

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ

УДК: 616.314.17-008.1-022.7-036.66-06:612.017.1]-092.9

А. Є. Демкович, Ю. І. Бондаренко, М. М. Якимчук

ЗМІНИ КЛІТИННОГО ІМУННОГО ЗАХИСТУ ОРГАНІЗМУ В ПРОЦЕСІ ХРОНІЗАЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО БАКТЕРІАЛЬНО-ІМУННОГО ПАРОДОНТИТУ

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

Актуальність дослідження

Запальні захворювання тканин пародонта в наш час набули широкого розповсюдження в усьому світі, а Україна належить до країн із високою частотою захворювань на хронічний генералізований пародонтит. За даними різних авторів, відбувається подальше зростання рівня пародонтологічних захворювань у нашій країні за останні роки, що має і загальномедичне, і соціальне значення [1].

Нині розвиток і прогресування запальних захворювань пародонта розглядають не стільки як локальне запалення навколозубних тканин, а як реакцію всього організму на бактеріальну інвазію тканин пародонта. Відомо, що розвиток пародонтиту стає наслідком дисбалансу між мікрофлорою порожнини рота й імунним захистом організму [2]. Слід при цьому також урахувати активність клітин-ефекторів запалення і достатність механізмів резистентності. Для розвитку запалення одного бактеріального чинника недостатньо, має бути сукупність цілого ряду патогенетичних факторів. При цьому має значення закріплення їх не тільки в тканинах пародонта, а і в організмі як цілому, від чого залежить ефективність стандартної терапії. Запальні захворювання пародонта зазвичай мають хронічний перебіг із періодичними загостреннями, а тому вимагають своєчасного і неодноразового проходження курсів лікування [3].

Дослідження мембранних рецепторів лімфоцитів на різних етапах їхнього розвитку, диференціювання, активації, клітинної проліферації, апоптозу є сучасним інформативним, об'єктивним і доступним методом, що використовується з науковою, діагностичною, лікувальною і прогностичною метою. Тому вивчення цієї проблеми має ґрунтуватися на комплексному дослідженні базових механізмів, що призводять до переходу запалення в хронічну форму з подальшим визначенням патогенетично обґрунтованого комплексу терапевтичних заходів, здатних ефективно впливати на процеси санації та повної регенерації пародонта. На цьому етапі дослідження вважали за доцільне проаналізувати особливості змін клітинної ланки адаптивного імунітету при експериментальному бактеріально-імунному пародонтиті, що сприятиме поглибленню розуміння суті

цього запального процесу і відкриє шляхи патогенетичного обґрунтування їх корекції.

З'ясування характеру порушень імунологічних процесів дозволить установити роль однієї з важливих ланок, що призводить до ушкодження структури пародонтального комплексу і формування запального процесу різних ступенів і характеру перебігу [4]. Клітинний імунітет становить собою тип імунної відповіді організму, за якого відсутня участь системи комплементу й антитіл. До клітинних неспецифічних факторів захисту належать два типи клітин: фагоцити і природні кілери. Клітинні специфічні фактори захисту включають Т-лімфоцити і В-лімфоцити [5].

Метою нашого дослідження було з'ясування патогенетичної ролі клітинного адаптивного імунітету в процесі формування хронічної запальної реакції в пізній період перебігу експериментального бактеріально-імунного пародонтиту

Матеріали і методи дослідження

Дослідження було проведено на білих безпородних клінічно здорових самцях-щурах масою 150-200 г в умовах віварію. Тварини перебували на стандартному раціоні, збалансованому за основними елементами харчування, з вільним доступом до води. Експерименти проводили з дотриманням загальних правил і положень Європейської Конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Київ, 2001). Піддослідні тварини були розподілені на дві групи: перша група – інтактні тварини (n=10); друга група – тварини з експериментальним пародонтитом на 30 добу дослідження (n=8). Експериментальний бактеріально-імунний пародонтит у дослідних тварин викликали шляхом уведення в тканини пародонтального комплексу суміші мікроорганізмів, розбавленої яєчним протеїном [6]. З метою посилення імунної відповіді одночасно вводили в лапку щура повний ад'ювант Фрейнда. Для подальших досліджень відбирали кров піддослідних тварин. Показники клітинного імунітету визначали методом, який ґрунтується на взаємодії моноклональних антитіл (МКАт), мічених флюоресцентною міткою, з поверхневими антигенами лімфоцитів [7]. Показниками клітинного імунного захи-

сту слугували відносна кількість лімфоцитів із маркерами CD3+ (загальні Т-лімфоцити), CD4+ (Т-хелпери), CD8+ (цитотоксичні клітини, Т-кілери), CD19+ (В-лімфоцити), CD16+ (натуральні кілери, NK-клітини) та імунорегуляторний індекс (CD4+/CD8+). Отримані цифрові дані статистично опрацьовували із застосуванням параметричних і непараметричних методів статистики за допомогою програмного забезпечення «Excel» («Microsoft», США) та «STATISTICA 10.0» («Statsoft», США) [8]. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за критерієм U-критерієм Манна-Уїтні [9].

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що однією із ключових патогенетичних ланок розвитку запального процесу в пародонтальному комплексі, від якої залежать тяжкість і характер перебігу, формування і завершеність регенераційних процесів у пародонті, є стан клітинної неспецифічної та специфічної резистентності [10]. Кількісні та якісні зміни характеристик лімфоцитів і моноцитів відбуваються в певних межах, що дозволяє підтримувати «клітинний гомеостаз», але разом із тим гостро реагувати на будь-які несприятливі впливи середовища. Тому визначення кількості та якості популяцій і субпопуляцій лімфоцитів і моноцитів дає важливу інформацію, яка може відображати активність і тяжкість перебігу захворювання [11].

Спектр субпопуляцій лімфоцитів у досліджуваній групі тварин із експериментальним бактеріально-імунним пародонтитом на 30 добу дослідження по-

рівняно з інтактними тваринами відображено в таблиці.

Таблиця
Показники клітинного адаптивного імунітету крові білих щурів з експериментальним бактеріально-імунним пародонтитом у період хронізації запального процесу (M±m)

Показники	Інтактні тварини. Контроль	Тварини з експериментальним пародонтитом на 30 добу дослідження
К-ість тварин	10	8
CD3+ (%)	45,94±0,73	34,39±0,90 (p<0,01)
CD4+ (%)	33,32±0,56	22,61±0,41 (p<0,01)
CD8+ (%)	15,70±0,74	23,30±0,48 (p<0,01)
CD19+ (%)	11,65±0,39	9,41±0,19 (p<0,01)
CD16+ (%)	9,63±0,40	12,31±0,36 (p<0,01)
CD4+/CD8+	2,17±0,11	0,97±0,02 (p<0,01)

Примітка: p – достовірність відмінностей відносно інтактних тварин.

Загальна оцінка імунного статусу щурів з експериментальним бактеріально-імунним запаленням у тканинах пародонтального комплексу показала, що ступінь і спрямованість змін усіх його ланок були різні. Так, при детальному аналізі отриманих результатів дослідження клітинної ланки адаптивного імунітету виявили, що вміст загальних Т-лімфоцитів (CD3+) у крові тварин із експериментальним бактеріально-імунним пародонтитом на 30 добу дослідження знизився в 1,34 раза порівняно з групою інтактних тварин (p<0,01). Поряд з тим у процесі розвитку експериментального бактеріально-імунного пародонтиту відбулося зниження в крові тварин на 30 добу дослідження вмісту Т-хелперів (CD4+) в 1,47 раза (p<0,01) (рис. 1).

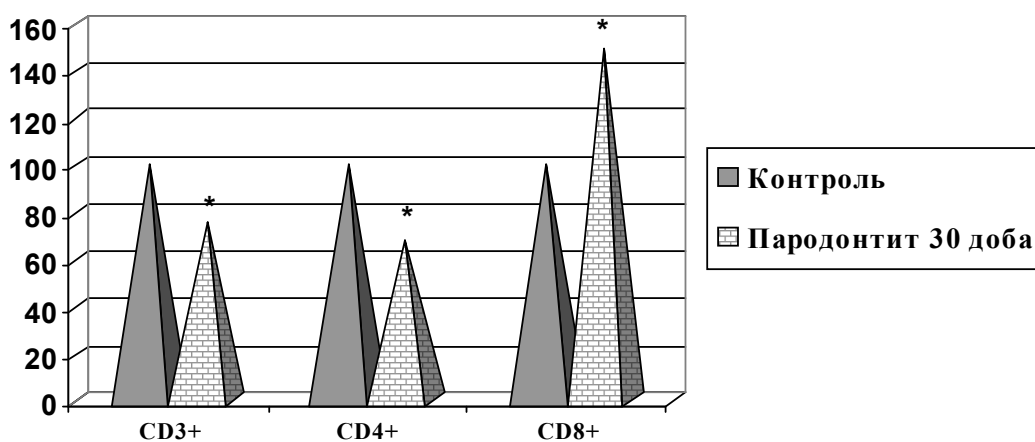


Рис. 1. Зміни відносної кількості CD3+, CD4+, CD8+ у крові щурів при експериментальному бактеріально-імунному пародонтиті на 30 добу дослідження (у % від контролю).

Примітки: * – достовірність відмінностей відносно інтактних тварин (p<0,01)

Уміст Т-ефекторів (CD8+), які виконують функції й супресорів, і кілерів, при експериментальному запаленні тканин пародонта, навпаки, підвищився в порівнянні з показниками інтактних тварин у 1,48 раза (p<0,01). Саме ці досліджувані клітини пригнічують активність клітинного і гуморального адаптивного імунітету, впливаючи на механізми міжклітинної взаємодії. Наявність їх у крові в гострій фазі запального процесу свідчить про активацію імунологічної реактивності у відповідь на антигенну стимуляцію продуктами тканинного розпаду. Імунорегуляторний індекс (CD4+ / CD8+) при цьому зменшився в порівнянні з цим показником групи інтактних тварин у 2,24 раза (p<0,01). Отримані дані свідчать про появу імуносупресивного стану в щурів за умови бактеріально-імунного пародонтиту, що розвинувся в пізній період перебігу запальної реакції за рахунок і Т-хелперів, і цитотоксичних Т-супресорів / кілерів (рис. 2).

Щодо характеру змін вмісту натуральних кілерів (NK-клітин, CD16+) у сироватці крові експериментальних тварин із пародонтитом на пізній стадії перебігу запалення, то слід зазначити, що на 30 добу досліджуваної їхній вміст перевищував (у 1,28 раза; p<0,01) показники у тварин інтактної групи. При визначенні загальних В-лімфоцитів крові (CD19+) також виявилися вірогідні відмінності в експериментальній групі тварин. Так, у тварин із пародонтитом на 30 добу цей показник був нижчим у 1,24 раза (p<0,01) відносно інтактних щурів (рис. 2).

Отримані дані свідчать про появу імуносупресивного стану в щурів за умови бактеріально-імунного пародонтиту, що розвинувся в пізній період перебігу запальної реакції за рахунок і Т-хелперів, і цитотоксичних Т-супресорів / кілерів (рис. 2).

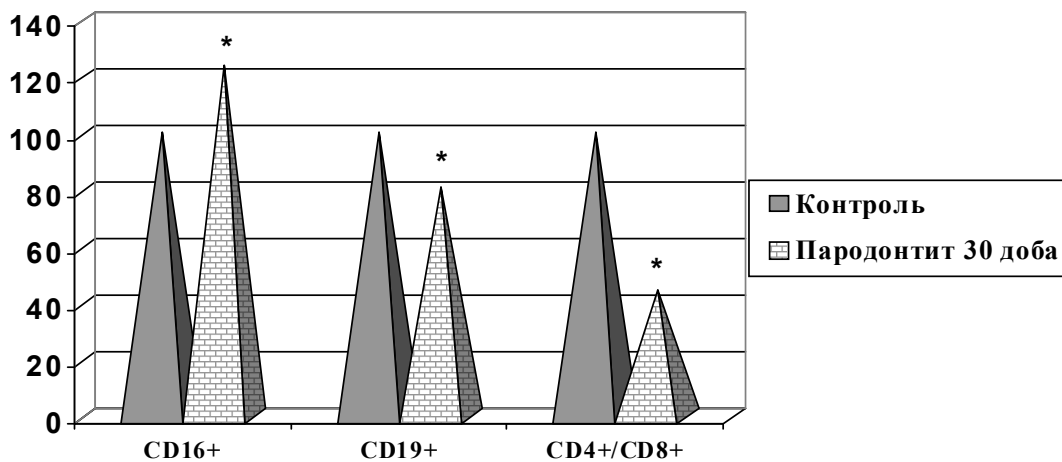


Рис. 2. Зміни відносної кількості CD16+, CD19+ та імунорегуляторного індексу (CD4+/CD8+) у крові щурів при експериментальному бактеріально-імунному пародонтиті на 30 добу дослідження (у % від контролю).

Примітки: * – достовірність відмінностей відносно інтактних тварин ($p < 0,01$)

Висновки

1. Перебіг експериментального пародонтиту в пізній період супроводжується функціональним порушенням Т- і В-клітинної ланок імунної системи щурів, свідченням чого є зниження відсоткового вмісту Т-лімфоцитів за рахунок Т-активних клітин, Т-хелперів, В-лімфоцитів та збільшення Т-кілерів і NK-клітин. Ці зміни можуть розглядатися як ознаки формування хронічного перебігу запального процесу в тканинах пародонтального комплексу.

2. Зміни кількісного складу Т-клітин і співвідношення їхніх популяцій при експериментальному бактеріально-імунному пародонтиті дають підставу розглядати їх як важливу патогенетичну ланку цієї хвороби, що має безпосереднє відношення до механізмів імунного захисту і толерантності, а також може бути розцінено як новий підхід до діагностики і терапії генералізованого пародонтиту.

Перспективи подальших досліджень. Планується продовжити дослідження клітинного імунного захисту за умови експериментального бактеріально-імунного пародонтиту за умови корекції його флавонолом.

Література

1. Димитрова А. Г. Оценка эффективности различных иммуномодуляторов в комплексном лечении генерализованного пародонтита у лиц молодого возраста (18-25 лет) / А.Г. Димитрова, Ю.Г. Коленко // Современная стоматология. – 2013. – № 2. – С. 38-39.
2. Periodontal disease as a risk factor for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw / V. Thumbigere-Math, B. S. Michalowicz, J. S. Hodges [et al.] // J. Periodontol. – 2014. – Vol. 85, № 2. – P. 226-233.
3. Алгоритм виникнення й розвитку генералізованого пародонтиту та пародонтозу схема комплексного лікування генералізованого пародонтиту / Г. М. Мельничук, А. М. Політун, Л. Є. Ковальчук [та ін.] // Современная стоматология. – 2013. – № 1. – С. 35-40.
4. Long-term clinical and hematologic effects of non-surgical treatment on aggressive periodontitis / X. E. Wang, L. Xu, H. X. Meng [et al.] // Zhonghua Kou Qiang. – 2013. – Vol. 48, № 8. – P. 467-471.
5. Induction of immune response and prevention of alveolar bone loss with recombinant Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase / C. Zhu, J. Yang, J. Sun [et al.] // Arch. Oral Biol. – 2013. – Vol. 58, №12. – P. 1777-1783.
6. Демкович А. Є. Патогенетичні основи моделювання пародонтиту у тварин / А. Є. Демкович, Ю. І. Бондаренко // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2015. – № 1 (22). – С. 54-57.
7. Bunders M. Age-related standards for total lymphocyte, CD4+ and CD8+ T cell counts in children born in Europe / M. Bunders, M. Cortina-Borja, M. L. Newell // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 595–600.
8. Орлов А. И. Математика случая: Вероятность и статистика – основные факты: учебное пособие / А. И. Орлов. – М.: МЗ-Пресс, 2004. – 100 с.
9. Berger R. L., Casella G. Statistical Inference 2nd ed. – Florida: Duxbury Press. – 2001. – 374 p.
10. Demkovych A. Oxidative modification of proteins in the process of experimental periodontitis development / A. Demkovych, Yu. Bondarenko, P. A. Hasiuk // Interventional Medicine and Applied Science. – 2017. – № 9 (4). – P. 218-221.
11. Proteomics for the discovery of biomarkers and diagnosis of periodontitis: a critical review / Y. A. Guzman, D. Sakellari, M. Arsenakis [et al.] // Expert Rev. Proteomics. – 2014. – Vol. 11, № 1. – P. 31-41.

Стаття надійшла
26.02.2018 р.

Резюме

Однією з важливих ланок, що призводить до ушкодження структур пародонтального комплексу і формування запального процесу різних ступенів, є порушення імунологічних процесів. Мета дослідження полягала у з'ясуванні патогенетичної ролі клітинного адаптивного імунітету в процесі формування хронічної запальної реакції в пізній період перебігу експериментального бактеріально-імунного пародонтиту. Дослідження було проведено на білих безпородних клінічно здорових самцях-щурах. Експериментальний бактеріально-імунний пародонтит у дослідних тварин викликали шляхом уведення в тканини пародонтального комплексу суміші мікроорганізмів, розбавленої яєчним протеїном. Отримані цифрові дані статистично опрацьовували із застосуванням параметричних і непараметричних методів статистики. У статті наведено результати досліджень показників клітинного імунного захисту, що визначали за відносною кількістю лімфоцитів із маркерами CD3+ (загальні Т-лімфоцити), CD4+ (Т-хелпери), CD8+ (цитотоксичні клітини, Т-кілери), CD19+ (В-лімфоцити), CD16+ (натуральні кілери, NK-клітини) та імунорегуляторним індексом (CD4+/CD8+) в інтактних тварин і на 30 добу розвитку експериментального бактеріально-імунного пародонтиту. Установлено, що характер перебігу експериментального запалення в тканинах пародонтального комплексу залежав від змін клітинного імунного статусу, що супроводжувався зниженням умісту загальних

зрілих Т-лімфоцитів (CD3+) у крові тварин із експериментальним бактеріально-імунним пародонтитом на 30 добу дослідження; разом з тим у процесі розвитку експериментального бактеріально-імунного пародонтиту відбулося зниження в крові тварин на 30 добу вмісту Т-лімфоцитів-хелперів (CD4+), підвищення Т-супресорів (CD8+), підвищення вмісту натуральних кілерів (CD16+) і зниження відносного вмісту В-лімфоцитів (CD19+). Імунорегуляторний індекс (CD4+ / CD8+) при цьому зменшився в порівнянні з цим показником групи інтактних тварин. У щурів за умови бактеріально-імунного пародонтиту розвинувся імуносупресивний стан у пізній період перебігу запальної реакції за рахунок і Т-хелперів, і цитотоксичних Т-супресорів / кілерів. Ці зміни можна розглядати як ознаки формування хронічного перебігу запального процесу в тканинах пародонтального комплексу.

Ключові слова: бактеріально-імунний пародонтит, імунна система, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, запалення.

Резюме

Одним из важных звеньев, приводящих к повреждению структур пародонтального комплекса и формированию воспалительного процесса различной степени, является нарушение иммунологических процессов. Цель исследования заключалась в выяснении патогенетической роли клеточного адаптивного иммунитета в процессе формирования хронической воспалительной реакции в поздний период течения экспериментального бактериально-иммунного пародонтита. Исследование было проведено на белых беспородных клинически здоровых самцах-крысах. Экспериментальный бактериально-иммунный пародонтит у опытных животных вызвали путем введения в ткани пародонтального комплекса смеси микроорганизмов, разбавленной яичным протеином. Полученные цифровые данные статистически обрабатывали с применением параметрических и непараметрических методов статистики. В статье приведены результаты исследований показателей клеточной иммунной защиты, которые определяли по относительному количеству лимфоцитов с маркерами CD3+ (общие Т-лимфоциты), CD4+ (Т-хелперы), CD8+ (цитотоксические клетки, Т-киллеры), CD19+ (В-лимфоциты), CD16+ (натуральные киллеры, NK-клетки) и иммунорегуляторного индекса (CD4+ / CD8+) в интактных животных и на 30 сутки развития экспериментального бактериально-иммунного пародонтита. Установлено, что характер течения экспериментального воспаления в тканях пародонтального комплекса зависел от изменений клеточного иммунного статуса, сопровождался снижением содержания общих зрелых Т-лимфоцитов (CD3+) в крови животных с экспериментальным бактериально-иммунным пародонтитом на 30 сутки исследования; вместе с тем в процессе развития экспериментального бактериально-иммунного пародонтита произошло снижение в крови животных на 30 сутки исследования содержания Т-лимфоцитов-хелперов (CD4+), повышение Т-супресоров (CD8+), повышение содержания натуральных киллеров (CD16+) и снижение относительного содержания В-лимфоцитов (CD19+). Иммунорегуляторный индекс (CD4+ / CD8+) при этом уменьшился по сравнению с данным показателем группы интактных животных. У крыс при бактериально-иммунном пародонтите развивалось иммуносупрессивное состояние в поздний период течения воспалительной реакции за счет как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-супресоров / киллеров. Эти изменения можно рассматривать как признаки формирования хронического течения воспалительного процесса в тканях пародонтального комплекса.

Ключевые слова: бактериально-иммунный пародонтит, иммунная система, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, воспаление.

UDC: 616.314.17-008.1-022.7-036.66-06:612.017.1]-092.9

CHANGES IN THE CELLULAR IMMUNE PROTECTION OF ORGANISM IN THE PROCESS OF CHRONIZATION OF EXPERIMENTAL BACTERIAL-IMMUNE PERIODONTITIS

A.Ye. Demkovych, Yu.I. Bondarenko, M.M. Yakymchuk

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University

Summary

One of the important factors that leads to damage of structures of the periodontal complex and leads to the formation of inflammatory process of varying degrees is the disruption of immunological processes.

The aim of the study was to clarify the pathogenetic role of cellular adaptive immunity in the process of formation of chronic inflammatory reaction in the late period of the experimental bacterial-immune periodontitis. The study was conducted on white, non-breeding, clinically healthy male rats. Experimental bacterial-immune periodontitis in experimental animals was caused by insertion into the tissues of the periodontal complex a mixture of microorganisms diluted with egg protein. The obtained digital data was statistically processed using parametric and nonparametric statistical methods.

The article represents the results of research on the parameters of cellular immune defense, determined by the relative number of CD3+ (common T-lymphocytes), CD4+ (T-helpers), CD8+ (cytotoxic cells, T-killers), CD19+ (B-lymphocytes), CD16+ (natural killers, NK-cell) and immunoregulatory index (CD4+ / CD8+) in intact animals and on the 30th day of experimental bacterial-immune periodontitis development. It was established that the nature of the course of experimental inflammation in the tissues of the periodontal complex depended on changes in the cellular immune status, accompanied by a decrease of the content of common mature T-lymphocytes (CD3+) in the blood of animals with experimental bacterial-immune periodontitis on the 30th day of the study. In the process of the development of the experimental bacterial-immune periodontitis there was a decrease of the content of T-lymphocytes-helper (CD4+) in the blood of animals and on the 30th day of the study an increase in T-suppressors (CD8+), an increase in the content of natural killers (CD16+) and a decrease in the relative content of B-lymphocytes (CD19+). The immunoregulatory index (CD4+ / CD8+) decreased in comparison with this indicator of a group of intact animals. In rats with bacterial-immune periodontitis, an immunosuppressive state developed in the late period of the inflammatory reaction due to both T-helper cells and cytotoxic T-suppressors / killers. These changes can be considered as signs of formation of the chronic course of the inflammatory process in the tissues of periodontal complex.

Key words: bacterial-immune periodontitis, immune system, T-lymphocytes, B-lymphocytes, inflammation.