

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

© И. Е. Сергеева, А. В. Борисенко, 2010.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ В ТКАНЯХ ПАРОДОНТА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

И. Е. Сергеева, А. В. Борисенко

Кафедра терапевтической стоматологии Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, г. Киев.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MOLECULES IN PERIODONTAL TISSUES AND PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH GENERALIZED PERIODONTITIS

I. E. Sergeeva, A. V. Borisenko

SUMMARY

A comparative clinical and immunological analysis of adhesion molecules HLA-A, B, C and HLA-DR major histocompatibility complex at the local level - in periodontal tissues and peripheral blood of patients with SE and related antigen antibody monoklialnyh T and B lymphocytes. There were no direct connection between korelyatsionnoy clinical manifestation of periodontal inflammation and the immune status of the somatic, that reveals the mechanisms of local T-cell characteristics of the immune changes and determines the correction of local therapy.

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЕКСПРЕСІЇ МОЛЕКУЛ ГОЛОВНОГО КОМПЛЕКСУ ГІСТОСУМІСНОСТІ У ТКАНИНАХ ПАРОДОНТА І ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ ПАРОДОНТИТ

I. Є. Сергеева, А. В. Борисенко

РЕЗЮМЕ

Проведено порівняльні клініко-імуннологічні аналізи стану адгезивних молекул HLA-A, B, C і HLA-DR головного комплексу гістосумісності на місцевому рівні - в тканинах пародонта і периферичної крові хворих на ГП і відповідних антигенів моноклональних антитіл Т і В-лімфоцитів. Не виявлено прямого кореляційного зв'язку між клінічним проявом запалення пародонту і загальносоматичним імунним статусом, що розкриває механізми локальних Т-клітинних характеристик імунних змін і зумовлює корекцію місцевої терапії.

Ключевые слова: ГП (генерализованный пародонтит), ГКГ (главный комплекс гистосовместимости), HLA-A,B,C, HLA-DR, антигены моноклональных антител.

Проведенные исследования данных литературы позволяют заключить, что адгезивные молекулы, молекулы ГКГ (главного комплекса гистосовместимости) или МНС принимают непосредственное участие в процессе распознавания чужеродных клеток, программируют активность иммунокомпетентных клеток, осуществляющих взаимодействия – контакты с антигенами и способствующие активации Т-клеточного ответа и синтезу иммуноглобулинов.

Макрофаги, ПМЯЛ реагируют на различные виды патогенов, в зависимости от степени экспрессии поверхностных адгезионных молекул и процессы распознавания, межклеточного взаимодействия, активации Т и В-клеток их процессинга, стимуляции цитокинов, биологически активных веществ, их метаболических реакций [1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12].

Функциональная активность фагоцитирующих клеток находится в зависимости от экспрессии молекул адгезии, а следовательно, не только от окружающих клеток, но и от межклеточного матрикса [4, 5, 6, 7, 8].

Постоянная экспрессия молекул I и II классов МНС (активированными моноцитами, ДК, В-лимфоцитами) приводит к быстрому формированию иммуногенных комплексов, бактериальных пептидов с соответствующими молекулами. В результате создаются условия для включения в ответ наивных CD8 Т-клеток и наивных CD4 Т-клеток, дифференцирующихся в Th1 клетки воспаления и хелперные Th2-клетки.

Образование комплекса бактериальных пептидов с молекулами II класса МНС транспортируются к клеточной поверхности Т-лимфоцитов, являясь

фактором включения в ответ Т-хелперов. Специфическое распознавание антигена Т-лимфоцитами – это центральный момент запуска и регуляции эффективного иммунного ответа. От выяснения природы выполняющих данную функцию комплексов зависит решение многих принципиальных иммунологических и, в целом, клинических проблем, расширяющих патогенетические механизмы развития, в данном случае, генерализованного пародонтита, с учетом характера течения заболевания и антиген-распознающих структур Т-клеток, а также в выборе патогенетических средств терапии.

Таким образом, вырабатывается сравнительная характеристика проявлений специфического клеточного и гуморального иммунного ответа, которая представлена:

а) презентацией антигена - комплекс антигенного пептида с молекулами I класса МНС на поверхности инфицированной клетки;

б) комплексом антигенного пептида с молекулами II класса МНС на поверхности инфицированных макрофагов;

в) комплексом антигенного пептида с молекулами II класса МНС на поверхности специфических инфицированных В-клеток, что формирует инициацию: эффекторные Т-клетки, цитотоксические CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки воспаления (Th1), хелперные CD4⁺ Т-клетки (Th2).

Несмотря на многочисленные данные литературы в клинической иммунологии по рассматриваемому вопросу, в тоже время публикаций по определению состояния экспрессии молекул МНС I и II классов и соответственно моноклональных антител в исследуемых «местных» средах полости рта – в содержимом гомогенате пародонтальных карманах у больных генерализованным пародонтитом, используя флуоресцентный метод проточной цитометрии, исследования или, практически не освещены.

Большинство публикаций, связанных с активацией иммунного ответа у больных ГП, затрагивают проблемы концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, главным образом, определяемых в сыворотке крови или слюне, в зависимости от степени тяжести заболевания и характера его течения.

Целью исследования явилось – определение количества моноклональных антител и показателей HLA-A,B,C и HLA-DR в гомогенатах содержимого пародонтальных карманов и в сыворотке крови больных ГП I-II степени, хронического и обострившегося течения, для изучения проблемы, уровня локализации активации антиген-презентирующих клеток и обеспечения цитокиновой регуляции в тканях пародонта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 168 пациентов (20-50 лет) с диагнозом: генерализованный пародонтит I-II степени, хронического и обострившегося течения и 24 человека того же возраста, которые составили контрольную группу.

Постановка диагноза соответствовала классификации болезней пародонта (проф. Н.Ф.Данилевский, 1994). Пациенты обследованы в стоматологической клинике НМУ имени А.А.Богомольца и лабораториях института «Проблем патологии» при НМУ, г. Киев.

Проведена общепринятая методика обследования: клинические, индексные показатели, рентгенологические, иммунологические. Использована статсистема для индивидуальных компьютеров при обработке полученных данных, достоверность по критерию Стьюдента считалось при ошибке P?0,01-0,05.

Материал исследования: 1) периферическая кровь пациентов из локтевой вены; 2) гомогенаты содержимого пародонтальных карманов.

Исследовались лимфоциты с маркерами CD3, CD4, CD8, CD19⁺ антигены II класса ГКГ (HLA-DR) и I класса (HLA-A,B,C). Используются моноклональные антитела, полученные в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е.Кавецкого (г.Киев). Исследования проводились методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием МКАТ, на флуоресцентном микроскопе «Olympus» в проходящем свете фазово-контрастной оптике, длина волны 495 нм, когда выявляется максимальная флюоресценция метки в лунках, где происходит реакция антигена с антителом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время известны два основных пути презентации антигенов – экзогенный, при участии молекул ГКГ II класса и эндогенный – преимущественно с молекулами ГКГ I класса. При эндогенном пути презентации белки синтезируются в клетке, поступают в эндосомальный компартмент, а затем через реакции ассоциируются с молекулами I класса ГКГ.

При экзогенном пути – АПК + антиген, эндоцитоз, эндосомы, транспортировка в лизосомы, обогащаются молекулами II класса ГКГ, образуется комплекс, который поступает непосредственно на поверхность клетки.

Наши исследования исходили из позиции, что для распознавания антигенов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами необходима деграция микробных антигенов и их представление в комплексе с антигенами ГКГ. Распознавание CD4⁺ - лимфоцитами рестриктировано антигенами II класса ГКГ, а CD8⁺ - как правило, антигенами I класса ГКГ.

Кроме того, мы учитывали, что гетерогенность клеточного состава, исходя из локализации органов

и тканей, определяет различия в экспрессии антигенов I класса ГКГ различными клетками. Важную роль в этом играют особенности микроокружения, продукция цитокинов, которые по-разному влияют на экспрессию HLA.

Результаты исследования показали, что уровень HLA-A, B, C у больных ГП I-II степени хронического и обострившегося течения в содержимом лизатов пародонтальных карманов по сравнению с тождественными показателями в сыворотке крови у этих же больных не имели прямой корреляционной зависимости, исходя из показателей контроля. Это имеет важное научное и клиническое значение для оценки межклеточных взаимодействий и микроокружения.

Необходимость и целесообразность наших исследований предполагает расширить научные знания о механизмах «ускользания» микроорганизмов от иммунного ответа, изменения индукции цитотоксических клеток и дифференцировки Т-клеточного местного ответа в тканях пародонта.

Это связано с технической невозможностью проведения исследований по определению влияния на функциональную активность молекул МНС, которая определяется снижением экспрессии транспортных белков, потери «иммунологической памяти и контроля» вследствие возможных мутационных изменений молекул ГКГ, а также под влиянием инфицирования микроорганизмами,

вирусами или неоправданным проведением иммунотерапией.

При исследовании классических локус-специфических антигенов HLA-A, B, C установлено, что в периферической крови у больных ГП I-II степени выявлено достоверное увеличение экспрессии молекул, которое превышает показатели контроля в 2,5-3 раза ($p < 0,01$).

Однако, не выявлена статистически достоверная закономерная разница экспрессии молекул HLA клетками в периферической крови, в зависимости от характера клинического проявления течения ГП в период обращения пациентов к врачу и их обследования.

Интересен тот факт, что экспрессия клетками антигена HLA-A, B, C в лизатах пародонтальных карманов уменьшена, по сравнению с аналогичным показателем, у этих же обследованных пациентов в периферической крови.

Однако, уровень экспрессии HLA-A, B, C клетками в тканях пародонтальных карманов превышал уровень данных контроля в 1,8-2 раза, с выраженным превалированием в сторону увеличения показателя у 78% пациентов с обострившемся течением ГП.

Результаты исследования антигенов моноклональных антител CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ Т и В-лимфоцитов в содержимом пародонтальных карманов больных ГП I-II степени хронического и обострившегося течения представлены на рис.1, 2.

Показатели CD у больных ГП I-IIст. в содержимом пародонтальных карманов. Хроническое течение

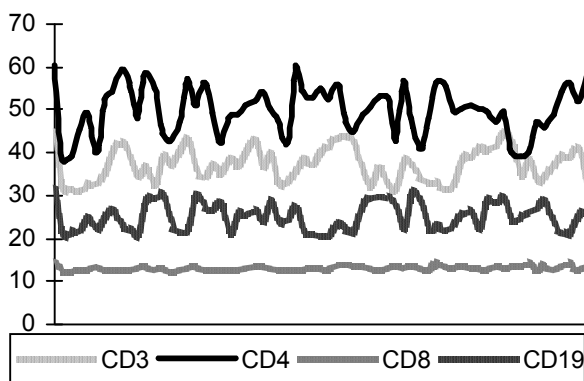


Рис.1.

Показатели CD у больных ГП I-IIст. в содержимом пародонтальных карманов. Обострившееся течение

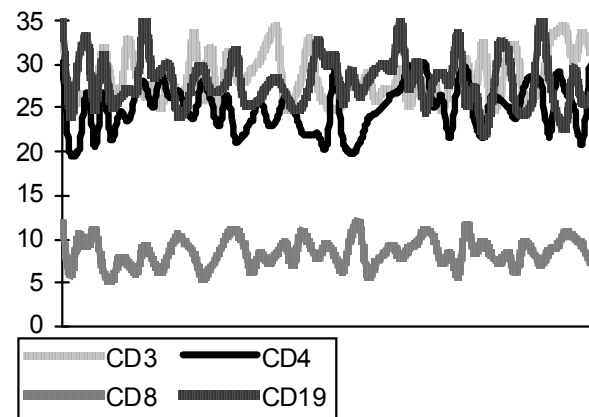


Рис.2.

Анализ данных позволяет выявить достоверную закономерность снижения CD4⁺ до 2 раз у пациентов с обострившемся течением, по сравнению с показателями обследования больных ГП I-II степени хронического течения. Изменения количества цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов не имело статистически достоверной разницы в зависимости

от характера местного воспалительного процесса. Однако, принципиально важным является снижение показателя CD8⁺ до $13,24 \pm 0,71$ у больных ГП I-II степени хронического течения в день первичного обследования пациентов. На фоне увеличения сегментоядерных лейкоцитов количество антигенов CD3⁺ имеет направленность на снижение у больных

с обострившемся течением ГП, что свидетельствует об активации неспецифического клеточного локального иммунного ответа. У больных с хроническим течением ГП определяется достоверное ($p < 0,05$) снижение $CD3^+$ на $23,7 \pm 1,85$, по сравнению с данными контроля. При обострении ГП выражена продукция антигенов $CD19^+$ В-клетками – увеличение до 2 раз, по сравнению с данными контрольной группы обследованных.

Антигены II класса ГКГ отличаются высоким полиморфизмом с различными локусами. Наиболее часто доминирует локус HLA-DR II класса ГКГ рестриктированным ответом.

$CD4^+$ Т-лимфоциты распознают антиген, который представлен АПК в комплексе с антигенами II класса ГКГ. Важность определения экспрессии молекул II класса ГКГ связана с тем, что функциональная активность $CD4^+$ Т-лимфоцитов: пролиферация клеток, секреция цитокинов, цитоксичность зависит от уровня экспрессии антигенов ГКГ и регуляции цитокинами, что в свою очередь будет обеспечивать баланс дифференциации Th1-Th2 и формировать в первую очередь – локальный клеточный и гуморальный иммунный ответ. Исследование экспрессии клетками HLA-DR в лизатах пародонтальных карманов выявило увеличение антигенов ГКГ II класса в 2 раза у больных с обострившемся течением ГП, и на 25-30% - у пациентов при хроническом течении ГП в день обследования пациентов, по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

Разница в процентном соотношении клеток периферической крови, которые участвуют в экспрессии антигена HLA-DR, соответствовала таким же закономерностям и тенденциям у больных с хроническим течением ГП, и имело вектор направленности в сторону показателей контроля у пациентов с обострившемся течением ГП во время обследования.

Проведенные исследования определения количества клеток, которые экспрессируют антигены HLA-A, B, C и HLA-DR в содержимом пародонтальных карманов и периферической крови больных ГП во время их первичного обследования выявили достоверно статистические изменения ($p < 0,01$) в зависимости от характера течения заболевания, при этом не отмечается прямая корреляционная их взаимосвязь.

ВЫВОДЫ

Не выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между соотношением экспрессированных молекул главного комплекса гистосовместимости клетками гомогената содержимого пародонтальных карманов и соответственно клетками периферической крови обследованных первичных больных ГП.

2. Экспрессия молекул HLA-A, B, C и HLA-DR в тканях пародонта изменяется в соответствии с

клиническим характером течения ГП, характеризуя направленность дифференциации Т-клеточного иммунного ответа, что дает обоснование проведения и выбора иммунотерапии.

3. Полученные данные сравнительного анализа показателей экспрессии молекул HLA-A, B, C и HLA-DR и количества $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Т-лимфоцитов и $CD19^+$ В-лимфоцитов на местном уровне в тканях пародонта и в периферической крови пациентов ГП, способствуют изучению механизмов активации иммунного ответа, определению уровня топических контактов антигенпрезентирующими клетками и предопределяет необходимость изучения маркеров воспаления, молекул адгезии в тканях микроокружения – в очагах воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. — 2001. — № 3. — С. 4—12.
2. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Система генов HLA и регуляция иммунного ответа // Аллерг. астма и клин. иммунология. — 2002. — № 8. — С. 7—16.
3. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Геномика HLA: новые возможности молекулярной генетики человека в диагностике и терапии // Мол. медицина. — 2003. — № 1. — С. 17—31.
4. Yang Y. Major histocompatibility complex class I antigen processing and presentation // Mod. Asp. Immunol. - 2000. - 1, N 2. - P. 70-73.
5. Singer D., Howcroft T., Weissman J. et al. Regulation of MHC-class I gene expression: a case study // The Immunologist. — 1998. — 6, N 6. — P. 214-219.
6. Strong R. Structural immunology of MHC class I proteins, homologs and receptor complexes // Med. Asp. Immunobiol. - 2000. - 1, N 3. - P. 125-128.
7. Contini P, Ghio M., Poggi A. et al. Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK $CD8^+$ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through $CD8$ ligation // Eur. J. Immunol. - 2003. - 33, N 1. - P. 125-134.
8. Ritz U., Seliger B. The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance // Mol. Med. — 2001. — 7, N 3. — P. 149-158.
9. Ponte M., Bertone S., Vitale C et al. Cytokine-induced expression of killer inhibitory receptors in human T lymphocytes // Eur. Cytokine Netw. — 1998. — 9, N 3. — P. 69-72.
10. Arndt S.O., Vogt A.B., Markovic-Plese S. et al. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells // EMBO. — 2000. — 19. — P. 1241-1251.
11. Alfonso C, Karlsson L. Nonclassical MHC class II molecules // Annu. Rev. Immunol. — 2000. - 18. - P. 113-142.
12. Frucht D.M. IL-23: a cytokine that acts on memory T cells // Sci. STKE. — 2002. - N114. - P. I.