

ХАРАКТЕР ВІДПОВІДІ ІМУННИХ КЛІТИН ПРИКОРЕНЕВОЇ ГРАНУЛЯЦІЙНОЇ ТКАНИНИ НА ОКРЕМІ ПАРОДОНТОПАТОГЕННІ МІКРООРГАНІЗМИ ПРИ ПЕРІОДОНТИТАХ ТИМЧАСОВИХ ЗУБІВ У ДІТЕЙ

О.В. Шешукова

*Вищий державний
навчальний заклад України
"Українська медична
стоматологічна академія"*

При хронічному запаленні періодонта у відповідь на інфекцію захисні механізми макроорганізму формують прикореневу грануляційну тканину. На основі проведених досліджень ми продемонстрували інфільтрацію прикореневої грануляційної тканини при загостренні хронічного періодонтиту тимчасових зубів основними субпопуляціями лімфоцитів та ДК у [4]. Установлена кореляція між загальною Т-клітинною та В-клітинною популяціями з переважанням CD3+ інфільтрації в осередку запалення періодонта тимчасових зубів. Важливо зіставити їх зі спектром пародонтопатогенів, які слугують етіологічним чинником досліджуваного захворювання і викликають певну відповідь із боку тканин періодонта [3, 7, 8, 12]. Для визначення основних ланок патогенезу захворювання необхідно виявити тип локальної імунної відповіді на основні пародонтопатогени при періодонтитах тимчасових зубів.

Мета дослідження: визначити зв'язок між наявністю того чи іншого мікроорганізму в кореновому каналі та характером локальної імунної відповіді при хронічному запаленні періодонта тимчасових зубів для визначення основних ланок патогенезу захворювання.

Матеріали і методи дослідження

Обстежено 40 дітей віком від 2 до 10 років із захворюваннями періодонта тимчасових зубів, які зверталися по допомогу в дитячу стоматологічну поліклініку м. Полтави. Діагноз визначали за міжнародною класифікацією стоматологічних хвороб на основі МКХ-10, залучаючи класифікацію періодонтитів у дітей за Т.Ф. Виноградовою (1968). Діагноз установлювали на підставі з'ясування скарг, анамнезу, результатів об'єктивного обстеження, а також рентгенографії.

За наявності показань проводили видалення тимчасового зуба, під час якого методом інцизійної біопсії отримували біоптати міжкореневої та/або періапикальної грануляційної тканини, які локалізувалися в ділянці деструкції, та видаляли їх разом із причинним зубом. Визначили 5 основних пародонтопатогенних мікроорганізмів (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*) методом ПЛР за допомогою набору реагентів для якісного визначення ДНК мікроорганізмів (ООО НПФ „ГЕНТЕХ“) за стандартною методикою [2]. Збір матеріалу проводився шляхом уведення стерильного паперового піну ("Paper

points", "Maillefer", Швейцарія) в кореневий канал тимчасового зуба на 6-8 сек., який після його вилучення використовували для визначення анаеробної мікрофлори за допомогою методу ПЛР.

Для імуногістологічного дослідження біопсійний матеріал поміщали в стерильні пластикові пробірки з охолодженням до 2-4°C стерильним фізіологічним розчином і протягом 1 год. (в термосі з кригою) транспортували до лабораторії, де проводили дослідження на тканинних криостатних зрізах товщиною 5-7 мкм, виготовлених із біоптатів грануляційної тканини. Дослідження основних імуноцитів здійснювали за допомогою моноклональних антитіл (мкАТ) проти HLA-DR-, CD3-, CD4-, CD8-, CD20-антигенів імуноцитів («Сорбент», Росія) для визначення антигенпрезентуючих дендритних клітин (HLA-DR+ ДК), загальної Т-клітинної популяції (CD3+), Т-лімфоцитів-хелперів (CD4+), цитотоксичних лімфоцитів (CD8+) і В-клітин (CD20+). Відповідно оцінювали основні клітини-представники індуктивної та ефекторної ланок імунітету [1]. Імуногістохімічним методом були досліджені прикореневі грануляції (38 біоптатів, а з кожними мкАТ1 - анти-HLA-DR, CD3, CD4, CD8, CD20 усього було досліджено більше 190 препаратів).

Локалізацію первинних мкАТ виявляли за допомогою стрептовідин-біотин-пероксидазного комплексу ("Sigma", USA) з подальшою обробкою зрізів аміноетилкарбазоном ("Sigma", USA) з червоно-бурим забарвленням, забезпечуючи візуалізацію реакції.

На наступному етапі ми контрастували тканинні зрізи гематоксилином

або метиленовим синім, поміщали в гуммі-сироп під покривне скло й оцінювали імунореактивні клітини під мікроскопом («ЛЮМАМ-Р11», Росія). Визначали відносно інтенсивність інфільтрації імуностатами, особливості локалізації, ознаки активності, особливості будови. Для зручності обліку і статистичної обробки кількісних характеристик імунних клітин ми виділили декілька рівнів інфільтрації: в загальних рисах, найменшу інфільтрацію зі всіх виявлених позначали «1», помірний рівень - «2» і різко виражену - «3». Результати дослідження документували фотографуванням на фотоплівку «Konica VX 400» за допомогою мікрофотонасадки МФН-10 («ЛОМО», Росія).

Для визначення зв'язку між наявністю того чи іншого мікроорганізму в кореневому каналі, визначених методом ПЛР, та наявністю імунних клітин був проведений непараметричний кореляційний статистичний аналіз із визначенням коефіцієнтів Kendall Tau і Gamma.

Результати дослідження. Ми встановили позитивні кореляції для *V.forsythus* і CD3+ інфільтрації в грануляції (Kendall Tau=0,458131, $p=0,022471$) і для *P.gingivalis* і CD20+ клітин (Kendall Tau=0,421637, $p=0,035684$), що може демонструвати певний тип локальної імунної реакції на інфекційні агенти: CD3+-тип - на *V.forsythus*, CD20+-тип (В-клітинний) - на *P.gingivalis*. Примітно, що як і при кореляціях з морфологічними особливостями грануляційної тканини [13], на перше місце виходять показники CD3+ і CD20+ клітин, що свідчить про можливий вплив мікроорганізмів через імунну відповідь на запальну перебудову тканин.

З літературних даних відомо, що *P.gingivalis* здатний локально модулювати профіль імунної відповіді [16], *V.forsythus* володіє цитолітичною активністю на лейкоцити людини [6], проте немає даних, що характеризують тип локальної імунної відповіді при періодонтиті. Однак, при генералізованих формах пародонти-ту Wasseenaar A. et al. (1995) отримали з тканин пародонта CD4+ і CD8+ Т-лімфоцити, реактивні до бактерійних антигенів *P.gingivalis*, *P.intermedia* і *A.actinomycescomitans* [15], що демонструє переважно клітинноопосередковану локальну імунну відповідь.

Грунтуючись на власних результатах про найбільш виражену CD3+

клітинну інфільтрацію [5], її кореляцію з виявленими мікроорганізмами [4], а також на літературних відомостях про Т-клітинну реакцію на пародонтопатогени [17], ми вважаємо, що при хронічному періодонтиті молочних зубів локально розвивається переважно Т-клітинна відповідь (у вигляді CD3+ інфільтрації).

Для *P.intermedia* показана здатність стимулювати потужну проліферацію CD4+ Т-клітин, що відбувається за V β -специфічним типом [10]. У свою чергу, активація й експансія Т-клітин може вести до продукції великих кількостей регуляторних і ефекторних цитокінів, здатних викликати порушення нормального функціонування макроорганізму [9, 17]. Унаслідок масивної акумуляції CD4+ Т-клітин може відбуватися клональна делеція антигенспецифічних Т-клітин, що, зрештою, веде до зменшення специфічної відповіді, яка захищає від інфекції [11, 17]. У нашому дослідженні спостерігався достовірний взаємозв'язок *P.intermedia* і кількісного показника загальної популяції CD3+ клітин (Kendall Tau=-0,416667, $p=0,037918$), куди входять і CD4+ Т-лімфоцити.

Про локальну модуляцію імунної відповіді свідчать літературні дані про здатність *P.intermedia* і *P.gingivalis* індукувати посилену продукцію фібробластами ІЛ-8 (потужного хемоатрактанту для нейтрофілів), а також прозапального цитокіну ІЛ-6 [13, 14]. Отже, специфічна інфекція періодонта може порушувати локальний імунний захист при хронічному періодонтиті молочних зубів.

Висновок. На основі проведених досліджень можна визначити, що характер бактеріальної флори впливає на тип локальної імунної відповіді при хронічному періодонтиті тимчасових зубів у дітей. У більшості випадків у дітей локально розвивається Т-клітинна реакція на визначені основні пародонтопатогени.

Література

1. Деклараційний пат. України 58163 А, МПК 7 А61С17/00. Спосіб оцінки імунологічного стану слизової оболонки порожнини рота: Пат.58163, А, МПК 7 А61С17/00 /Кайдашев І.П. Шинкевич В.І. (Україна).-№2002108169; заявл.15.10.02; опубл.15.08.03. Бюл.№8.

2. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині; за ред. проф. Кайдашева І. П.- Полтава: Полімет, 2003.-319 с.
3. Диагностика хронического периодонтита с помощью полимеразной цепной реакции и перспективы эндодонтического применения макролидов и цефалоспоринов / Царев В.Н. Митронин А.В., Максимовский Ю.М. [и др.] // Стоматология для всех.-2004.-№ 1. - С.8-11.
4. Шешукова О.В. Зв'язок між наявністю пародонтопатогенної інфекції у корневих каналах і гістологічними особливостями грануляційної тканини при хронічному періодонтиті тимчасових зубів / Шешукова О.В., Кайдашев І.П., Шинкевич В.І. // Вісник проблем біології і медицини.-2006.-№2.-С.413-416.
5. Шешукова О.В. Характеристика імунних клітин прикореневої грануляційної тканини при періодонтитах тимчасових зубів у дітей / Шешукова О.В. // Вісник проблем біології і медицини.-2009.-№2.-С.314-319.
6. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* / Arakawa S., Nakajima T., Ishikura Y. [et.al.] // Infection and Immunity.- 2000.-Vol.68, N8.-P.4611-4615.
7. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections / J.C. Baumgartner, B.J. Watkins, K. Bae [et.al.] // J.Endod.-1999.-Vol.25.-P.413-415.
8. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction / J.C.M. Oliveira, J.F.Jr. Siqueira, G.B. Alves [et al.] // J.Endod.-2000.-Vol.26.-P.729-732.
9. Antigen-specific T-cell receptor V beta expression in *Porphyromonas gingivalis*-specific T-cell lines / Gemmell E., Grieco D.A., Cullinan M.P. [et al.] // Oral Microbiol.Immunol.-1998.-Vol.13.-P.335-361.
10. Leung K.-P. Prevotella intermedia Stimulates Expansion of Vp-Specific CD4+ Cell / Leung K.-P., Torres B.A. // Infect.Immun.-2000.-Vol.68, N9.-P.5420-5424.

11. Influence of periodontal bacteria and disease status on V beta expression in T cells / Mathur A., Michalowicz C., Yang C. [et al.] // J. Periodontal. Res. -1995.-Vol.30.-P.369-373.
12. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria / R.C. Jacinto, B.P.F.A. Gomes, C.C.R. Ferraz [et al.] // Oral Microbiol. Immunol.-2003.-Vol.18.-P.285-292.
13. Takeshita A. CpG Motifs in Porphyromonas gingivlis DNA Stimulate Interleukin-6 Expression in Human Gingival Fibroblasts / Takeshita A., Imai K., Hanazawa S. // Infect. Immun.-1999.-Vol.15.-P.226-231.
14. Lipopolysaccharides of Bacteroides intermedius (Prevotella intermedia) and Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis induce interleukine-8 gene expression in human gingival fibroblast culture / Tamura V., Tocuda M., Nagaoka S. [et al.] //Infect.Immun.-1992.-Vol.60, N11.-P.4932-4937.
15. Cloning, characterization? And antigen specificity of T0lymphocyte subsets extract from gingival tissue of chronic adult periodontal patients/Wassenaar A., Reinhardus C, Thepen T. [et al.] //Infect.Immun.-1995.-Vol.63, 6.-P.2147-2153.
16. Hydrolysis of interleukin-12 by Porphyromonas gingivalis major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis/Yun P.L., Decarlo A.A., Collyer C.C. [et al.] // Infect.Immunol.-200.-Vol.69, N9.-P.5650-5660.
17. Zadeh H.H. Evidence for involvement of superantigens in human periodontal diseases: skewed expression of T cell receptor variable regions by gingival T cells/Zadeh H.H., Kreutzer D.L.// Oral Microbiol. Immunol.-1996.-Vol.11.-P.88-95.

Стаття надійшла
11.05.2009 р.

Резюме

Изучена связь между наличием пародонтопатогенов в корневом канале и характером локального иммунного ответа при хроническом периодонтите временных зубов. Выявлено, что у детей преимущественно развивается локальная Т-клеточная реакция на основные пародонтопатогены.

Summary

The connection between the paradontopathogens in root canal and the character of local immune response in chronic periodontitis of milk teeth is studied. The prevailing development of local T-cell reaction on basic paradontopathogens in children is revealed

Ключевые слова:

временный зуб, хронический периодонтит, пародонтопатогены, иммунный ответ

Key words:

milk tooth, chronic periodontitis, paradontopathogens, immune response.