

Debreceni Orvostudományi Egyetem Stomatológiai Klinika
(igazgató: dr. Keszthelyi Gusztáv egyetemi tanár), Debrecen
*Restauratív Fogászati Tanszék
(tanszékvezető: dr. Márton Ildikó egyetemi docens), Debrecen
**Patológiai Intézet (igazgató: dr. Nemes Zoltán egyetemi tanár), Debrecen
***Gyermekklinika (igazgató: dr. Oláh Éva egyetemi tanár), Debrecen

A sejtes összetétel, az aktivált állapotú sejtek vizsgálata granuloma apicaleban

DR. MÁRTON ILDIKÓ*, DR. RADICS TÜNDE, DR. SZAKÁLL SZABOLCS** és DR. KISS CSONGOR***

A granuloma apicale a periapicalis tér gyakori idült gyulladásos kórfarmája. Szövettanilag a fog gyökércsúcsa körül elhelyezkedő, kötőszövetes tokkal körülvett, krónikus gyulladásos sejtekkel beszűrt perzisztáló sarjszövet [13]. Kialakulásának oka a periapicalis tér fertőződése [5]. A fertőzés az esetek többségében a fog üregrendszere, ritkábban a parodontalis szövetek felől, esetenként egyidejűleg mindkét irányból terjed a periapicalis szövetek közé. A szervezet védekezése, a specifikus és a nem specifikus immunválasz nem képes eliminálni a szövevényes gyökércsatorna-rendszerben, a tasakok mélyén megbújó fertőzést, de a továbbterjedést feltartóztatja. Az állandó kiváltó inger hatására a periapicalis tér gyulladása állandósul. A védekező sejtek között lymphocyták, plazmasejtek, macrophagok, natural killer sejtek, granulocyták, hízósejtek találhatóak. A laesiót felépítő sejtek arányára vonatkozó vizsgálatok során az egyes munkacsoportok eltérő, esetenként ellentmondásos eredményeket észleltek [7, 9, 11, 16, 18, 20]. Emellett ez ideig kevés, főleg állatkísérletes próbálkozás történt a felépítő sejtek között lévő aktivált állapotú sejtek arányának meghatározására [14, 15]. A gyulladásos folyamatokban részt vevő, aktivált állapotban lévő sejtek solubilis mediatápanyagokat termelnek, amelyek a sejtek egymás közötti kölcsönhatásának szabályozásán túl a gyulladástól távoli szervek, szervrendszerek működésére is hatnak [21]. Az egyik leggyakoribb odontogén „góc”-ként számontartott granuloma apicale feltételezett távolhatása, „góc”-szerepe a felépítő sejtek, ezen belül az aktivált állapotú sejtek arányának ismerete nélkül nem tisztázható.

Köszönetnyilvánítás: a munka a DOTE Mec. 16/96., OTKA T025853 pályázatok támogatásával készült. A szerzők köszönetet mondanak Kovácsné Virág Juditnak és Drecea Virgilnek a technikai segítségért.

Érkezett: 1999. január 31.
Elfogadva: 1999. március 7.

Tanulmányunk során célul tűztük ki a granuloma apicalet felépítő sejtek: a CD3⁺ T-lymphocyták, CD4⁺ CD8⁺ alcsoportjaik, a CD14⁺ macrophagok, a CD56⁺ natural killer sejtek arányának vizsgálatát. Külön figyelmet szenteltünk az aktivált állapotú, CD25⁺ T-lymphocyták és a CD68⁺ macrophag sejtek meghatározására a periapicalis szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata során.

Anyag és módszer

Vizsgálataink során 20 granuloma apicalét tanulmányoztunk. A szövetmintákat a betegek beleegyezésével a DOTE Stomatológiai Klinikáján extractio vagy endodontiai kezelést követő sebészi beavatkozás során nyertük. Az eltávolított mintákat hossz tengelyüknek megfelelően feleztük. Az egyik felet rutin szövettani vizsgálattal dolgoztuk fel, míg a másik felet propane-ban történő lehűtést követően folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk. Negatív kontrollként gyulladásmentes gingiva-szövetrészlet szolgált. A cryostaton metszett 4 µm vastag metszeteket levegőn szárítottuk, és alumíniumfóliába csomagolva -20°C-on tároltuk a feldolgozásig. A vizsgálat során a mintákat szobahőn felolvasztottuk, majd 10 percig acetonban fixáltuk. A jelölés avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) módszerrel történt, melynek részeként először az endogén peroxydase-aktivitást gátoltuk 0.2% H₂O₂ alkoholos oldatában 30 percig szobahőn. A továbbiakban pH 7,6-os Trispufferolt sóoldatos öblítést követően 20 perces 3% bovinszérum albumint tartalmazó Tris-pufferolt sóoldatban történő előinkubáció következett szobahőn az aspecifikus kötődés gátlására, majd a megfelelő hígítású első antitesttel történő inkubáció 4°C-on egy éjszakán át. A CD3, CD4, CD8, CD14, CD25, CD56 és CD68 antigén ellenes egérben termelt antihumán monoclonalis antitest DAKO (A/S, Denmark) készítmény volt. A jelölés során negatív kontrollként humán reaktivitással nem rendelkező egérben termelt monoclonalis ellenanyagot használtunk. Az első antitesttel történő jelölést 3-szori 5 perces Tris-pufferolt sóoldatos öblítés követte. A második jelölés során biotinylált, lóban termelt egérellenes IgG antitesttel kezeltük a metszeteket 60 pecig szobahőn, majd ismételt 3-szori mosás után avidin-biotin-komplex (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) kezelés történt szobahőn 45 percig, végezetül alapos mosást követően diaminobenzidine-H₂O₂-oldatos kezelés következett. A folyóvízes mosás után haemalaunos (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) háttérfestés, dehidrálás, fedés fejezte be a metszetek kezelését a fénymikroszkópös kiértékelés előtt. A kvantitatív értékelés folyamán az ugyanabban a látótérben számolt jelölt sejtek számát viszonyítottuk az összes mononuclearis gyulladásosejt számához (100%). Minden antitesttel történő jelölésből 2-2 metszetet kiválasztva 10-10 random módon választott centrális és perifériás mezőben kapott arányból átlagot számolva kaptuk meg a pozitív sejtek végső arányát. A mor-

fológiai vizsgálat során az immunhisztokémiai jelölés mellett heamatoxylin-eozin, Giemsa és van Gieson festett metszeteket is értékeltünk.

A vizsgálat során felhasznált monoclonalis antitestek specificitását és hígítását az *I. táblázatban* tüntettük fel.

I. Táblázat

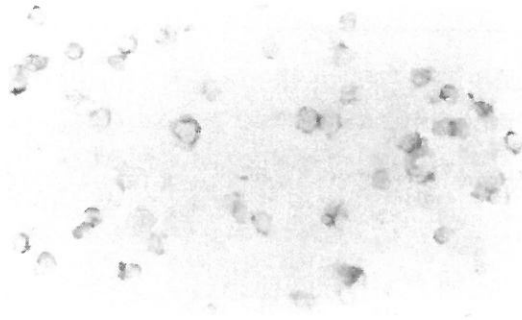
Az alkalmazott monoclonális antitestek specificitása és hígítása

Monoclonalis antitest	Antigén specificitás	Antigén megjelenés	Hígítás
OKT3	CD3	T lymphocyták	1:50
MT310	CD4	helper and inducer T sejtek	1:20
C8/144B	CD8	cytotoxic and szuppressor T sejtek	1:100
TÜK4	CD14	érett monocyták és macrophagok egyes granulocyták	1:20
ATC1	CD25	aktivált T sejtek, B sejtek, natural	1:50
MOC-1	(IL-2receptor α -lánc) CD56	killer sejtek, transformált T-sejt vonalak	
		natural killer sejtek, neuroectodermalis sejtek	1:50
KP1	CD68	aktivált macrophagok, monocyta, myeloid sejtek	1:100

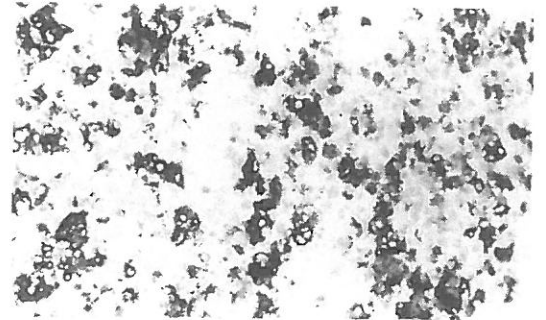
Eredmények

A granuloma apicale morfológiai értékelése során a laesióban keverten elhelyezkedve nagy számban találtunk lymphocytákat, plazma-sejteket, macrophagokat, kisebb arányban natural killer sejteket, neutrophil és eosinophyl granulocytákat valamint fibrovascularis elemeket. Esetenként habos sejtek, Malassez-féle epitheliális elemek és Russel-testek is megfigyelhetők voltak. A laesio perifériáján kollagén rostokból álló kötőszöveti tok határolta az elváltozást. A kötőszöveti rostok között néhány helyen kis csoportokban hízósejtek voltak megfigyelhetők. Az immunhisztokémiai vizsgálat során a sejtek felületén megjelenő barna gyűrű-sejtmembrán típusú jelölődés mutatta a megfelelő ellenanyaggal végzett reakció pozitivitását. A CD3⁺ T-lymphocyták átlagértéke az összes felépítő mononukleáris sejt közel 50%-át tette ki, számuk arányban állt a CD4⁺ és CD8⁺ jelölés során pozitívnak észlelt T-lymphocyták számával. A CD4⁺ és CD8⁺ sejtek következetesen egyenletes eloszlásban voltak jelen a laesióban. A CD8⁺ sejtek száma kis fokban meghaladta a CD4⁺ sejtek számát. A CD14⁺ macrophagok, a T-lymphocytákhoz hasonlóan egyenletes eloszlásban, de alacsonyabb számban, míg a CD56⁺ natural killer sejtek ennél is alacsonyabb számban voltak megfigyelhetők a granuloma apicalét felépítő sejtek között. A jelen lévő sejtek jelentős hányada

reagált az aktivált állapotra utaló CD marker ellenes monoclonalis antitesttel. A CD25 monoclonalis antitesttel reagáló sejtek kis lymphocita morfológiájú, míg a CD68 monoclonalis antitesttel pozitív reakciót adó sejtek nagy szabálytalan, macrophag morfológiájú sejtek voltak. Az 1. ábrán CD3⁺ T-lymphocyták, míg a 2. ábrán CD68⁺ aktivált állapotú macrophag sejtek láthatók a granuloma apicale centrumában.



1. ábra. CD3⁺ T-lymphocyták granuloma apicale granulomatosis zónájában. 400× nagyítás.



2. ábra. Aktivált állapotú, CD68⁺ macrophagok granuloma apicale granulomatosis zónájában. 200× nagyítás.

Az immunhistochemiai vizsgálat során észlelt eredményeket a II. táblázatban összesítettük.

II. Táblázat

Immunhisztokémia vizsgálattal meghatározott mononuclearis sejtek aránya granuloma apicaleban

Antigén	Szöveti eloszlás	Arány (%)	
		szórás	átlag
CD3	T sejtek	39–71	55
CD4	Helper és inducer T sejtek	15–32	23
CD8	Cytotoxic és suppressor T sejtek	25–44	34
CD14	Monocyták és macrophagok, egyes granulocyták	14–27	22
CD56	Natural killer sejtek	10–42	21
CD25 (IL-2R α)	Aktivált T sejtek, B sejtek, monocyták és macrophagok	34–58	48
CD68	Aktivált macrophagok	25–72	55

Megbeszélés

A periapicalis tér krónikus gyulladásai (granuloma apicale, cysta radicularis) következményes elváltozások, amelyek kiváltó oka a periapicalis szövetek közé jutó kevert, obligát anaerob túlsúlyú fertőzés [6, 22]. A fertőzés elsősorban a fog üregrendszere, ritkábban a fog

károsodott támasztószövetei, esetenként egyidejűleg mindkét irányból éri el az apex környékét. A térbe jutó bakteriális komponensek, toxinok erős antigenitásuk révén specifikus és nem specifikus immunválaszokat indítanak el, melyek fő célja a szervezetbe behatolni igyekvő fertőzés eliminálása [13]. E cél megvalósításában ugyan a védekezés sikertelen, mivel nem képes a fog szövetes csatorna-rendszerében, a károsodott parodontalis szövetek között megbújó fertőzést eltávolítani, a szervezetbe való továbbterjedésének azonban eredményesen gátat vet. Az állandó antigén inger hatására a védekezés, a gyulladás állandósul. A krónikus gyulladás szövettani képére a nagy számú lymphocytá, plazmasejt, macrophag kisebb számú natural killer sejt, többmagvú óriássejt és hízósejtek jelenléte jellemző. E sejtek a védekező immunreakciók valamennyi típusának kivitelezésére képesek [1, 4, 8]. A granuloma apicale vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a felépítő sejtek között legnagyobb arányban T-lymphocyták találhatók, a felépítő sejtek közel 50%-át teszik ki. A T-lymphocytá sejtek nem homogén sejtcsoportok CD4⁺ helper/inducer sejtek és CD8⁺ cytotoxikus/szuppresszor sejtek alkotják, mely sejtek aránya egészséges körülmények között a perifériás vérben az a nyirokszövetekben 2:1 a helper/inducer T-lymphocyták javára. Számos munkacsoport vizsgálta e két sejtpopuláció arányát a granuloma apicaléban, de közölt eredményeik eltérőek. Az eltérő eredményeket a különböző vizsgáló és kiértékelő módszerek magyarázhatják. *Stashenko* [19] kísérletesen előidézett granuloma apicale sejtösszetételére vonatkozó vizsgálata során azt tapasztalta, hogy a laesio kialakulását követően kezdetben a CD4⁺ helper/inducer sejtek jelenléte dominál szemben a CD8⁺ sejtekével, amely arány a laesio állandósulásakor megfordul CD8⁺ sejtek javára. Amennyiben a rágcsálókban tapasztalt eredményeket a humán periapicalis laesióra vonatkoztatjuk, úgy az egyes vizsgálók által a CD4/CD8 arányban észlelt eltéréseket, változásokat a folyamat dinamikája magyarázhatja. Munkacsoportunk *Stashenko* [19] eredményeihez hasonlóan a CD8⁺ lymphocyták túlsúlyát tapasztalta a krónikus elváltozás sejtösszetételének tanulmányozása során. Az eredmény azzal magyarázható, hogy míg a laesio kialakulásának kezdeti fázisában a behatolni igyekvő fertőzést egy erőteljesen működő immunválasz képes csak feltartóztatni, amelyhez a CD4⁺ helper/inducer lymphocyták nagy száma szükséges, addig a krónikus gyulladásban a védekezés már elég hatékony a fertőzés feltartóztatásához, így a szöveti károsodást is okozható immunválaszok visszaszorítása kívánatos, amelyet a CD8⁺ cytotoxicus/szuppresszor T-lymphocyták túlsúlya valósít meg. A laesiót alkotó sejtek között jelentős hányadban vannak jelen CD14⁺ macrophag sejtek és kis hányadban CD58⁺ natural killer sejtek, amely sejtek aránya megfelel a krónikus gyulladásos folyamatokban észlelt arányoknak. A sejtösszetétel tanulmányozása során kevés szerző szentelt figyelmet az aktivált állapotú sejtek arányának vizsgálatára, holott e tény ismerete nélkül nem lehetséges a laesio felté-

CD4 CD8
ratio

CD3⁺
-> chr.
gyulladás

?

telezett távolhatásának, a „góc” szerepének megítélése. Az aktivált állapotú sejtek ugyanis szolubilis mediátoranyagot termelnek, amelyek az immunreakciók sejt-sejt közötti kölcsönhatásának szabályozásán túl távoli szervek, szervrendszerek működését is befolyásolhatják [10]. Ilyen mediátoranyagok a lymphocyták és phagocyták által termelt interleukinek közül az interleukin-1 és -6 (IL-1, IL-6) az interferon γ (IFN- γ), a tumor necrosis factor α (TNF- α) (10). IL-1, IL-6 jelenlétét krónikus apicalis periodontitisben már leírták [2, 3]. A gyulladásos reakció változását igen érzékenyen követő, a gyulladással szembeni védekezésben több fronton is résztvevő IL-6 hatásra kialakuló akutfázis-reakció meglétét és megszűnését a granuloma apicale fennállásakor és eltávolítását követően munkacsoportunk is igazolta [12]. Az aktivált állapotú sejtek kísérletes vizsgálata azon alapul, hogy aktivált állapotban jellegzetes markerek jelennek meg a sejtek felszínén, amelyek megfelelő monoklonális antitestek felhasználásával kimutathatók [17]. Ilyen aktivációs marker a T-lymphocyták felszínén megjelenő CD25 antigénnel identikus IL-2 receptor α -lánc alegysége, a phagocytasejtek CD68 antigénje. A granuloma apicale sejtjeinek vizsgálata során tapasztalt eredményeink szerint a felépítő sejtek jelentős hányada aktivált állapotban van. Az általuk termelt szolubilis mediátoranyagok képesek lehetnek más szervek és szervrendszerek működését befolyásolni. Annak a kérdésnek a megválaszolásához azonban, hogy a granuloma apicale lehet-e odontogén „góc”, további kísérletek szükségesek. E kísérletek során a gondosan megválasztott, feltételezetten gócbetegségben szenvedő betegcsoportok, góctalanító kezelése és ezzel párhuzamos vér- és szérumparamétereinek elemzése szükséges. A góctalanító kezelést követően a gyógyulás várható időpontjában újbóli vér- és szérumparaméter értékelést kell végezni. Munkacsoportunk célul tűzte ki a fentebb említett góctalanítással egybekötött utánkövetéses vizsgálatok elvégzését.

IRODALOM: 1. *Barkhordar, R. A., Desouza, Y. G.*: Human T-lymphocyte subpopulations in periapical lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 65, 763, 1988. – 2. *Barkhordar, R. A., Hussain, M. Z., Hayashi, C.*: Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesion. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 73, 334, 1992. – 3. *Euler, G. J., Miller, G. A., Hutter, J. W., D'Alesandro, M.*: Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues. *J. Endod.* 24, 480, 1998. – 4. *Johannessen, A. C., Nilsen, R., Skaug, N.*: Deposits of immunoglobulins and complement factor C3 in human dental periapical inflammatory lesions. *Scand. J. Dent. Res.* 91, 191, 1983. – 4. *Johannessen, A. C., Nilsen, R., Skaug, N.*: Enzyme histochemical characterization of mononuclear cells in human dental periapical chronic inflammatory lesions. *Scand. J. Dent. Res.* 92, 325, 1984. – 5. *Kakehashi, S., Stanley, H. R., Fitzgerald, R. J.*: The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 20, 340, 1965. – 6. *Kawashima, N., Okiji, T., Kosaka, T., Suda, H.*: Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: A quantitative immunohistochemical study. *J. Endod.* 22, 311, 1996. – 7. *Konttinen, S., Ranta, H., Lautenschlager, I.*: Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J. Oral Pathol.* 15, 544, 1986. – 8. *Kopp, W.*:

Immunologische Prozesse in apikalen Granulationsgewebe. 1. Die humorale Immunantwort. Dtsch. Zahnartzl. Z., 40, 944, 1985. – 9. Kopp, W., Schwarting, R.: Differentiation of T-lymphocyte subpopulations, macrophages, HLA-DR restricted cells in apical granulation tissue. J. Endod. 15, 72, 1989. – 10. Hamada, S., Holt, S. C., McGhee, J. R. (eds): Periodontal Disease: Pathogens and Host Immune Responses. Quintessence Publishing Co. Ltd. 2-1, Kanda Surugadai, Chiyodaku, Tokyo 101, Japan, 1991. 329-343. – 11. Lukic, A., Arsenijevic, N., Vujanic, G., Ramic, Z.: Quantitative analysis of the immunocompetent cells in periapical granuloma: Correlation with the histological characteristics of the lesions. J. Endod. 16, 119, 1990. – 12. Márton, I., Kiss, C., Balla, G., Szabó, T., Karmazsin, L.: Acute phase proteins in patients with chronic periapical granuloma before and after surgical treatment. Oral Microbiol. Immunol. 3, 95, 1988. – 13. Nair, P. N. R.: Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host responses. Periodontology 2000. 13, 121, 1997. – 14. Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Matsumoto, A., Kobayashi, C., Suda, H.: An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells especially macrophages, Ia antigen-expressing cells of heterogenous populations in normal rat molar pulp. J. Dent. Res. 71, 196, 1992. – 15. Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Kobayashi, C., Suda, H.: Distribution of Ia-antigen expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. J. Endod. 20, 27, 1994. – 16. Piatelli, A., Artese, L., Rosini, S., Quarenta, M., Musiani, P.: Immune cells in periapical granuloma: Morphological and immunohistochemical characterization. J. Endod. 17, 26, 1991. – 17. Roit, I. M., Brostoff, J., Male, D. K. (eds): Immunology, J. B. Lippincott Company Philadelphia, Philadelphia, 1990. 9.2-9.12. – 18. Sol M-A., Thaczuk, J., Voight, J.-J., Durand, M., Sixou, M., Maurette, A., Thomsen, M.: Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. Oral Microbiol. Immunol. 13, 253, 1998. – 19. Stashenko, P., Yu, S. M.: T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. J. Dent. Res.: 68, 831, 1989. – 20. Stashenko, P., Yu, S. M., Wang, C. Y.: Kinetics of immune cell and bone resorption responses to endodontic infections, J. Endod. 18, 422, 1992. – 21. Paul, W. E. (ed.): Fundamental Immunology 3rd edn. Raven Press Ltd., New York, 1993. 467-502. – 22. Wang, C. Y., Stashenko, P.: Kinetics of boneresobing activity in developing periapical lesions. J. Dent. Res. 70, 1362, 1991.

Dr. Márton, I., dr. Radics, T., dr. Szakáll, Sz., dr. Kiss C.: *Analysis of Activated Cells in Apical Perilodontitis*

The ratio and in situ distribution of CD3⁺ T-lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ subsets, CD14⁺ macrophages, CD56⁺ natural killer cells and CD25⁺ activated T-lymphocytes and CD68⁺ activated macrophages were determined in 20 chronic peripical granulomas by immunohistochemical method using monoclonal antibodies. CD3⁺ T-lymphocytes made up about 50% of the mononuclear cells. CD14⁺ macrophages were distributed all over the area but their proportion was much less that that of the T-lymphocytes. CD56⁺ natural killer cells made up a small proportion of the cells. The major proportion of the T-lymphocytes and macrophages were in activated stage within the lesion.