеріалі періапикальних утворень не виявлено. У багатошаровому незроговілому пласкому епітелії ясенної борозни СК 18 не виявлений (рис. 1 С, D). Високий рівень експресії СК 18 виявлений у епітелії на внутрішній поверхні кістозних утворень (рис. 2 А, В). Поодинокі епітеліальні елементи, які виявлені також в операційному матеріалі видалених зубів серед сполучної тканини та волокон періодонтальної зв'язки, не мали позитивної імуногістохімічної реакції на СК 18.

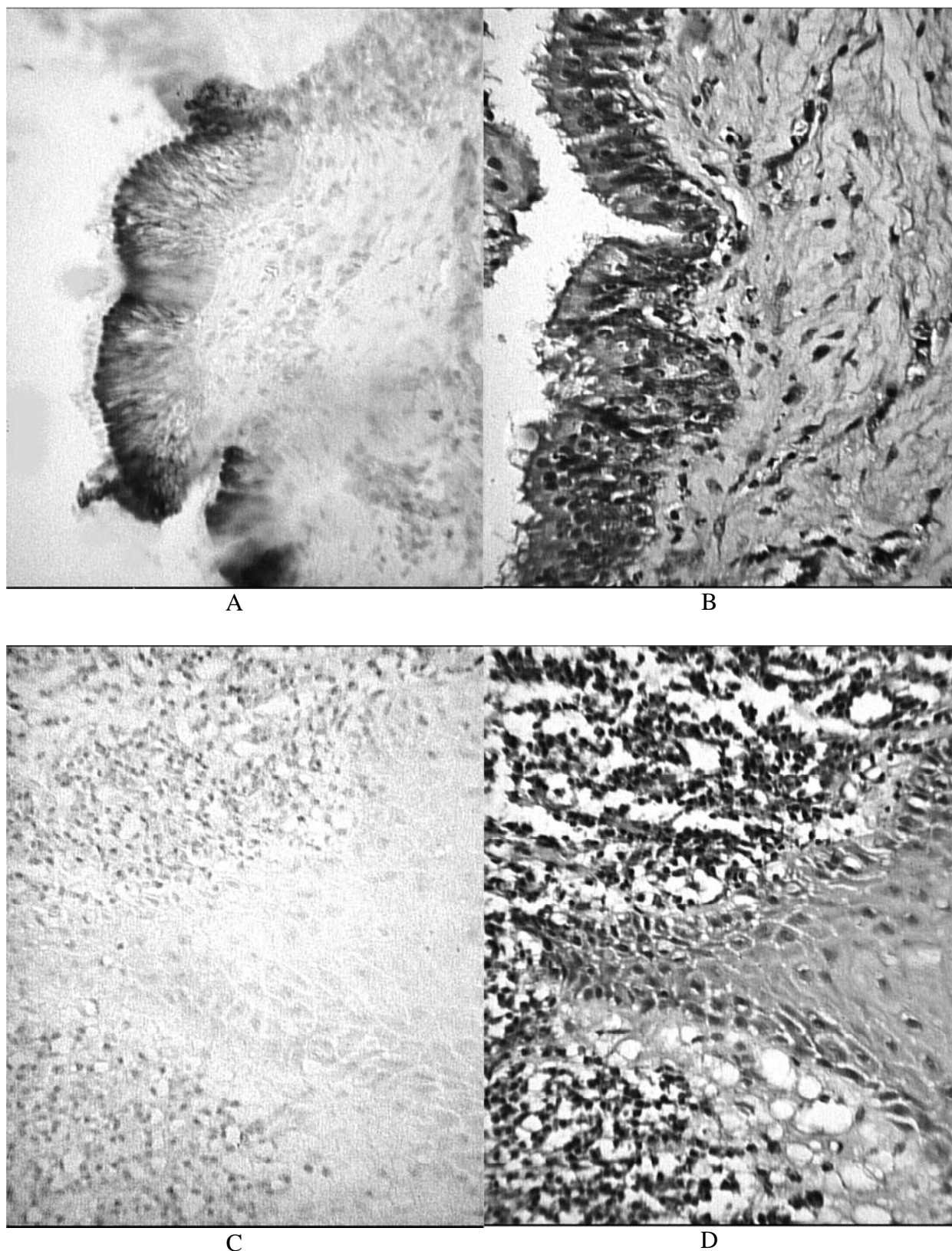


Рис. 1. Формування епітеліальної структури в кістогранульомі (А, В) та ділянка багат шарового плоского незроговілого епітелію ясенної борозни (С, D). Імуногістохімічне фарбування з використанням моноклональних антитіл до цитокератину 18, ядра клітин дофарбовані гематоксиліном Майєра (А, С). Гематоксилін-еозин (В, D). Збільшення: x100 (окуляр x2,5, об'єктив x40).

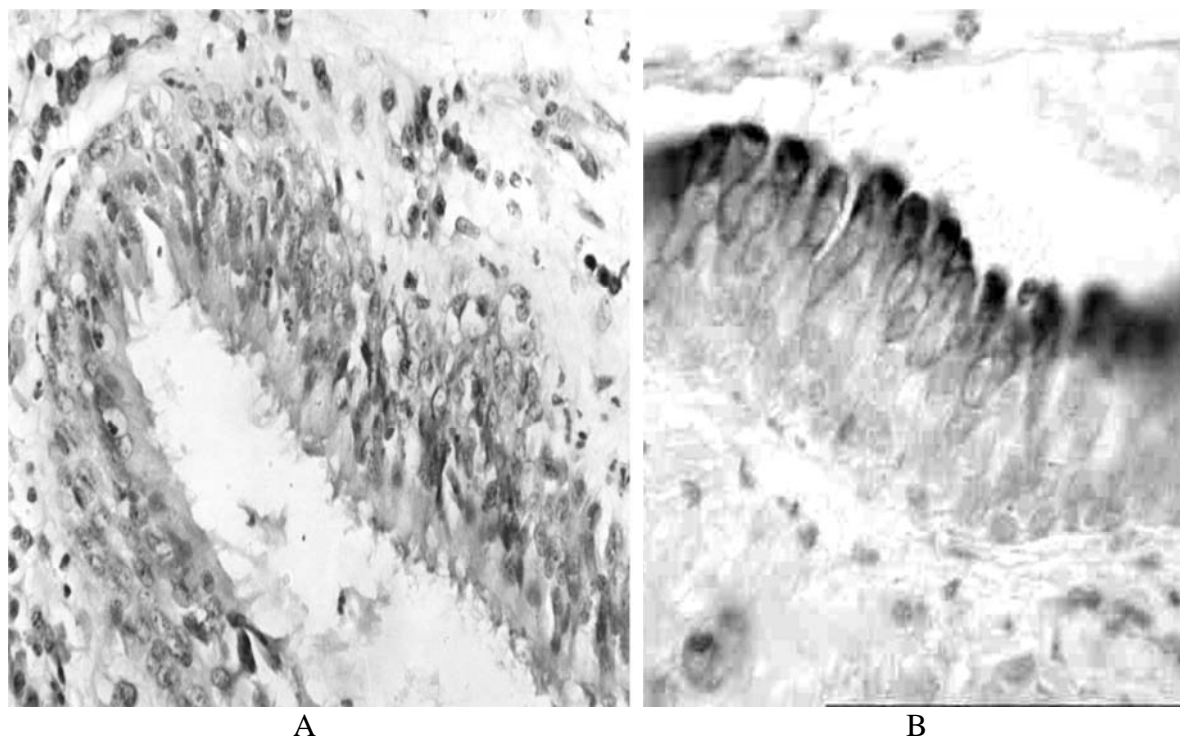


Рис. 2. Мікрофотографія зрізу тканини кісти. Гематоксилін-еозин. Збільшення: $\times 100$ (окуляр $\times 2,5$, об'єктив $\times 40$) (А). Епітелій кісти позитивно пофарбований на цитокератин 18. (В). Максимальне зафарбування виявлене в поверхневих шарах епітелію. Імуногістохімічне фарбування з використанням моноклональних антитіл до цитокератину 18. Дофарбування ядер гематоксиліном. Збільшення: $\times 250$ (окуляр $\times 2,5$, об'єктив $\times 100$, імерсія).

Висновки. Експресія білка цитоскелету – цитокератину 18 наявна виключно в епітелії кістозних елементів періапикальних утворень і відсутня в інших клітинних елементах верхівкового періодонту. Прояв експресії цитокератину 18 збігається зі зміною організації цитоскелету клітин і пов'язаний з активним перебігом процесів морфогенезу, зокрема, епітеліальної диференціації і кістоутворення.

Імуногістохімічне виявлення цитокератину 18 дозволяє зробити прогностичні висновки про пе-

ребіг патологічного процесу у верхівковому періодонті з акцентом на кістоутворення, збільшення зони деструкції та вірогідність рецидивування. На підставі наших даних можна запропонувати використання цитокератину 18 як маркера, за допомогою якого на гістологічному зрізі можна виявити епітеліальні елементи на початковому етапі утворення кістозних порожнин, кінцевим клінічним проявом якого є кістозна трансформація періапикальних гранульом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
2. Ромейс Б. Микроскопическая техника: Пер. с англ. — М.: Иностранная литература, 1953. — 718 с.
3. Brezillon S. Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non-cystic fibrosis patients / S. Brezillon, F. Dupuit, J. Hinrasky // *Lab. Invest.* — 1995. — Vol. 72, №2. — P. 191—200.
4. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts / W.R. Duan, D.S. Garner, S.D. Williams [et al.] // *J. Pathol.* — 2003. — Vol. 199, № 2. — P. 221—228.
5. Cytokeratin 18 and their gene expression in jaw odontogenic keratocyst epithelial lining / D.P. Lu, R.D. Xing, P. Shu [et al.] // *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* — 2007. — Vol. 25, № 2. — P. 106—110.
6. Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck / A.J. Balm, P.C. Hageman, M.H. van Doornwaard [et al.] // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* — 1996. — № 253. — P. 227—233.
7. Cytokeratin 18, 13 and their gene expression in post-operative maxillary cyst linings with metaplastic epithelium / D.P. Lu, R.D. Xing, Y. Tatamoto, T. Osaki // *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* — 2006. — Vol. 41, № 6. — P. 376—379.

8. Dedifferentiation of odontogenic keratocyst epithelium after cyst decompression / M. August, W.C. Faquin, M. Troulis, L.B. Kaban // *Oral Maxillofac. Surg.* — 2003. — Vol. 61, № 6. — P. 678—684.
9. Differentiation of odontogenic keratocysts from nonkeratinizing cysts by use of fine-needle aspiration biopsy and cytokeratin-10 staining / M. August, W.C. Faquin, M. Troulis, L.B. Kaban // *Oral Maxillofac. Surg.* — 2000. — Vol. 58, № 9. — P. 935—941.
10. Kizil Z. An evaluation of radiographic and histopathological findings in periapical lesions / Z. Kizil, K. Energin // *J Marmara Univ. Dent. Fac.* — 1990. — № 1. — P. 16—23.
11. Monoclonal antibody M3 used in tissue polypeptide-specific antigen assay for the quantification of tissue polypeptide antigen recognizes keratin 18 / J.M. Bonfrer, E.M. Groeneveld, C.M. Korse [et al.] // *Tumour Biol.* — 1994. — Vol. 15, № 4. — P. 210—222.
12. Radicular cyst associated with a primary molar following pulp therapy: a case report / M. Takiguchi, T. Fujiwara, S. Sobue, T. Ooshima // *International Journal of Paediatric Dentistry.* — 2001. — Vol. 11, № 6. — P. 452—455.

N.I. ZHERO¹, V.S. USENKO²

¹Uzhhorod National University, Faculty of Dentistry, *Department of Dentistry Postgraduate Education, Uzhhorod;*

²Morphology laboratory BIONTEK, *Dnepropetrovsk*

CYTOKERATIN 18 EXPRESSION AS THE MARKER OF THE CYST TRANSFORMING PROCESSES IN THE APICAL PERIODONT

Immunohistochemical study has been conducted of the teeth surgically removed from 34 patients due to the destructive forms of apical periodontitis. According to their morphological characteristics, 27 periapical lesions were described as granulomas, 3 as a cystogranulomas, and 4 as a radicular cysts. The presence and the distribution of the simple epithelial marker, cytokeratin 18, were investigated. The advantage of this method over the standard pathohistological evaluation was established. Immunohistochemical revealing of certain markers allows recognizing cyst transformation of the periapical lesions at the initial stages, and reliably prognosticating them.

Key words: apical periodontitis, radicular cyst, granuloma, cystogranuloma, cytokeratin 18, immunohistochemical study

Стаття надійшла до редакції: 5.11.2013