

RAFAŁ WIENCH, IWONA PŁOCICA, BRYGIDA BECK, KATARZYNA PAKOSZ

Schemat pobudzenia limfocytów T pomocniczych w zdrowym dziąśle i w czasie rozwoju zapalenia dziąsła i przyzębia

Scheme of T-helper lymphocytes stimulation in the healthy gingiva and during the development of gingivitis and periodontitis

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Chorób Przyzębia Śl. AM w Zabrze

Streszczenie

Cel pracy. Celem pracy była ocena ekspresji IL-1 α , IL-1 β , IL-10 i IFN- γ w tkance dziąsłowej u osób ze zdrowym przyzęciem z kolejnymi stadiami zapalenia przyzębia.

Materiał i metody. Cytokiny oznaczano ilościowo metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Wyniki i wnioski. U wszystkich badanych osób w tkance dziąsłowej wykryto oznaczalne miana badanych substancji. Wyniki badań własnych oraz dane z dostępnego piśmiennictwa pozwoliły opracować prawdopodobny schemat pobudzenia określonych typów limfocytów T pomocniczych w stanie zdrowia i różnych fazach patologii przyzębia (**Dent. Med. Probl. 2002, 39, 1, 13–22**).

Słowa kluczowe: limfocyty T pomocnicze, cytokiny, ELISA, tkanka dziąsłowa.

Abstract

Objectives. The aim was the estimation of the expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-10 and IFN- γ locally in the gingiva tissue in the patients with healthy periodontium and with the consecutive stages of periodontitis.

Material and methods. Cytokines was quantitatively determined by the immunoenzymatic method (ELISA).

Results and conclusions. In all the tested persons in the gingiva tissue it was demonstrated the markable levels of cytokines. The results of the available literature allowed to work out the possible scheme of the stimulation of the given types of T-helper lymphocytes in the health state and in different stages of periodontal lesions (**Dent. Med. Probl. 2002, 39, 1, 13–22**).

Key words: T-helper lymphocytes, cytokines, ELISA, gingival tissue.

Współczesna klasyfikacja limfocytów T, w zależności od receptora TCR, obejmuje limfocyty T $\alpha\beta$ (pomocnicze Th i supresorowe/cytotoksyczne Ts/Tc) oraz limfocyty T $\gamma\delta$. Podział limfocytów Th i Ts/Tc jest oparty na obecności cząstek (odpowiednio CD4⁺ i CD8⁺) nie determinuje funkcji, lecz jest odpowiedzialny za rozpoznawanie antygenów w połączeniu z MHC klasy II lub klasy I [7, 19, 25].

U myszy, limfocyty Th obejmują dwie różniące się pod względem czynnościowym subpopulacje Th1 i Th2. Z pewnym uproszczeniem można powiedzieć, że limfocyty Th1 biorą udział w odp-

wiedzi typu komórkowego, a Th2 w odpowiedzi humoralnej. Różnice w działaniu uwidoczniają się najwyraźniej w wydzielanych przez nie cytokinach: limfocyty Th1 wytwarzają IL-2 (stymuluje m.in. cytotoksyczność limfocytów) i IFN- γ (aktywujący makrofagi), limfocyty Th2 wydzielają IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 będące czynnikami wzrostu i różnicowania komórek typu B [4, 7, 10, 25]. Istnieje jednak wiele limfocytów Th, których profil wydzielania nie pasuje ani do Th1 ani do Th2. Wiążą się z fazami pośrednimi rozwoju limfocytów T pomocniczych, które po opuszczeniu grasicy przechodzą przez kolejne (trzy) fazy rozwoju.

U człowieka nie stwierdzono tak wyraźnego podziału na Th1 i Th2, choć można wyróżnić grupę limfocytów wydzielających głównie IL-2 i IFN- γ oraz TNF- α i TNF- β [7].

Ich rola w etiopatogenezie zapaleń przyzębia była tematem wielu doniesień, szczególnie w odniesieniu do cytokin jako mediatorów odpowiedzialnych za aktywację i utrzymywanie się procesu zapalnego. Nie poznano jednak do końca zaangażowania tych aktywnych substancji oraz pobudzenia poszczególnych subpopulacji limfocytów Th w mechanizmie uszkodzenia towarzyszącego tkanek przyzębia.

Celem pracy była ocena ekspresji IL-1 α , IL-1 β , IL-10 i IFN- γ w tkance dziąsłowej u osób ze zdrowym klinicznie przyzęciem oraz w czasie rozwoju zapalenia dziąseł i przyzębia.

Material i metody

Do badań zakwalifikowano 90 pacjentów Zakładu Stomatologii Zachowawczej i Chorób Przyzębia w Zabrze, w wieku 14–67 lat (średni wiek 39 lat), w tym 47 kobiet. Byli to pacjenci ogólnie zdrowi, którzy w okresie ostatnich 6 miesięcy przed badaniem wstępnym nie przyjmowali antybiotyków [8, 11, 23].

Wyodrębniono następujące grupy badawcze:

- grupa G – 30 pacjentów w wieku 14–53 lat (średnio 27 lat), w tym 17 kobiet z zapaleniem dziąseł,
- grupa P – pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) – 30 osób w wieku 29–67 lat (średnio 45 lat), w tym 13 kobiet,
- K1 – kontrola dla grupy G – 15 osób w wieku 16–56 lat (średnio 29 lat), 9 kobiet i 6 mężczyzn,
- K2 – kontrola dla grupy P – 15 osób w wieku 23–66 lat (średnio 47 lat), w tym 8 kobiet.

W grupach kontrolnych były osoby z klinicznie zdrowym przyzęciem, zgłaszające się do celu wykonania plastyki lub wycięcia wędzidełka wargi górnej lub/i dolnej. Brodawki dziąsłowe pobierano także przed planowanym zabiegiem usunięcia zęba w miejscach, gdzie przyzębie było w stanie niezmienionym chorobowo [8, 23, 24].

Diagnostykę różnicową chorób przyzębia prowadzono na podstawie wywiadu, badania klinicznego i radiologicznego. Stan kliniczny przyzębia, u wszystkich badanych, określono na podstawie następujących wskaźników: higieny jamy ustnej (OHI) według Greena i Vermilliona, krwawienia z kieszonki dziąsłowej (SBI) według Mühlemanna i Sonna, wskaźnika przyzębia (PI) według Russella, pomiaru głębokości kieszonek przyzębnych i utraty przyczepu łącznotkankowego [8, 11].

Materiałem badawczym była tkanka dziąsłowa (brodawka międzyczębowa) pobierana podczas

zabiegu kiretażu otwartego lub zamkniętego oraz podczas zaplanowanych innych zabiegów chirurgicznych, po poinformowaniu pacjentów o prowadzonym eksperymencie. Uzyskany materiał zamrażano w temperaturze -70°C i przechowywano do czasu zgromadzenia zaplanowanej liczby próbek [8, 23, 24].

W okresie początkowym wizyty wyznaczano w odstępach dwutygodniowych, kontrolowano skuteczność zaleconych zabiegów higienizacyjnych, wykonywano przyczynowe zabiegi lecznicze (scaling nad- i poddziąsłowy z wygładzeniem korzeni, kiretaż zamknięty w miejscach występowania kieszonek patologicznych o głębokości przekraczającej 4 mm, korektę wypełnień oraz ewentualną eliminację węzłów urazowych, unieruchamiano rozchwiane zęby. Po 26 tygodniach przeprowadzano kontrolne badania periodontologiczne.

Tkanekę dziąsłową po rozmrożeniu rozcieńczono w 0,9% roztworze NaCl do 1% roztworu (jedynie w przypadku IFN- γ wykonano roztwór 2% ze względu na niewykrywalność w badaniu próbnym, w stężeniu standardowym), a następnie homogenizowano przez 2 minuty [8, 23, 24].

IL-1 α , IL-1 β , IL-10 i IFN- γ oznaczano ilościowo metodą immunoenzymatyczną (ELISA) [11, 23] na mikroplatkach (R and D SYSTEMS, QUANTIKINE®, Minneapolis, USA), zgodnie z zaleceniami producenta.

Pomiaru dokonano na automatycznym czytniku mikroplatek ELX800 (BIO-TEK INSTRUMENTS INC, USA). Stężenie badanych interleukin podawano w pg/ml.

Progi czułości metody dla poszczególnych cytokin wynosiły: IL-1 α – 20 pg/ml, IL-1 β – 15 pg/ml, IL-10 – 0,5 pg/ml i IFN- γ – 5 pg/ml.

Analizy statystycznej dokonano na podstawie porównania średnich arytmetycznych różnych grup wyników. Przed przystąpieniem do obliczeń sprawdzono założenia wymagane w zastosowaniu tych analiz. Zgodność rozkładu uzyskanych wyników badań z rozkładem normalnym sprawdzono testem Shapiro-Wilka. Hipotezę o jednorodności wariancji weryfikowano testem F Snedecora.

Do porównania średnich arytmetycznych grup wyników zastosowano test *t*-Studenta. W przypadku niejednorodnych wariancji stosowano test Cochran-Coxa.

Dla porównania średnich wartości stanu klinicznego osób z niskim i wysokim stężeniem badanych cytokin, niezależnie od przynależności do grup badanych (jako punkt odcięcia ze względu na nieparametryczny rozkład wyników przyjęto medianę) zastosowano test U Manna-Whitneya.

W celu zbadania korelacji między stężeniem cytokin w poszczególnych grupach a wskaźnikami klinicznymi przyzębia obliczono wartość współ-

czynnika korelacji Spearmana oraz prawdopodobieństwo istotności korelacji [8, 10, 23, 24].
Przyjęto stosowany w badaniach medycznych poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki

U wszystkich badanych osób w tkance dziąsłowej wykryto oznaczalne miana IL-1 α . Stwierdzono znamioną różnicę stężeń ($p < 0,00001$) IL-1 α u pacjentów z zapaleniem dziąseł (G), w porównaniu do grupy kontrolnej (K1) oraz chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia (P) ($p < 0,00001$). Nie zanotowano takiej zależności między grupami chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia (P) oraz grupą kontrolną (K2).

W tabeli 1 zestawiono średnie wskaźniki stanu klinicznego u pacjentów z niskim i wysokim stężeniem IL-1 α w tkance dziąsłowej. Jako kryterium graniczne przyjęto wartość $Me = 119,64$ pg/ml (ze względu na nieparametryczny rozkład wyników jako limes przyjęto medianę). U osób z wysokim stężeniem badanej cytokiny wykazano jedynie znamienne wyższą wartość wskaźnika SBI ($p \leq 0,027$). Dodatkowo przeprowadzono analizę korelacji poziomów IL-1 α z wartościami wskaźników opisujących stan kliniczny przyzębia dla całej populacji i w poszczególnych grupach chorych (tab. 2). Odn-

towane korelacje nie wykazywały jednak statystycznej znamienności.

IL-1 β w tkance dziąsłowej wykazano we wszystkich badanych próbkach. Stwierdzono istotną statystycznie ($p \leq 0,0001$) różnicę stężenia badanej interleukiny u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (P) w stosunku do grupy kontrolnej (K2) oraz do chorych z zapaleniem dziąseł (G) ($p \leq 0,00001$). Nie zanotowano takiej zależności między grupą chorych z zapaleniem dziąseł (G) oraz grupą kontrolną (K1).

Porównanie średnich wartości wskaźników klinicznych u osób z małym i dużym stężeniem IL-1 β obrazuje tabela 3 (punkt odcięcia $Me = 46,03$ pg/ml). Wykazano większy stopień zaawansowania zmian zapalnych w przyzębiu (wyrażony przez wskaźniki PI, głębokość kieszonki dziąsłowej i utraty przyczepu łącznotkankowego) u pacjentów z wysokim mianem badanej cytokiny. Wykazano również statystycznie znamienne dodatnie korelacje między stężeniem IL-1 β a głębokością kieszonek dziąsłowych i utratą przyczepu u wszystkich badanych i w obu grupach chorych, wskaźnika OHI w całej populacji i grupie chorych z P oraz wskaźnika PI u chorych z zapaleniem dziąseł (tab. 4).

Stężenie IL-10 w tkance dziąsłowej powyżej wartości wykrywalnej zaobserwowano u wszystkich badanych pacjentów. W każdym przypadku porów-

Tabela 1. Średnie wartości wskaźników stanu klinicznego przyzębia w zależności od stężenia IL-1 α
Table 1. The average of the parameters of the clinical state of periodontium according to the concentration of IL-1 α

Wskaźnik	Średnia wartość kliniczna IL-1 α < 119,64 pg/ml (n = 45)	Średnia wartość kliniczna IL-1 α > 119,64 pg/ml (n = 45)	(p) w teście Manna-Whitneya
OHI	1,97	2,14	$\leq 0,38$
SBI	2,46	2,61	$\leq 0,02$
PI	0,66	0,67	$\leq 0,33$
Głębokość kieszonek (mm)	4,08	4,13	$\leq 0,18$
Utrata przyczepu łącznotkankowego (mm)	1,31	1,32	$\leq 0,21$

n – liczba badanych osób, OHI – wskaźnik higieny jamy ustnej według Greena i Vermilliona, SBI – wskaźnik krwawienia z kieszonki dziąsłowej według Mühlemanna i Sonna, PI – wskaźnik przyzębia według Russella.

Tabela 2. Analiza korelacji stężeń IL-1 α w tkance dziąsłowej ze wskaźnikami stanu klinicznego
Table 2. The analysis of the correlation of the concentration of IL-1 α in the gingival tissue with the clinical states indices

Średnie stężenia	OHI	SBI	PI	Głębokość kieszonek (mm)	Utrata przyczepu (mm)
IL-1 α (wszyscy badani) (n = 90)	$Rs \leq 0,25$ $p \leq 0,19$	$Rs \leq 0,24$ $p \leq 0,27$	$Rs \leq 0,24$ $p \leq 0,31$	$Rs \leq 0,33$ $p \leq 0,17$	$Rs \leq 0,43$ $p \leq 0,29$
IL-1 α (chorzy z grupy G) (n = 30)	$Rs \leq 0,19$ $p \leq 0,38$	$Rs \leq 0,26$ $p \leq 0,32$	$Rs \leq 0,21$ $p \leq 0,36$	$Rs \leq 0,27$ $p \leq 0,22$	$Rs \leq 0,21$ $p \leq 0,34$
IL-1 α (chorzy z grupy P) (n = 30)	$Rs \leq 0,31$ $p \leq 0,13$	$Rs \leq 0,22$ $p \leq 0,27$	$Rs \leq 0,37$ $p \leq 0,07$	$Rs \leq 0,35$ $p \leq 0,09$	$Rs \leq 0,58$ $p \leq 0,06$

Rs – współczynnik korelacji Spearmana.

Tabela 3. Średnie wartości wskaźników stanu klinicznego przyzębia w zależności od stężenia IL-1 β **Table 3.** The average of the parameters of the clinical state of periodontium according to the concentration of IL-1 β

Wskaźnik	Średnia wartość kliniczna IL-1 β < 46,03 pg/ml (n = 45)	Średnia wartość kliniczna IL-1 β > 46,03 pg/ml (n = 45)	(p) w teście Manna-Whitneya
OHI	1,92	2,29	$\leq 0,0014$
SBI	2,46	2,54	$\leq 0,22$
PI	0,66	1,25	$\leq 0,0005$
Głębokość kieszonek (mm)	4,08	4,40	$\leq 0,0002$
Utrata przyczepu łącznotkankowego (mm)	1,30	2,13	$\leq 0,001$

Tabela 4. Analiza korelacji stężeń IL-1 β w tkance dziąsłowej ze wskaźnikami stanu klinicznego**Table 4.** The analysis of the correlation of the concentration of IL-1 β in the gingival tissue with the clinical states indices

Średnie stężenia	OHI	SBI	PI	Głębokość kieszonek (mm)	Utrata przyczepu (mm)
IL-1 β (wszyscy badani) (n = 90)	$R_s \leq 0,45$ $p \leq 0,019$	$R_s \leq 0,18$ $p \leq 0,61$	$R_s \leq 0,24$ $p \leq 0,37$	$R_s \leq 0,36$ $p \leq 0,02$	$R_s \leq 0,43$ $p \leq 0,03$
IL-1 β (chorzy z grupy G) (n = 30)	$R_s \leq 0,31$ $p \leq 0,06$	$R_s \leq 0,20$ $p \leq 0,32$	$R_s \leq 0,49$ $p \leq 0,01$	$R_s \leq 0,45$ $p \leq 0,03$	$R_s \leq 0,45$ $p \leq 0,03$
IL-1 β (chorzy z grupy P) (n = 30)	$R_s \leq 0,67$ $p \leq 0,001$	$R_s \leq 0,03$ $p \leq 0,86$	$R_s \leq 0,25$ $p \leq 0,22$	$R_s \leq 0,41$ $p \leq 0,05$	$R_s \leq 0,46$ $p \leq 0,02$

Tabela 5. Średnie wartości wskaźników stanu klinicznego przyzębia w zależności od stężenia IL-10**Table 5.** The average of the parameters of the clinical state of periodontium according to the concentration of IL-10

Wskaźnik	Średnia wartość kliniczna IL-10 < 3,24 pg/ml (n = 45)	Średnia wartość kliniczna IL-10 > 3,24 pg/ml (n = 45)	(p) w teście Manna-Whitneya
OHI	2,06	2,13	$\leq 0,51$
SBI	2,61	2,43	$\leq 0,06$
PI	0,67	0,67	$\leq 0,21$
Głębokość kieszonek (mm)	4,11	4,13	$\leq 0,42$
Utrata przyczepu łącznotkankowego (mm)	1,31	2,32	$\leq 0,52$

Tabela 6. Analiza korelacji stężeń IL-10 w tkance dziąsłowej ze wskaźnikami stanu klinicznego**Table 6.** The analysis of the correlation of the concentration of IL-10 in the gingival tissue with the clinical states indices

Średnie stężenia	OHI	SBI	PI	Głębokość kieszonek (mm)	Utrata przyczepu (mm)
IL-10 (wszyscy badani) (n = 90)	$R_s \leq 0,34$ $p \leq 0,12$	$R_s \leq 0,19$ $p \leq 0,06$	$R_s \leq 0,22$ $p \leq 0,39$	$R_s \leq 0,37$ $p \leq 0,14$	$R_s \leq 0,21$ $p \leq 0,09$
IL-10 (chorzy z grupy G) (n = 30)	$R_s \leq 0,20$ $p \leq 0,18$	$R_s \leq 0,35$ $p \leq 0,06$	$R_s \leq -0,12$ $p \leq 0,40$	$R_s \leq -0,11$ $p \leq 0,46$	$R_s \leq -0,15$ $p \leq 0,31$
IL-10 (chorzy z grupy P) (n = 30)	$R_s \leq 0,40$ $p \leq 0,008$	$R_s \leq 0,27$ $p \leq 0,047$	$R_s \leq 0,42$ $p \leq 0,005$	$R_s \leq 0,51$ $p \leq 0,0007$	$R_s \leq 0,40$ $p \leq 0,007$

nań grup badawczych odnotowano statystycznie istotne różnice stężeń badanej cytokiny.

Próba ustalenia zależności między ekspresją IL-10 a stanem klinicznym nie wykazała znamiennych różnic (tab. 5). Stwierdzono natomiast ujemne korelacje między stężeniem tej interleukiny a wskaźnikami klinicznymi w grupie chorych z za-

paleniem dziąseł (nie potwierdzono jednak statystycznej istotności tej różnicy) oraz dodatnie, znamienne korelacje w grupie chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia (tab. 6).

Stężenia wykrywalne IFN- γ odnotowano we wszystkich badanych przypadkach. Stwierdzono znamienne ($p \leq 0,0016$) różnice stężeń badanej cy-

Tabela 7. Średnie wartości wskaźników stanu klinicznego przyzębia w zależności od stężenia IFN-γ

Table 7. The average of the parameters of the clinical state of periodontium according to the concentration of IFN-γ

Wskaźnik	Średnia wartość kliniczna IFN-γ < 9,49 pg/ml (n = 45)	Średnia wartość kliniczna IFN-γ > 9,49 pg/ml (n = 45)	(p) w teście Manna-Whitneya
OHI	1,97	2,12	≤ 0,20
SBI	2,38	2,60	≤ 0,004
PI	0,66	0,67	≤ 0,19
Głębokość kieszonek (mm)	4,07	4,13	≤ 0,16
Utrata przyczepu łącznotkankowego (mm)	1,31	1,32	≤ 0,20

Tabela 8. Analiza korelacji stężeń IFN-γ w tkance dziąsłowej ze wskaźnikami stanu klinicznego

Table 8. The analysis of the correlation of the concentration of IFN-γ in the gingival tissue with the clinical states indices

Średnie stężenia	OHI	SBI	PI	Głębokość kieszonek (mm)	Utrata przyczepu (mm)
IFN-γ (wszyscy badani) (n = 90)	Rs ≤ -0,21 p ≤ 0,31	Rs ≤ -0,27 p ≤ 0,41	Rs ≤ -0,13 p ≤ 0,25	Rs ≤ -0,18 p ≤ 0,07	Rs ≤ -0,09 p ≤ 0,08
IFN-γ (chorzy z grupy G) (n = 30)	Rs ≤ -0,13 p ≤ 0,38	Rs ≤ -0,47 p ≤ 0,75	Rs ≤ -0,21 p ≤ 0,16	Rs ≤ -0,21 p ≤ 0,18	Rs ≤ -0,24 p ≤ 0,11
IFN-γ (chorzy z grupy P) (n = 30)	Rs ≤ 0,13 p ≤ 0,41	Rs ≤ 0,17 p ≤ 0,26	Rs ≤ 0,09 p ≤ 0,53	Rs ≤ 0,09 p ≤ 0,54	Rs ≤ 0,05 p ≤ 0,74

tokiny u pacjentów z zapaleniem dziąseł (G) w porównaniu do grupy kontrolnej (K1) oraz do chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia (P) (p ≤ 0,0027).

Nie wykazano znamiennej różnicy między stężeniem IFN-γ a stanem klinicznym (punkt odcięcia Me = 9,49 pg/ml) z wyjątkiem wskaźnika SBI (p = 0,004) (tab. 7).

Nie wykazano istotnych współzmienności między stężeniem INF-γ a wskaźnikami stanu klinicznego (tab. 8).

Omówienie

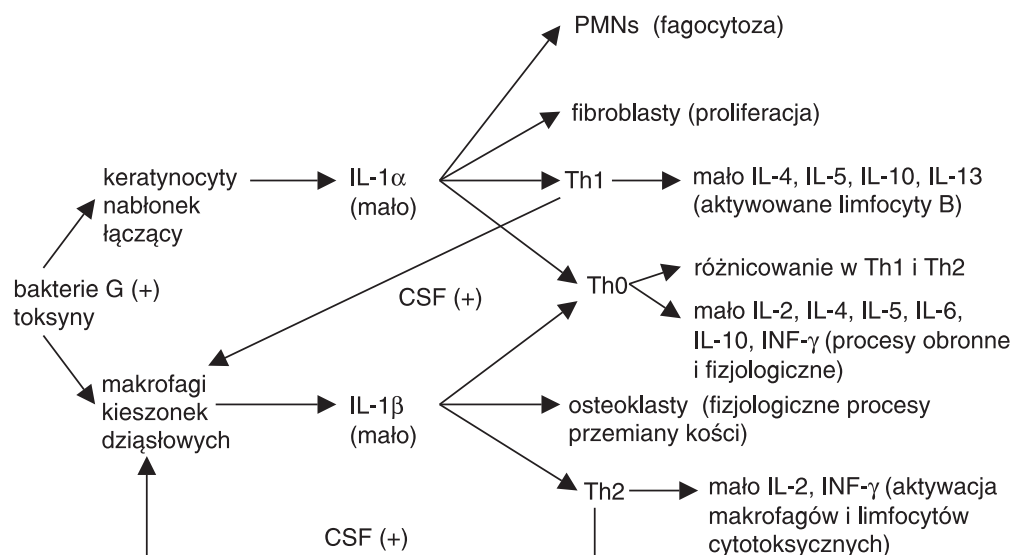
Cytokiny – substancje mediatorowe odpowiedzialne za aktywację i utrzymywanie się procesu zapalnego – stały się głównym przedmiotem badań współczesnej periodontologii. Powstało wiele teorii i hipotez dotyczących zaangażowania tych aktywnych substancji w mechanizmie uszkodzenia towarzyszącego tkanek przyzębia. Jedną z nich jest teoria Seymura et al. [22] dotycząca aktywacji czynnościowych subpopulacji limfocytów T pomocniczych (Th1 i Th2), różniących się rodzajem wydzielanych cytokin, a tym samym odgrywających kluczową rolę w selekcji efektorowych mechanizmów obronnych. Th1 wytwarzają IL-2 i IFN-γ, które aktywują makrofagi i limfocyty cytotoksyczne (odpowiedź typu komórkowego odpowiedzialna prawdopodobnie za wolny i słabo nasilony przebieg przewlekłego procesu zapalnego przyzębia). Th2

wydzielają: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 aktywujące limfocyty B (wspomagają odpowiedź humoralną będącą przyczyną szybkiego przebiegu zapalenia w miejscach zaostrzenia choroby).

Ustosunkowanie się do cytowanej hipotezy umożliwiły badania ekspresji IL-10 i IFN-γ miejscowo w tkankach u osób z kolejnymi stadiami periodontopatii.

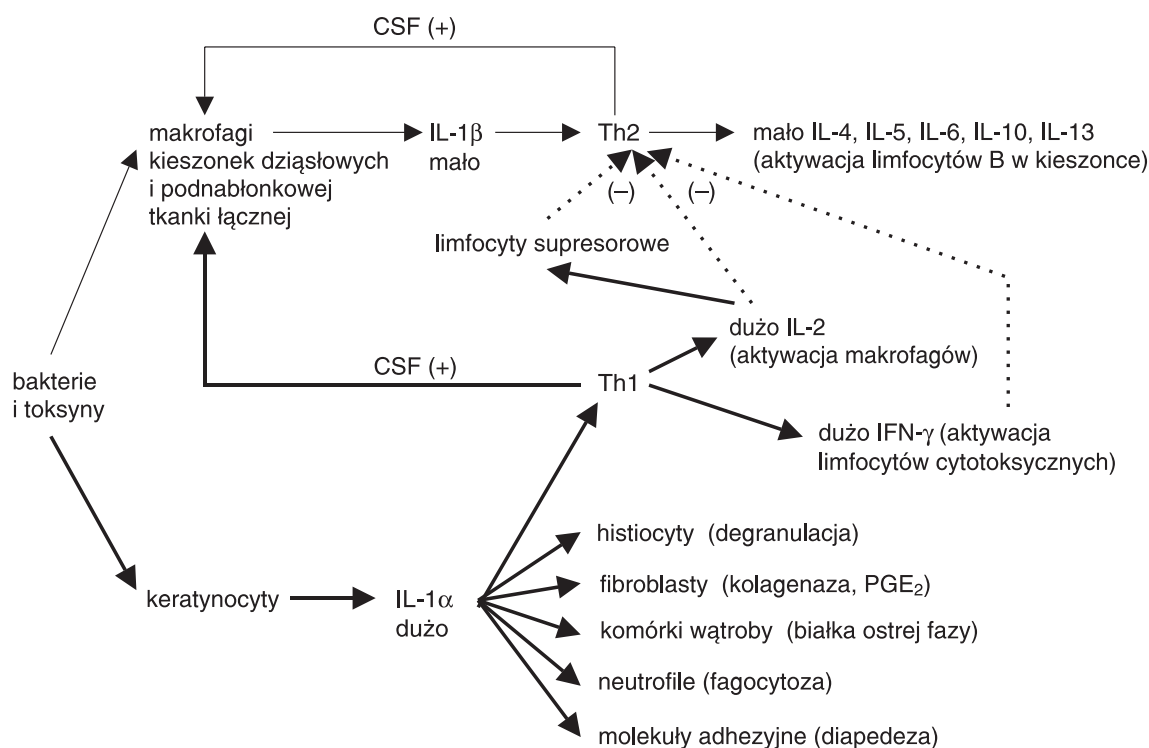
W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac określających stężenia IL-10 w tkance dziąsłowej.

W badaniach własnych obecność IL-10 w tkance powyżej wartości wykrywalnych stwierdzono u wszystkich badanych osób. Najwyższe stężenia odnotowano u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (śr. 3,94 pg/ml), niższe w obu grupach kontrolnych (śr. odpowiednio 3,45 i 3,39 pg/ml), a najmniejsze w grupie chorych z zapaleniem dziąseł (śr. 2,69 pg/ml). Otrzymane wyniki między porównywanymi grupami wykazały istotne statystycznie różnice. Podobny rozkład wyników uzyskał Konopka et al. [10], badający IL-10 w płynie kieszonki dziąsłowej i surowicy krwi. Cytowani autorzy stwierdzili zdecydowanie wyższe ilości badanej cytokiny u chorych z CP miejscowo w płynie dziąsłowym (śr. 70 pg/ml) w stosunku do chorych z zapaleniami progresywnymi (śr. 12 pg/ml) i grupą kontrolną (śr. 1,8 pg/ml). Nieco inaczej rozkładają się wartości w surowicy krwi, gdzie IL-10 na średnim poziomie 5–6 pg/ml w najwyższych stężeniach wykryto u chorych z uogólnionym, agresywnym zapale-



Ryc. 1. Proponowany schemat działania mechanizmu obrony w stanie zdrowia przyzębia

Fig. 1. The suggested scheme of the activity of the protection mechanism in the health state of periodontium

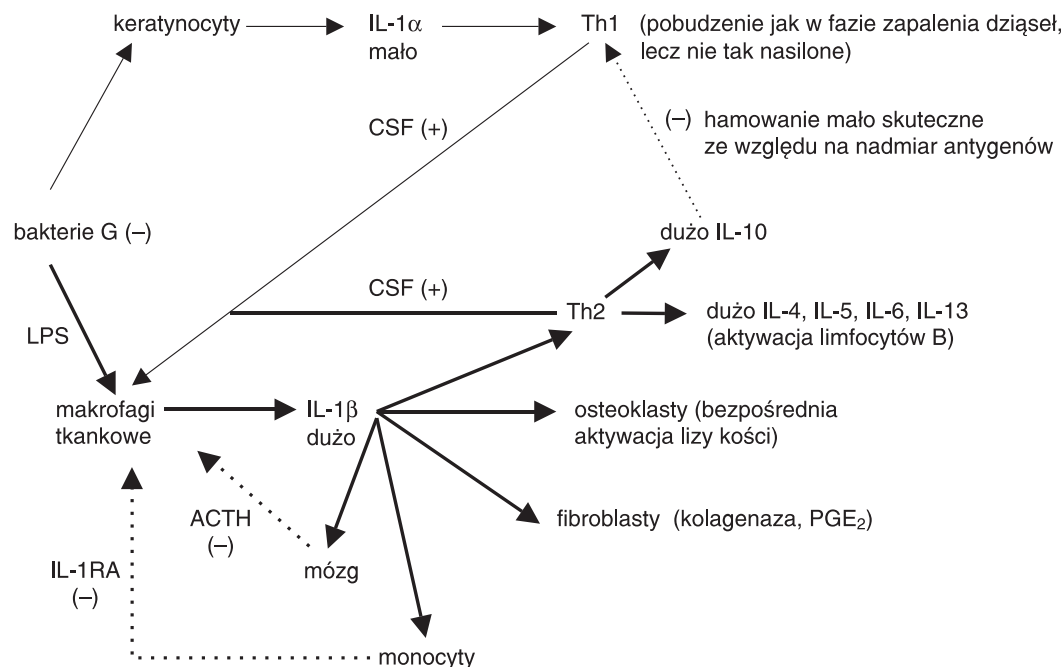


Ryc. 2. Proponowany schemat działania mechanizmu obrony w czasie rozwoju zapalenia dziąseł

Fig. 2. The suggested scheme of the activity of the protection mechanism during the development of gingivitis

niem przyzębia, a niższe z CP (śr. 2,1 pg/ml) i w grupie kontrolnej (śr. 1,7 pg/ml). Ponadto ww. autorzy nie wykazali większych różnic w obrazie klinicznym między pacjentami z małym i dużym stężeniem IL-10 w płynie kieszonkowym oraz

stwierdzili istotnie ujemne korelacje między stężeniem a wskaźnikiem płytki (PI) [10]. W obserwacjach własnych ujemne nieistotne statystycznie korelacje odnotowano jedynie w grupie chorych z zapaleniem dziąseł, a znamienne dodatnie kore-



Ryc. 3. Proponowany schemat działania mechanizmu obrony w czasie rozwoju zapalenia przyzębia

Fig. 3. The suggested scheme of the activity of the protection mechanism during the development of periodontitis

lacje w grupie chorych z zapaleniem przyzębia. Przedstawione wyniki sugerują, że u pacjentów z CP w miejscach aktywności choroby występuje pobudzenie limfocytów Th2, a przez to aktywacja odpowiedzi typu humoralnego [4]. Notowane wysokie stężenia IL-10 w tkance dziąsłowej i dodatnie korelacje ze wskaźnikami klinicznymi sugerują, że jest ona jedną z przyczyn destrukcji wywołanej uszkodzeniem towarzyszącym. W grupach kontrolnych obecność niskich stężeń IL-10 wiąże się prawdopodobnie z zaangażowaniem jej w fizjologiczne procesy regulacyjne. U chorych z zapaleniem dziąseł wykrywane bardzo niskie stężenia IL-10 (niższe nawet niż u osób zdrowych) wynikają z supresji Th2 w tej fazie choroby (wysokie stężenia IL-2 i IFN- γ działają hamująco na Th2) [7, 19, 22] i sugerują działanie zapalnych mechanizmów komórkowych w tej fazie zapalenia.

W badaniach własnych IFN- γ , jako efekt pobudzenia Th1, stwierdzono u wszystkich badanych osób dopiero, gdy do badań użyto 2% homogenatu tkanki dziąsłowej. Najwyższe stężenia badanej cytokiny wykazano w grupie chorych z zapaleniem dziąseł (śr. 12,1 pg/ml) i było ono statystycznie wyższe niż u chorych z CP (śr. 9,41 pg/ml) i w grupach kontrolnych (śr. odpowiednio 8,44 i 9,04 pg/ml). Nie wykazano również istotnych różnic w stanie klinicznym przyzębia między pacjentami z wysokim i niskim stężeniem IFN- γ . Dodatkowo stwierdzono ujemne

korelacje między wskaźnikami stanu klinicznego i stężeniem interferonu u wszystkich badanych i chorych z zapaleniem dziąseł. Ujemne korelacje oraz podwyższone stężenia w stanie zapalnym dziąseł i niskie w zapaleniu przyzębia sugerują ochronne działanie IFN- γ dla tkanek.

Przedstawione wyniki potwierdzają zaangażowanie cytokin w odwracalnej formie zapalenia (duże stężenia interferonu γ aktywują limfocyty T supresorowe, co powoduje czasową blokadę odpowiedzi humoralnej, kontrolę obrony organizmu i brak postępu w szybkiej destrukcji tkanek) [7, 22, 25]. W zaawansowanej chorobie (CP), na skutek zwiększenia ilości i swoistości patogenów, w celu skutecznej obrony, włącza się i zaczyna przeważać odpowiedź komórek plazmatycznych i jest ona tak nasiloną, że maskuje działające nadal mechanizmy komórkowe [4, 14, 22].

Interleukina 1, mimo że nie jest cytokiną wydzielaną przez limfocyty T pomocnicze, dzięki działaniu aktywującemu te komórki oraz znanemu działaniu prozapalnemu w stosunku do tkanki łącznej dziąsła i kości, została włączona do badań.

Charon et al. [2] po raz pierwszy wykazali obecność czynnika aktywującego osteoklasty (OAF) w płynie dziąsłowym chorych z zapaleniem dziąseł już w 1982 r. W 1985 r. Dewhirsta et al. wprowadzili dla OAF nazwę IL-1 [12]. Późniejsze dokładne badania wykazały istnienie dwóch form IL-1 α i IL-1 β oraz obecność obu w płynie dziąsłowym. Masada et al. [15] oraz Ebersole et al. [3] wykazali szcze-

gólnie wysokie stężenia IL-1 β u pacjentów z CP w miejscach aktywnych chorobowo.

Nowe techniki immunoenzymatyczne i hybrydyzacja *in situ* pozwoliły oznaczyć stężenie IL-1 bezpośrednio w tkance dziąsłowej i ustalić, że główną komórką wydzielniczą jest makrofag. Stashenko et al. [23, 24] oraz Jadrinski et al. [8] wykazali obecność najwyższych stężeń IL-1 β w tkance dziąsłowej chorych z CP w miejscach o szybkiej utracie przyczepu łącznotkankowego (10–61,8 pg/ml), nie stwierdzili jej natomiast w tkankach niezmiennych zapalnie i po zastosowaniu efektywnego leczenia periodontologicznego. IL-1 β uznano jako czuły marker odzwierciedlający aktywność i zaawansowanie stanu zapalnego [8, 12, 23]. W badaniach własnych potwierdzono obecność IL-1 β w zapalnie zmienionej tkance dziąsłowej, a najwyższe jej stężenia wykazano również u chorych z CP (śr. 102,5 pg/ml). Ponadto dzięki dużej dokładności stosowanej metody wykryto, w niewielkich ilościach, obecność badanej cytokiny u wszystkich osób w grupach kontrolnych (śr. 27,8 i 34,3 pg/ml). Wyniki te potwierdzają sugerowane zaangażowanie IL-1 β w przemiany zachodzące w zdrowej kości [26, 29, 30]. Równolegle prowadzone badania własne aktywności IL-1 β w ślinie potwierdziły otrzymane z homogenatu tkanki dziąsłowej rozkład wyników (w CP najwyższe stężenia śr. 112,2 mniejsze w G śr. 39,6 oraz najmniejsze u osób zdrowych śr. 13,2 i 16,7 pg/ml). Ustalono w badaniach własnych i notowane przez Stashenkę et al. znamienne różnice między wielkością stężenia IL-1 β a stanem klinicznym oraz istotne dodatnie korelacje potwierdzają jej czynny udział w destrukcji tkanek przyzębia [8, 23, 24].

Najwyższe stężenie IL-1 α w tkance dziąsłowej w badaniach własnych uzyskano u chorych z zapaleniem dziąseł (śr. 145,6 pg/ml). Nie znaleziono innych prac określających stężenia tej cytokiny w początkowych stanach patologii przyzębia. Statystycznie niższe ilości wykazali w biopsjach dziąsłowych chorych z CP (śr. 125,9 pg/ml) oraz osoby zdrowe (śr. 4,28 i 11,34 pg/ml). Stashenko et al. [24] w tkance dziąsłowej w grupie chorych z zapaleniem przyzębia uzyskali stężenie IL-1 α na średnim poziomie 160 pg/ml. Miejskowo w płynie kieszonki dziąsłowej u chorych z CP ekspresję IL-1 α badali: Masada et al. [15] oraz Ebersole et al. [3] – wykryli jej niskie stężenia. Cytowani autorzy notowali również całkowity brak IL-1 α u osób zdrowych (brak interleukiny w stanie zdrowia klinicznego był prawdopodobnie związany z wysokim progiem wykrywalności stosowanej metody). Wysokie stężenia u chorych z zapaleniem dziąseł w tkance dziąsłowej i płynie kieszonkowym (nieco większe w kieszonce) potwierdzają teorię o wydzielaniu IL-1 α głównie

przez komórki uszkodzonego bakteryjnymi lipopolisacharydami nabłonka łączącego [7].

Wyniki badań własnych oraz dane z piśmiennictwa pozwoliły opracować prawdopodobny schemat pobudzenia określonych typów limfocytów T pomocniczych w stanie zdrowia i czasie rozwoju zapalenia dziąsła i przewlekłego zapalenia przyzębia (ryc. 1–3).

Stała obecność nieswoistej flory bakteryjnej w płytce (głównie bakterii Gram-dodatnich), nawet przy braku objawów klinicznych przyzębia pobudza makrofagi w płynie kieszonkowym do wytwarzania niewielkich ilości IL-1 β , a uszkodzone pojedyncze keratynocyty przyczepu nabłonkowego wydzielają IL-1 α [7]. Porównanie stężeń IL-1 α i IL-1 β u osób zdrowych w płynie kieszonkowym i tkance dziąsłowej wykazuje wyższe stężenia badanych cytokin w płynie [3, 8, 15, 23, 24]. Te niewielkie ilości aktywują, obecne w niezmiennym zapalnie tkance, limfocyty Th0 (powodują ich różnicowanie w kierunku Th1 i Th2 oraz sekrecję minimalnych ilości całego zakresu cytokinowego: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 i IFN- γ) [7, 10]. Chociaż w wysokich stężeniach poszczególne spektra cytokinowe uruchamiają tylko jeden z typów odpowiedzi organizmu (komórkowy lub humoralny), działając supresyjnie na drugi, to przy małych stężeniach współdziałają, uruchamiając oba mechanizmy w celu skutecznej eliminacji bakterii i prawidłowego gojenia. Dodatkowo niewielkie ekspresje cytokin zapewniają fizjologiczne procesy przemian tkankowych w przyzębiu [7, 20, 30, 31].

W przypadku nieprawidłowej higieny jamy ustnej w płytce zaczynają pojawiać się bakterie Gram-ujemne wydzielające toksyny uszkadzające komórki nabłonka łączącego i pobudzające je do wytwarzania IL-1 α . Zaangażowanie makrofagów tkankowych w tej fazie zapalenia jest jeszcze bardzo słabe, a niewielkie ilości IL-1 β pochodzą z aktywacji makrofagów kieszonki dziąsłowej [31]. IL-1 α dzięki swojemu układowi receptorowemu [7, 22, 31] (wymaga potwierdzenia badaniami) aktywuje Th1 do wytwarzania IL-2 i IFN- γ . Zarówno obserwacje własne stężeń IFN- γ , jak i prace innych autorów badające ekspresję IL-2 w początkowym stanie zapalenia przyzębia, wykazują wysokie stężenia obu cytokin [10, 11, 16]. Duże ilości IL-1 α dodatkowo powodują degranulację histocytów (obrzęk, przekrwienie), wydzielanie białek ostrej fazy w hepatocytach, aktywację adhezyn komórek śródbłonka ułatwiających diapedezę, uruchamiają chemotaksję i fagocytozę granulocytów i makrofagów oraz uszkodzenie fibroblastów przez działanie kolagenazy i PGE₂. IL-1 α , działając w pozytywnej pętli sprzężenia zwrotnego, aktywuje keratynocyty do samoprodukcji i zwiększa ekspresję swoich receptorów na limfocytach Th1 [5, 7, 9, 12,

20, 29–31]. Podwyższone stężenia IL-2 aktywują limfocyty cytotoksyczne, a IFN- γ makrofagi. Obie substancje również działając pobudzają na limfocyty T supresorowe i hamują na Th2, czasowo wyłączając odpowiedź humoralną [4, 7] (brak danych z piśmiennictwa na temat stężeń IL-4, IL-6, IL-10 i IL-13 u chorych z zapaleniem dziąseł). Wyniki badań własnych wykazują ekstremalnie niskie stężenie IL-10 w tkance dziąsłowej w tej fazie zapalenia.

Odwracalne zniszczenie tkanek przyzębia jest spowodowane czynnikiem bakteryjnym i komórkową odpowiedzią zapalną, zapewniającą z jednej strony skuteczną obronę i gojenie, a z drugiej uszkodzenie towarzyszące (znaczenie dominujące w tym procesie przypisuje się IL-1 α , IFN- γ pełni natomiast prawdopodobnie rolę ochronną).

Wraz z wydłużonym czasem ekspozycji płytki i przemianą zakresu drobnoustrojów dochodzi do znaczącej penetracji toksyn w głąb tkanek przyzębia. Keratynocyty wytwarzają nadal podwyższone ilości IL-1 α , ale nie są już one tak duże jak w fazie zapalenia dziąseł (spowodowane martwicą dużej liczby komórek nabłonka łączącego). Makrofagi w płynie dziąsłowym i tkance łącznej stymulowane bakteryjnymi LPS zaczynają wydzielać wysokie stężenia IL-1 β , która przez swoisty receptor pobudza Th2 do produkcji IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 aktywujących limfocyty B i uruchamiających immunologicznie swoiste procesy humoralne [4, 7, 22, 31]. Szeroki zakres działania IL-1 β obejmuje również uszkodzenie fibroblastów w wyniku działania kolagenazy i PGE₂ oraz resorpcję kości przez bezpośrednie pobudzenie osteoklastów [5, 7, 9, 12, 20, 29–31]. Podwyższenie stężenia IL-1 β i IL-10 w tkance dziąsłowej potwierdziły badania własne, wysokie stężenia IL-4 i IL-10 w płynie kieszonkowym notowane były natomiast przez Konopkę et al. [10] oraz Lee et al. [13]. Nadmiar antygeny, jego różnorodność oraz wyższe stężenia IL-1 α sprawiają,

że mechanizmy komórkowe nie zostają zahamowane (mimo supresyjnego działania IL-10 na Th1) [7]. Zdecydowana odpowiedź organizmu w fazie głębokiego zapalenia przyzębia powoduje z jednej strony eliminację bakterii i ich toksyn, lecz także w wyniku działania na własne tkanki doprowadza do uszkodzenia towarzyszącego (dominującą rolę pełni IL-1 β , współuczestniczą natomiast IL-6 i IL-10) [1, 6, 12, 18, 20, 27]. Aby uchronić organizm przed nadmiernym i niekontrolowanym rozwojem odpowiedzi zapalnej i immunologicznej są uruchamiane specjalne mechanizmy supresyjne oparte na działaniu ACTH i inhibitorów cytokin (głównie inhibitora IL-1) [7, 12, 17, 21].

Postulowana w wielu doniesieniach dominacja profilu cytokinowego wydzielanego przez komórki Th2 w procesie przewlekłego zapalenia przyzębia potwierdziły badania własne. Dominację taką notowali Tokoro et al. [28], badając metodą hybrydyzacji *in situ* ekspresję interleukin wydzielanych przez Th2 (IL-4 i IL-5) oraz Th1 (IL-2), wykazali przewagę tych pierwszych w naciekach komórkowych w zapaleniu przewlekłym przyzębia. Podobną dominację sugerowali Konopka et al. [10] określając stężenia IL-2, IL-4 i IL-10 w płynie kieszonkowej i surowicy krwi oraz Prabhu et al. [18] badający IL-2 i IL-4 w surowicy krwi u chorych z CP i progresywnymi zapaleniami przyzębia. Inną stymulację limfocytów T pomocniczych opisali Fujihashi et al. [4] oraz Yamamoto et al. [32], którzy badając ekspresję cytokin IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 oraz IFN- γ stwierdzili występowanie dwóch profili: pierwszy zawierał IFN- γ , IL-6 i IL-13, drugi te same cytokiny oraz IL-10. Autorzy stwierdzili całkowity brak IL-2, IL-4 i IL-5. Otrzymane wyniki zdaniem tych autorów sugerują istnienie innych niż Th0, Th1 i Th2 czynnościowych subpopulacji limfocytów T pomocniczych [4, 32].

Piśmiennictwo

- [1] AGARWAL S., PIESCO N., JOHNS L.: Differential expression of IL-1beta, TNF-alpha, IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.*, 1995, 74, 1057–1056.
- [2] CHARON J., RUTHERFORD R.: The effects of IL-1 on collagenolytic activity and prostaglandin E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *Arch. Oral. Biol.* 1988, 33, 237–243.
- [3] EBERSOLE J., TAUBMAN M.: The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol.* 2000., 1994, 11, 112–141.
- [4] FUJIIHASHI K., KANA Y., BEAGLEY K.: Cytokine and periodontal disease: Immunopathological role of interleukins for B-cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *J. Periodontol.* 1993, 64, 400–406.
- [5] Genzyme Corporation: 1994 Cytokine Research Products. Cambridge, Massachusetts: Genzyme 1994.
- [6] GOVAN M., WOOD D. D.: An IL-1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*. *Nature* 1983, 306, 378–379.
- [7] JAKÓBISIAK M.: Populacje i subpopulacje limfocytów. W: Immunologia, red. Jakóbisiak M. PWN, Warszawa 1993, 159–170.
- [8] JANDINSKY J. J., STASHENKO P.: Localization of IL-1 β in human periodontal tissue. *J. Periodont. Res.* 1991, 62, 36–43.
- [9] KJELDSSEN M., HOLMSTRUP P., BENDTZEN K.: Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature. *J. Periodontol.* 1993, 64, 1013–1022.
- [10] KONOPKA T., ZIĘTEK M., KOPEĆ W.: Znaczenie subpopulacji limfocytów T pomocniczych w etiopatogenezie zapalenia przyzębia. *Czas. Stomat.* 1998, 51, 11, 711–720.

- [11] KONOPKA T., ZIĘTEK M., RADWAN-OCZKO M.: Interleukina-2 (IL-2) w zapaleniach przyzębia. *Czas. Stomat.* 1995, 48, 7, 442–447.
- [12] KONOPKA T., ZIĘTEK M., RADWAN-OCZKO M.: Rola interleukin w etiopatogenezie zapaleń przyzębia. *Mag. Stomat.* 1995, 5, 6, 24–30.
- [13] LEE H. J., KANG I. K., CHUNG C. P.: The subgingival microflora and crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 1995, 22, 885–890.
- [14] LEHNER T.: Primary immunodeficiency states in the human. In: *Immunology of oral diseases*. Ed.: Lehner T. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1992, 97–124.
- [15] MASADA M. P., PERSSON R., KENNEY J.: Measurement of IL-1 α and IL-1 β in gingival crevicular fluid. Implications for pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 1990, 25, 156–163.
- [16] MCFARLANE C., MEIKE M.: Interleukin-2, interleukin-2 receptor and interleukin-4 levels are elevated in the sera of patients with periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 1991, 26, 402–408.
- [17] NISHIHARA T., OHSAKI Y., UEDA N.: Maus IL-1RA induced by A a lipopolysaccharide blocks the effects of IL-1 on bone resorption and osteoclast-like cell formation. *Infect. Immun.* 1994, 62, 390–397.
- [18] PRABHU A., MICHALOWIC B., MATHUR A.: Detection of local and systemic cytokines in adult periodontitis. *J. Periodontol.* 1996, 67, 512–522.
- [19] ROITT I. M.: The Acquired immune response control. In: *Essential immunology*. Ed.: Roitt I. M. Wright, London 1991. 116–133.
- [20] SANDERINK R.: Gliosar der Grundbegriffe für die Praxis. Zytokine ihre wichtigsten Quellen und Aufgaben. *Paradontologie* 1995, 2, 147–149.
- [21] SECKINGER P., KLEIN-NULEND J.: Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonist block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. *J. Immunol.* 1990, 145, 4181–4184.
- [22] SEYMUR G., GEMMELL E., REINHARDT R.: Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J. Periodontol. Res.* 1993, 28, 478–486.
- [23] STASHENKO P., FUJIYOSHI P., OBERNESSER M.: Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. *J. Clin. Periodont.* 1991, 18, 548–554.
- [24] STASHENKO P., JANDINSKY J., FUJIYOSHI P.: Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J. Periodont.* 1991, 62, 504–509.
- [25] TERR A. L.: The basis of immunology. In: *Basic and clinical immunology*. Ed.: Stites D. P., Terr A. L. Prentice-hall International, London 1991, 15–30.
- [26] TAICHMAN R., HAUSCHKA P.: Effects of interleukin 1 β and TNF- α on osteoblastic expression of osteoblastic and mineralized extracellular matrix *in vitro*. *Inflammation* 1992, 16, 587–601.
- [27] TAKANASHI K., TAKASHIBA S., NAGAI A.: Assessment of interleukin 6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 1991, 26, 502–510.
- [28] TOKORO Y., MATSUKI Y., YAMAMOTO M.: Relevance of local Th2 type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrate in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 107, 166–174.
- [29] VAN DER ZEE E.: Cytokines modulate the intra and extracellular pathways of collagen degeneration. Thesis. University Amsterdam 1994.
- [30] WALCZAK M.: Biologiczne właściwości interleukin. *Immunol. Pol.* 1991, 16, 169–181.
- [31] WIKTOROWICZ K., MACKIEWICZ S.: Immunobiologia cytokin (sieć cytokinowa). *Post. Nauk. Med.* 1993, 4, 141–146.

Adres do korespondencji:

Rafał Wiench
Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Chorób Przyzębia Śl. AM
Pl. Traugutta 2
41-800 Zabrze
tel.: (32) 271-72-17

Praca wpłynęła do Redakcji: 22.03.2002 r.
Zaakceptowano do druku: 17.04.2002 r.

Received: 22.03.2002
Accepted 17.04.2002