

Summary

NEOANGIOGENESIS PARAMETERS AND THEIR SIGNIFICANCE IN KERATINIZING SQUAMOUS CELL LUNG CANCER

Fileiko B.N., Royko N.V., Proskurnya S.A.

Key words: VEGF, CD34, correlation, prognosis, microcirculatory blood flow, vessel density.

One of the important medical and social problems nowadays in developed countries is the uncontrolled growth of the incidence of malignant neoplasms. The search for the novel approaches to the prevention, diagnosis, treatment and prognosis of the progress of neoplasia has been the topical issue of contemporary oncology and pathomorphology. An important stage in the development of a tumor is its ability to induce and maintain angiogenesis. The study of the biological characteristics of tumor angiogenesis may be of great significance not only for better understanding of the mechanism of the development of the primary tumor and metastases, but also for the treatment planning. This paper was aimed at studying the processes of neoangiogenesis in keratinizing squamous cell lung cancer and grounding its significance in morphogenesis and prognosis of the progression of the diseases. Our study shows that the vascular component of the stroma was characterized by an uneven number of them in different parts of the tumor. All cases of keratinizing squamous cell lung cancer are VEGF-positive with high or moderate expression of this protein. The comparison of the data of CD34 and VEGF expression has demonstrated a strong correlation between them. No reliable relation between the CD34 and VEGF expression and the age, tumor size, presence of the cavity has been detected; however, a strong correlation with metastasis has been found out. The investigations have revealed active angiogenesis in keratinizing squamous cell lung cancer. Correlation between metastasis, the stage of keratinizing squamous cell lung cancer and VEGF expression verifies its prognostic value, especially in combination with other criteria.

УДК 616.71-007.234-076:616.61-036

Черемісіна В.Ф.

**ІМУНОМОРФОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СПОЛУЧНОЇ
ТКАНИНИ ПАРОДОНТА У ЩУРІВ ПРИ ПАРОДОНТИТІ ТА ГІНГІВІТІ**

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

В роботі представлені результати вивчення імуноморфологічних та імуногістохімічних показників сполучної тканини пародонта у щурів при пародонтиті та гінгівіті. Ґрунтового дослідження місцевого імунітету безпосередньо у вогнищі пошкодження не проводилося. Така можливість з'явилась лише з впровадженням імуногістохімічних методів. Відомо, що в запально-репаративних реакціях приймають участь різні популяції клітин, і на різних етапах запалення регуляція розвитку подальших подій послідовно переходить від однієї до іншої популяції. Спочатку ініціюється посилення агрегації тромбоцитів, відбувається дегрануляція тромбоцитами речовин, серед яких є сполуки, що здійснюють прямий стимулюючий вплив на колагенсинтезуючі клітини, тромбоцитарний фактор росту, ендотеліальний фактор росту та ін. Як наслідок, при вираженому запальному процесі в сполучній тканині спостерігаються розлади імуноморфологічних та імуногістохімічних показників. Встановлено, що в місцевій клітинній імунній реакції пріоритетною є Т-клітинна реакція з переважанням цитотоксичних CD8+ Т-клітин як при пародонтиті, так і при гінгівіті. Концентрація CD8+ Т-лімфоцитів навколо кровоносних судин при гінгівіті та навколо дрібних слинних залоз при пародонтиті з лімфоцитопенією та лімфоцитозом свідчить про аутоімунну цитотоксичну агресію в патогенезі вивчених захворювань.

Ключові слова: імуногістохімія, пародонтит, гінгівіт, імунітет.

Стаття є самостійним фрагментом науково-дослідної теми «Клітинні та молекулярні механізми розвитку і корекції патологічних станів», № держ. реєстрації 0115U000966.

Вступ

Диференційна діагностика захворювань пародонту – одна із найбільш складних проблем в стоматологічній практиці, що обумовлено схожістю клінічних проявів різних нозологічних форм, часто не до кінця з'ясованим етіопатогенезом. Особливу увагу дослідників на сьогодні привертають питання резорбції сполучної тканини пародонту та механізми її відновлення. В останній час з впровадженням сучасних методів дослідження з'явилась можливість ревізії накопичених знань про захворювання тканин пародонту та їх розглядання з імунологічної та молекуляр-

ної позиції. Раніше імунологічні дослідження зводилися, в основному, до вивчення імунокомпетентних клітин та імуноглобулінів периферичної крові [1;6]. Ґрунтового дослідження місцевого імунітету безпосередньо у вогнищі пошкодження не проводилося. Така можливість з'явилась лише з впровадженням імуногістохімічних методів. Відомо, що в запально-репаративних реакціях приймають участь різні популяції клітин, і на різних етапах запалення регуляція розвитку подальших подій послідовно переходять від однієї до іншої популяції. Спочатку ініціюється посилення агрегації тромбоцитів, відбувається дегрануляція тромбоцитами речо-

вин, серед яких є сполуки, що здійснюють прямий стимулюючий вплив на колагенсинтезуючі клітини, тромбоцитарний фактор росту, ендотеліальний фактор росту та ін. Внаслідок, при вираженому запальному процесі в сполучній тканині спостерігаються розлади імунорфологічних та імунологічних показників [2].

В механізмах розвитку гінгівіту важливе значення відіграє стрес. Це пов'язано з ін'єкціями, їжею, екстракцією зубів та ін. В результаті в крові підвищується рівень глюкокортикоїдів. В зв'язку з цим зниження оксипроліну в сечі з гінгівітом може свідчити про уповільнення синтезу та розпаду сполучної тканини в цілому. Це обумовлено, скоріш за все, тим, що підвищення глюкокортикоїдів в крові пригнічує активність клітин, які синтезують колаген. В результаті адаптаційні резерви організму виявляються вичерпаними, і пошкодження починає проявлятися на системному рівні [2].

Мета дослідження

Встановлення деяких імуногістохімічних та морфологічних механізмів, а саме Т-лімфоцитів, сегментоядерних нейтрофілів, сегментоядерних лейкоцитів, гранулоцитів в патогенезі пародонтиту та гінгівіту.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведено на нелінійних лабораторних білих щурах-самцях масою 260,0±20,0, які були розподілені на 4 групи: 1 група – інтактний контроль для пародонтиту; 2 група – щури з пародонтитом; 3 група – інтактний контроль для гінгівіту; 4 група – тварини з гінгівітом. Пародонтит викликали за методом Пешкової Л. В. [5], гінгівіт моделювали за методом [4].

Біопсійний матеріал брали під місцевої анестезією 4 %-им розчином ультракаїну. Біоптат фіксували в 12 % нейтральному формаліні, заливали в парафін, зрізи товщиною 4-5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином, пікрофусцином за Ван-Гізон. Імуногістохімічним методом виявляли CD3+, CD4+, CD8+, CD43+ (Т-хелпери, ци-

тотоксичні Т-лімфоцити), CD20+ (В-лімфоцити), CD68+ (макрофаги).

Для підрахунку клітин використовували мікросітку Г. Г. Автандилова [1]. Визначали кількість CD3+, CD4+, CD8+, CD43+, CD20+, CD68+.

Експериментальні маніпуляції здійснювали у відповідності з принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986), «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та вимогами «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (2012) [3].

Статистичну обробку результатів дослідження проводили непараметричним методом за допомогою U-критерія Манна-Уїтні [2]. Достовірними вважали результати при p<0,05. А також здійснювали із застосуванням пакета статистичного аналізу «Statistica 8.0» з використанням параметричних та непараметричних методів аналізу [6].

Результати дослідження та їх обговорення

В результаті гістологічного дослідження виявлені припухлі колагенові волокна, набряк міжклітинної тканини, як при пародонтиті, так і при гінгівіті. В сполучній тканині між кровоносними судинами виражена лімфоцитарна та плазмоцитарна інфільтрація, місцями – келоїдні зміни. Імуногістохімічно в стромі зустрічаються як CD3+Т, так і CD20+В-лімфоцити та переважання CD8+Т-клітин. В сполучній тканині, в лімфоцитарних інфільтратах з вираженою перевагою в порівнянні із сегментоядерними лейкоцитами, представлені лімфоцити. Кількість гранулоцитів приблизно в 8-10 разів менше порівняно з лімфоцитами. Цікава особливість виявлена в динаміці кількісних показників лімфоцитів в залежності від захворювання: максимальна кількість CD4+ТН-лімфоцитів представлено при гінгівіті (90,2±3,31; 39,9±3,25), а при пародонтиті їх кількість скорочується майже вдвічі (50,3±2,11; 15,9±2,15) (табл 1).

Таблиця 1
Кількісні показники імунокомпетентних клітин при пародонтиті та гінгівіті (X±Sx)

CD-маркер	Гінгівіт		Пародонтит	
	Абсолютна кількість	%	Абсолютна кількість	%
CD3+ Т	105,5±0,03	46,78±3,28	140,0±0,01	44,48±2,79
CD4+ Т	90,2±3,71	40,01±3,25	50,3±2,11	15,91±2,05
CD8+ Т	20,0±2,71	8,81±1,89	110,0±3,11	34,97±2,68
CD20+ В	8,3±2,12	3,77±0,32	12,4±0,73	3,91±0,92
CD68+ В	2,0±0,05	0,9±0,31	3,0±0,001	0,98±0,27
Сегм.ядерн.лейк.	12,0±1,12	3,41±0,92	5,0±1,53	1,01±0,47

Стосовно CD8+Т-лімфоцитів, їх максимальна кількість відмічається також при гінгівіті, а при пародонтиті вона збільшується в 5 разів. Співвідношення CD4+ТН-лімфоцитів та CD8+ТС-лімфоцитами (ТН/ТС) ми одержали в наступному вигляді: при гінгівіті – 2,5/1 (20,0±2,71; 8,8±1,89 %), при пародонтиті – 1/3 (110,0±3,11; 34,9±2,68 %). Це свідчить про те, що при гінгівіті Т-хелпери переважають цитотоксичними лімфо-

цитами, а при пародонтиті, навпаки, різко переважають Т-цитотоксичні лімфоцити, тобто при більш вираженому клінічно захворюванні знижується хелперна функція Т-лімфоцитів і підвищується цитотоксичний ефект.

Цікаву картину представляють кількісні зміни лімфоцитів. Зокрема, CD4+ ТН-лімфоцитів мало, і вони складають 30,0±0,71 (11,0±1,89 %). Стосовно CD8+ Т-лімфоцитів, їх кількість в 5 ра-

зів вище і дорівнює $150,0 \pm 2,21$ ($55,0 \pm 3,11$ %). Таке співвідношення CD4+ ТН-лімфоцитів з CD8+ ТС-лімфоцитами (ТН/ТС) вказує на те, що при гінгівіті знижується хелперна функція Т-лімфоцитів та підвищується цитотоксичний ефект. Кількість CD20+ В-лімфоцитів при пародонтиті набагато менша порівняно з Т-лімфоцитами та складає $11,5 \pm 0,92$ ($4,2 \pm 0,61$ %). Це вказує на те, що значення CD20+ В-лімфоцитів в патогенезі захворювань другорядне та їх кількісні зміни, в основному, повинні бути обумовлені не стільки тяжкістю пошкодження, скільки ступенем інфікування та особливостями мікробного агента. Більш того, одержані результати свідчать ще про те, що в патогенезі пародонтиту ключовими є Т-лімфоцити та співвідношення між CD4+ ТН та CD8+ТС субпопуляціями. При гінгівіті, в залежності від стадії в морфогенезі, на передній план виступають васкулярні чи виразково-некротичні та запальні зміни, тобто явища периваскуліта. На це вказують і інші автори, які вивчають морфогенез цих захворювань [6].

Ще однією особливістю гінгівіту є те, що у лімфоцитів в клітинному інфільтраті представлені тільки CD3+, CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитами. Стосовно В-лімфоцитів, вони майже не зустрічаються. З такою ж частотою зустрічаються макрофаги.

Таким чином, при гінгівіті запальний інфільтрат має виражений Т-лімфоцитарний характер. Лімфоцити представлені великою кількістю у всіх трьох популяціях: CD3+, CD4+ та CD8+. Окрім імунітетів, у великій кількості зустрічалися і нейтрофільні лейкоцити.

Спираючись на вищезазначене, на основі гістологічного та імуногістохімічного вивчення тка-

нин пародонту при гінгівіті можна вважати, що характерними гістологічними та імуногістохімічними ознаками вказаної патології є переважна участь в запаленні Т-лімфоцитів та сегментоядерних нейтрофілів, а також Т-лімфоцитарний периваскуліт. В патогенезі захворювання ключовими є кількісні та якісні зміни Т-лімфоцитів і співвідношення між субпопуляціями CD4+ Т та CD8+ Т з переважанням цитотоксичних CD8+ Т-лімфоцитів. Концентрація цитотоксичних Т-лімфоцитів переважно навколо дрібних кровоносних судин вказує на те, що цитотоксична агресія, в першу чергу, направлена на клітини стінок кровоносних судин, запускаючи процес їх пошкодження.

Т-лімфоцитарному васкуліту не слід надавати однозначну етіологічну роль, оскільки Тс агресія проти судин може бути обумовлена пошкодженням кровоносних судин різної природи. Головним, вочевидь, є зміни генетичних та фенотипових особливостей клітин стінок кровоносних судин, що, в кінцевому результаті, стає причиною Т-лімфатичної цитотоксичної агресії по відношенню до кровоносних судин.

Гістологічне дослідження біопсійного матеріалу щурів при пародонтиті показало, що характерною морфологічною ознакою, яка відрізняє пародонтит від інших нозологій, є пошкодження слинних залоз. Гістологічно при цьому виявляються перигранулярні інфільтрати. Ці дані співпадають з дослідженнями інших експериментаторів [6].

Імуногістохімічні дослідження показали, що в лейкоцитарному інфільтраті при пародонтиті з явною перевагою представлені CD4+ та CD8+ Т-лімфоцити (табл. 2).

Таблиця 2

Показники кількості CD3+, CD4+, CD8+, CD20+ та сегментоядерних лейкоцитів при пародонтиті ($X \pm S_x$)

CD-маркер	Середня кількість	%
CD3+ Т	$8,0 \pm 0,01$	$29,7 \pm 2,76$
CD4+ Т	$30,0 \pm 0,71$	$11,0 \pm 1,89$
CD8+ Т	$150,0 \pm 2,21$	$55,0 \pm 3,11$
CD20+ В	$11,5 \pm 0,91$	$4,2 \pm 0,61$
Загальна кількість лімфоцитів	$230,9 \pm 0,51$	$45,6 \pm 2,21$
Сегментоядерні лейкоцити	$3,2 \pm 2,11$	$0,74 \pm 0,31$

Це вказує на те, що автоімунні процеси при пародонтиті направлені на слинні залози, переважно дрібні, що, в цілому, запускає патологічний процес.

Висновки

1. При пародонтиті та гінгівіті в місцевій клітинній імунній реакції пріоритетною є Т-клітинна реакція з переважанням цитотоксичних CD8+ Т-клітин.

2. Концентрація CD8+ Т-лімфоцитів навколо кровоносних судин при гінгівіті та навколо дрібних слинних залоз при пародонтиті з лімфоепітеліальними та лімфоендотеліальними пошкодженнями свідчить про автоімунну цитотоксичну агресію в патогенезі вивчених захворювань.

Перспективи подальших досліджень

Надалі планується більш детальне і глибоке вивчення імуноморфологічних та імуногістохімічних показників, а саме Т-лімфоцитів, та детальніше вивчення їх ролі у запальних процесах при пародонтиті.

Література

1. Павлов С. Б. Морфофункциональные изменения соединительной ткани у крыс с экспериментальной патологией панкреатодуоденальной области / С. Б. Павлов, А. В. Гончарова, О. Б. Литвинова [и др.] // Проблемы непрерывной медицинской освіти та науки. – 2011. – № 2. – С. 62–65.
2. Резніков О. Г. Біотична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації / О. Г. Резніков, А. І. Соловійов [та ін.] // Вісник фармакології та фармації. – 2006. – № 7. – С. 47–61.

3. Общие этические принципы экспериментов на животных / Материалы I Национального конгресса по биоэтике, 2001. – К.: НАНУ. – 16 с.
4. Патент 31011 Україна, МПК (2006) А61Р 31/00А 61К35/66А 61С7/00. Спосіб моделювання гінгівіту / Левицький А. П., Селиванська Т. О., Макаренко О. А. Заявник і патентовласник: Інститут стоматології АМН України. – Бюл. 6. – 3 с.
5. Пешкова Л. В. Спонтанное поражение тканей пародонта у крыс в условиях вивария, как модель пародонтита / Л. В. Пешкова // Вісник стоматології. – 1997. – № 2. – С. 163–168.
6. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
7. Николаева А.В. Влияние препаратов полифенолов с витаминно-минеральным комплексом на ткани пародонта и слизистую оболочку рта крыс молодого возраста / А.В. Николаева // Вісник стоматології. – 2015. - №2. - С.22-25.

Реферат

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПАРОДОНТА У КРЫС ПРИ ПАРОДОНТИТЕ И ГИНГИВИТЕ

Черемисина В. Ф.

Ключевые слова: иммуногистохимия, пародонтит, гингивит, иммунитет.

В работе представлены результаты изучения иммуноморфологических и иммуногистохимических показателей соединительной ткани пародонта у крыс при пародонтите и гингивите. Основательного исследования местного иммунитета непосредственно в очаге повреждения не проводилось. Такая возможность появилась только с использованием иммуногистохимических методов. Известно, что в воспалительно-репаративных реакциях принимают участие различные популяции клеток, и на разных этапах воспаления регуляция развития дальнейших событий последовательно переходят от одной к другой популяции. Сначала инициируется усиление агрегации тромбоцитов, происходит дегрануляция тромбоцитами веществ, среди которых соединения, которые оказывают прямое стимулирующее влияние на коллагенсинтезирующие клетки, тромбоцитарный фактор роста, эндотелиальный фактор роста и др. Вследствие этого при выраженном воспалительном процессе в соединительной ткани наблюдаются расстройства иммуноморфологических и иммуногистохимических показателей. Установлено, что в местной клеточной иммунной реакции приоритетной является Т-клеточная реакция с преобладанием цитотоксических CD8 + Т-клеток как при пародонтите, так и при гингивите. Концентрация CD8 + Т-лимфоцитов вокруг кровеносных сосудов при гингивите и вокруг мелких слюнных желез при пародонтите с лимфоэпителиальными и лимфоэндотелиальными повреждениями свидетельствует об аутоиммунной цитотоксической агрессии в патогенезе изученных заболеваний.

Summary

IMMUNOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL INDICATORS OF PERIODONTAL CONNECTIVE TISSUE IN RATS WITH PERIODONTITIS AND GINGIVITIS

Cheremisina V. F.

Key words: immunohistochemistry, periodontitis, gingivitis, immunity.

This article presents the results of the study of immunomorphological and immunohistochemical parameters of parodontal connective tissue in rats with periodontitis and gingivitis. A thorough investigation of local immunity was not conducted directly at the focus of the injury. Such an opportunity appeared only with the introduction of immunohistochemical methods. It is known that various population of cells participate in inflammatory-reparative reactions, and the various stages of the development of subsequent events in different phases of inflammation consistently passes from one to another population. Initially, an increase in platelet aggregation is initiated, following the platelet degranulation of substances, among which there are compounds that have a direct stimulating effect on collagen-synthesizing cells, platelet growth factor, endothelial growth factor, and others. As a result, with the expressed inflammatory process in the connective tissue, there are disorders of immunomorphological and immunohistological parameters. It has been assumed that in the local cellular immune response, the T-cell reaction with predominance of cytotoxic CD8 + T cells, both during periodontitis and with gingivitis, is a priority. Concentration of CD8 + T lymphocytes around blood vessels with gingivitis and around small salivary glands during periodontitis with lymphoepithelial and lymphoendothelial lesions indicates autoimmune cytotoxic aggression in the pathogenesis of disease research.