

УДК: 616.314.17.-008.1-031.81.-092-07:612.017.1

И. Е. СергееваНациональный медицинский университет
им. А.А. Богомольца**ПОКАЗАТЕЛИ МЕСТНОГО
ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ
ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ**

Обследовано 60 пациентов генерализованным пародонтитом I-II степени, хронического течения и 24 пациента – контрольной группы. Установлено, что локальный клеточный иммунный ответ поддерживается преимущественно Т-супрессорами, которые активированы молекулами ГКГ-I класса, при высокой пролиферации В-клеток. В ПК выявляется избыточное количество CD54, CD95. Определяется недостаточная функциональная способность нейтрофилов, макрофагов, что играет важную роль для связи с F_c – фрагментом молекул иммуноглобулинов и осуществления фагоцитоза опсонированных частиц, при достаточной экспрессии молекул ГКГ II класса.

Ключевые слова: генерализованный пародонтит (ГП), главный комплекс гистосовместимости (ГКГ), маркеры адгезии и апоптоза, дифференциация Т-лимфоцитов, ЖК спектр липидов, содержащее пародонтальных карманов (ПК).

І. Є. СергєєваНаціональний медичний університет
ім. О. О. Богомольця**ПОКАЗНИКИ МІСЦЕВОГО
ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ
ГЕНЕРАЛІЗОВАНИМ ПАРОДОНТИТОМ**

Обстежено 60 пацієнтів хворих на генералізований пародонтит I-II ступеня хронічного перебігу і 24 пацієнта - контрольної групи. Встановлено, що локальна клітинна імунна відповідь підтримується переважно Т-супрессорами, які активовані молекулами ГКГ-I класу, при високій проліферації В-клітин. У ПК виявляється надмірна кількість CD54, CD95. Визначається недостатня функціональна здатність нейтрофілів, макрофагів, що грає важливу роль для зв'язку з F_c - фрагментом молекул імуноглобулінів та здійснення фагоцитозу опсонованих частинок, при достатній експресії молекул ГКГ II класу.

Ключові слова: генералізований пародонтит (ГП), головний комплекс гістосумісності (ГКГ), маркери адгезії та апоптозу, диференціація Т-лімфоцитів, ЖК спектр ліпідів, вміст пародонтальних кишень (ПК).

I. E. Sergeeva

National Medical University. A.A Bogomol'tsya

**THE INDICES OF LOCAL IMMUNITY
IN PATIENTS WITH GENERALIZED PERIODONTITIS**

The study involved 60 patients with generalized periodontitis I-II degree of chronic course and 24 patients - control group. It was established that the local cellular immune response is supported mainly T-suppressor at the lowest level that activated molecules MHC-I class, with a high proliferation of B -cells. In the PC detected an excess of CD54, CD95. Imperfectly identified functional ability of neutrophils, macrophages, which plays an important role in connection with F_c - fragments of immunoglobulins and phagocytosis of opsonation particles at a sufficient expression of MHC class II molecules.

Key words: generalized periodontitis (GP), major histocompatibility complex (MHC), markers of adhesion and apoptosis, differentiation of T- lymphocytes, the LCD range of lipids, the contents of periodontal pockets (PC).

Хемокинетическая и хемотактильная активность полиморфноядерных лейкоцитов – это достаточно сложное направление в изучении функциональных способностей иммуннокомпетентных клеток (ИКК) с интерпретацией существующих многокомпонентных факторов, влияющих на этот процесс. Установлено и изучено усиливающее действие лейкотриена – LTB-4 не окислительный метаболизм жирных кислот (ЖК) и их производных в нейтрофилах.[1-3].

Однако, детализация разных механизмов активации фагоцитоза требует дальнейшего углубленного анализа. Время нахождения нейтрофилов в кровеносном русле в среднем составляет 6-8 ч., так как они быстро мигрируют в слизистые оболочки или межтканевую ткань. Гранулоциты способны, за счет анаэробного гликолиза, существовать в воспаленных, отечных тканях, с выраженными процессами гипоксии в посткапиллярных венах и в участках с субкомпенсированным нарушением кровообращения. Вопросы активации диапедеза нейтрофилов через эндотелиальный барьер и дальнейший хемотаксис мигрирующих клеток для успешной презентации антигена, и выполнения эффективной функции активированных макрофагов окончательно не решены.

Установлено, что молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) I-II классов также опосредуют адгезивные соединения между клетками и контролируют местоположение клеток в пространстве.

Экспрессия молекул ГКГ II класса на мембранах макрофагов подавляется различными видами патогенов, среди которых вирусы, бактерии, грибы и простейшие. Выявлено, что патогены модулируют экспрессию молекул адгезии и других поверхностных рецепторов моноцитов – в частности CD14, CD49d, CD54. Инкубация с бактериями в значительной степени увеличивает экспрессию этих поверхностных молекул, что выражается в способности активировать их секреторную активность, а в дальнейшем находит свое отражение в характере течения заболевания [4-9].

Таким образом, определено, что Т-клеточный рецептор распознает не собственно чужеродный антиген, а его комплекс с молекулами ГКГ, молекулами адгезии, что определяет момент запуска и регуляции эффекторного иммунного ответа. Однако, эти вопросы механизмов реализации защитной реакции тканей пародонта у больных генерализованным пародонтизом на современном этапе требуют еще достаточно активного изучения и презентации данных исследования стоматологам.

Цель исследования. Определить состояние экспрессии молекул ICAM-1 (CD54) и HLA-DR (ГКГ II кл.), HLA-A,B,C (ГКГ I кл.) с учетом субпопуляции Т-лимфоцитов у больных ГП I- II степени, хронического течения, для оценки направления регуляции механизмов иммунного ответа, и соотношения изменения насыщенности жирнокислотного (ЖК) спектра липидов мембран клеток в содержимом фильтрате пародонтальных карманов (ПК).

Методы исследования: клинические, иммунологические – непрямая иммунофлюоресценция, ИФА, газо-жидкостная хроматография, статистические (достоверность по критерию Стьюдента $P < 0,05$).

Материалы и методы исследования. Обследовано 60 пациентов в возрасте 20-54 лет с диагнозом: ГП I-II ст., хронического течения; использована классификация болезней пародонта проф. Н.Ф. Данилевского, 1994 г. Контрольная группа – 24 человек. Пациенты обследованы в стоматологическом центре НМУ имени А.А.Богомольца и лабораториях института «Проблем патологии» при НМУ, г. Киев. Проведена общепринятая методика обследования: клинические, индексные показатели, рентгенологические, иммунологические, биохимические. Использована статистика для индивидуальных компьютеров при обработке полученных данных, достоверность по критерию Стьюдента считалось при ошибке $P \leq 0,01-0,05$. Сравнительный анализ изучаемых показателей рассчитан по отношению к полученным данным контрольной группы. Предмет исследования: гомогенаты со-

держимого пародонтальных карманов (ПК); смешанная ротовая жидкость (СРЖ); секрет околоушной слюнной железы. Иммунологический метод включал определения концентрации CD-антигенов, иммуноглобулинов, цитокинов – CD3, CD4, CD8, CD19, CD54, CD95, антигены II класса ГКГ (HLA-DR) и I класса (HLA-A,B,C), IgA, IgG, IgM, SIgA, ФНО- α , ИФН- α , ИФН- γ , SLPI, лизоцима (по Manchini). Использованы моноклональные антитела, полученные в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого (г. Киев). Исследования проводились методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием МКАТ, на флуоресцентном микроскопе «Olympus» в проходящем свете фазово-контрастной оптики, длина волны 495 нм, когда выявляется максимальная флюоресценция метки в лунках, где происходит реакция антигена с антителом. Определение провоспалительных цитокинов интерферонов, SLPI проводили иммуноферментным методом на анализаторе STAT-Fax 2100 (США), используя тест-системы «Протеиновый контур» (С.-Петербург, Россия), «Nucult biotechnology» (Нидерланды) в соответствии с инструкциями от производителей. Полученные результаты математически обработаны на персональном компьютере - пакет программ «SPSS for Windows». Определение жирнокислотного состава липидов осуществлялось методом газохроматографического анализа на хроматографе «Цвет-500», измеряя площадь пиков метилированных производных ЖК и определяя их содержание в процентах, ошибка отклонения составляет $\pm 10\%$ (Брюзгина Т.С., 2001), достоверно критерию Стьюдента, при $p < 0,05$, методом вариационной статистики.

Результаты исследования. Установлено, что при хроническом течении ГП I-II степени, у пациентов в лизированной ткани ПК определяется уменьшение воспалительных Т-лимфоцитов CD4⁺ Th-1 на 27-30 %. Клеточный иммунный ответ поддерживается преимущественно Th-2 субпопуляцией и лимфоцитами – супрессорами CD8⁺, которые активированы молекулами I и II класса ГКГ. Определяется тенденция к пролиферации В-клеток (увеличение CD19⁺ на 64-69 %), что косвенно указывает на усиление дифференциации Th-2 клеток. Показатели CD8⁺ в пределах нижней границы контроля, с тенденцией вектора на уменьшение, что предопределяет снижение активации супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов, и вероятно влияет на эффекторные внутри и субэпителиальные лимфоциты. CD54 – маркер адгезии на макрофагах, моноцитах, определяя взаимоотношения Т-клеток и АПК, или вовлечение клеточных взаимодействий Т-Т и Т-В увеличен на 37-

39 % при избыточной экспрессии HLA-DR на 25-30 % и HLA-A,B,C – в 2 раза. Отмечается снижение субпопуляции цитотоксических лимфоцитов на мембранах нейтрофилов, что играет важную роль для связи с F_c –фрагментом молекул Ig и осуществлении фагоцитоза опсонированных частиц при достаточной продукции сигналов и молекул ГКГ. Количества SIg A снижено на 35 %, лизоцима – на 40 %, лейкоцитарного ИФН- α – на 35-45 %, ИФН- γ – до 26 %, антипротеаз (SLPI), продуцируемых лейкоцитами, в ответ на стимулированные сигналы липополисахаридов, причем в паротидной слюне этот показатель увеличивается на 10-12 %, а в СРЖ (смешанная ротовая жидкость) – уменьшается на 50 %. Изменение ЖК спектра в содержимом фильтрата ПК отмечается за счет дисбаланса – увеличение суммы насыщенных ЖК ($C_{14:0}$ > на 52 %, $C_{15:0}$ > на 47 %), уменьшение суммы ненасыщенных ЖК ($C_{18:2}$ < на 51 %, $C_{18:3}$ < на 30 %), снижение арахидоновой ЖК ($C_{20:4}$) на 23-25 % при активных ферментативных липооксигеназных метаболических процессах, характеризуя избыточную пероксидацию и фосфорилирование, вызывая торможение некоторых клеточных функций: Т-клеточной цитотоксичности, продукции Ig A, Ig G, Ig M В-клетками (табл.).

Таблица

**Жи́рноки́слотный состав липидов (в %)
у больных ГП I-II ст., хронического течения**

Название ЖК	Контроль (n=24)	Фильтрат ПК (n=61)
C 14:0 - миристиновая	13,81 ± 1,1	20,98±1,0
C 15:0 – пентадекановая	6,0 ± 0,27	8,82±0,41
C 18:2 - линолевая	11,54 ± 1,0	5,63±0,026
C 18:3 - линоленовая	6,53 ± 0,27	4,55±0,21
C 20:4 - арахидоновая	8,22 ± 0,37	6,23±0,3

Таким образом, специфически сенсебилизованные Т-лимфоциты с фенотипом $CD8^+$ с помощью ТКР распознают чужеродный антиген на поверхности инфицированных клеток в комплексе с молекулами ГКГ I класса (HLA-A,B,C). Цитотоксический эффект обуславливается белком перфорином и $CD95L$ – $CD95$ взаимодействием с клетками-мишенями (уровень $CD95$ увеличено на 33-35 %). При распознавании молекул I класса ГКГ дифференцировка Т-клеток в тимусе направляется в сторону формирования Т-киллеров. $CD8$ секретирует медиатор ИФН- γ , который оказывает прямое ингибирующее действие на размножение вирусов и других микроорганизмов, препятствуя распространению инфекции. Кроме того, ИФН- γ способен активировать макрофаги, которые мигрируют в зону воспаления и выступают, как эффекторные клетки, и как АПК, способствующие специфическому распознаванию чужеродного антигена цитотоксическими

Т-лимфоцитами. Однако, уровень ИФН- γ в полости рта зафиксирован в незначительном количестве, его экспрессия снижена на 35-40% ($P<0,05$) в паротидной слюне, и на 22% – в СРЖ, у больных ГП. Цитотоксичность ЦТЛ регулируется антиген-зависимым локальным продуцированием цитокинов (ИФН- γ и ФНО); причем 50% интерферон-положительных ЦТЛ способны продуцировать и ФНО. По нашим показателям исследование содержания ФНО- α на локальном уровне при хроническом течении ГП определяется в пределах данных контроля, с вектором увеличения лишь до 10%, что не имеет достоверно статистической разницы для активации иммунной реакции. Из полученных данных следует, что популяция $CD4^+$ + Th-1 клеток, обладающих макрофагальной активностью, и выраженная эффекторная популяция $CD4^+$ + Th-2 (значительная экспрессия молекул HLA-DR и $CD19^+$), предельно низкий уровень $CD8^+$ для адгезии Т-клеток к АПК и вовлечению в Т-Т и Т-В взаимодействия. При высокой экспрессии $CD54$ и HLA-A,B,C, $CD95$, а также и при экспрессии эффекторно низких и недостаточных концентрациях, дозах ФНО- α , ИФН- γ , ИФН- α , IgA, IgG, IgM, SIgA характеризуют молекулярные механизмы обеспечения специфического иммунного ответа по отношению к антигенам тканей пародонта собственного организма, штаммам микроорганизмов эконизи, и как результат – формирование иммунной ауто толерантности (за счет Т-супрессоров) и В-клеточной толерантности (доза толарогена пародонтопатогенов должна быть в 100 раз выше) при хроническом течении ГП. В тоже время, показатели неспецифического иммунного ответа свидетельствуют о недостаточном уровне их функциональной способности (ФИ, ФЧ, SLPI), низкий уровень лизоцима, ИФН- α , ФНО- α , данные собственных исследований были представлены в предыдущих публикациях. Причем, градиент различия этих показателей достаточно высокий при сопоставлении тождественных параметров, определяемых в секрете СРЖ и экскрете околоушной слюнной железы и в периферической крови больных, топически указывая на уровень локализации иммунной дисрегуляции как клеточных, так и гуморальных факторов.

Полученные данные позволяют еще раз убедиться в правомочности введения клинического термина «местный иммунитет» в пародонтологию, как общепризнанный термин, используемый в клинической иммунологии.

Заключение. При хроническом течении ГП I-II ст. выявлено, что клеточный иммунный ответ поддерживается преимущественно Т-лимфоцитами супрессорами, которые активированы экспрессируемыми (>в 2 раза)

молекулами ГКГ I класса. Определяется достаточно высокий уровень CD19, для потенциальной пролиферации В-клеток. Для выполнения функций иммунного ответа или развития воспаления имеется избыточное количество CD54, что способствует адгезии Т-клеток к АПК или вовлечению клеточных взаимодействий Т-Т и Т-В. Количество SIg A снижено на 35 %, лизоцима на 47 %, анти-протеаз, продуцируемых лейкоцитами, в ответ на стимулированные сигналы липополисахаридов уменьшено на 50 %, и ИФН- α ИФН- γ – до 26-48 %. Определено снижение функциональной активности нейтрофилов, макрофагов, что играет важную роль для связи Fc-фрагментом молекул иммуноглобулинов и осуществления фагоцитоза опсонированных частиц, при достаточной презентации ГКГ II класса.

Список литературы

1. **Polymorphnunclear** neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis / Liu R.K, Cao C.F, Meng H.X, Gao Y. // J Peroidontol 2001. - 72:1545-1553.
2. **Lipoteichoic** acid (LTA) of Streptococcus pneumonia and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR) -2, lipopolysaccharide-binding protein (LBR), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. / Schroder NW, Morath S, Alexander C, et. al // J Biol Chem 2003. - 278: 15587-15594.
3. **Gemmell E, McHugh GB, Grieco DA.** Costimulatory molecules in human periodontal disease tissues. // J Periodont Res 2001. - 36: 92-100.
4. **Bickel M, Axtelious B, Solioz C, Attstrom R.** Cytokine gene expression in chronic periodontitis.// J Clin Preiodontol 2001. - 28: 336-44.
5. **Kotake S, Nanke Y, Mogi M.** INF- γ producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. // Eur J Immunol 2005. - 35: 3353-63.
6. **Ito H, Honda T, Dommonal H** et al. Gene expression analysis of the CD4⁺ T0cells clones derived from gingival tissues of periodontitis patients // Oral Microb. Immun. 2005. - 20: 382-6.
7. **Acheson DW, Luccoli S.** Microbial-gut interaction in health and disease. Mucosal immune responses.// Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004. – 18: 387-404.
8. **Dale B.A.** Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease.// Periodontol 2000. 2002. – 30:70-78.
9. **Kornman K.S.** The role of local factors in the etiology of periodontal diseases.// Periodontology 2000. – 2: 83-97.

Поступила 07.02.11

