

ОСОБЛИВОСТІ МІСЦЕВОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ В ОСІБ ІЗ ЗАПАЛЬНИМИ ТА ДЕСТРУКТИВНО-ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ТКАНИН ПЕРІОДОНТУ, АСОЦІЙОВАНИМИ З ПЕРСИСТУЮЧОЮ ГЕРПЕСВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ

Т.М. Волосовець, Н.М. Юнакова, В.П. Сільченко

Інститут стоматології НМАПО ім. П.Л. Шупика

Резюме. Хронічний періодонтит — це запальне захворювання, яке викликане умовно-патогенними бактеріями в можливій коінфекції з латентними герпесвірусами. Метою даного дослідження було ідентифікувати герпесвіруси, у тому числі цитомегаловірус (HCMV), вірус Епіштейна-Барра (EBV), вірус простого герпесу (HSV-1) у периапікальних тканинах. При застосуванні праймера ПЦР було встановлено наявність ДНК у досить великій кількості осіб з ендодонтичними патологіями. При вивченні Т-клітинної ланки місцевого імунітету в пацієнтів з персистуючою вірусною інфекцією було встановлено, що віруси уникають імунного захисту організму-носія та створюють імносупресію в місцевому імунітеті периапікальних тканин зуба.

Ключові слова: герпесвіруси, цитомегаловірус, вірус Епіштейна-Барра, захворювання тканин періодонту.

ОСОБЕННОСТИ МЕСТНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ И ДЕСТРУКТИВНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ТКАНЕЙ ПЕРИОДОНТА, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Т.М. Волосовец, Н.М. Юнакова, В.П. Сильченко

Резюме

Хронический периодонтит — это заболевание, вызванное условно-патогенными организмами в возможной коинфекции с латентными вирусами. Целью данного исследования было идентифицировать герпесвирусы, в том числе цитомегаловирус (HCMV), вирус Эпштейна-Барра (EBV), вирус простого герпеса (HSV-1) в периапикальных тканях. При помощи праймера ПЦР было установлено наличие ДНК герпесвирусов у большого количества лиц с эндодонтической патологией. При изучении Т-клеточного звена иммунитета у пациентов с персистирующей вирусной инфекцией было установлено, что вирусы избегают иммунного ответа организма-носителя и создают состояние иммуносупрессии местного иммунитета периапикальных тканей зуба.

Ключевые слова: герпесвирусы, цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барра, заболевание тканей периодонта.

FEATURES OF THE LOCAL IMMUNE REACTION FROM PEOPLE WITH THE INFLAMMATORY AND DESTRUCTIVE-INFLAMMATORY DISEASES OF PERIODONTAL TISSUES, ASSOCIATED WITH PERSISTENT HERPESVIRUS INFECTION

T. Volosovets, N. Yunakova, V. Silchenko

Summary

Chronic periodontitis is a disease caused by conditionally-pathogenic bacteria in possible coinfection with latent human viruses. The aim of this research was to identify herpesviruses, including cytomegalovirus (HCMV), Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus (HSV-1) in periapical tissues. Applying polymerase chain reaction (PCR), it was evidenced that the majority of people with endodontic pathologies possess DNA herpesvirus. Studying the T-cells link of local immunity for patients with persistent virus infection revealed that viruses avoid immune defense of seropositive people; and create an immunosuppression in local immunity of periapical issues of a tooth.

Key words: herpesviruses; cytomegalovirus; Epstein-Barr virus; periodontal disease.

Провідну роль у патогенезі герпесвірусної інфекції (ГВІ) відіграє стан імунної системи людини [1–4, 16, 17]. Саме стан противірусної імунної відповіді визначає тип ГВІ, характер і глибину вірусного ураження, частоту рецидивів [3, 9, 13, 16]. За результатами численних досліджень було встановлено, що у хворих з рецидивами проявів ГВІ спостерігаються глибокі порушення в усіх ланках імунної системи (клітинній, гуморальній, системі інтерферону — ІФН), які призводять до розвитку вторинного вірусіндукованого імунодефіциту та прогресування хвороби [2, 9, 12, 13, 15]. Так, у клітинній ланці імунітету спостерігається пригнічення продукції лімфоцитів, цитокинів, збільшення абсолютної кількості Т-супресорів і зниження загальної кількості CD3 і CD4 лімфоцитів.

Особливістю морфологічної будови тканин періодонту є наявність скупчення в ній клітин різних типів, у тому числі й епітеліальних, таких, що являються залишками зубоутворюючого епітелію. Уперше ці скупчення були описані Маласе в 1885 р. У роботах Н.А. Астахова (1908) було доведено, що ці клітини являють собою залишки епітелію зубного органа, які збереглися після його резорбції. При запальному процесі в періодонті клітини активізуються та проявляють тенденцію до розмноження. Таким чином, ці клітини можуть слугувати морфологічним субстратом для проникнення вірусу.

При морфологічному дослідженні виявляється, що в результаті вірусного ураження в епітелії виникає явище балонуючої дистрофії, що супроводжується загибеллю епітеліальних клітин і скупченням серозного ексудату. В ядрах клітин епітелію знаходяться внутрішньоядерні базofilні вклучення, оточені зоною просвітлення, — тільця Коундрі (за іменем автора, який установив взаємозв'язок вклучень з вірусом герпесу).

Останніми роками інтенсивне вивчення ролі клітинно-гуморальних чинників імунної системи як у розвитку періодонтитів, так і в розвитку механізмів противірусного захисту, показало, що у тканинах періодонту виявляються різні субпопуляції імунних клітин. Ці клітини синтезують прозапальні цитокіни та інтерферони [17].

Метою даного дослідження було вивчення вмісту субпопуляцій Т-лімфоцитів у періапикальній тканині осіб залежно від наявності або відсутності в ній герпесвірусів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У рамках дослідження, проведеного нами, були обстежені 62 пацієнти. З них 42 пацієнти були носіями персистоючої вірусної інфекції й мали відповідні ураження тканин періодонту, що було підтверджено даними ПЛР. У 20-ти пацієнтів носійство персистоючої вірусної інфекції виявлено не було. Середній вік пацієнтів склав $41 \pm 3,4$ року (від 18 до 65-ти років). У досліджуваній групі чоловіки склали 28 осіб, жінки — 34 особи.

Діагноз установлювався на підставі анамнезу, результатів інструментальних методів обстеження й даних радіовізографії.

Розмір вогнища деструкції в періапикальних тканинах вивчали за допомогою комп'ютерних рентгенографічних методів діагностики — радіовізографії й ортопантомографії. Для оцінки інтенсивності ураження та ступеня активності протікання хронічного апікального періодонтиту використовували комплексний апікальний індекс (КАІ) та показник активності хронічного верхівкового періодонтиту (АП), які дозволяють дати кількісну та якісну оцінку стану періапикальних тканин за наявності патологій тканин періодонту.

Лікування пацієнтів проводили на кафедрі стоматології ІС НМАПО ім. П.Л. Шупика. Пацієнти були поінформовані про особливості клінічного дослідження та дали згоду на участь у ньому. Коректність методів дослідження відповідала сучасним етичним нормам і принципам проведення клінічних досліджень (протокол KE № 3 (27) від 05.03.2007).

Методика забору тканин періапикальної ділянки та підготовка до дослідження

Перед провідниковою анестезією пацієнти прополіскували порожнину рота 0,12 % розчином хлорексидину впродовж 1 хв. Стерильним скальпелем № 15 робили трапецієподібний розріз. Тупо й гостро відшаровували слизово-окісний клапоть. Основа розрізу була звернена до перехідної складки. Клапоть відшаровували распатором від альвеолярного краю до перехідної складки. За допомогою стерильних фрез і борів різних діаметрів здійснювали обробку періапикальної ділянки з використанням фізіологічного розчину в якості охолоджувача. Збір періапикальної тканини здійснювався за допомогою стерильної кюрети. При зборі періапикальної тканини із зубів, отриманих після екстракції, ця тканина відділялась від верхівки кореня за допомогою стерильного леза скальпеля.

Зразки тканини розміщували у флаконах з поживним середовищем ДЕМ (Дульбекко, модифіковане поживне середовище Голка), що містить антибіотики гентаміцин (150 мкг/мл) та Амфотерицин (10 мкг/мл), транспортували в лабораторію, зберігали при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ не більше 4-х годин.

Шматочки тканини періапикальної ділянки механічно подрібнювали, переносили в чашку Петрі шляхом пропускання через шприц із голкою для внутрішньовенних ін'єкцій, обробку клітин трипсином або ферментами не проводили для виключення дії ферментних експресій CD імунологічних рецепторів, оскільки відомо, що трипсин

зменшує експресію Т-лімфоцитів CD2 й CD3-рецепторів. Отриману клітинну суспензію фіксували, пропускаючи через клітинний фільтр, і підраховували кількість фіксованих клітин за забарвленням 0,1 % розчином трипсинового синього. Отриману клітинну суспензію доводили до концентрації $2-3 \times 10^9$ клітин в одному мілілітрі й використовували в подальших дослідженнях.

Визначення методом ПЛР герпесвірусів у періапикальних тканинах

Серед герпесвірусів, що виявляються найчастіше, у періапикальних тканинах виявляються цитомегаловірус, вірус простого герпесу і значно рідше вірус Епштейна-Барра. У зв'язку з цим у наших дослідженнях проводили визначення наявності тільки цих трьох основних вірусів.

Визначення вірусів методом ПЛР включає, як відомо, три етапи. Перший етап — виділення ДНК вірусів з біологічного матеріалу; другий етап — ампліфікація (розмноження) ДНК збудника з відомим вірусним фрагментом ДНК (праймером) і третій етап — електрофорез в агаровому гелі продуктів реакції ампліфікації. У роботі постановки реакції ПЛР проводилася згідно з інструкцією РО проведення цієї реакції фірми «АмплиСенс», Москва, Росія, Центральний інститут епідеміології АМН Росії. У роботі використовували набори для виділення ДНК, праймери для ПЛР до герпесвірусів I та II типу, цитомегаловірусу й вірусу Епштейна-Барра та концентровані розчини для електрофорезу та агарозу фірми «АмплиСенс», Росія.

Результати ПЛР дослідження обробляли за допомогою транслюмінації (ДНК технологія, Росія) та програми «Біо-тест» для комп'ютерної обробки зображення.

Визначення вмісту окремих субпопуляцій лімфоцитів у періапикальних тканинах

У наших дослідженнях основні субпопуляції лімфоцитів, відповідальних за місцевий імунітет, і таких, що беруть участь у реакціях противірусного захисту, визначалися за допомогою набору моноклональних антитіл виробництва Інституту проблем онкології НАН України.

Використовувались у роботі наступні моноклональні антитіла антиCD3, 4, 8, що для виявлення Т-лімфоцитів хелпери (CD4) і Т-лімфоцитів цитотоксичних (CD8). У роботі також досліджували антиген адгезії та колонізації CD — 11 β , який експресується переважно на макрофагах і CD95 антитіла проти рецептора апоптозу (Fas-рецептор), який відображає готовність активованих клітин до апоптозу або подальшого диференціювання.

Визначення вказаних субпопуляцій лімфоцитів здійснено згідно з методичними рекомендаціями Б.В. Пінегіна та ін. [18] та інструкції із застосування моноклональних антитіл.

Методика визначення окремих субпопуляцій

До 100 мкл суспензії клітин тканин періодонту додавали 10,0 мкл відповідного моноклонального антитіла й інкубували протягом 40 хвилин, після цього клітинну суспензію відмивали два рази фізіологічним розчином і зважували у 100,0 мкл готового розчину, до якого додавали 10,0 мкл вторинних антитіл, мічених флуоресцентом, на 40 хвилин. Після цього проводили 2-кратне промивання фізіологічним розчином. Клітинну суспензію фіксували 0,1 % розчином формаліну. Вміст окремих субпопуляцій лімфоцитів проводили на проточному цитофлуориметрі FACS COM фірми «Vector Diskinson» (США). Кількість окремих фракцій лімфоцитів визначали у відсотках до загальної кількості клітин у суспензії клітин, отриманих із тканин періодонту за програмою Wind MDI 2.8.

Вміст субпопуляцій Т-лімфоцитів у тканинах періодонту в осіб з персистуючою вірусною інфекцією

Імунологічні показники	Хворі з ГВІ (n = 42)	Хворі, в яких ГВІ не виявлена (n = 20)
CD3+ лімфоцити, %	29,81±4,85*	65,85±7,20
CD4+ лімфоцити, %	26,69±2,55*	33,60±1,20
CD8+ лімфоцитів, %	23,42±2,37	21,50±2,01
CD11+ лімфоцити, %	15,06±4,01	19,91±4,01
CD95+ лімфоцити, %	39,54±7,04*	22,0±4,38

Примітки: 1) * p < 0,01 – достовірність різниці показників основної й контрольної груп; 2) n – кількість обстежених.

Статистичну обробку проводили у програмі Statistica програмного забезпечення Word 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При вірусологічному обстеженні активна моновірусна інфекція була виявлена у 15-ти (36,9 %) пацієнтів, HSV1/2 – у 3 (7,1 %), CMV – у 6 (14,3 %), EBV – у 6 (14,3 %), асоційована герпесвірусна інфекція – у 27 (64 %) хворих: HSV1/2-EBV-CMV – у 2 (4,7 %), HSV1/2-EBV – у 3 (7,1 %), HSV1/2-CMV – у 8 (19 %), EBV-CMV – у 14-ти (33,3 %).

Можна зробити висновок, що асоційовані форми герпесвірусної інфекції виявляються у два рази частіше, ніж моноінфекція. Найчастіше асоціюються EBV-CMV і HSV1/2-CMV.

Дані пацієнтів були згруповані залежно від масштабів деструкції кісткової тканини (≥ 5 мм або < 5 мм). У 48 пацієнтів деструкція досягла ≥ 5 мм, а в 14-ти пацієнтів вона складала < 5 мм. Із загальної кількості пацієнтів з радіографічно виявленою деструкцією кісткової тканини ≥ 5 мм ДНК EBV, HCMV, HSV – 1/2 виявлена в 46-ти пацієнтів – 95,8 %. У пацієнтів з радіографічною деструкцією кісткової тканини < 5 мм ДНК EBV, HCMV, HSV – 1/2 виявлена у 2-х (14,2 %). Таким чином, існує прямий зв'язок між розміром періапикального вогнища та наявністю вірусної ДНК в періапикальній тканині.

При вивченні субпопуляційного складу лімфоцитів періапикальних тканин встановлено істотне достовірне зниження загальної кількості CD3+Т-лімфоцитів у хворих з ГВІ, а також виявлені зміни свідчать про розвиток вірусіндукованих імунних порушень, які максимально проявляються в кількісній і функціональній недостатності клітинної ланки місцевого імунітету. Так, якщо в контрольній групі обстежених людей доля CD4+хелперів-лімфоцитів дорівнювала 33,60±1,20; то в пацієнтів з ГВІ – 26,69±2,55 (p < 0,05). У той же час у них був статистично недостовірно підвищений відсотковий вміст CD8+лімфоцитів, що вказує на слабкий протівірусний імунний захист як на рівні Т-хелперів (-CD4+), так і на рівні CD8+.

CD11b-антиген у нормі, експресований на CD8+лімфоцитах, NK-кілерах і лімфоцитах, здійснює зв'язок між позаклітинним матриксом і цитоплазматичною мембраною клітин (Барішников А.Ю., Шишкин Ю.В., 2002). Встановлено зниження рівня клітин, що вказує на порушення процесів кооперації. У той же час вміст лімфоцитів, що експресують маркер пізньої активації CD95, був збільшений в 1,7–1,8 разу (p < 0,05). Частотний аналіз показав, що в 72–78 % обстежених пацієнтів з ГВІ спостерігалися значні відхилення від норми у вмісті лімфоцитів, які експресують молекули адгезії CD11b.

Збільшення вмісту CD95 вказує на те, що ці клітини знаходяться у стані активації, яка зазвичай закінчується

апоптозом (Kiener P.A. et al., 1997). Одним з механізмів індукції Fas-індукованого апоптозу є інфікування ГВІ (Contreras et al., 1999).

Таким чином, проведені імунологічні дослідження стану Т-клітинної ланки імунної системи періапикальних тканин указують на істотне двократне зниження CD3+Т-лімфоцитів у хворих, які є носіями герпесвірусної інфекції. При цьому встановлено кілька факторів:

- пригнічується робота Т-хелперної ланки (CD4+);
- субпопуляції CD8+лімфоцитів, відповідальних за цитотоксичну функцію Т-клітин, які завжди активуються при вірусних інфекціях, у наших спостереженнях мають тенденцію до збільшення на 2–3 % у порівнянні з контрольною групою, що вказує на вірусну імунну супресію CD8 ланки імунітету.
- майже 40 % лімфоцитів періапикальної тканини активують рецептор апоптозу (Fas-рецептор), що вказує на причину зниження активності Т-клітинної ланки, а саме викликає розвиток процесів апоптозу в лімфоцитах замість активації розвитку нормальної імунної відповіді проти вірусів.

Таким чином, віруси уникають імунного захисту та створюють імуносупресію в місцевому імунітеті періапикальних тканин зуба. Окрім індукції апоптичних процесів у лімфоцитах відзначається також порушення процесів активації й кооперації, що проявляється в незначному зниженні вмісту CD-11+лімфоцитів, які експерують молекули міжклітинного зв'язку.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції в періапикальних тканинах пацієнтів із хронічними періодонтитами виявляється ДНК вірусів герпесу I та II типів, цитомегаловірусів і вірусу Епштейна-Барра з різною частотою:

- у 36,9 відсотка пацієнтів у вигляді моноінфекції;
- у 64 % у вигляді асоційованої вірусної інфекції.

2. Розмір вогнища деструкції корелює з наявністю вірусів герпесу в періапикальних тканинах.

3. При хронічному періодонтиті, асоційованому з вірусом Епштейна-Барра, герпесвірусною й цитомегаловірусною інфекцією, формується стан вторинного імунodefіциту місцевого імунітету з «низькою» реактивністю Т-системи імунітету й переважним пригніченням Т-хелперної ланки імунітету.

4. Пригнічення Т-клітинної ланки місцевого імунітету досягається шляхом стимуляції вірусами апоптичних процесів у лімфоцитах, на що вказує вміст CD 95+.

5. Виявлені зміни свідчать про розвиток вірусіндукованих місцевих імунних порушень, які максимально проявляються в кількісній і функціональній недостатності Т-клітинної ланки імунітету та нездатності протівірусного захисту.

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 аллергология. – 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. – № 4. – 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. – № 4. – С. 15–19.
8. Малашенкова И.К., Тазулахова Э.Б., Дидковский Н.А. Интерфероны и их индукторы // Терапевт. арх. – 1998. – № 11. – С. 35–39.
9. Роль системы естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммуно-

- гический статус / А.М. Борисова, А.Б. Алкеева, М.З. Саидов и др. // Иммунология. – 1991. – № 6. – 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. Иммунная 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. Иммуитет и генитальный герпес. – Н. Новгород-Москва: НЦФГи П РАМН, 1997.
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. HSV infection // *Pediatr. in Review.* – 1996. – Vol. 17 (12). – P. 415–424.
17. Marton I.J., 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.

biodinâmica

с уважением к вам

- ➔ уникальные разработки
- ➔ передовые технологии
- ➔ высокое качество
- ➔ доступные цены

**ПРЕДЛАГАЕМ ВЕСЬ СПЕКТР
РЕСТАВРАЦИОННЫХ
МАТЕРИАЛОВ**

тел. 067-463-5752
044-501-6290

антас

Подробнее на сайте www.antas.com.ua и www.biodinamica.com.br