

УДК 616.314.18.-002.2/4-092

**Роль імунних клітин тканин пародонту в патогенезі хронічного генералізованого пародонтиту**

Шинкевич В.І.

Резюме

**Роль імунних клітин тканин пародонту в патогенезі хронічного генералізованого пародонтиту**

Шинкевич В.І.

Сучасний рівень наукових досягнень дозволяє вважати хронічний пародонтит імуноопосередкованим захворюванням. Не дивлячись, що перевага лімфоцитів серед клітин інфільтрату in locus morbi при хронічних формах пародонтитів, була показана досить давно, власні результати дослідження вперше на Україні продемонстрували його субпопуляційний склад. Імунні клітини, що інфільтрують ясна при хронічному генералізованому пародонтиті наведені: визріваючими антиген-презентуючими дендритними клітинами, CD3<sup>+</sup> Т-клітинами, CD4<sup>+</sup> Т-хелперами/регуляторами, CD8<sup>+</sup> цитотоксичними/ефекторними лімфоцитами,  $\gamma\delta^+$  внутрієпітеліальними лімфоцитами і CD20<sup>+</sup> В-клітинами. Кількісні та якісні характеристики цих клітини дозволяють оцінити їх внесок в патогенез пародонтиту.

*Ключові слова: хронічний генералізований пародонтит, імунопатогенез, імунні клітини*

Сучасний рівень наукових досягнень дозволяє вважати хронічний пародонтит імуноопосередкованим захворюванням. Велика кількість досліджень присвячена розкриттю ураження тканин пародонта як результата комбінованого впливу мікроорганізмів і захисних процесів власних тканин макроорганізму, навіть переважанню у деструкції останніх [10].

Деструкція тканин пародонта, викликана мікроорганізмами, опосередкована прямими і непрямими універсальними механізмами. Прямий негативний вплив чинять бактерії та їх продукти: ензими (колагеназа, гіалуронідаза, хондроїтиназа, кисла фосфатаза), ендотоксини та метаболіти (бутират, пропіонат, поліаміни амонію, сульфовані компаунди). Бактерії та їхні

компоненти: пептидогліканги, тейхоева кислота, фімбрії, зовнішні мембранні протеїни, капсула та ліпополісахариди стимулюють розвиток імунних реакцій макроорганізму, здатних викликати важку тканинну деструкцію.

Важливе питання складає дослідження клітин, що реалізують локальні імунні реакції при хронічних запальних захворюваннях тканин пародонта. Тому метою дослідження було встановлення кількісних та якісних характеристик основних імунних клітин-представників адаптивного імунітету, що знаходяться безпосередньо у місці ураження при хронічному генералізованому пародонтиті (ХГП) для з'ясування їх внеску в деструкцію пародонту.

Матеріали та методи дослідження. Під спостереженням знаходилися пацієнти віком 41- 60 років з хронічним генералізованим пародонтитом (n=30). До групи порівняння були обрані особи, врівноважені за віком та статтю, з інтактним пародонтом (n=6). Місцевий статус тканин порожнини рота з'ясовували при клінічному стоматологічному дослідженні.

У дослідження включали осіб з необтяженим алергологічним анамнезом; без хронічних системних захворювань крові, шлунково-кишкового тракту, сполучної тканини; без цукрового діабету та системних серцево-судинних захворювань, що підтверджувалося клінічним, біохімічним аналізами крові з визначенням показників гемоглобіну, його середньої концентрації, та середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті; гематокриту; еритроцитів, їх середнього об'єму; лейкоцитів, тромбоцитів, нейтрофілів, еозинофілів, базофілів, лімфоцитів, моноцитів; міжнародне стандартизоване співвідношення; креатині; загальний білірубін, АЛТ, АСТ,  $\gamma$ - глутамілтранс-пептидаза, натрій, калій, кальцій, мочеви́на, холестерин, тригліцериди, глюкозу, ТТГ, частковий тромбопластиновий час, а також рівень загального білку; та аналізами сечі, з визначенням, окрім загальних, показників білку, цукру, ацетону (данні не наводяться) (по заключенням відповідних лікарів-інтерністів).

Діагноз «хронічний генералізований пародонтит» встановлювали за класифікацією Данилевського М.Ф. (1994). Діагностику здійснювали на основі

результатів загальноприйнятих клініко-інструментальних досліджень (індекси та проби), ступінь тяжкості підтверджували рентгенографічно.

Матеріалом досліджень служили біоптати ясен, які отримували у пацієнтів під час оперативного втручання за відповідними показами, під анестезією та без шкоди для здоров'я. Всі маніпуляції пацієнтам проводили за дозволом етичної комісії Української медичної стоматологічної академії, на базі кафедр та Центральної науково-дослідної лабораторії УМСА. Біоптати, поміщені в 6% розчин карбоксиметилцелюлози (Sigma, USA), заморожували в рідкому азоті. Виготовляли серійні кріостатні зрізи, товщиною 5-7 мкм. Імуногістохімічне та гістологічне дослідження на кріостатних зрізах проводили як описано раніше [6]. Використовували первинні моноклональні антитіла (мкАТ 1) до CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-DR-антигенів імуніцитів людини ("Сорбент", Росія) [1], та антитіла до  $\gamma\delta$ -ланцюгів Т-клітинного рецептора (ТКР) лімфоцитів людини ("CALTAG Laboratories", UK) [2]. Локалізацію мкАТ 1 виявляли у непрямій авідін-біотин-пероксидазній реакції з проявкою розчином аміноетілкарбазолу та контрастуванням гематоксиліном [6]. Імунореактивні клітини підраховували окремо в межах епітелію – на 100 епітеліоцитів, і у власне слизовій – на стандартну площину [6]. Результати досліджень документували фотографічно.

Статистичну обробку цифрового матеріалу здійснювали за допомогою непараметричних методів: Ван-дер-Вердена, Kruskal-Wallis ANOVA & Median Test програми STATISTICA.

Лімфоїдний склад клітинних інфільтратів, що зосереджені *in locus morbi* при хронічних формах пародонтитів, був показаний досить давно [12]. Не дивлячись на це, власні дослідження вперше на Україні надали змогу продемонструвати які саме субпопуляції лімфоцитів складають цей інфільтрат [3].

Антиген-презентуючі дендритні клітини (АПК або ДК) ясен визначали за високим рівнем експресії HLA-DR-молекул; загальна Т-клітинна популяція характеризувалася CD3-експресією; Т-хелпери/регулятори – CD4-експресією;

цитотоксичні/ефекторні Т-лімфоцити (ЦТЛ) – CD8-експресією; внутрієпітеліальні лімфоцити, які несуть у складі ТКР  $\gamma\delta$ -ланцюги, були  $\gamma\delta^+$  (позитивними); і В- клітини на стадії розвитку від пре В-клітин до В-бластів були CD20<sup>+</sup> [1].

Результати показали, що в інфільтратах присутні всі досліджувані імунні клітини. Для приклада наведено мікрофотографію, яка ілюструє числені CD3<sup>+</sup> клітини, що інфільтрують ясна хворого А. при ХГП II ступеню тяжкості (рис.1).

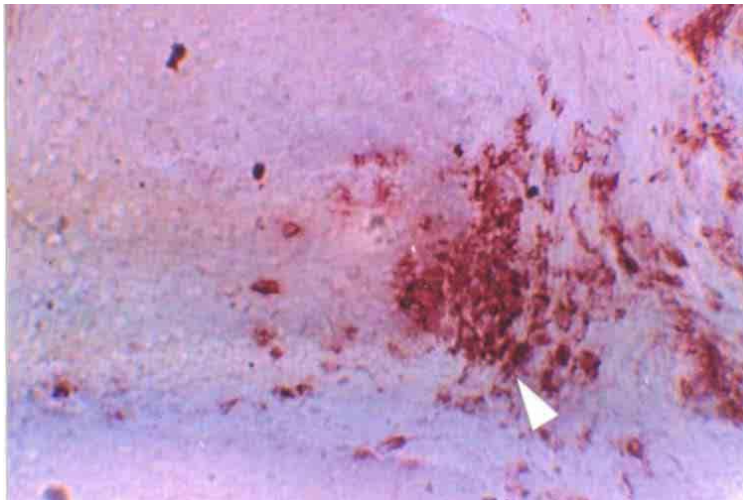


Рис. 1. Скупчення CD3<sup>+</sup> клітин, які складають інфільтрат у яснах при ХГП II ступеня тяжкості. Кріостатний зріз; мкАТ1 – CD3; проявка - аміноетилкарбазол; контрастування – гематоксилін; зб.х60.

За змінами кількісних (рис. 2, 3) і якісних характеристик основних імунних клітин ясен було встановлено чітку відповідність імунних процесів у пацієнтів до певного ступеня тяжкості захворювання.

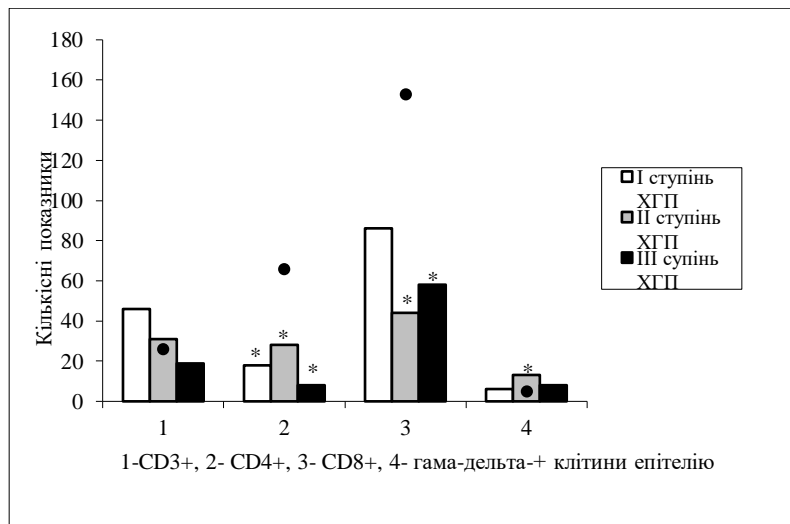


Рис. 2. Кількісна динаміка субпопуляцій Т-клітин, локалізованих в епітелії ясен.  
Примітка. Тут і далі: \* –  $p < 0,05$ .

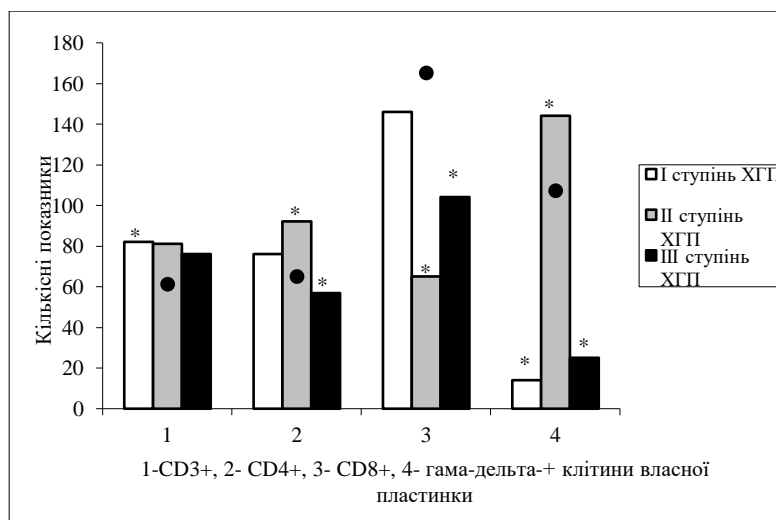


Рис. 3. Кількісна динаміка субпопуляцій Т-клітин, локалізованих у власній пластинці ясен

Інтерпретація кількісних та якісних показників імуніцитів заключається в тому, що при ХГП I ступеню у центрі імуніологічних подій знаходиться процес затримки АПК у власній пластинці, що передбачає активну локальну презентацію. Мають місце ефекторні реакції: у вигляді рекрутування  $CD3^+$  клітин до власної пластинки; перерозподілу  $CD4^+$  клітин. Доля  $\gamma\delta^+$  клітин у власне слизовій зменшується, порівняно з інтактними яснами, що припускає недостатність їх функції.

II ступені тяжкості також ХГП відповідають інтенсивні процеси рекрутування імуніцитів до тканин ясен:  $HLA-DR^+$ ,  $CD4^+$ ,  $\gamma\delta^+$  клітин – головним чином, до власної пластинки. Ця інфільтрація може означати перебіг

аутоімунних реакцій. Установлено зниження Т-клітинного захисту епітеліального компартменту ясен при II ступені тяжкості (рис. 2).

При III ступені тяжкості ХГП продемонстровано домінування В-клітин у складі інфільтратів власної пластинки на тлі вірогідного зменшення кількості HLA-DR<sup>+</sup> клітин епітелію і Т-клітин обох відділів ясен (рис. 2, 3) Зменшення переважної кількості з досліджуваних імунних клітин означає, що головна роль на остаточному ступені зруйнованості періодонта й міжкореневих перетинок належить неспецифічним механізмам, очевидно, травматичного характеру, і неспецифічним механізмам індукції тканинної деструкції. З іншого боку: підвищення долі CD20<sup>+</sup> клітин відповідає зміні профілю локальної імунної відповіді на антитілоопосередкований. Локальні В-клітини здатні продукувати не лише захисні, але і аутоімунні антитіла – тієї ж специфічності, що і активовані АПК та інші Т-клітини, за умов міжклітинної кооперації.

Сутність імунних процесів при розвитку ХГП відповідно ступеням тяжкості полягає в переміщенні основних взаємодій імуніцитів з епітелію до власної пластинки та високою активністю цих процесів вцілому. Персистенція запалення при ХГП, його поновлення після ремісії підтримується і аутоантигенами, наявність яких підтверджена і раніше [9]. CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцити, CD8<sup>+</sup> цитотоксичні лімфоцити та  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> клітини, які у великій кількості обов'язково присутні в інфільтратах, беруть участь у руйнуванні власних клітин і тканини. При прогресуванні у важкий ступінь захворювання значна доля інфільтратів утворюється CD20<sup>+</sup> В-клітинами, що передбачає підключення локального синтезу антитіл і аутоантитіл, та перехід провідної патогенетичної ролі до В-клітин.

Отже, при ХГП імунна відповідь опосередковує активацію ендогенних деструктивних механізмів і призводить до експресії деградуючих фенотипів серед мігруючих і резидентних популяцій клітин. Ряд наукових робіт підтверджують зв'язок зазначених механізмів з локальною продукцією прозапальних цитокінів і факторів росту [4, 5, 13].

Комплекс регуляторних механізмів, який „управляє” тканинною деструкцією залишається не повністю зрозумілим, хоча недавні дослідження висвітлюють багато суттєвих елементів [11]. Прозапальні цитокіни та фактори росту індують сигнальні шляхи, певні з них є залежними від протеїнкінази С, і призводять до транзиторної експресії транскрипційних факторів c-jun і c-fos. Ініціація транскрипції більшості генів матриксних протеїназ потребує зв'язування транскрипційного фактору AP-1 (c-jun/c-fos) із специфічною промоторною послідовністю, але досягнення максимальних транскрипційних рівнів залежить від взаємодії і з іншими промоторними елементами також. Транскрипцію декількох матриксних протеїназ (ММР) регулюють прозапальні цитокіни ІЛ-1 та ФНП- $\alpha$ . Однак, міра, в якій присутні ензими і цитокіни у кривікулярній рідині, не обов'язково впливає на функцію *per se* – що відображає існування певних просторових або часових зв'язків між експресією металопротеїназ/цитокінів і запаленням ясен [4, 5, 11, 13].

Під впливом мікроорганізмів імунні клітини можуть зазнавати активації та модуляції і ставати джерелом цитокінів, ММР. Відомо, що під час міграції ДК вивільняють ММР-2 та ММР-9, розщеплюючи компоненти сполучної тканини, базальної мембрани, що паралельно підвищує проникність останньої [17]. Припускається, що провідна роль ДК в патогенезі ХГП полягає в індукції аутоімунних процесів [18].

Одним із центральних механізмів регуляції метаболізму кісткової тканини є RANKL-активація попередників та зрілих остеобластів, що веде до підвищення їх життєздатності і запуску остеорезорбції. RANK-L (відомий і як OPG-L) стимулює свій специфічний рецептор RANK, який експресується остеобластами, а також активованими Т-клітинами і ДК мієлоїдного походження [7, 15, 19]. Остеопротегерін (OPG, також відомий як фактор, що пригнічує остеокластогенез (OCIF), рецептор 1 фолікулярно-дендритно-клітинного походження (FDCR-1) або ФНП-рецептор-залежна молекула 1 (TR1)), є конкурентним антагоністом RANK-L, і співвідношення цих факторів регулює метаболізм кісткової тканини.

Імунні клітини, а саме, ДК і Т-лімфоцити потребують і забирають OPG для підтримання своєї життєздатності [15]. Отже, присутність ДК і Т-клітин в інфільтратах при ХГП може робити внесок в деструкцію кісткової тканини, яка є, в принципі, спільною рисою всіх форм хронічних пародонтитів, зміщуючи рівновагу OPG/RANK-L на користь останнього.

Внесок класичних цитотоксичних  $CD8^+\alpha\beta$  Т-лімфоцитів в імуноопосередковану тканинну деструкцію при ХГП зумовлений здатністю вивільняти прозапальні цитокіни і токсичні фактори під час реалізації цитолітичної активності [20]. Для активованих інтраепітеліальних ЦТЛ ( $CD8^+\gamma\delta$  Т-лімфоцитів) внесок в модуляцію імунної відповіді через зазначені механізми вважається доведеним [13].

Відомо також, що  $\gamma\delta$  Т-лімфоцити здатні до перехрестної реактивності з білками теплового шоку бактеріального походження і власними, що також може бути одним з механізмів індукції аутоімунної відповіді *in situ* при пародонтиті [14].

Роль гуморального антигенспецифічного імунітету в більшій мірі вважається захисною при пародонтитах. Так, на моделі пародонтиту у тварин показано, що В-клітини не є необхідними для деструкції кісткової тканини [16]. Однак, при пародонтиті, також показана активація експресії молекул CD86 і CD83 на В-клітинах, що робить ці клітини потенційними антиген-презентуючими, і означає їх роль по підтриманню Т-клітинної відповіді [21].

Важливо, що плазматичні клітини, які інфільтрують запалені ясна, здатні синтезувати не лише захисні антитіла проти пародонтопатогенів, але й антитіла іншої специфічності, навіть не до антигенів мікроорганізмів порожнини рота [8]. Це слугує непрямим доказом здатності синтезувати і аутоантитіла, що підтримує запалення в пародонті.

І, нарешті, безпосередня роль в активації остеокластогенеза  $CD4^+$ Т-клітин, активованих антигенами *A.actinomicetemcomitans*, показана на моделі пародонтиту у мишей. Ці клітини набували здатності продукувати RANK-L, зосереджуючись в уражених тканинах пародонта [19].



Аналізуючи внесок окремих імуніцитів в патогенез хронічного генералізованого пародонтиту, власні данні, разом з літературними, дозволили сформуванати наступні положення:

1. ДК ясен здатні презентувати антигени и аутоантигени локально, в яснах, індукуючи імунну відповідь.
2. CD4<sup>+</sup> клітини разом з ДК, запускають імунну відповідь *in situ*; беруть участь в триклітинній кооперації; вкладають внесок в стимуляцію тканинної деструкції, експресуючі прозапальні цитокіни та, очевидно, RANK-L.
3. CD3<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> клітини беруть участь у деструкції за рахунок вивільнення прозапальних цитокінів та реалізації цитолітичної активності; частина з них регулює регенерацію ясен.
4.  $\gamma\delta^+$  лімфоцити можуть індукувати аутоімунну відповідь; здатні підтримувати запалення за рахунок експресії прозапальних цитокінів.
5. CD20<sup>+</sup> клітини є попередниками плазматичних, які здатні до продукції аутоантитіла *in situ*, що може ставати ланкою патогенезу ХГП.
6. Імунні клітини роблять внесок в специфічну перебудову в патологічних умовах із реалізацією компенсаторних механізмів, що являє собою особливе нове поняття – ремоделювання тканин пародонту при ХГП, в основі якого лежить здатність імунних клітин активувати резидентні клітини ясен і регулювати регенерацію.
7. Порушення імунних механізмів при хронічному пародонтиті має провідне патогенетичне значення, виступає критичним посередником між патогенною мікрофлорою й розвитком захворювання і становить важливий напрямок терапевтичного втручання.

#### Список літератури

1. Деклараційний патент України № 48519 А, МПК 7 А61С17/00. Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота / Кайдашев І.П., Ткаченко П.І., Курєдова В.Д. та ін. (Україна).- Заявл.24.09.2001; Опубл.15.08.2002, Бюл.№ 8.-3с.

2. Кайдашев І.П., Шинкевич В.І. Спосіб оцінки імунологічного стану слизової оболонки порожнини рота. Деклараційний патент України № 58163 А, МПК 7 А61С17/00, заявл. 15.10.2002, опубл.15.08.2003. Бюл.№ 8.-2с.
3. Кайдашев І.П., Шинкевич В.І. Характеристика імунних клітин слизової оболонки ясен при хронічному генералізованому пародонтиті відповідно ступенів тяжкості // Імунологія та алергологія.-2004.-№ 4.-С.15-19.
4. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Рогова М. А., Буданова Е. В., Шабанова Н. А. Роль цитокинов в механізмах розвитку хронічного запалення в ткани пародонта // Імунологія.- 2000.- №6.- С.24-26.
5. Мащенко І. С. Інтерлейкіни при генералізованом пародонтиті // Вісник стоматології.-2002.-№1.-С.15-18.
6. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Під ред. проф. Кайдашева І. П.- Полтава.-«Полімет».-2003.-319с.
7. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function / D.M. Anderson, E. Marakovsky, W.L. Bilingsley et al. // Nature.-1997.-Vol.390.-P.175-179.
8. Antibody synthesis specific for nonoral antigens in inflamed gingiva / S.M. Mallison, A.K. Szakal, R.R. Ranney, J.G. Tew // Infect Immun.-1988.-Vol.56, N 4.-P.823-830.
9. Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease / H.Z. Hirsch, A. Tarkowski, E.J. Miller et al. // J.Oral.Pathol.-1998.-Vol.17.-P.456-459
10. Baker P.J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease // Microbes and Infection.-2000.-Vol.2, Issue 10.-P.1181-1192.
11. Bircedal-Hensen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction // J Periodontal Res.-1993.-Vol.28, N 6.-P.500-510.
12. Cloning, characterization, and antigen specificity of T-lymphocyte subsets extract from gingival tissue of chronic adult periodontitis patients / A. Wassenaar, C. Reinhardus, T. Thepen et al. // Infect.Immun.-1995.-Vol.63, N6.-P.2147-2153.
13. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing / O. Takeichi, J. Haber, T. Kawai et al. // J Dent Res.-2000.-Vol.79.-P.1548–1555.
14. Goulhen F., Grenier D., Mayrand D. Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections // Crit. Rev. Oral. Biol. Med.-2003.-Vol.-14, N 6.-P.399-412.
15. Green E.A., Flavell R.A. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation // J Exp Med.-1999.-Vol.189.-P.1017-1020.
16. Immunization with the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* protects against periodontal bone loss in the rat periodontitis model / P.S. Rajapakse, N.M. O'Brien-Simpson, N. Slakeski et al. // Infect Immun.-2002.-Vol.70.-P.2480–2486.
17. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin / G.

- Ratzinger, A. Stoitzner, P.A. Ebner et al. // J Immunol.-2002.-Vol.168, N 9.-P. 4361-4371.
18. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: *in situ*, *in vivo*, and *in vitro* studies / R. Jotwani, A.K. Palucka, M. Al-Quotub et al. // J Immunol.-2001.-Vol.167.-P.4693–4700.
19. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis / N. Nakagawa, M. Kinoshita, N. Shima et al. // Biochem Biophys Res Commun.-1998.-Vol.253.-P.395-400.
20. Teng Y.-T. A. The Role of Acquired Immunity and Periodontal Disease Progression // Crit. Rev. Oral. Biol. Med.-2003.-Vol.14, No 4.-P.237-252.
21. Upregulation of co-stimulatory molecular expression and dendritic cell marker (CD83) on B cells in periodontal disease / R. Mahanonda, N. Sa-Ard-Iam, K. Yongvanitchang et al. // J. Periodontal. Res.-2002.-Vol.37, N 3.-P.177-183.

#### Резюме

### **Роль иммунных клеток тканей пародонта в патогенезе хронического генерализованного пародонтита**

Шинкевич В.И.

Современный уровень научных изысканий позволяет считать хронический пародонтит иммуноопосредованным заболеванием. Не смотря на то, что доминирование лимфоцитов среди клеток, инфильтрирующих *locus morbi* при хронических формах пародонтитов, было доказано достаточно давно, собственные результаты исследования впервые на Украине продемонстрировали его субпопуляционный состав. Иммунные клетки, инфильтрирующие десну при хроническом генерализованном пародонтите представлены: созревающими антиген-презентирующими дендритными клетками, CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, CD4<sup>+</sup> Т-хелперами/регуляторами, CD8<sup>+</sup> цитотоксическими/эффektorными лимфоцитами,  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> внутриэпителиальными лимфоцитами и CD20<sup>+</sup> В-клетками. Количественные и качественные характеристики этих клеток позволяют оценить их вклад в патогенез пародонтита.

*Ключевые слова:* хронический генерализованный пародонтит, иммунопатогенез, иммунные клетки.

#### **Summary**

Contemporary level of medicine allows to consider chronic parodontitis as an immunomediated disease. Although the dominance of lymphocytes among the cells infiltrating *locus morbi* in chronic forms of parodontitis has been proved for a long time, the present studies at first in Ukraine represent its subpopulation composition. Immune cells infiltrating the gum under

chronic generalized parodontitis are represented by maturing antigen-presenting dendritic cells, CD3+ T-lymphocytes, CD4+ T-helpers-regulators, CD8+ cytotoxic-effector lymphocytes,  $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes and CD20+ B-cells. Both quantitative and qualitative characteristics of the cells make it possible to estimate their contribution into the pathogenesis of parodontitis.

*Key words: chronic generalized parodontitis, immunopathogenesis, immune cells.*