Сведения об авторах:

Яглова Наталья Валентиновна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы;
тел.: 89104042101; e-mail: yaglova@mail.ru

Цомартова Элина Сослановна, аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии; тел.: 89169729400; e-mail: tselso@yandex.ru

Обернихин Сергей Станиславович, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы; тел.: 89035712526; e-mail: ober@mail.ru

Назимова Светлана Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник;
тел.: 89037910458; e-mail: pimka60@list.ru

Яглов Валентин Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник;
тел.: 89163758259; e-mail: vyaglov@mail.ru

Черешнева Елизавета Васильевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии;
тел.: (4956)297643; e-mail: yelizaveta.new@mail.ru

Иванова Марина Юрьевна, кандидат медицинских наук, доцент;
тел.: 89162452077, (4956)297643; e-mail: ivanova_m_y@mail.ru

Кузнецов Сергей Львович, кандидат медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой;
тел.: 89037724037, (4956)297643; e-mail: vakmedbiol@rambler.ru

© Коллектив авторов, 2019
УДК 616.314.17-008.1.71-007.234
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14168>
ISSN – 2073-8137

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ С ОСТЕОПОРОЗОМ КОСТНОГО СКЕЛЕТА

С. В. Сирак¹, С. П. Рубникович², Е. В. Щетинин¹, М. Г. Перикова¹,
Г. Г. Петросян¹, Н. И. Быкова³, Т. Л. Кобылкина¹, М. О. Диденко¹

¹ Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

² Медицинская академия последипломного образования, Минск,
Республика Беларусь

³ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар,
Российская Федерация

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF CHANGES IN PERIODONTAL TISSUES IN EXPERIMENTAL ANIMALS WITH BONE SKELETON OSTEOPOROSIS

Sirak S. V.¹, Rubnikovich S. P.², Shchetinin E. V.¹, Perikova M. G.¹,
Petrosyan G. G.¹, Bykova N. I.³, Kobylkina T. L.¹, Didenko M. O.¹

¹ Stavropol State Medical University, Russian Federation

² Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic Belarus

³ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Изложены результаты исследований по разработке модели остеопороза у экспериментальных животных с последующим анализом картины иммунного ответа тканей пародонта через 90 и 180 суток после начала формирования модели. Результаты исследования показали, что уменьшение числа ЕК-клеток в сочетании с увеличением Т-клеточной популяции (CD3+, CD4+, CD8+) отражает усиленный иммунный ответ в условиях повышенной антигенной нагрузки при остеопорозе. При этом количественные показатели В-клеток, как показали проведенные исследования, остаются без изменений.

Ключевые слова: остеопороз, пародонтит, иммунный ответ, эксперимент

The materials of the article contain data on the development of a model of osteoporosis in experimental animals, followed by a detailed description of the immune response of periodontal tissues 90 and 180 days after the beginning of the model formation. The results of the study showed that the decrease in the number of EC cells in combination with an increase in the T-cell population (CD3+, CD4+, CD8+) reflects an enhanced immune response in conditions of increased antigenic load in osteoporosis. At the same time, the quantitative indicators of B cells, as shown by the studies, remain unchanged.

Keywords: osteoporosis, periodontitis, immuneresponse, experiment

Для цитирования: Сирак С. В., Рубникович С. П., Щетинин Е. В., Перикова М. Г., Петросян Г. Г., Быкова Н. И., Кобылкина Т. Л., Диденко М. О. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ С ОСТЕОПОРОЗОМ КОСТНОГО СКЕЛЕТА. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(4):681-685. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14168>

For citation: Sirak S. V., Rubnikovich S. P., Shchetinin E. V., Perikova M. G., Petrosyan G. G., Bykova N. I., Kobylkina T. L., Didenko M. O. IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF CHANGES IN PERIODONTAL TISSUES IN EXPERIMENTAL ANIMALS WITH BONE SKELETON OSTEOPOROSIS. *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(4):681-685. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14168> (In Russ.)

АЭК – 3-амино-9-этилкарбазол

ЕК – естественные киллеры

ЗФР – забуференный физиологический раствор

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

ОП – остеопороз

РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

CD – кластер дифференцировки

Воспалительно-дистрофическими заболеваниями пародонта страдают более 80 % населения. Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) все чаще встречается у пациентов молодого возраста, что определяет его как социально значимую медицинскую проблему [1, 2]. Хронический генерализованный пародонтит всегда протекает с убылью костной ткани, усугубляясь системным остеопорозом различной этиологии (гормональные нарушения, пре-, постменопаузный период, болезни обмена веществ) [3–5]. Современные взгляды на развитие воспалительно-деструктивных форм пародонтита дополняются исследованиями об изменениях в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета тканей пародонта [6, 7]. Однако описания иммуногистохимической картины, наблюдаемой в альвеолярной кости при ХГП, особенно на фоне остеопороза костного скелета, в литературе весьма скудны [8, 9]. А ведь именно регенерация костных структур пародонта так важна при планировании ортопедического и имплантологического лечения. Изучение экспериментальной модели остеопороза и механизма иммунного ответа при остеопорозе тканей пародонта даст возможность рекомендовать включение в комплекс терапии ХГП патогенетически обоснованной иммунокорректирующей терапии. В связи с вышесказанным особый интерес представляет гистохимическая оценка тканей пародонта в условиях прогрессирующего системного обменного заболевания скелета – остеопороза (ОП).

Цель исследования – изучение иммунологических изменений в тканях пародонта у экспериментальных животных с остеопорозом костного скелета.

Материал и методы. Модель экспериментального остеопороза создана у 14 взрослых овец северокавказской породы. Животных разделили на основную (10) и контрольную (4) группы. Способ создания экспериментальной модели остеопороза овец описывали по установленному протоколу [10].

В основной группе под общим внутривенным наркозом (Zoletil 50) проводили двухстороннюю овариэктомию. Со второго дня после операции и в течение последующих 3 месяцев проводили ежедневные внутримышечные инъекции дексаметазона по 0,12 мг/кг массы.

Экспериментальную модель считали окончательно сформированной при плотности костной ткани нижней челюсти ниже 750 ЕД по шкале Хаунсфилда. В контрольной группе овариэктомию животным не проводили.

Для формирования модели экспериментального пародонтита животным в обеих группах вводили

внутримышечно метилурацил в дозе 60 мг/кг 2 раза в сутки в течение 4 недель. Локальное поражение десен и тканей преддверия рта вызывали с помощью аппликаций суспензии пчелиного яда в дозе 2 мг на килограмм веса животного. Каждому животному проведено по 5 аппликаций с интервалом 5 суток.

Исследование показателей клеточного и гуморального иммунитета у экспериментальных животных проводили сразу после моделирования патологии, через 90 и 180 суток.

Использовали иммуногистохимический метод, модифицированный для исследования биоптатов слизистой оболочки и тканей пародонта. Изучали экспрессию CD3, CD4, CD8, CD20, CD16 и CD56-антигенов иммуноцитов и цепей Т-клеточного рецептора лимфоцитов слизистой оболочки и тканей пародонта. Метод определения иммуноцитов на тканевых срезах позволил определить количество, локализацию, признаки активности, особенности строения иммуноцитов. Исследования проводили на серийных криостатных срезах. Определение маркеров иммуноцитов слизистой оболочки проводили прямым биотин-экстравидин-пероксидазным методом (G. S. Wood и R. Warnke, 1981).

Использовали моноклональные антитела к CD3, CD4, CD8, CD20; CD16 и CD56 и к ячеек-Т-клеточному рецептору. Локализацию первичных антител выявляли с помощью биотинилированных (вторичных) антител и экстравидин-пероксидазного комплекса (Sigma, США).

Постановку иммуногистохимического анализа (для каждого биоптата) проводили параллельно с двумя положительными и с четырьмя негативными контролями для серии срезов. Подсчет положительно окрашенных клеток (иммунореактивный) проводили с помощью микроскопа Olympus BX45, определение уровня цитокинов в сыворотке крови – методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Результаты и обсуждение. В основной группе животных через 3 месяца плотность костной ткани челюстных костей по шкале Хаунсфилда составила 705 ЕД, в контрольной группе – 945 ЕД.

На рисунке 1 (а, б) изображены отпечатки скриншотов с экрана компьютера при проведении рентгеновской денситометрии овец (выполненной для контроля формирования у животных остеопороза). К 3-му месяцу эксперимента явными становились конституциональные различия в строении скелета: животные в контрольной группе оказались явно крупнее, чем в основной, отличались ускоренной прибавкой веса и лучшим аппетитом.

Для подтверждения специфичности показателей состояния иммунологического аппарата слизистой оболочки десны при хроническом генерализованном

пародонтите проведено иммуногистохимическое исследование тканей пародонта.

Установлено, что ЕК-клетки (естественные киллеры, CD16+, CD56+) слизистой оболочки локализовались в базальном и шиповатом слоях. Их количество в эпителии составляло от 4 до 6 на 100 эпителиоцитов. Сведения согласуются с литературными данными о малом количестве клеток Лангерганса в эпителиальном слое слизистой оболочки десны и о наличии участков, свободных от этих клеток [11]. Отмечена высокая плотность ЕК-клеток в собственной слизистой.

Рис. 1. Результаты рентгеновской денситометрии челюстных костей овцы через 3 месяца после начала эксперимента. Скриншот с экрана компьютера: а – основная группа, б – контрольная группа

Таким образом, эпителиальный покров десен не является специализированным в восприятии антигенов, по сравнению с другими участками тканей пародонта. К 90-м суткам после окончания формирования экспериментальной модели остеопороза в эпителии, который выстилает ткани десен у остеопорозных животных, число ЕК-клеток составляло от 3 до 5 на 100 эпителиоцитов, однако в единичных препаратах выявлены группы клеток в количестве 10–15 на 100 эпителиоцитов (рис. 2-1). Локализация ЕК-клеток к 180-м суткам не отличалась от срока в 90 суток, однако в собственной слизистой отмечено резкое уменьшение количества ЕК-клеток (рис. 2-2).

CD3+ клетки в пародонте контрольных животных локализовались в базальном и центральном отделе шиповатого слоя, в количестве 2–5 на 100 эпителиоцитов (рис. 2-3). При остеопорозе отмечено значительное увеличение количества CD3+ клеток – до 15–20 на 100 эпителиоцитов (рис. 2-4).

В слизистой оболочке контрольной группы животных с пародонтитом обнаружено от 5 до 9 CD4+ клеток, локализованных в основном в базальном и толще шиповатого слоя (рис. 2-5). В пределах эпителии слизистой оболочки при остеопорозе количество CD4+ клеток увеличивалось до 12–16 (на 100 эпителиоцитов). Отмечена тенденция накопления CD4+ клеток на вершинах сосочков в базальных отделах эпителии (рис. 2-6). Около трети из всех обнаруженных CD4+ клеток имели отростки различной длины.

Большинство CD8+ клеток тканей пародонта контрольных животных размещалось в основе сосочков под базальной мембраной, то есть в собственной пластинке слизистой. В анализируемых препаратах обнаружено максимум до 5 CD8+ клеток на 100 эпителиоцитов, локализованных в основном в базальном и близлежащих шиповатых рядах толщи эпителии (рис. 2-7). В эпителии слизистой оболочки животных с остеопорозом отмечено увеличение количества CD8+ клеток – до 10–15 на 100 эпителиоцитов. Клетки локализовались в базальном и по всей толще шиповатого слоя. При этом CD8+ клетки образовывали группы в пределах эпителии и в собственно слизистой (рис. 2-8).

В тканях пародонта животных контрольной группы обнаружены одиночные (1–3) CD20+ клетки в шиповатом слое эпителии (рис. 2-9). У остеопорозных животных их количество увеличивалось до 20–25 на 100 эпителиоцитов уже к 90-м суткам моделирования (рис. 2-10).

Таким образом, в результате иммуногистохимических исследований установлены отклонения показателей локального иммунитета слизистой оболочки пародонта. Указанные отклонения свидетельствуют об определенном уровне локальных иммунологических изменений, которые позволяют уточнить характер постнатального цито- и гистогенеза пародонта и его составных частей в связи с адаптацией тканей пародонта к явлениям остеопороза для реализации возможности их полноценного функционирования.

При сравнении с результатами исследования слизистой десны при пародонтите количество Т-лимфоцитарной популяции при остеопорозе выше, а количество ЕК-клеток, локализованных в эпителии и собственной слизистой, меньше, что соответствует диаметрально противоположным изменениям при пародонтите и остеопорозе соответственно.

Закключение. При экспериментальном остеопорозе в пародонте на клеточном уровне наблюдается уменьшение числа ЕК-клеток в сочетании с увеличением Т-клеточной популяции (CD3+, CD4+, CD8+), а количественные показатели В-клеток остаются без изменений, что отражает усиленный иммунный ответ в условиях повышенной антигенной нагрузки при остеопорозе.

Обнаруженные локальные иммунологические отклонения при остеопорозе следует расценивать как расстройства в регуляции регенераторных процессов, препятствующие ремоделированию и перестройке всего тканевого гомеостаза зубоальвеолярного пародонтального комплекса, что может составить основу разработки патогенетических методов лечения заболеваний пародонта в случаях системного остеопороза.

Рис. 2. Микрофотография фрагмента биоптата зубоальвеолярного сегмента овцы: 1 – ЕК-клетки в количестве от 10 до 15 на 100 эпителиоцитов через 90 суток после формирования экспериментальной модели остеопороза; 2 – резкое уменьшение количества ЕК-клеток в собственно слизистой через 180 суток после формирования модели. Криостатный срез; мкАТ1-CD16; проявка-аминоэтилкарбазол (АЭК); контрастирование – гематоксилин; ок. 10, об. 60; 3 – CD3+ клетки в количестве 2 на 100 эпителиоцитов через 180 суток после начала исследования в контрольной группе; 4 – 15–20 CD3+ клеток на 100 эпителиоцитов через 180 суток после формирования экспериментальной модели; 5 – CD4+ клетки в количестве 5–9 на 100 эпителиоцитов в пародонте контрольной группы; 6 – 12–16 CD4+ клеток на 100 эпителиоцитов через 180 суток после формирования экспериментальной модели; 7 – CD8+ клетки в количестве 5 на 100 эпителиоцитов в пародонте группы; 8 – 10–15 CD8+ клеток на 100 эпителиоцитов через 180 суток после формирования экспериментальной модели; 9 – CD20+ клетки в количестве 1–3 на 100 эпителиоцитов (контрольная группа); 10 – 20–25 CD20+ клеток на 100 эпителиоцитов через 90 суток после формирования экспериментальной модели. Криостатный срез; мкАТ1-CD3; проявка-АЭК, контрастирование – кислый гемалаун по П. Майеру; ок. 15, об. 60

Информированное согласие. Экспериментальное исследование проведено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (изложенными в национальном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434-2009), с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), Общими этическими прин-

ципами экспериментов на животных (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и положительным заключением этического комитета.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на выполнение научных исследований и разработок по теме «Направленная регенерация тканей пародонта в условиях экспериментального остеопороза».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Пузин С. Н., Пряников И. В., Ванченко Н. Б., Караков К. Г., Шургая М. А. Медико-социальные аспекты хронического генерализованного пародонтита. *Медико-социальная экспертиза и реабилитация*. 2018;21(3-4):129-133. [Puzin S. N., Pryanikov I. V., Vanchenko N. B., Karakov K. G., Shurgaya M. A. Medical and social aspects of chronic general parodontitis. *Mediko-socialnaya ekspertiza i reabilitatsiya*. – *Medical and Social Expertise and Rehabilitation*. 2018;21(3-4):129-133. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18821/1560-9537-2018-21-3-4-129-133>
2. Papapanou P. N., Sanz M., Buduneli N., Dietrich T., Feres M. [et al.]. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45:S162-S170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
3. Choi J.-K., Kim Y.-T., Kweon H.-I., Park E.-C., Choi S.-H., Lee J.-H. Effect of periodontitis on the development of osteoporosis: Results from a nationwide population-based cohort study (2003-2013). *BMC Women's Health*. 2017;17(1):77. <https://doi.org/10.1186/s12905-017-0440-9>
4. Mau L. P., Kuan Y. C., Tsai Y. C., Lin J. J., Huynh-Ba G. [et al.]. Patients with chronic periodontitis present increased risk for osteoporosis: a population-based cohort study in Taiwan. *Journal of Periodontal Research*. 2017;52(5):922-929. <https://doi.org/10.1111/jre.12464>
5. Penoni D. C., Vettore M. V., Torres S. R., Farias M. L. F., Leão A. T. T. An investigation of the bidirectional link between osteoporosis and periodontitis. *Archives of Osteoporosis*. 2019;14(1):94. <https://doi.org/10.1007/s11657-019-0643-9>
6. Knight E. T., Seymour G. J., Cullinan M. P., Faggion C. M., Liu J. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontology*. 2000. 2016;1(71):22-51.
7. Kayal R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Research International*. 2013;2013:639368. <https://doi.org/10.1155/2013/639368>
8. Щетинин Е. В., Сирак С. В., Григорьянц Л. А., Вафияди М. Ю., Дилекова О. В. [et al.]. Репаративная регенерация тканей пародонта – результаты экспериментального исследования. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2015;10(4):411-415. [Shchetinin E. V., Sirak S. V., Grigoryants L. A., Vafiadi M. Yu., Dilekova O. V. [et al.]. Reparative regeneration of periodontal tissues – results of experimental studies. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza*. – *Medical News of North Caucasus*. 2015;10(4):411-415. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2015.10100>
9. Сирак С. В., Щетинин Е. В., Слетов А. А. Субантральная аугментация пористым титаном в эксперименте и клинике. *Стоматология*. 2016;95(1):55-58. [Sirak S. V., Shchetinin E. V., Sletov A. A. Subantral'naya augmentatsiya poristym titanom v ehksperimente i klinike. *Stomatologiya*. – *Dentistry*. 2016;95(1):55-58. (In Russ.)].
10. Sirak S., Shchetinin E., Bobryshev D., Fritsch T., Giesenhausen B. [et al.]. Osteoporotic sheep mandibular model for comparative alveolar bone healing research. *Medical News of North Caucasus*. 2017;12(3):284-289. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12091>
11. Рубникович С. П., Денисова Ю. Л., Андреева В. А., Квачева З. Б., Панасенкова Г. Ю., Хомич И. С. Оценка эффективности комплексного применения мезенхимальных стволовых клеток и биопластического материала коллост на модели рецессии десны в эксперименте *in vivo*. *Российская стоматология*. 2018;11(3):35-44. [Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Andreeva V. A., Kvacheva Z. B., Panasenкова G. Yu., Khomich I. S. Otsenka ehffektivnosti kompleksnogo primeneniya mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok i bioplasticheskogo materiala kollost na modeli retsessii desny v ehksperimente in vivo. *Rossiyskaya stomatologiya*. – *Russian dentistry*. 2018;11(3):35-44. (In Russ.)].

Сведения об авторах:

Сирак Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии; тел.: (8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Рубникович Сергей Петрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии и ортодонтии с курсом детской стоматологии; тел.: +375(17)2922561; e-mail: rubnikovichs@mail.ru

Щетинин Евгений Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии; тел.: (8652)352684; e-mail: ev.cliph@rambler.ru

Перикова Мария Григорьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии; тел.: (8652)350551; e-mail: masha.perikova@yandex.ru

Петросян Григорий Григорьевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии; тел.: (8652)352684; e-mail: ev.cliph@rambler.ru

Быкова Наталья Ильинична, кандидат медицинских наук, доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии; тел.: (8652)350551; e-mail: ilya.bh@mail.ru

Кобылкина Татьяна Леонидовна, доктор медицинских наук, доцент кафедры стоматологии; тел.: (8652)743304; e-mail: tatiana.kob1405@yandex.ru

Диденко Мария Олеговна, аспирант кафедры гистологии; тел.: 89283406900; e-mail: dr.maria.didenko@gmail.com