

УДК 616.216.1-002:611.018.025:612.42

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЦИТОВ CD4/CD8 СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОДОНТОГЕННОГО ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСИТА

^{1,2}Рева И.В., ¹Рева Г.В., ^{1,2}Ямамото Т., ¹Толмачёв В.Е., ³Первов Ю.Ю.,
³Догадина Н.А., ¹Миргазизов А.М., ¹Гилицанов Е.А., ¹Бочаров В.С.,
¹Мухлаев С.Ю., ¹Ким А.Р., ¹Грахова Н.В.

¹Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток, e-mail: RevaGal@yandex.ru;

²Международный Медицинский Научно-образовательный Центр,
Ниигата, Япония; e-mail: avers2@yandex.ru;

³Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

Установлена зависимость длительности заболевания одонтогенным гайморитом и соотношением количества эффекторных клеток CD4/CD8 в слизистой оболочке гайморовой пазухи человека. При одонтогенном гайморите с длительностью патологического процесса свыше 3-х месяцев в анамнезе больного маркеры CD4/CD8 идентифицируются в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки, меняя соотношение от 1:1 до 3:3. Сделан вывод о зависимости гипертрофического и воспалительного процесса в слизистой оболочке гайморовой пазухи с изменением количества иммунных клеток CD4/CD8 в эпителиальной пластинке и прилежащей соединительной ткани. Апоптоз кератиноцитов и гибель базального камбиального слоя эпителиоцитов с образованием участков локального повреждения с вовлечением в процесс базальной мембраны, приводят к усилению пролиферативной активности как железистого эпителия, так и кератиноцитов. Выявленная гипертрофия бокаловидных клеток коррелирует с изменением количества иммунных клеток в слизистой оболочке гайморовой пазухи. Установлена роль CD4/CD8 в патогенезе одонтогенного гайморита.

Ключевые слова: иммунные клетки, антигенпрезентирующие клетки, CD4, CD8, гайморова пазуха, одонтогенный гайморит, лимфоциты крови, стволовые клетки крови

FEATURE IMMUNOCYTES CD4/CD8 OF MUCOUS MEMBRANE IN PATHOGENESIS ODONTOGENIC MAXILLARY SINUSITIS.

^{1,2}Reva I.V., ¹Reva G.V., ^{1,2}Yamamoto T., ¹Tolmachev V.E., ³Pervov YU.YU.,
³Dogadina N.A., ¹Mirgazizov A.M., ¹Gilifanov E.A., ¹Bocharov V.S., ¹Muhlaev S.YU.,
¹Kim A.R., ¹Grakchova N.V.

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

²International Medical Research Center, Niigata, Japan, e-mail: avers2@yandex.ru;

³Pacific state medical university, Vladivostok

The dependence of the duration of the disease odontogenic sinusitis and the ratio of CD4/CD8 antigen-presenting cells in the mucosa of the human maxillary sinus. When odontogenic sinusitis with the duration of the pathological process more than 3 months in the history of the patient's CD4/CD8 markers identified in the connective tissue of the lamina propria of the mucosa, changing the ratio from 1:1 to 3:3. Concluded depending hypertrophic and inflammatory process in the mucosa of the maxillary sinus with the change in the amount of immune cells in the epithelial CD4/CD8 plate and the adjacent connective tissue. Keratinocyte apoptosis and loss of basal epithelial layer of cambial to form portions of local damage with involvement in the process of basement membrane lead to increased proliferative activity as glandular epithelium and keratinocytes. Revealed hypertrophy of goblet cells correlates with the change in the amount of immune cells in the mucosa of the maxillary sinus. It was showed the role of CD4/CD8 in the pathogenesis of odontogenic sinusitis.

Keywords: immune cells, antigen presenting cells, CD4, CD8, maxillary sinus, odontogenic sinusitis, blood lymphocytes, blood stem cells

На современном этапе болезни околоносовых пазух являются самой распространенной ЛОР-патологией [7, 10, 13, 19]. Около 40 % всех госпитализированных лорбольных составляют пациенты с синуситами. Частой причиной развития верхнечелюстных синуситов являются тесные топографо-анатомические взаимоотношения верхнечелюстной пазухи (ВЧП) с зубами верхней челюсти [1, 2, 4, 16]. По мнению многих авторов, особенности строения стенки верхнечелюстной пазухи повышают степень риска возникновения внутриглазных и внутричерепных осложнений при воспалительных заболе-

ваниях этой пазухи, что требует участия различных специалистов: офтальмологов, челюстно-лицевых хирургов, стоматологов, отоларингологов и нейрохирургов [18]. Основным методом диагностики заболеваний околоносовых пазух (ОНП) в настоящее время является рентгенологический, который, как и жесткая эндоскопия носовой полости, и возможность компьютерного сканирования (КТ) синусов, тем не менее, не позволяет комплексно оценить состояние всех ОНП, не даёт полного представления о динамике патологического процесса и патогенетических механизмах [8, 14, 15]. Следу-

ет учесть, что ни один из этих диагностических методов не доступен для врача общей практики, которому нередко приходится ставить диагноз и лечить синусит на основании клинических симптомов. Диагностика и лечение болезней придаточных пазух носа (ППН) связаны с неспецифичностью и неинформативностью неинвазивных методов обследования. При этом КТ подвергает пациента значительному облучению. Запущенный синусит приводит к распространению инфекции за пределы пазух, приводя к серьезным осложнениям, чаще у детей [3, 5, 12]. При этом, как следствие, эмпирическая неадекватная антибиотикотерапия не является полностью патогенетически обоснованной: при остром синусите отсутствует единое мнение о выборе антибиотика и продолжительности курса лечения, что также подтверждают данные об особенностях анаэробной инфекции у пациентов с различными формами хронических максиллярных синуситов [11]. Микроорганизмы, присутствующие в околоносовых пазухах, не реагируют на антибактериальные средства. Опасность длительного курса антибиотиков заключается в развитии антибиотикорезистентности, риске остаточной инфекции с высокой вероятностью развития осложнений. Поэтому разработка методов гистоло-

гической и иммуногистохимической оценки патологического процесса в слизистой оболочке гайморовой пазухи с использованием маркеров CD4/CD8 является наиболее актуальной на современном этапе.

Цель исследования. Установить особенности взаимодействия CD4:CD8 в структурах слизистой гайморовой пазухи и их роль в патогенезе одонтогенного гайморита.

В задачи исследования мы включили получение характеристики морфологических особенностей альтерации структур слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи в зависимости от сроков заболевания, а также выявление количественной динамики изменений CD4:CD8 в гайморовой пазухе в зависимости от возраста и давности заболевания.

Материалы и методы исследования

Исследование было проведено с учётом положений Хельсинской декларации (2000) и с разрешением этического комитета ФГАОУ ВПО Дальневосточный Федеральный Университет. По клиническим показаниям и с письменного информированного согласия пациентов с учётом зависимости показателей от циркадных ритмов произвели забор биоптатов слизистой гайморовой пазухи у 42 пациентов в возрасте от 45 до 78 лет, которых распределили с учётом возрастных групп, принятых Международным симпозиумом по возрастной периодизации в Москве (1965 г.) и срокам заболевания одонтогенным гайморитом (табл. 1).

Таблица 1

Распределение больных с учётом возрастной периодизации и сроков давности одонтогенного гайморита

Количество больных в возрастных группах	Всего больных	Продолжительность заболевания				1 год и более
		1 мес.	1,5 мес	3 мес.	0,5 года	
VI	5	1	1	1	1	1
VII	7	1	1	2	2	1
VIII	5	1	2	1	1	1
IX	3	1	0	0	0	1
X	6	1	1	2	2	0
XI	7	3	1	1	1	1
XII	9	3	3	1	1	1
Итого	42	11	9	8	8	6

Клинический анализ материала показал, что причинами одонтогенного гайморита в большинстве случаев были мероприятия по имплантации зубов (35), ретенционные зубы (2) и инфицирование в результате кариозного поражения зубов (5).

По клиническим показаниям и с согласия пациентов производили забор биоптатов с помощью интраназальной этмоидэктомии, образцы нормальной слизистой оболочки были получены из области задней решетчатой пазухи от трех пациентов, у которых заболевание было ограничено передним решётчатым регионом. Кроме того, ни один из этой группы пациентов не получал интраназальных препаратов, оральных стероидов, а также антибиотиков для лечения в течение предыдущих 6 месяцев. Все они имели отрицательные результаты на аллергические пробы. Полу-

ченные биоптаты фиксировали в 10%-м формалине на фосфатном буфере с pH 6,8–7,2 в течение 24-х часов, затем промывали в воде в течение 2-х часов и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации в течение 1 часа в каждой порции. В спирте 96 °C выдерживали в течение 1, 2, 4-х часов, а затем помещали в абсолютный спирт 5 раз по 30 минут, потом оставляли в последней порции на всю ночь. После этого материал помещали в смесь абсолютного спирта и ксилола в соотношении 1:1 на 30 минут, а затем в сменах ксилола в термостате при 37 °C по 30 минут в каждой. После этого использовали смесь ксилола с парафином (1:1) при 56 °C по 20 минут в 2-х порциях, а затем в двух порциях парафина при 56 °C (по 1 часу в каждой порции), после чего проводили заливку. Парафиновые блоки выдерживали в течение суток в

термостате при 37°C, после чего производили срезы толщиной 3–5 мкм. Срезы и вся дальнейшая обработка материала (депарафинирование и обезвоживание) выполнялась на автоматизированной аппаратуре лаборатории патоморфологии Международного медицинского научно-образовательного центра (IMERC, Ниигата, Япония). Идентификация иммунокомпетентных клеток проводилась по одинаковой схеме, в связи с одинаковой локализацией антигена в клеточных структурах. Иммуногистохимическими методами на определение CD4/CD8 в биоптатах слизистой гайморовой пазухи, произвели фенотипирование иммуноцитов и проанализировали их количественные соотношения в слизистой оболочке гайморовой пазухи в норме, а также выявили особенности топографии иммуноцитов при одонтогенном гайморите. Демаскировка антигенных детерминант проводилась в стеклянном контейнере, заполненном восстанавливающим раствором, с созданием водяной бани в течение одного часа. Часть препаратов была обработана в течение 30 минут с помощью микроволнового излучения, которое даёт лучший демаскировочный эффект. Для демаскировки антигенов использовали 10 ммоль/л цитратный буфер с pH 6,0 или DAKO TRS (Target retrieval solution, code № S1700). Остывшие препараты промывали в дистиллированной воде. Антитела применяли в разведении 1:50 и 1:100. Анализ материала проведён с помощью микроскопа Olympus – Bx82 и цифровой камеры PDx25.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами установлено, что в группе обследованных пациентов развитие одонтогенного верхнечелюстного синусита чаще было связано с тем, что нижняя стенка, или дно, верхнечелюстной пазухи находилось вблизи задней части альвеолярного отростка верхней челюсти и обычно соответствовало лункам четырех задних верхних зубов, корни которых в 12 случаях отделялись от пазухи лишь мягкими тканями. Также развитию патологического процесса способствовало

низкое расположение дна, а также нахождение корней зубов и их луночек вблизи или даже внутри верхнечелюстной полости. При этом было отмечено, что вдающиеся в пазуху луночки зубов имели отверстия, через которые надкостница корня приходила в соприкосновение со слизистой оболочкой пазух. Это способствовало лёгкому распространению одонтогенной инфекции в соответствующих зубах на слизистую оболочку верхнечелюстной пазухи.

Слизистая оболочка, выстилающая верхнечелюстную пазуху, плотно спаяна с костными стенками. Отличие от слизистой оболочки проксимального отдела дыхательного тракта заключается в том, что она не содержит кавернозной ткани, очень тонкая, включает небольшое количество слизистых желез и обильно кровоснабжена. В норме верхнечелюстная пазуха выстлана слизистой оболочкой, покрытой многорядным призматическим мерцательным эпителием. Нами установлено, что толщина слизистой оболочки в околоносовых пазухах составляет 120–1000 мкм и не видна на рентгенограмме, но при воспалении она может увеличиваться в десятки и сотни раз, давая пристеночное затемнение.

Основными морфофункциональными единицами эпителия в пазухах являются реснитчатые, вставочные и бокаловидные клетки. Известно, что реснитчатые клетки имеют на своей поверхности 50–200 ресничек длиной 5–8, диаметром 0,15–0,3 мкм.

Нами отмечено, что препараты, изготовленные из биоптатов больных с продолжительностью процесса 1–1,5 месяца, в сравнении с нормой характеризовались гипертрофией слизистой оболочки и гиперплазией бокаловидных клеток (рис. 1 а, б, в).

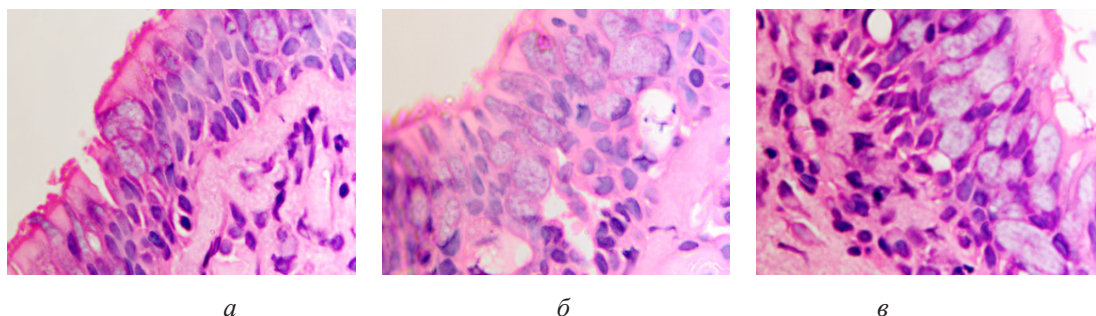


Рис. 1 а, б. А – в норме количество бокаловидных клеток 2–3 в поле зрения, идентифицируется слой ресничек. Б – гиперплазия и гипертрофия бокаловидных эпителиоцитов. В – слой ресничек разрушен (указано стрелкой). Микрофото. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х400

Известно, что ранние дегенеративные изменения реснитчатых эпителиоцитов проявляются уменьшением удельного объема митохондрий, гранулярной эндоплазматической сети, увеличением ядерно-цито-

плазматических отношений, что связано с нарушением эвакуации секрета из бокаловидных клеток.

При появлении воспалительного инфильтрата в слое эпителиальной пластинки

слизистой оболочки в сочетании с разрушением базальной мембраны и гибели базальных и бокаловидных клеток в отсутствие дифференцировки и специализации проис-

ходит замещение однослойных многорядных эпителиоцитов многослойным эпителием в результате реституции пролиферирующих стволовых клеток (рис. 2 а, б, в).

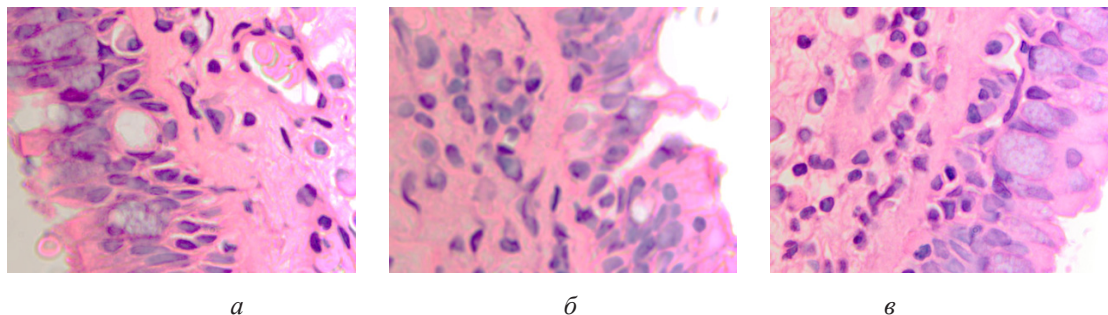


Рис. 2 а, б. А – расширение кровеносных сосудов с гипертрофированными эндотелиоцитами и лейкоцитарная инфильтрация в собственной пластинке слизистой оболочки. Кровеносный сосуд указан белой стрелкой. Б – разрушение эпителиальной пластинки, реснитчатого эпителия, апоптоз бокаловидных клеток. Микрофото. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х400

Кроме этого, лейкоцитарная инфильтрация, которая при инфицировании наблюдается не только в пределах собственной соединительнотканной пластинки, но и на поверхности слизистой, сопровождается разрушением базальной мембраны (рис. 2 б).

При продолжительности заболевания более 3-х месяцев развивается метapлазия эпителия в однорядный кубический и многослойный плоский ороговевающий или не-

ороговевающий (рис. 2 в).

Нами установлено, что содержание CD4/ CD8 иммуноцитов в слизистой оболочке синусов постепенно увеличивается, но при продолжительности заболевания более 6 месяцев уменьшается содержание CD4 клеток, одновременно возрастает содержание CD8 как в эпителиальной пластинке, так и на поверхности слизистой оболочки (рис. 3; табл. 2).

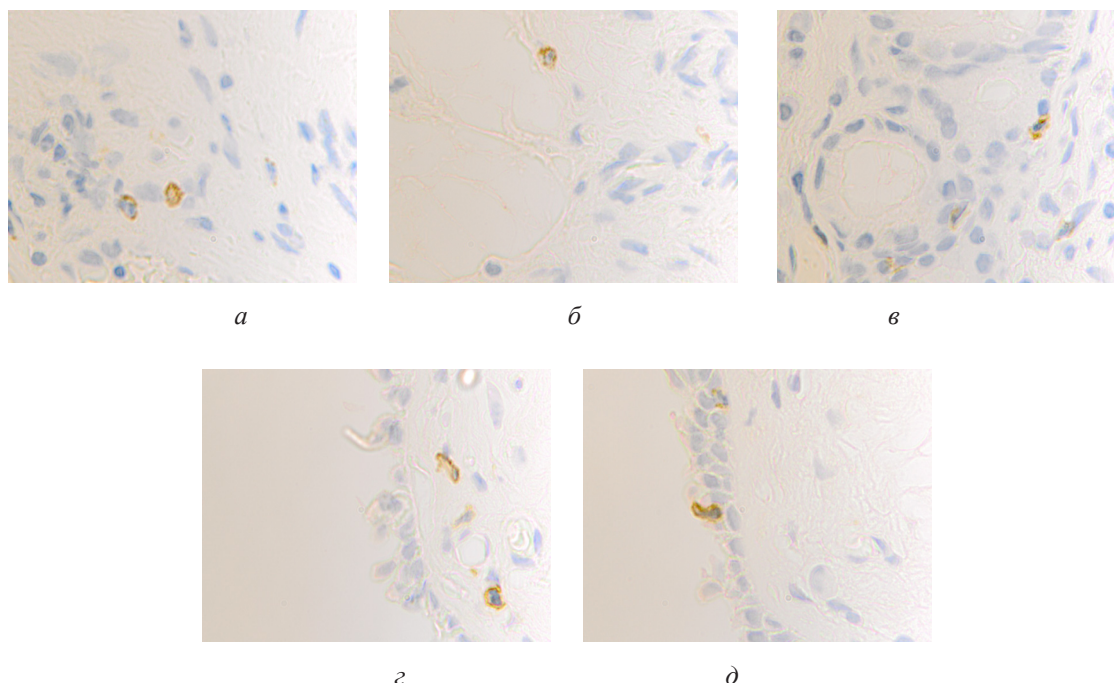


Рис. 3. а, б. А, б – CD4 инфильтрация в собственной пластинке слизистой оболочки верхнечелюстного синуса. В, г, д – идентификация CD 8 лимфоцитов как в собственной пластинке слизистой оболочки синуса, так и на поверхности эпителия. Наблюдается разрушение эпителиальной пластинки, реснитчатого эпителия, апоптоз бокаловидных клеток. Микрофото. Иммунная гистохимия. Ув.х400

Таблица 2

Показатели иммунного гомеостаза в слизистой оболочке верхнечелюстного синуса в норме и при хронической инфекции

Параметры фенотипирования	CD 4				CD8			
	контроль	1 мес.	3–6 мес.	1 год	контроль	1 мес.	3–6 мес.	1 год
От 20 до 40 лет	1,69 ± 0,11	3,78 ± 0,11	3,21 ± 0,05	2,60 ± 0,07	1,41 ± 0,18	2,79 ± 0,23	3,45 ± 0,27	3,57 ± 0,12
От 40 до 60 лет	1,55 ± 0,09	2,77 ± 0,09	3,64 ± 0,07	3,24 ± 0,05	1,09 ± 0,24	2,53 ± 0,19	3,37 ± 0,10	3,44 ± 0,13
Старше 60 лет	1,43 ± 0,25	2,44 ± 0,17	3,15 ± 0,11	2,99 ± 0,14	1,06 ± 0,19	2,01 ± 0,18	3,24 ± 0,22	3,35 ± 0,16

Примечание: критерий достоверности при уровне значимости $p < 0,05$.

Выявленное количество CD4/CD8 в слизистой оболочке верхнечелюстного синуса в группе контроля согласуется с данными литературы о показателях CD4/CD8 в периферической крови, количество CD4 превышает содержание CD8 во всех возрастных группах ($p < 0,05$). Динамика изменения количества эффекторных иммуноцитов в слизистой оболочке верхнечелюстного синуса в группе контроля согласуется с данными литературы об уменьшении с возрастом количества CD4/CD8 ежегодно на 0,09%. Повышение соотношения CD4/CD8 отмечается в острой фазе воспалительного процесса, за счёт повышения количества Т-хелперов и снижения Т-супрессоров. При переходе воспалительного заболевания в хронический процесс отмечается медленное снижение содержания Т-хелперов и повышение количества Т-супрессоров. При стихании воспалительного процесса эти показатели и их соотношения нормализуются.

Гиперсекреция слизи является общей чертой при хронических синуситах, сопровождаясь выраженной гиперплазией бокаловидных клеток, что, по мнению, связано с генами, отвечающими за выработку муцина матричными РНК (мРНК), которые выражены в бокаловидных клетках поверхностных эпителиальных пластов респираторного тракта человека. На сегодняшний день идентифицированы 12 генов человека, отвечающие за выработку муцина (MUC1-4, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8, MUC9, MUC11, при этом MUC12, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 и MUC8 известны как гены, отвечающие за секреторную активность бокаловидных клеток в дистальных дыхательных путях. Увеличение количества лимфоцитов CD4/CD8 и динамика изменения их соотношения в патогенезе синусита свидетельствуют о том, что эффекторные иммуноциты обеспечивают защит-

ные барьерные свойства покровной ткани в условиях гипер-, гипофункции и гибели эпителиальных пластов.

Таким образом, соотношение CD4/CD8 является интегральным показателем состояния иммунных процессов в слизистой оболочке верхнечелюстного синуса. Несмотря на то, что существует мнение о том, что исследование поверхностных маркеров лимфоцитов периферической крови при заболеваниях, не связанных с классифицированными иммунодефицитами или онкогематологией, не является диагностически значимым, однако эти показатели в слизистой оболочке синусов позволяют оценивать распространенность, тяжесть заболевания и патогенетические особенности воспалительного процесса, прогнозировать развитие патологии.

Фенотипирование лимфоцитов у пациентов с воспалительными заболеваниями дает дополнительную информацию о текущем состоянии больного и может использоваться для мониторинга состояния иммунной системы пациента в процессе лечения.

Работа выполнена при поддержке Научного Фонда ДВФУ и Международного гранта ДВФУ (соглашение № 13-09-0602-м_а от 6 ноября 2013 г.

Список литературы/References

1. Abi Najm S., Malis D., El Hage M., Rahban S., Carrel J.P., Bernard J.P. Potential adverse events of endosseous dental implants penetrating the maxillary sinus: long-term clinical evaluation. // Laryngoscope. 2013 Dec;123(12):2958-61.
2. Asnani S., Mahindra U., Rudagi B.M., Kini Y., Kharkar V.R. Dentigerous cyst with an impacted third molar obliterating complete maxillary sinus. // Indian J Dent Res. 2012 Nov-Dec;23(6):833-5.
3. Byun J.Y., Lee J.Y. Usefulness of partial uncinctomy in patients with localized maxillary sinus pathology. // Am J Otolaryngol. 2014 May 17. pii: S0196-0709(14)00114-8. doi: 10.1016/j.amjoto.2014.05.006.
4. Crovetto-Martínez R., Martín-Arregui F.J., Zabala-López-de-Maturana A., Tudela-Cabello K., Crovetto-de la

- Torre M.A. Frequency of the odontogenic maxillary sinusitis extended to the anterior ethmoid sinus and response to surgical treatment. //Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2014 Mar 8.
5. Ferguson M. Rhinosinusitis in oral medicine and dentistry.//Aust Dent J. 2014 May 23. doi: 10.1111/adj.12193.
6. Davydov D.V., Gvozdoch V.A., Stebunov V.E., Manakina A.Iu. Odontogenic maxillary sinusitis: peculiarities of diagnostics and treatment.//Vestn Otorinolaringol. 2014;(1):4-7.
7. Drago L., Vassena C., Saibene A.M., Del Fabbro M., Felisati G. A case of coinfection in a chronic maxillary sinusitis of odontogenic origin: identification of *Dialister pneumosintes*.//J Endod. 2013 Aug;39(8):1084-7.
8. Fanucci E., Nezzo M., Neroni L., Montesani L.Jr., Ottria L., Gargari M. Diagnosis and treatment of paranasal sinus fungus ball of odontogenic origin: case report. //Oral Implantol (Rome). 2014 Apr 4;6(3):63-6. eCollection 2013 Mar.
9. Felisati G., Chiapasco M., Lozza P., Saibene A.M., Pipolo C., Zaniboni M., Biglioli F., Borloni R. Sinonasal complications resulting from dental treatment: outcome-oriented proposal of classification and surgical protocol.//Am J Rhinol Allergy. 2013 Jul-Aug;27(4):e101-6.
10. Giovannetti F., Priore P., Raponi I., Valentini V. Endoscopic sinus surgery in sinus-oral pathology.//J Craniofac Surg. 2014 May;25(3):991-4.
11. Guliuk A.G., Varzhapetian S.D., Bokova E.N., Zheltov A.Ia. Frequency of detection of anaerobic microorganisms in the maxillary sinuses of patients with different forms of chronic maxillary sinusitis.//Georgian Med News. 2013 May;(218):15-8.
12. Konstantinidis I, Constantinidis J. Medial maxillectomy in recalcitrant sinusitis: when, why and how?//Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2014 Feb;22(1):68-74.
13. Kunihiro T., Oba T. Endoscopic sinus surgery for otolaryngological complications associated with dental and oral surgical treatment: a report of three illustrative cases.//Fukuoka Igaku Zasshi. 2013 Jun;104(6):205-13.
14. Pokorny A., Tataryn R. Clinical and radiologic findings in a case series of maxillary sinusitis of dental origin.//Int Forum Allergy Rhinol. 2013 Dec;3(12):973-9.
15. Shahbazian M., Vandewoude C., Wyatt J., Jacobs R. Comparative assessment of periapical radiography and CBCT imaging for radiodiagnostics in the posterior maxilla.//Odontology. 2013 Dec 28.
16. Shanbhag S., Karnik P., Shirke P., Shanbhag V. Association between periapical lesions and maxillary sinus mucosal thickening: a retrospective cone-beam computed tomographic study.//J Endod. 2013 Jul;39(7):853-7.
17. Sysoliatin S.P., Sysoliatin P.G., Palkina M.O., Solop M.V. Sinus lift and dental implantation after endosurgical treatment of odontogenic maxillary sinusitis.//Stomatologiya (Mosk). 2013;92(3):93-6.
18. Vishniakov V.V., Makarova N.V., Pashovkina O.V. Changes in the mucous membrane of the patients with chronic maxillary sinusitis caused by foreign bodies.//Vestn Otorinolaringol. 2014;(1):12-4.
19. Zustin J., Scheuer H.A., Knecht R., Friedrich R.E. Enhanced podoplanin expression in chronic maxillary sinusitis.//In Vivo. 2013 Jul-Aug;27(4):551-4.

Рецензенты:

Храмова И.А., д.м.н., профессор, врач акушер-гинеколог, Приморский Краевой Диагностический Центр, г. Владивосток;
Транковская Л.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой гигиены ТГМУ, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 25.08.2014.