

СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИАПИКАЛЬНЫХ ТКАНЯХ ЛИЦ С ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

ЛИСЯНЫЙ Н.И., ВОЛОСОВЕЦ Т.Н., ЮНАКОВА Н.Н., ГАЛЯРНИК Н.А.

Институт нейрохирургии имени ак. А.П.Ромоданова

Институт стоматологии Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л.Шупика

В последние годы в стоматологическую практику внедрены высокочувствительные и высокоспецифические диагностические методы, результаты использования которых, расширили взгляды на этиологию воспалительно-деструктивных заболеваний тканей периодонта. Результаты ряда исследований указывают на существование взаимосвязи между поражением тканей периодонта и персистенцией вирусной инфекции. В развитии патологии периапикальных тканей играют важную роль влияние факторов, среди которых ведущими являются наличие первичных и вторичных изменений обмена веществ, изменение местной иммунной системы, активизация условнопатогенной микрофлоры и вирусов и в особенности герпесвирусной природы (Исаков В.А., Борисова В.В., 1999; Yound P., Main J., 2003; Kandoff R., 2004; Ibrahim A.I., Obeid M.T., 2005).

Ведущую роль в патогенезе герпесвирусной инфекции (ГВИ) играет состояние иммунной системы человека [1-4, 16, 17]. Именно состояние противовирусного иммунного ответа определяют тип ГВИ, характер и глубину вирусного поражения частоту рецидивов [3, 9, 13, 16]. По результатам многочисленных исследований было установлено, что у больных с рецидивирующим течением ГВИ наблюдаются глубокие нарушения во всех звеньях иммунной системы (клеточном, гуморальном, системе интерферона — ИФН), что приводит к развитию вторичного вирусиндуцированного иммунодефицита и прогрессированию болезни [2, 9, 12, 13, 15]. Так, в клеточном звене иммунитета наблюдается угнетение продукции лимфокинов, цитокинов, увеличение абсолютного количества Т-супрессоров и снижение общего количества CD3- и CD4-лимфоцитов,

Особенностью ткани периодонта является скопление в нем различных типов клеток, в том числе и эпителиальных, представляющих собой остатки зубообразующего эпителия. Впервые эти скопления были описаны Малассе в 1885 г. В работах Н.А. Астахова (1908) было доказано, что эти клетки являются остатками эпителия зубного органа, которые сохранились после его резорбции. При воспалительном процессе в периодонте клетки активизируются и проявляют

тенденцию к размножению. Таким образом эти клетки могут служить морфологическим субстратом для внедрения вируса.

При морфологическом исследовании обнаруживается, что в результате вирусного поражения в эпителии возникает явление баллонирующей дистрофии с гибелью эпителиальных клеток и скоплением серозного экссудата. В ядрах клеток эпителия находятся внутриядерные базофильные включения, окруженные зоной просветления - тельца Коундри (по имени автора, который установил взаимосвязь включений с вирусом герпеса).

В последние годы интенсивное изучение участия клеточно-гуморальных факторов иммунной системы как в развитии периодонтитов, так и в развитии противовирусной защиты, показало что различные субпопуляции иммунных клеток определяются в ткани, установлен синтез ими провоспалительных цитокинов и интерферонов [17].

Целью настоящего исследования было изучение содержания субпопуляций Т-лимфоцитов в периапикальной ткани лиц в зависимости от наличия или отсутствия в ней герпесвирусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках исследования, проведенного нами было, обследовано 62 пациента. Из них 42 пациента были носителями персистирующей вирусной инфекции и имели соответствующие поражения тканей периодонта, что было подтверждено данными ПЦР. 20 пациентов не являлись носителями персистирующей вирусной инфекции. Средний возраст пациентов составлял $41 \pm 3,4$ г (от 18 до 65 лет). В исследуемой группе мужчин было 28, женщин – 34.

Диагноз устанавливался на основании анамнеза болезни, результатов инструментальных методов обследования и радиовизиографии.

Размер очага деструкции в периапикальных тканях изучали с помощью компьютерных рентгенографических методов диагностики – радиовизиографии и ортопантомографии. Для оценки интенсивности поражения и степени активности течения хронического верхушечного периодонтита использовали – комплексный апикальный индекс (КАИ) и показатель активно-

сти хронического верхушечного периодонтита (АП), которые позволяют дать количественную и качественную оценку состояния околоверхушечных тканей при наличии патологии тканей периодонта.

Лечение пациентов проводили на кафедре стоматологии ИС НМАПО имени П.Л.Шупика. Пациенты были информированы об особенностях клинического исследования и дали согласие на участие в нем. Корректность методов исследования отвечала современным этическим нормам и принципам относительно проведения клинических исследований (протокол КЕ № 3 (27) от 05.03.2007г.)

Методика забора тканей периапикальной области и подготовка к исследованию.

Перед проведением проводниковой анестезии пациенты прополаскивали полость рта 0,12% раствором хлоргесидина на протяжении 1 мин. Стерильным скальпелем №15 производили трапециевидный разрез. Тупо, остро отслаивали слизисто-надкостничный лоскут. Основание разреза было обращено к переходной складке. Лоскут отслаивали распатором от альвеолярного края к переходной складке. С помощью стерильных фрез и боров разного диаметра производили обработку периапикальной области с использованием солевого раствора в качестве охлаждения. Забор периапикальной ткани осуществлялся с помощью стерильной юреты. При заборе периапикальной ткани с зубов, полученных после экстракции, данная ткань отделялась от верхушки корня с помощью стерильного лезвия скальпеля.

Образцы ткани помещались во флаконы с питательной средой ДМЕМ (Дульбекко модифицированная питательная среда Игла), содержащей антибиотики: гентамицин (150 мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл), тотчас же транспортировались в лабораторию, хранились при +4°C не более 4-х часов.

Кусочки ткани периапикальной области измельчали механически, переносили в чашку Петри путем пропускания через шприц с иглой для внутривенных инъекций, обработку клеток трипсином или ферментами не проводили по причине исключения воздействия ферментных экспрессов CD иммунологических рецепторов, так как известно что трипсин уменьшает экспрессию Т-лимфоцитов CD-2 CD-3 рецепторов. Полученную клеточную взвесь фиксировали через клеточный фильтр и подсчитывали количество фиксированных клеток по окраске 0,1 % раствор трипсинового синего. Полученную клеточную взвесь доводили до концентрации $2-3 \times 10^9$ клеток в одном миллилитре и использовали в дальнейших исследованиях.

Определение методом ПЦР герпесвирусов в периапикальных тканях.

Среди наиболее часто выявляемых герпесвирусов в периапикальных тканях является цитомегаловирус, вирус простого герпеса и значительно реже вирус Эпштейн-Барра. В этой связи в наших исследованиях проводили определение наличия только этих трех основных вирусов.

Определение вирусов методом ПЦР включает, как известно, три этапа. Первый этап - выделение ДНК вирусов из биологического материала; второй этап - проводится амплификация (размножение) ДНК возбудителя с известным вирусным фрагментом ДНК (праймером) и третий этап – электрофорез в агаровом геле продуктов реакции амплификации. В работе постановки реакции ПЦР проводилась согласно инструкции РО проведения этой реакции фирмы «АмплиСенс», Москва Россия, Центральный институт эпидемиологии АМИ России. В работе использовали наборы для выделения ДНК фирмы «АмплиСенс» Россия. Праймеры для ПЦР к герпесвирусам I, II типа, цитомегаловирусу и вирусу Эпштейн-Барра, а также концентрированные растворы для электрофореза и агарозу использовали этой же фирмы.

Результаты ПЦР исследования обрабатывали с помощью транслюминации (ДНК технология Россия) и программы «Био-Тест» для компьютерной обработки изображения.

Определение содержания отдельных субпопуляций лимфоцитов в периапикальных тканях.

В наших исследованиях определялись основные субпопуляции лимфоцитов ответственных за местный иммунитет и принимающих участие в реакциях противовирусной защиты с помощью набора моноклональных антител производства Института проблем онкологии НАН Украины.

Использовались в работе следующие моноклональные антитела анти CD-3, 4, 8, выявляющие следующие Т-лимфоциты, Т-лимфоциты хелперы (CD-4) и Т-лимфоциты цитотоксические (CD-8). Кроме этого в работе исследовали антиген адгезии и колонизации CD-11 β , который экспрессируется преимущественно на макрофагах, а также CD-95 антитела против рецептора апоптоза (Fas-рецептор), который отражает готовность активированных клеток к апоптозу или дальнейшей дифференцировке.

Определение указанных субпопуляций лимфоцитов осуществлен согласно методическим рекомендациям Б.В.Пинетина и др. [18] и инструкции по применению моноклональных антител. Методы определения отдельных субпопуляций заключалось в следующем. К 100 мкл взвеси клеток тканей периодонта добавляли

10,0 мкл соответствующего моноклонального антитела и инкубировали в течении 40 минут, после этого клеточную взвесь отмывали 2 раза физиологическим раствором и взвешивали в 100,0 мкл готового раствора к которому добавляли 10,0 мкл вторичных антител меченых флуорисцентом на 40 минут. После этого проводили 2-х кратное промывание физраствором и клеточную взвесь фиксировали 0,1% раствором формалина. Содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре FACS сор фирмы Vector Diskinson (США). Количество отдельных фракций лимфоцитов определяли в процентах к общему количеству клеток во взвеси клеток, полученных из тканей периодонта по программе Wind MDI 2.8.

Статистическую обработку проводили в программе Statistika программного обеспечения Word 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При вирусологическом обследовании активная моновирусная инфекция была выявлена у 15(36,9±6,0)% NSV1/2 – 3(7,1±4,1)%, CMV – 6(14,3±3,7)%, EBV – 6(14,3±3,7)%, ассоциированная герпесвирусная инфекция — у 27 (64±6,0)% больных: HSV1/2 – EBV- CMV – 2(4,7±3,5)%, HSV1/2 – EBV – 3(7,1±4,1)%, HSV1/2 – CMV - 8(19 ±4,1)%, EBV- CMV – 14(33,3±4,3)%

следовательно можно сделать вывод, что ассоциированные формы герпесвирусной инфекции выявляются в 2 раза чаще чем моноинфекция. Наиболее часто ассоциируются EBV- CMV и HSV1/2 – CMV.

Данные пациентов были сгруппированы в зависимости от масштабов деструкции костной ткани(≥5 мм или < 5 мм) У 48 пациентов деструкция достигла ≥5 мм, а у 14 пациентов она была < 5 мм. Из общего количества пациентов с радиографически выявленной деструкцией костной ткани ≥5 мм ДНК EBV, HCMV, HSV-1/2 выявлена у 46 пациентов – 95,8%. У пациентов с радиографической деструкцией костной ткани < 5 мм ДНК EBV, HCMV, HSV-1/2 выявлена у 2 (14,2%). Таким образом существует прямая связь между размером периапикального очага и наличием вирусной ДНК в периапикальной ткани.

При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов периапикальных тканей установлено существенное достоверное снижение общего количества CD3⁺T-лимфоцитов, у больных с ГВИ, а также выявленные изменения свидетельствуют о развитии вирусиндуцированных иммунных нарушений, которые максимально проявляются в количественной и функциональной недостаточности клеточного звена местного иммунитета.

Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов в тканях периодонта у лиц с персистирующей вирусной инфекцией

Иммунологические показатели	Больные с ГВИ (n=42)	Больные без ГВИ (n=20)
CD 3+ лимфоциты%	29,81±4,85*	65,85±7,20
CD 4+ лимфоциты %	26,69±2,55*	33,60±1,20
CD 8+ лимфоциты %	23,42±2,37	21,50±2,01
CD11+ лимфоциты %	15,06±4,01	19,91±4,01
CD95+ лимфоциты %	39,54±7,04*	22,0±4,38

Примечание: 1. * p<0,01 – достоверность разницы показателей основной и контрольной группы;
2. n – количество обследованных

Так, если в контрольной группе обследованных людей доля CD4+хелперов -лимфоцитов была равна 33,60±1,20 то у пациентов с ГВИ 26,69±2,55 (p<0,05). В тоже время у них было статистически не достоверно повышено процентное содержание CD8+-лимфоцитов, что указывает на слабую противовирусную иммунную защиту как на уровне Т-хелперов(CD4+) так и на уровне CD8+.

CD11b-антиген в норме экспрессирован на CD8+-лимфоцитах и натуральных киллерах и

лимфоцитах, осуществляет связь между внеклеточным матриксом и цитоплазматической мембраной клеток [Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 2002]. Установлено снижение уровня клеток что указывает на нарушение процессов кооперации. В тоже время содержание лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации CD95, было увеличено в 1,7 - 1,8 раза (p<0,05). Частотный анализ показал, что у 72 - 78 % обследованных пациентов с ГВИ наблюдались значительные отклонения от нормы (2 - 3

степени) в содержании лимфоцитов, экспрессирующих молекулы адгезии CD11b.

Увеличение содержания CD95 указывает на то, что эти клетки находятся в состоянии активации, которое обычно заканчивается апоптозом [Kiener P.A. et. al., 1997]. Одним из механизмов индукции Fas-индуцированного апоптоза является инфицирование ГВ [Contreras et. al., 1999].

Таким образом проведенные иммунологические исследования состояния Т-клеточного звена иммунной системы периапикальных тканей указывают на существенное двухкратное снижение CD3+ Т-лимфоцитов у больных с герпесвирусной инфекцией. При этом установлено несколько факторов: первым угнетается Т-хелперное звено (CD4+); второй факт – субпопуляции CD8+ лимфоцитов, ответственных за цитотоксическую функцию Т-клеток, которые всегда активируются при вирусных инфекциях в наших наблюдениях лишь имеют тенденцию к увеличению на 2-3% по сравнению с контрольной группой, что указывает на вирусную иммунную супрессию CD-8 звена иммунитета. Третий факт заключается в том, что почти 40% лимфоцитов периапикальной ткани активируют рецептор апоптоза (Fas рецептор), что указывает на причину снижения Т-клеточного звена, а именно вызывает развитие процессов апоптоза у лимфоцитов, вместо активации развития нормального иммунного ответа против вирусов. Таким образом вирусы избегают иммунной защиты и создают иммунносупрессию в местном иммунитете периапикальных тканей зуба. Помимо индукции апоптотических процессов в лимфоцитах, отмечается также нарушение процессов активации и кооперации, что проявляется в незначительном снижении содержания CD-11+ лимфоцитов, экспрессирующих молекулы межклеточной взаимосвязи.

ВЫВОДЫ

1. С помощью полимеразной цепной реакции в периапикальных тканях пациентов с хроническими периодонтитами выявляется ДНК вирусов герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловирусов и вируса Эпштейн-Барра с различной частотой: у 36,9±6,0% процентов пациентов в виде моноинфекции, у 64±6,0% в виде ассоциированной вирусной инфекции.
2. Размер очага деструкции коррелирует с наличием вирусов герпеса в периапикальных тканях.
3. При хроническом периодонтите ассоциированном с вирусом Эпштейн-Барра, герпесвирусной и/или, цитомегаловирусной инфекцией формируется состояние вторичного иммунодефицита местного иммунитета с «низкой» реактивностью Т-системы иммунитета, и преимущественным угнетением

Т-хелперного звена иммунитета.

4. 4. Угнетение Т-клеточного звена местного иммунитета достигается путем стимуляции вирусами апоптотических процессов в лимфоцитах, на что указывает содержание CD 95+.
5. Выявленные изменения свидетельствуют о развитии Вирусиндуцированных местных иммунных нарушений, которые максимально проявляются в количественной и функциональной недостаточности Т-клеточного звена иммунитета и в неспособности противовирусной защиты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринский И.Ф., Шубладзе А.К. Герпес: этиология, диагностика, лечение. — М.: Медицина, 1986. — 296 с.
2. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика /В.А. Исаков, В.В. Борисова и др. // Руководство для врачей. — СПб: Издательство Лань, 1999. — 192 с.
3. Герпетический иммунодефицит как условие развития генерализованного патологического процесса, (редакционная заметка) // Вопросы вирусологии. — 1990. —№6. —С. 524-526.
4. Драник Г.Н. Клиническая иммунология и алергология — М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2003. - 604 с.
5. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. - М.: Медицина, 1996. — 240 с.
6. Завелевич М.П., Деев В.А., Рыбалко С.Л. Современные представления о системе интерферона// Лаб. диагностика. — 2004.— N4.—С. 65-72.
7. Интерфероновый статус и эффект противовирусной терапии с использованием индукторов интерферона у женщин с привычным выкидышем в анамнезе, хронической смешанной вирусной инфекцией в сочетании с аутоиммунными реакциями/ А.В. Борисова, В.М. Сидельникова, Г. Т. Сухих, Н.С. Логинова // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов.—1998.—N4.—С. 15-19.
8. Малашенкова И.К., Тазулахова Э.Б., Дидковский Н.А. Интерфероны и их индукторы // Терапевт. арх. — 1998. -N11. - С. 35-39.
9. Роль системы естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммунологический статус / А.М. Борисова, А.Б. Алкеева, М.З. Саидов и др. // Иммунология. — 1991. — N6 — С. 60-62.
10. Руководство по иммунофармакологии: Пер. с англ. / Под ред. М.М. Дейла, Дж.К. Формена. —М.: Медицина, 1998. — 332 с.

11. Сапин М.Р. Этинген Л.Е. Иммуная система человека. – М.: Медицина, 1996. — 304 с.
12. Состояние вегетативной и иммунной систем у инфицированных вирусом простого герпеса/О.А. Малышева, В.С. Ширинский, В.С. Кожевников, Н.М. Старостина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001.-№3.-С 37-40
13. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Кулаков В.И. Имунитет и генитальный герпес // НЦФГи П РАМН, 1997; Н. Новгород-Москва.
14. Хахалин Л.Н., Соловьева В.В. герпесвирусные заболевания человека // Клиническая фармакология и терапия.-1998. – № 1 – С. 72-78.
15. Чиркин В.В., Семенов В.Ф., Карандашов В.И. Вторичные иммунодефициты. – М: Медицина, 1999. – 248 с.
16. Annunziato P.W., Gershon A. HSVinfection // *Pediatr in Review* 1996. – Vol. 17(12). – P. 415-424.
17. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000: 15: 139–150.
18. Пинегин Б.В. и др. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека. Пособие для врачей-лаборантов. – Москва, 2001. – С. 54.

УДК 616.61-008.6-036.12-097-053.2

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ HLA-A, B, DR У ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ХВОРОБУ НИРОК, ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТ З НЕФРОТИЧНИМ СИНДРОМОМ

ПЕТРИНА О. П., ДРАННИК Г. М., БАГДАСАРОВА І. В., ДРІЯНСЬКА В. Є.

ДУ «Інститут нефрології НАМН» України, Київ

Хронічні хвороби нирок є глобальною медичною та соціальною проблемою, що обумовлено їх тенденцією до прогресуючого перебігу. Гломерулонефрит, в порівнянні з іншими нефропатіями, має більш швидкі темпи прогресування і є імуноопосередкованим захворюванням нирок - імунне запалення являє собою первинну ланку у розвитку тубуло-інтерстиційних змін, що знаменують подальший фіброз та склероз ниркової тканини [3, 7, 8]. Хронічний гломерулонефрит є найчастішою причиною хронічної ниркової недостатності (ХНН), яка потребує лікування поза-нирковими методами очищення крові та пересадкою нирки.

Адекватність терапії хронічного гломерулонефриту з нефротичним синдромом (ХГН, НС) суттєво впливає на прогноз та наслідки захворювання. Одним з сучасних підходів до підвищення ефективності лікування хворих можна вважати дослідження механізмів порушень імунної системи з визначенням особливостей як стандартних показників імунітету, так і факторів міжклітинної кооперації - продукції цитокінів, рецепторів міжклітинної адгезії, проапоптотичних маркерів - та використання цих показників з метою прогнозування перебігу ГН та розробки більш індивідуалізованої тактики терапії хворих [9, 10].

Але особливий інтерес викликають дослідження взаємозв'язку між HLA фенотипом і розвитком захворювання, тому що генетична схильність до імунної відповіді, в тому числі з участю

вищенаведених факторів, може обумовлювати як розвиток нефротичного синдрому, так і його перебіг, а тому і відповідну реакцію на лікування та прогноз для хворого.

Мета роботи - встановити розподіл антигенів гістосумісності (HLA-A, B, DR) у дітей, хворих на ХГН, НС, та виявити особливості в порівнянні із здоровими та дорослими з цією патологією.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Вивчали розподіл HLA-антигенів у 255 дітей, хворих на хронічну хворобу нирок I-II ст., гломерулонефрит з нефротичним синдромом, в порівнянні з 350 здоровими донорами, а також особливостями частоти антигенів у 143 дорослих хворих з таким самим діагнозом. Пацієнти були обстежені загальноприйнятими для нефрологічної практики лабораторно-інструментальними методами. Клінічний діагноз встановлювали на основі анамнезу, даних об'єктивного обстеження, даних лабораторних і інструментальних досліджень: загального аналізу крові, сечі, добової протеїнурії, біохімічного дослідження крові з визначенням вмісту сечовини, креатиніну, загального білка, альбуміну, АЛТ, АСТ, білірубіну, холестерину, УЗД нирок, патоморфологічних досліджень ниркових біопсій.

Стан функції нирок оцінювали за рівнем креатиніну крові, який визначали на біохімічному аналізаторі методом Яффе у мікромолях на літр, а також за швидкістю клубочкової фільтрації (ШКФ), що оцінювалася за допомогою форму-