УДК 611.3.018.025:612.017

# РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В СИСТЕМЕ МЕСТНОГО ИММУНОФАГОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ПАРОДОНТА У ДЕТЕЙ

Рева Г.В., Русакова Е.Ю., Толмачёв В.Е., Первов Ю.Ю., Разумов П.В., Игнатенко К.А., Голенкова Н.А., Погорелый В.В., Игнатьев С.В., Денисенко Ю.В., Рева И.В.

ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет», Владивосток, e-mail: vgmu.ru

Изучена возрастная динамика тучных клеток в системе пародонта у детей. Проведён иммуногистохимический мониторинг тканевых базофилов при патологии пародонта и на фоне применения иммуномодулирующих препаратов. Установлено, что иммуномодулирующие препараты способствуют снижению количества активных тканевых базофилов и ускоряют процессы репаративной регенерации структур пародонта после удаления зубов. Сделан вывод об индуцирующем влиянии иммуномодуляторов на репаративные процессы в пародонте в условиях воспалительных процессов через механизмы снижения проницаемости основного вещества соединительной ткани и усиления синтетических процессов.

Ключевые слова: тучные клетки, иммуноциты, пародонт

# THE ROLE OF MAST CELLS IN THE SYSTEM OF THE LOCAL IMMUNE AND PHAGOCYTIC PART OF CHILDREN'S PERIODONTIUM

Reva G.V., Rusakova E.Y., Tolmachev V.E., Pervov Y.Y., Razumov P.V., Ignatenko K.A., Golenkova N.A., Pogoreliy V.V., Ignatiev S.V., Denicenko J.V., Reva I.V.

Vladivostok State Medical University, Vladivostok, e-mail: vgmu.ru

Must cells age dynamics of children's periodont was studied. Immuno- hystochemical monitoring of tissue basophylic leukocytes in the case of periodontium pathology and against the background of immunomodulatory drugs usage was held. It was determined that immunomodulatory drugs were able to promote the decrease of the active tissue basophylic leukocytes number and to accelerate reparative regeneration processes of periodontium structures after teeth removal. It was concluded that immunomodulatory drugs had inductive influence on periodontium reparative processes in the conditions of inflamation through the decrease of basal substance permeability and synthetic processes intensification.

### Keywords: labrocytes, immunocytes, periodontium

Многолетние наблюдения за больными с поражениями зубов, которые встречаются в детском возрасте, такими, как периодонтит, свидетельствуют о высокой актуальности исследований, ведущихся в направлении поисков ключевого морфологического субстрата, являющегося ведущим в развитии различных патологических процессов в полости рта [1, 9]. Одним из важнейших механизмов, обеспечивающих все этапы перестройки периодонта в онтогенезе человека, является гомеостаз в системе иммунофагоцитарного звена. Несмотря на многочисленность работ, посвящённых изучению тучных клеток в различных тканях и органах [2, 5, 12], их роль в патологии пародонта окончательно не выяснена, отсутствуют данные системных наблюдений тучных клеток в тканях пародонта в условиях физиологической и репаративной регенерации, алгоритм их количественных и качественных изменений на фоне применения иммуномодулирующих

Целью нашего исследования является совершенствование методов диагностики, лечения и профилактики стоматологиче-

ских заболеваний у детей. В связи с этим в работе решались следующие задачи:

- изучить структуру стоматологической заболеваемости у детей Приморского края;
- изучить роль тучных клеток в системе иммунофагоцитарного звена пародонта детей;
- провести анализ применения различных иммуномодулирующих лекарственных средств в лечении стоматологической патологии у детей;
- разработать алгоритм патогенетически обоснованного лечения и профилактики стоматологической патологии у детей с учётом иммунного гомеостаза пародонта в различных возрастных группах.

## Материалы и методы исследования

Клиническая характеристика материала

Обследованы 360 детей Приморского края, проживающих в сельской и городской местности. В комплекс исследования входили методы: эпидемиологический, статистический, лабораторный, анкетирование. Осмотры и лечебные мероприятия проводились в условиях школьных стоматологических и медицинских кабинетов с использованием стерильных наборов пародонтальных зондов и стоматологических зеркал. По клиническим показани-

ям удаление зубов проведено у 117 детей. Одновременно с экстирпацией производили забор биоптатов пародонта размерами 0,3×0,3 мм. В случаях с предшествующими экстирпации зубов воспалительными процессами в периодонте применяли иммуномодулирующий препарат имудон. Учитывали детей сельской местности и городской. Распределение детей также провели по возрастным группам, рекомендованным ВОЗ (2009).

С целью определения фенотипа иммунокомпетентных клеток методом иммунной гистохимии биоптаты фиксировали в 10%-у формалине на фосфатном буфере рН 6,8-7,2 в течение 24 часов. Затем промывали в проточной воде в течение 2-х часов и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации в течение 1 часа в каждой порции спирта. В спирте 96 градусов выдерживали в течение 1, 2-х, 1 часа и 4-х часов, а затем помещали в абсолютный спирт 5 раз по 30 минут и оставляли в последней порции абсолютного спирта на ночь. После этого материал погружали в смесь абсолютного спирта и ксилола в соотношении 1:1 на 0,5 часа, а затем проводили в 3 сменах ксилола в термостате при 37 градусах по 0,5 часа в каждой. Затем использовали смесь ксилол/ парафин (1:1) при 56 градусах по 20 минут в 2-х порциях, а затем в 2-х порциях парафина при 56 градусах в течение 1 часа в обеих порциях. После этого производили заливку. Парафиновые блоки выдерживали в течение суток в термостате при температуре 37 градусов, а затем приготавливали срезы. Срезы и вся дальнейшая обработка материала (депарафинирование и обезвоживание) производились на автоматизированной аппаратуре лаборатории патоморфологии Медицинского университета Ниигаты (Япония), дающей высокую чувствительность к маркировке, Еп Vision -системе. Тучные клетки на срезах определяли с помощью классического метода окрашивания метиленовой синью и выявляли с помощью маркера CD204 фирмы DAKO.

Подсчёт клеток производили в 100 полях зрения в 60 срезах. При этом подсчитывали общее количество иммуноцитов в поле зрения и анализировали степень их окрашивания.

Фон и неспецифическое окрашивание исключали, строго соблюдая условия окрашивания — температуру, рН, время. Для блокирования неспецифического окрашивания срезы в течение 20 минут инкубировали с неиммунной сывороткой, а уже затем инкубировали с первичными антителами. Для контроля и исключения артефактов при выполнении исследований, часть препаратов обрабатывали дважды только не иммунной сывороткой.

Все статистические данные получены с помощью компьютерного программного обеспечения микроскопа Olympus BX51и цифровой камеры CD25 фирмы Olympus.

# Результаты исследования и их обсуждение

Макроскопические анатомические исследования и микроскопическое изучение периодонта приводят к мнению о важнейшей роли его структур в поддержании гомеостаза пародонта. Поэтому полученные в исследовании результаты дают более глубокие представления о структуре, физиологической регенерации, физиологии и роли пародонта в нормальном функционировании. Как и другими исследователями, нами установлено, что периодонт представлен особым видом соединительной ткани, состоящей из клеток и коллагенового волокнистого остова, окружённого аморфным основным веществом. Во все периоды онтогенеза человека формирующийся периодонт человека участвует в трофическом обеспечении метаболических потребностей зубов. Изменение клеточных взаимодействий в системе периодонта – процесс, обеспечивающий регенераторные процессы, как физиологические, так и репаративные [3]. Одним из важнейших механизмов, обеспечивающих все этапы перестройки периодонта в онтогенезе человека, является гомеостаз в системе взаимодействий иммунофагоцитарного звена. Деструкция и инволюция периодонта, нарушение межклеточных взаимодействий в системе периодонта, является одним из пусковых механизмов патологии зубочелюстного аппарата. Иммуномоделирование в механизмах репаративной регенерации периодонта является одним из основных в регуляции взаимоотношений структур пародонта.

Нами установлено, что при удалении зуба альтерация слизистой оболочки сопровождается отёком и выраженной инфильтрацией клеток крови в соединительную ткань пародонта (рис. 1).

Отмечено, что в повреждённую ткань после экстирпации зубов мигрирует большое количество базофилов, идентифицируются тучные клетки (рис. 2).

Дополнительное подтверждение наличия миграции в повреждённую ткань тучных клеток мы получили с помощью метода маркировки CD 204 клеток иммунофагоцитарного звена, соответствующих тучным клеткам (рис. 3).

Тучные клетки периодонта, благодаря наличию в них биогенных аминов, представляют мощное звено, определяющее развитие и регуляцию гомеостатических и компенсаторных механизмов при травме и инфекциях периодонта.

Как и другими авторами, нами отмечено, что коэффициент дегрануляции и коэффициент функциональной напряженности тканевых базофилов в сосудистой и межсосудистой областях периодонта являются критерием устойчивости системы тучных клеток к действию стрессирующего фактора [4, 6]. Критический период их активности отмечается через 20–30 минут после травмы, лабильность системы — через 2—3 часа, истощение компенсаторных механизмов отмечается через сутки после травмы.

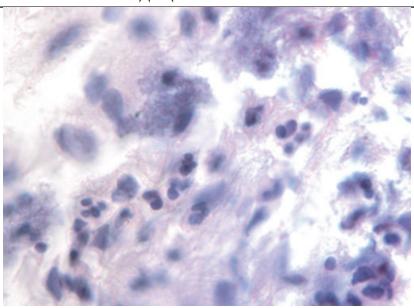


Рис. 1. Инфильтрация клеток крови в соединительную ткань пародонта. Микрофото. Ув. X 200. Окраска г/э. Идентифицируются лейкоциты

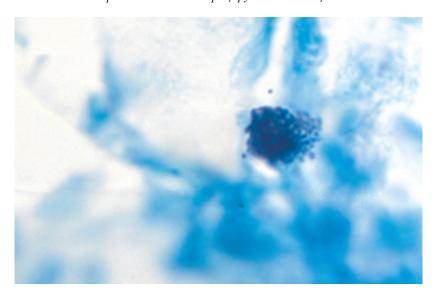


Рис. 2. Тучная клетка в пародонте. Микрофото. Ув. Х 400. Окр. метиленовым синим

В процессе патологического процесса в периодонте первоначально происходит активное перераспределение крови, которое определяет защитные гомеостатические механизмы, осуществляемые, в том числе, тучными клетками. Наименьшая устойчивость к действию повреждающего фактора отмечается в зоне верхушки корня зуба, наиболее устойчивой является область периодонта второй трети корня зуба.

Результаты биохимического анализа содержания биогенных аминов в крови человека определяют степень устойчивости к действию стрессирующего фактора. Высокий коэффициент отношения катехола-

минов к серотонину является показателем устойчивости клеточных взаимодействий при развитии патологических реакций в системе пародонта и определяет, в конечном итоге, прогноз в течение патологического процесса с вовлечением тучных клеток [10].

Параллельное определение уровня биогенных аминов в крови детей, имеющих патологический процесс в периодонте, является важнейшим показателем степени нарушения периодонтального кровообращения и фактором, определяющим назначение патогенетически обусловленного лечения лекарственными препаратами.

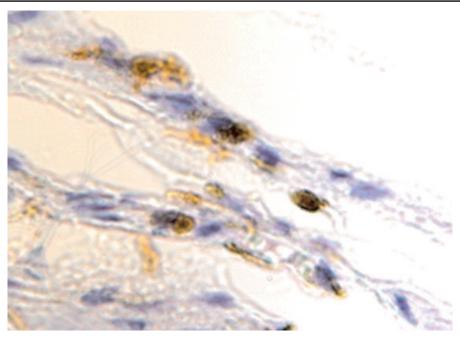


Рис. 3. Тучные клетки в пародонте. Микрофото. Ув. Х 400. Окр. ИГХ

Ранняя коррекция в системе тканевых базофилов, осуществляемая через биогенные моноамины, может быть одним из основных факторов, определяющих исход травматических и инфекционных поражений периодонта, как и других структур организма [8]. В молочных и несформированных постоянных зубах заболевание часто протекает с закрытой полостью зуба и при неглубокой кариозной полости. Также особенностью периодонтита у детей является преобладание гранулирующей формы хронического периодонтита, при этом часто наблюдается патологическая резорбция корней этих зубов. Нами отмечено, что гранулирующая форма периодонтита у маленьких детей сопровождается образованием свища на десне чаще, чем у подростков и взрослых. Отмечается довольно частое разрежение кости в области бифуркации корней, превышающее таковое у верхушки корня на фоне периодонтита.

Нами установлено, что у детей, получивших до экстирпации зуба препараты иммуномоделирующего действия (имудон и др.), имеют повышенные количественные показатели тучных клеток в тканях пародонта, клинически нами установлено более быстрое завершение репаративной регенерации. Это может быть связано с тем, что тучные клетки, выделяя специфические цитокины для привлечения макрофагов, вызывают ускорение процессов фагоцитоза повреждённых тканей [1, 4]. Одновременно они, выделяя медиаторы гистамин и гепа-

рин, изменяющие проницаемость стенки сосудов и межклеточного вещества структур периодонта, способствуют усиленной миграции антиген представляющих и фагоцитирующих иммуноцитов в зону альтерации [7, 12].

Полученные результаты свидетельствуют о важности применения иммуномодулирующих препаратов у детей с патологией пародонта вне зависимости от необходимости проведения экстирпации зубов, как влияющих через тучные клетки на систему клеток иммунофагоцитарного звена и ускоряющих репаративную регенерацию.

### Список литературы

- 1. Роль тучных клеток слизистой оболочки десны в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта / Ю.Л. Осипова, Н.В. Булкина, А.Ю. Кропотина, Н.А. Хариш, О.Ю. Гусева, Ю.Н. Альбицкая // Успехи современного естествознания. -2009. -№ 7-C.55-56.
- 2. Tissue eosinophilia in a mouse model of colitis is highly dependent on TLR2 and independent of mast cells / E.J. Albert, J. Duplisea, W. Dawicki, I.D. Haidl, J.S Marshall // Am J Pathol.. Am J Pathol. 2011, Jan. Nototallow178(1). C. 150–60.
- 3. Galli, S.J., Maurer M., Lantz, C.S. Mast cells as sentinels of innate immunity // Curr. Opin. Immunol. 1999. №11. C. 53–59.
- 4. Galli, S.J., Nakae, S., Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune response // Nat. Immunol. − 2005. − №6. − C. 135–142.
- 5. The significant role of mast cells in cancer / K. Khazaie, N.R. Blatner, M.W. Khan, F. Gounari, E. Gounaris, K. Dennis, A. Bonertz, F.N. Tsai, M.J. Strouch, E. Cheon et al. // Cancer Metastasis Rev. 2011 Mar; 30(1):45–60.
- 6. Marie Fischer<sup>1,2</sup>, Ilkka T. Harvima<sup>3</sup>, Ricardo F.S. Carvalho<sup>1</sup>, Christine Möller<sup>1</sup>, Anita Naukkarinen<sup>4</sup>, Gunilla Enblad<sup>2</sup> and Gunnar Nilsson. Mast cell CD30 ligand is upregulated in

- cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion // J Clin Invest. 2006. №116(10). C. 2748–2756.
- 7. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice / S. Nakae, L.H. Ho, M. Yu, R. Monteforte, M. Iikura, H. Suto, S.J. Galli // Allergy Clin Immunol. 2007 Jul. №120(1). –C. 48–55.
- 8. A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth / S.A. Oldford, I.D. Haidl, M.A. Howatt, C.A. Leiva, B. Johnston, J.S. Marshall // J Immunol. 2010. Dec 1. №185(11). C. 7067–76.
- 9. Prussin C., Metcalfe D.D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils // J Allergy Clin Immunol. 2003. 111 (2 Suppl): S486-94. doi:10.1067/mai. 2003.120.
- 10. Pulendran B., Ono S.J. A shot in the arm for mast cells // Nat. Med. May 2008. N14 (5). C. 489–90.
- 11. Saito H. et al. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells // J. Immunol. 1996. №157. C. 343–350.
- 12. Wilhelm M., Silver R., Silverman A.J. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation // Eur. J. Neurosci. November, 2005. №22 (9). C. 2238–48.

#### References

- 1. Osipova Yu.L., Bulkina N.V., Kropotina A.Yu., Harish N.A., Gyseva O.Yu., Albitskay Yu.N. Rol tuchnych kletok slizistoy obolochki desny v patogeneze vospalitelnykh zabolevaniy parodonta Uspechi sovremennogo estestvoznaniya. 2009. no. 7 pp. 55–56.
- 2. Albert EJ, Duplisea J, Dawicki W, Haidl ID, Marshall JS. Am J Pathol. *Tissue eosinophilia in a mouse model of colitis is highly dependent on TLR2 and independent of mast cells Am J Pathol.* 2011, Jan; 178(1):150–60.
- 3. Galli, S.J., Maurer, M., Lantz, C.S. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity Curr. Opin. Immunol. 11:53–59.
- 4. Galli, S.J., Nakae, S., Tsai, M. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune response Nat. Immunol. 6:135–142.

- 5. Khazaie K., Blatner N.R., Khan M.W., Gounari F., Gounaris E., Dennis K., Bonertz A., Tsai F.N., Strouch M.J., Cheon E., et al. *The significant role of mast cells in cancer Cancer Metastasis Rev.* 2011 Mar; 30(1):45–60.
- 6. Marie Fischer<sup>1,2</sup>, Ilkka T. Harvima<sup>3</sup>, Ricardo F.S. Carvalho<sup>1</sup>, Christine Möller<sup>1</sup>, Anita Naukkarinen<sup>4</sup>, Gunilla Enblad<sup>2</sup> and Gunnar Nilsson. *Mast cell CD30 ligand is upregulated in cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion J Clin Invest.* 2006;116(10):2748–2756.
- 7. Nakae S., Ho L.H., Yu M., Monteforte R., Iikura M., Suto H., Galli S.J. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice Allergy Clin Immunol. 2007 Jul; 120(1):48–55.
- 8. Oldford S.A., Haidl I.D., Howatt M.A., Leiva C.A., Johnston B., Marshall J.S. *A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth J Immunol.* 2010. Dec 1;185(11):7067–76.
- 9. Prussin C., Metcalfe D.D. *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils J Allergy Clin Immunol* (2003). 111 (2 Suppl): S486–94. doi:10.1067/mai. 2003.120.
- 10. Pulendran B., Ono S.J. *A shot in the arm for mast cells Nat. Med.* (May 2008). 14 (5): 489–90.
- 11. Saito H. et al. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells J. Immunol. 1996.157:343–350.
- 12. Wilhelm M/, Silver R/, Silverman AJ. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation Eur. J. Neurosci. (November, 2005) 22 (9): 2238–48.

#### Рецензенты:

Красников Ю.А., д.м.н., профессор кафедры хирургии Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток.

Усов В.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 30.03.2012.