

УДК 616.31

## ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

Академик РАН А. А. Кулаков<sup>1,2</sup>, Е. А. Коган<sup>1</sup>, Т. В. Брайловская<sup>1,2</sup>,  
А. П. Ведяева<sup>1,2,\*</sup>, Н. В. Жарков<sup>1</sup>

Поступило 09.04.2019 г.

Проведено морфологическое и иммуногистохимическое исследование 24 биоптатов десны 19 пациентов в возрасте 35–60 лет с диагнозом “частичная вторичная адентия, хронический генерализованный пародонтит” средней и тяжёлой степени (14 пациентов), а также без патологических изменений в пародонте (5 пациентов), которым проводилась дентальная имплантация. На серийных парафиновых срезах проводили иммуногистохимические реакции с антителами к Ki-67, VEGF, SMA. Установлено, что хронический пародонтит тяжёлой степени отличается более высокой пролиферативной активностью эпителия, что отражает его гиперпластические изменения, а также меньшим содержанием SMA-позитивных клеток и практическим отсутствием формирования приваскулярных муфт из SMA-позитивных клеток, которые ассоциируются в тканях с “зонами роста”, что косвенно указывает на сниженную регенеративную способность тканей. Следовательно, в случае проведения операции дентальной имплантации требуется дополнительное лечение, направленное на противовоспалительное и прорегенераторное воздействие.

*Ключевые слова:* хронический пародонтит, зоны роста, регенераторный потенциал, Ki-67, VEGF, SMA.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524884452-456>

### ВВЕДЕНИЕ

Исследования последних лет показали, что дентальная имплантация не всегда даёт успешный и гарантированный результат у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) [1] ввиду нарушений процессов регенерации мягких тканей и костной ткани [2]. В научной литературе описывается механизм регенерации тканей пародонта и костной ткани челюстей с участием стволовых клеток при пародонтите. Однако литературные данные немногочисленны и касаются в основном экспериментальных исследований и работ, выполненных на культуре клеток. Авторы работ [3, 4] установили, что клетки с признаками стволовости могут иметь миофибробластический фенотип и участвовать в процессах регенерации и роста тканей пародонта. При этом передача сигналов Wnt3 $\alpha$  и TGF- $\beta$ 1 может играть роль в дифференцировке миофибробластов в ответ на повреждение [5, 6]. Поэтому исследование состояния тканей зоны пред-

полагаемой имплантации у пациентов с ХГП, разработка и внедрение в клиническую практику системы диагностических, лечебно-профилактических мероприятий на пред- и послеоперационном этапах лечения представляется необходимым, современным и актуальным.

Целью работы явилось прогнозирование процессов регенерации тканей пародонта при дентальной имплантации на фоне ХГП разной степени тяжести на основании морфологического исследования с иммуногистохимическим изучением уровня экспрессии ростовых факторов VEGF, SMA (маркёров миофибробластической дифференцировки клеток) и Ki-67 (маркера пролиферативной активности).

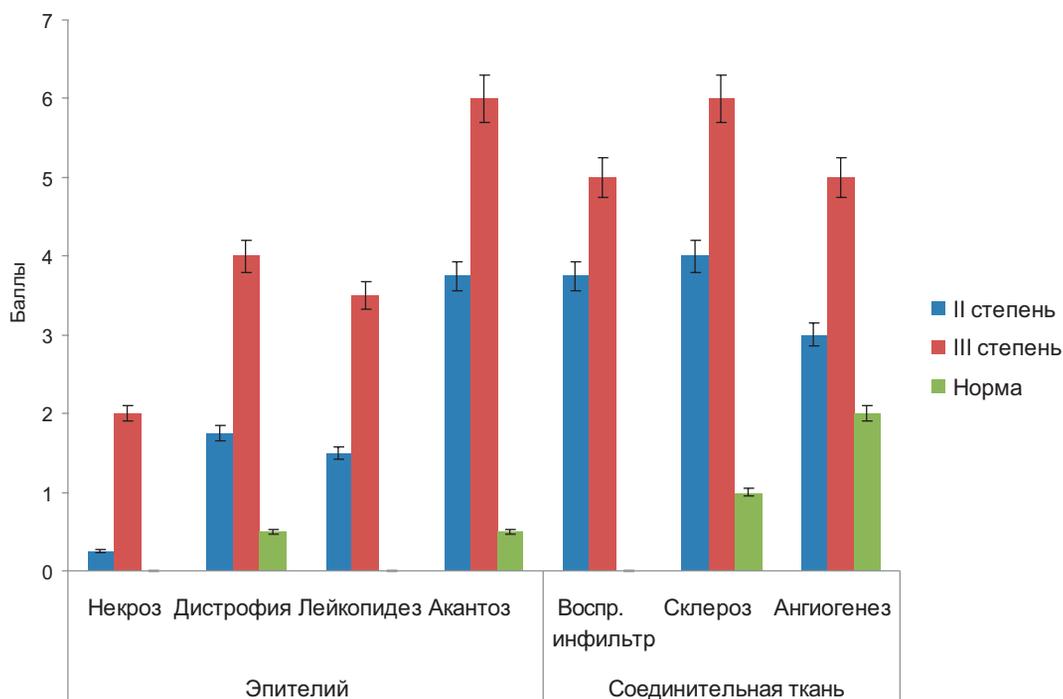
### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы 24 биоптата пародонта 19 пациентов (10 женщин и 9 мужчин) с диагнозом частичная “вторичная адентия, ХГП” средней и тяжёлой степени (14 пациентов) и без патологических изменений в пародонте (5 пациентов). Средний возраст пациентов составил  $43,9 \pm 8,1$  лет. Пациентам проведена внутрикостная дентальная имплантация в отделении клинической и экспериментальной имплантологии ФГБУ “ЦНИИС и ЧЛХ” Минздрава России в 2018 г. В ходе исследования пациенты были разделены на три группы по стадиям заболевания и

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва

\*E-mail: [avedyaeva@yandex.ru](mailto:avedyaeva@yandex.ru)



**Рис. 1.** Полуколичественная оценка патологических изменений в эпителии и строме при ХГП средней и тяжёлой степени.

степени прогрессирования пародонтита согласно разработанной новой классификации заболеваний пародонта (EFP 2018) [8]. В 1-ю группу включены 7 пациентов с ХГП средней степени, умеренным уровнем прогрессирования (IIВ). Во 2-ю группу включены 7 пациентов с ХГП тяжёлой степени, умеренным уровнем прогрессирования (IIIВ). В 3-ю группу включены 5 пациентов с интактным пародонтом.

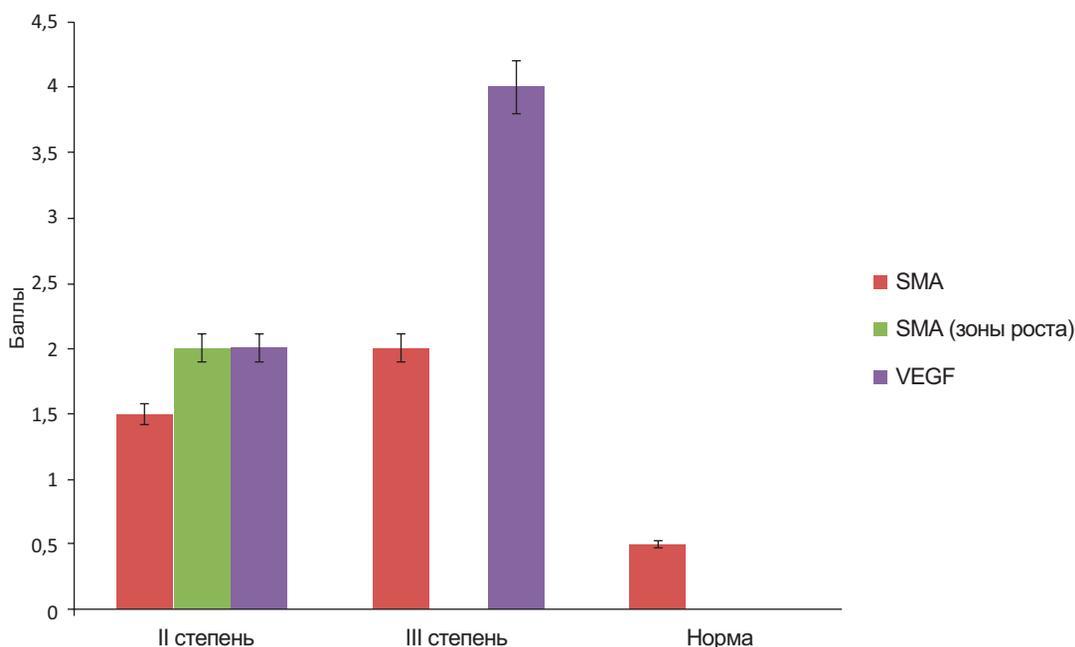
С информированного согласия всем пациентам проводили инцизионную биопсию мягких тканей десны на этапе установки дентальных имплантатов, размер биоптатов в среднем достигал 3×3 мм. Биопсионный материал для исследования фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине и помещали в парафин. Серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван Гизону для морфологической оценки. На серийных парафиновых срезах проводили иммуногистохимические реакции с антителами к Ki-67 (в разведении 1:100, “Dako”), VEGF (в разведении 1:100, Abcam), SMA (“LabVision”, в концентрации 1:100) с последующим докрасиванием ядер клеток гематоксилином Майера. Демаскировка антигенов проводилась в ретривере с цитратным буфером с pH 6,0, при температуре 98 °С в течение 20 мин с последующим остыванием до 60 °С. Результаты реакций SMA, VEGF оценивали полуколичественным методом по

шкале от 1 до 6 баллов. Оценка экспрессии Ki-67 проводилась с расчетом индекса пролиферации (ИП) по проценту пролиферирующих клеток одного типа из расчёта на 300 клеток [7]. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программного пакета для статистических исследований IBM SPSS Statistic 22 (“IBM Corp.”, USA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Морфологическая характеристика*

Хронический генерализованный пародонтит средней степени характеризовался разрастанием грануляционной ткани с воспалительной лимфогистиоцитарной инфильтрацией с примесью плазматических клеток и лейкоцитов на территории мягких тканей. При этом в слизистой обнаруживались небольшие участки некроза эпителия в сочетании с дистрофией клеток плоского эпителия, умеренно выраженным диспаракератозом и акантозом, а также явлениями лейкопидеза (рис. 1). Хронический генерализованный пародонтит тяжёлой степени отличался разрастанием грануляционной ткани со значительно более выраженной воспалительной лимфогистиоцитарной инфильтрацией с большим количеством нейтрофилов и с примесью плазматических клеток, а также очаго-



**Рис. 2.** Полуколичественная оценка иммуногистохимических изменений в эпителии и в строме при хроническом пародонтите средней и тяжёлой степени.

выми грубыми склеротическими изменениями на территории мягких тканей ( $p < 0,05$ ). При этом в слизистой обнаруживались крупные участки некроза эпителия, в сочетании с дистрофией клеток, выраженным диспаракератозом, акантозом и явлениями лейкопедеза (рис. 1). В контрольной группе слизистая оболочка представлена многослойным плоским эпителием без патологических изменений с инвагинацией базального слоя в собственную пластинку слизистой, подслизистый слой с редкими тонкостенными сосудами и единичными лимфогистиоцитарными элементами. При окраске по Ван Гизону диффузное отложение коллагеновых волокон (рис. 1).

#### *Иммуногистохимическая характеристика тканей пародонта*

Хронический генерализованный пародонтит средней степени сопровождался повышенной пролиферативной активностью сохранных клеток эпителия (12,5%), клеточных элементов грануляционной ткани, эндотелия сосудов и фибробластических элементов (7,5%). При этом основные очаги пролиферации в грануляционной ткани обнаруживались вокруг сосудов, где имелась гиперплазия SMA-позитивных клеток, которые в литературе называются зонами роста. VEGF-позитивные клетки в небольшом количестве определялись в собственной пластинке слизистой, а также в эндотелии сосудов ( $p < 0,05$ ), рис. 2, 3. Хронический

генерализованный пародонтит тяжёлой степени сопровождался повышенной пролиферативной активностью как сохранных клеток эпителия (22,5%), так и клеточных элементов грануляционной ткани, прежде всего эндотелия сосудов и фибробластических элементов (7,5%) ( $p < 0,05$ ). При этом пролиферирующие и SMA располагались разрозненно и не формировали так называемых зон роста (рис. 2, 3,  $p < 0,05$ ). VEGF-позитивные клетки в умеренном количестве в собственной пластинке слизистой, в основном в клетках сосудистой стенки (рис. 3,  $p < 0,05$ ). В контрольной группе обнаружены единичные пролиферирующие клетки в эпителии и в подслизистом слое, а также SMA-позитивные клетки в периваскулярной зоне в соединительной ткани. Экспрессия VEGF в единичных клетках стромы (рис. 2, 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведённого исследования установлено, что морфологическими отличиями ХГП тяжёлой степени от средней являются не только более выраженная воспалительная реакция с активацией неоангиогенеза в связи с образованием грануляционной ткани, повреждение покровного эпителия, связочного аппарата и склероз, но и иммуногистохимические различия. Хронический генерализованный пародонтит тяжёлой степени отличается более высокой пролиферативной активностью эпителия, что отражает его гиперпластические изменения, а

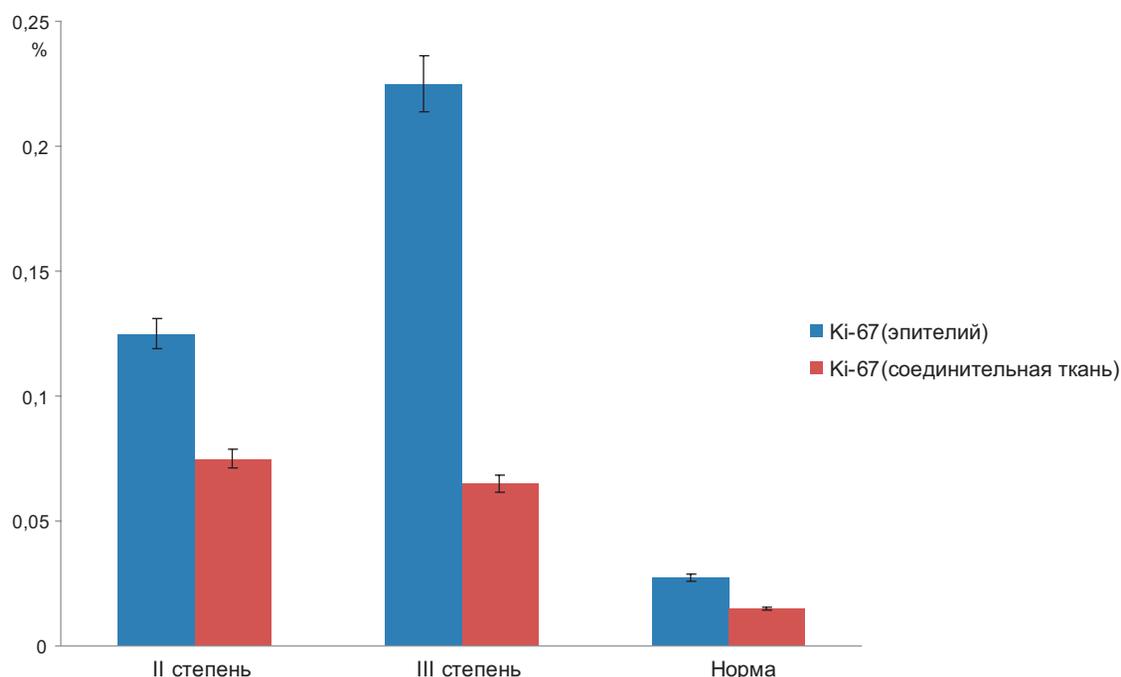


Рис. 3. Ki-67 в эпителии и в строме при хроническом пародонтите средней и тяжёлой степени.

также меньшим содержанием SMA-позитивных клеток и практически отсутствием формирования приваскулярных муфт из SMA-позитивных клеток, которые в тканях ассоциируются с зонами роста.

Пролиферативная активность, судя по Ki-67 (MIB1), в основном сосредоточена в базальных и парабазальных слоях эпителия, а также в строме, в участках роста грануляционной ткани, что подтверждается экспериментальными исследованиями [3]. SMA-позитивные клетки, обнаруженные нами, по всей вероятности, судя по их локализации в области зон роста и в сосудах, не являются истинными миофибробластами, а скорее относятся к клеткам более ранней дифференцировки, что описано в экспериментальных исследованиях, как клетки с признаками стволовости [4].

Нами установлено, что иммуногистохимические отличия ХГП тяжёлой степени по сравнению с пародонтитом средней степени проявляются в виде достоверного повышения пролиферации клеток по показателям Ki-67 в эпителии в 2 раза, а также ангиогенеза по показателям VEGF в грануляционной ткани в 2 раза при одновременном снижении содержания SMA-позитивных клеток в грануляционной ткани, которые принимают активное участие в регенерации и составляют ключевой пул регенерирующих тканей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанное противоречие свидетельствует о наличии у пациентов с ХГП тяжёлой степени дискоординации процессов, участвующих в репарации тканей, что в итоге проявляется гиперплазией эпителия и склерозом подлежащих мягких тканей, выявленных нами при исследовании гистологических препаратов. Фактически регенерация тканей идет по механизмам субституции (неполной регенерации) и может считаться плохим прогностическим признаком для репарации тканей. Можно высказать предположение, что при ХГП тяжёлой степени высокий ангиогенез не обеспечивает в полной мере репарацию тканей, так как по морфологическим данным в тканях наблюдается хроническое воспаление, развивается гиперплазия эпителия и склероз. Следовательно, можно предположить, что и регенераторный потенциал при ХГП тяжёлой степени ниже, чем при ХГП средней степени, а в случае проведения операции имплантации зубов требует дополнительного лечения, направленного на противовоспалительное и прорегенераторное воздействие.

**Источник финансирования.** Научно-исследовательская работа проводится при поддержке внутривузовского гранта ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (г. Москва, 2019 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Перова М.Д., Карнюк В.Б., Козлов В.А., Севостьянов И.А., Ананич Ю.А.* Влияние хирургического лечения пародонтита с дополнительным источником регенерации на состояние околоимплантатных тканей // Институт стоматологии. 2018. № 4 (81). С. 37–39.
2. *Bullon P., Fioroni M., Goteri G., et al.* Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and periimplantitis condition, and aggressive periodontitis // *Clin. Oral Impl. Res.* 2004. № 15(5). P. 553–559.
3. *Xu H., He Y., Feng J.Q., et al.* Wnt3 $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  induce myofibroblast differentiation from periodontal ligament cells via different pathways // *Exp. Cell Res.* 2017. № 353(2). P. 55–62. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.12.026
4. *Zhao X., Gong P., Lin Y., et al.* Characterization of  $\alpha$ -smooth muscle actin positive cells during multilineage differentiation of dental pulp stem cells // *Cell Prolif.* 2012. № 45(3). P. 259–265. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00818.x
5. *Roman A., Páll E., Mihu C.M., et al.* Tracing CD34+ Stromal Fibroblasts in Palatal Mucosa and Periodontal Granulation Tissue as a Possible Cell Reservoir for Periodontal Regeneration // *Microsc. Microanal.* 2015. № 21(4). P. 837–848. doi: 10.1017/S1431927615000598
6. *Cheung J.W., McCulloch C.A., Santerre J.P.* Establishing a gingival fibroblast phenotype in a perfused degradable polyurethane scaffold: mediation by TGF- $\beta$ 1, FGF-2,  $\beta$ 1-integrin, and focal adhesion kinase // *Biomaterials.* 2014. № 35(38). P. 10025–10032. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.09.001
7. *Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C., et al.* Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis // *Hepatology.* 1981. № 1(5). P. 431–435.
8. *Caton J.G., Armitage G., Berglundh T., et al.* // A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions Introduction and key changes from the 1999 classification // *J. Clin. Periodontol.* 2018. V. 45. № 45(20). P. 1–8. doi: 10.1111/jcpe.12935

## IMMUNOISTOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL STUDY OF PERIODONT TISSUES WHEN PREDICTING THE RESULTS OF DENTAL IMPLANTATION IN PATIENTS WITH CHRONIC PARODONTITIS

Academician of the RAS **A. A. Kulakov<sup>1,2</sup>**, **E. A. Kogan<sup>1</sup>**,  
**T. V. Brailovskaya<sup>1,2</sup>**, **A. P. Vedyeva<sup>1,2</sup>**, **N. V. Zharkov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

Received April 9, 2019

A morphological and immunohistochemical study of 24 gums biopsies was conducted in 19 patients aged 35–60 years with a diagnosis of partial secondary edentulous, chronic generalized periodontitis of moderate and severe degree (14 patients), and also without pathological changes in the periodontal disease (5 patients), who underwent dental implantation. Immunohistochemical reactions with antibodies to Ki-67, VEGF, SMA were performed on serial paraffin sections. It has been established that chronic periodontitis is characterized by a higher proliferative activity of the epithelium, which reflects its hyperplastic changes, as well as a lower content of SMA positive cells and the practical absence of the formation of privascular couplings from SMA-positive cells that are associated in tissues with “growth zones”, which indirectly indicates reduced tissue regenerative capacity. Therefore, in the case of the operation of dental implantation requires additional treatment aimed at anti-inflammatory and pro-regenerative effects.

**Keywords:** chronic periodontitis, growth zones, regenerative potential, Ki-67, VEGF, SMA.