

# Kvantitativna evaluacija imunoglobulina G, A i M humane zubne pulpe

## Quantitative Evaluation of the Immunoglobulin G, A and M in the Human Dental Pulp

Greta Škaljac-Staudt,  
Ivana Ciglar,  
Jozo Šutalo,  
Dubravka Čvorišćec\*

Zavod za dentalnu patologiju  
Stomatološkog fakulteta  
u Zagrebu

\* Zavod za kliničko  
laboratorijsku dijagnostiku  
KBC-a u Zagrebu

### Sažetak

*Humane dentalne pulpe ispitivali smo kvantitativnom metodom radialne imunodifuzije imunoglobulina razreda G, A i M. Na osnovi određenih koncentracija imunoglobulina u svakom uzorku pulpnog tkiva, te stavljanjem tih vrijednosti u odnos s određenim koncentracijama ukupnih proteina, dobili smo vjerodostojne podatke s količinama IgG, IgA i IgM. Rezultati koje smo dobili pokazuju 100% zastupljenost IgG, 15% zastupljenost IgA, te 8% zastupljenost IgM u 13 ispitivanih uzoraka kronično upalnog pulpnog tkiva. Srednja vrijednost određene količine IgG iznosi 84,3 mg/g proteina, IgA 4,4 mg/g proteina, te IgM 1,4 mg/g proteina. U intaktnom pulpnom tkivu primijenjenom metodom imunoglobulina G, A i M nismo mogli dokazati. Na osnovi dobivenih rezultata može se pretpostaviti da u kronično upalnom pulpnom tkivu postoji mogućnost lokalne sinteze imunoglobulina, te da se usporedo s nespecifičnim upalnim reakcijama mogu odvijati i specifične imunološke reakcije. Dominantnost IgG upućuje na imunološke reakcije rane preosjetljivosti tipa II. i III.*

Ključne riječi: *imunoglobulini, pulpno tkivo*

Acta Stomatologica Croatica  
1991; 25:33-38

IZVORNI  
ZNASTVENI RAD

UDK 616.31-056  
CODEN: ASCRBK  
YUISSN: 0001-7019

Primljeno: 15. february 1991.  
Prihvaćeno: 20. march 1991.

### Uvod

Zubna pulpa je jedinstven organ s ograničenom sposobnošću ozdravljenja nakon ponavljanih bakterijskih afekcija. Najčešći način koji doводи do upale pulpe je infekcija koja je posljedica karijesa. Pulpno tkivo se pri tome prožima stanicama kronične upale, a to su prvenstveno limfociti, plazma stanice, mastociti, makrofagi. Početno je broj navedenih staničnih elemenata malen, ali se njihova gustoća postepeno povećava, pa postojeći eksudat postaje sve više proliferativan.

U upalnom pulpnom tkivu su prisutni brojni aerobni i anaerobni mikroorganizmi. Intaktne bakterije, topivi bakterijski dijelovi, stanično zidne strukture, lipopolisaharidi, lipoteihoične kiseline djeluju kao jako djelotvorni imunogeni (1). Prisutne imunokomponentne stanice kao i antigene supstancije upućuju na mogućnost specifičnih imunoloških reakcija u pulpnom tkivu zahvaćenom kroničnom upalom. Imunopatološke reakcije koje se mogu odvijati u zubnoj pulpi još su uvijek nerazumljive. Neki imunopatološki reaktanti ili imunokompetentne stanice su doka-

zani u pulpnom tkivu, ali njihova uloga u imunopatološkim mehanizmima ili u tkivnoj destrukciji nije do kraja objašnjena (2). Dosadašnja ispitivanja imunog statusa pulpnog tkiva pretežno su kvalitativne prirode i odnose se na dokazivanje stanica koje sadrže imunoglobuline (2, 3, 4, 5, 6).

Cilj našeg ispitivanja su kvantitativne analize pulpnog tkiva s imunološkog stajališta, određivanjem količine imunoglobulina razreda G, A i M, kako bi se odredio udio humoralnih imunoloških odgovora u humanoj zubnoj pulpi. Nadalje, ako se takvi odgovori dokažu, možda bi se klinički status zubne pulpe mogao dovesti u vezu s postojećim upalnim reakcijama, a takve pak korelacije mogu imati značajne kliničke primjene s osvrtnom na simptome i postupke pri liječenju.

### Materijal i metoda

Materijal koji smo ispitivali bilo je intaktno pulpno tkivo ( $n = 5$ ), te kronično upalno tkivo ( $n = 13$ ). Uzorci intaktnog pulpnog tkiva uzeti su od osoba čiji su se zubi morali devitalizirati zbog protetičke indikacije, ili su bili ekstrahirani zbog ortodontske indikacije. Uzorke tkiva smo pohranili u Ependorf ampule i čuvali u zamrzivaču sve do trenutka laboratorijskog analiziranja.

Uzorci pulpnog tkiva su homogenizirani u 0,5 ml PBS pufera (NaCl 8,0 g/L; KCl 0,2 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/L). Dobiveni homogenati su dobro promiješani u vortexu, te centrifugirani na 3500 o/min u vremenu od 10 minuta. U supernatantima su određeni ukupni proteini metodom po Lovoryju, te imunoglobulini G, A i M razreda metodom radialne imunodifuzije na LC-partigen pločama (Boehring). Vrijednosti imunoglobulina tkiva izražene su po gramu proteina.

### Rezultati

Intaktno pulpno tkivo, koje je podvrgnuto ispitivanju na imunoglobuline G, A i M razreda,

nije pokazalo njihovu prisutnost, odnosno primijenjenom metodom imunoglobulini se nisu mogli dokazati. U uzorcima pulpnog tkiva kroničnog ireverzibilnog pulpitisa dokazani su imunoglobulini razreda G, A i M u različitoj postotnoj zastupljenosti: IgG je dokazan u 100% slučajeva, IgA u 15% a IgM u 8% slučajeva (tablica 1).

Tablica 1. Učestalost nalaza IgG, IgA i IgM u upalnom pulpnom tkivu

Table 1. Frequency of IgG, IgA and IgM in the inflamed pulp tissue

Imunoglobulin	Broj testiranih	Broj pozitivnih	%
IgG	13	13	100
IgA	13	2	15
IgM	13	1	8

Količine imunoglobulina, koje su određene u uzorcima pulpnog tkiva kroničnog pulpitisa, pokazuju slijedeće vrijednosti: IgG je dokazan u rasponu vrijednosti od 31,8–212,5 mg/g proteina, srednje vrijednosti 84,3 mg/g proteina. IgA u istim uzorcima pulpnog tkiva pokazuje količine u rasponu vrijednosti od 0–35,8 mg/g proteina, srednje vrijednosti 4,4 mg/g proteina. IgM pokazuje količine u rasponu vrijednosti od 0–18,8 mg/g proteina, srednje vrijednosti 1,4 mg/g proteina (tablica 2).

Distribucija imunoglobulina G, A i M u kronično upalnom pulpnom tkivu pokazuje slijedeću postotnu zastupljenost: imunoglobulin G je u 30% slučajeva zastupljen u količinama od 2–4 mg/g proteina, u 30% slučajeva u količinama od 4–6 mg/g proteina, u 7% vrijednosti od 60–80 mg/g proteina, u 7% u količinama od 120–140 mg/g proteina, u 7% od 160–180 mg/g proteina te u daljnjih 7% u vrijednostima od 200–220 mg/g proteina (slika 1).

Tablica 2. Količina imunoglobulina G, A i M u uzorcima kronično-upalnog pulpnog tkiva izražena u mg/g proteina

Table 2. The Quantity of the Immunoglobulins G, A and M in the Samples of Chronic Inflamed Pulp Tissue Expressed in the mg/g of Proteins

	$\bar{x}$	raspon	SD	SE	KV
IgG n = 13	84,3	31,8–212,5	60,9	16,9	0,7
IgA n = 13	4,4	0–35,8	11,1	3,1	2,5
IgM n = 13	1,4	0–18,8	5,2	1,4	3,6

Količina imunoglobulina A u upalnom pulpnom tkivu u 85% slučajeva u rasponu je vrijednosti od 0–4 mg/g proteina, u 8% u vrijednostima od 20–24 mg/g proteina, te u 8% slučajeva u količinama od 32–36 mg/g proteina (slika 2).

Imunoglobulin M u ispitivanim uzorcima upalnog pulpnog tkiva dokazan je u količinama od 0–2 mg/g proteina u 92% slučajeva, a u 8% u rasponu vrijednosti od 18–20 mg/g proteina (slika 3).

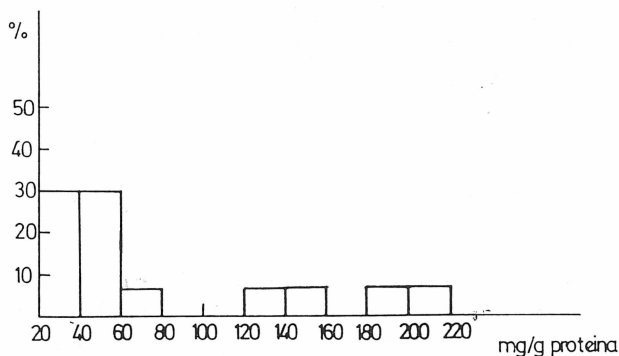
Rezultati koje smo dobili na temelju našeg ispitivanja pokazuju prisutnost imunoglobulina G, A i M razreda različite postotne zastupljenosti

u ispitivanim uzorcima tkiva, te različitost količina pojedinih razreda imunoglobulina.

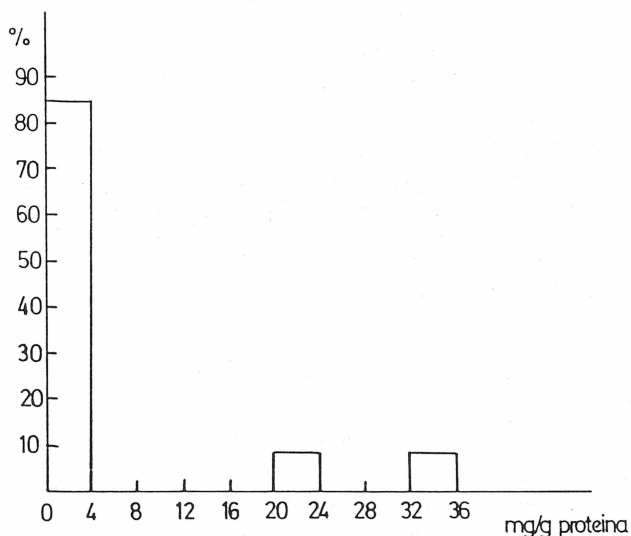
Najveće dokazane količine su one IgG, dok su IgA i IgM dokazani u znatno nižim količinama. IgM pokazuje najnižu postotnu zastupljenost i najniže vrijednosti određenih mu količina.

### Diskusija i zaključci

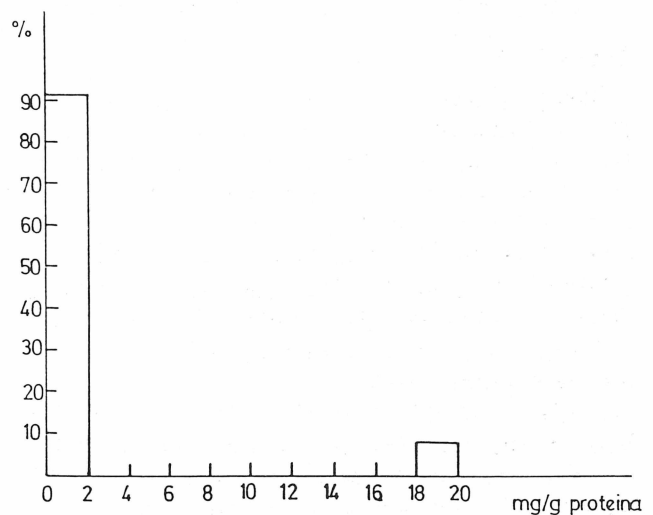
U intaktnom pulpnom tkivu primijenjenom metodom imunoglobulini G, A i M nisu se mogli dokazati. Seltzer (7) smatra da zdravo pulпно tkivo ne sadrži imunokompetentne stanice. Drugi autori na osnovi svojih ispitivanja zdravog



Slika 1. Distribucija IgG u upalnom pulpnom tkivu  
Figure 1. Distribution of the IgG in the Inflamed Pulp Tissue



Slika 2. Distribucija IgA u upalnom pulpnom tkivu  
Figure 2. Distribution of the IgA in the Inflamed Pulp Tissue



Slika 3. Distribucija IgM u upalnom pulpnom tkivu  
Figure 3. Distribution of the IgM in the Inflamed Pulp Tissue

pulpnog tkiva upozoravaju da je ono opskrbljeno različitim stanicama koje su u vezi s imunim obrambenim sustavima. Većine stanica koje se se identificirale pripadaju grupi limfocita T, koji imaju sposobnost prezentiranja antigena. Yontell (8) je dokazao pomoćničke limfocite T u intaktnom pulpnom tkivu, koji imaju funkciju da u određenom trenutku potaknu limfocite B na stvaranje protutijela. Limfociti B se nisu mogli dokazati, što bi značilo da oni ne sudjeluju u početnoj fazi imunog odgovora, što je u skladu s rezultatima našeg ispitivanja, a moglo bi objasniti zašto primijenjenom metodom nismo mogli dokazati imunoglobuline u uzorcima intaktnog pulpnog tkiva.

Dosadašnja ispitivanja imunog statusa zdravog pulpnog tkiva pretežno su kvalitativne prirode. Pulver (5) je metodom imunofluorescencije dokazao da ono ne posjeduje stanice koje sadrže imunoglobuline. Iako je metoda kojom se on koristio različita od naše, ona potvrđuje i u skladu je s našim rezultatima da neupalno pulpno tkivo ne sadrži komponente potrebne za lokalnu sintezu imunoglobulina. Limfociti B, naime, nisu stalni prekrivatelji u zdravoj zubnoj pulpi (8). Međutim, imunokompetentne stanice poput limfocita T i dentritične endotelijalne stanice pulpe prisutne u intaktnom pulpnom tkivu odgovorne su za pobuđivanje imunoloških reakcija koje se odnose na stvaranje protutijela odnosno imunoglobulina.

Kvalitativnim analizama uzoraka pulpnog tkiva zahvaćenog kroničnom upalom dokazane su brojne stanice koje sadrže imunoglobuline (5). Najbrojnije stanice, kako je to uočio Pulver, bile su one koje sadrže imunoglobulin G, a čine 60% od ukupnih stanica koje sadrže imunoglobuline, 35% čine stanice koje sadrže IgA, a najmanji postotak, 5%, čine IgM stanice. Koncentracije imunoglobulina G, A i M razreda Speer (4) je odredio u uzorcima upalnog i neupalnog pulpnog tkiva. U upalnom pulpnom tkivu koncentracija IgG iznosila je 97,2 mg/ml, za IgA 7,7 mg/ml, dok imunoglobulin M isti autor nije mogao dokazati u ispitivanim uzorcima. Anđić (9) je dokazane imunoglobuline u kronično upalnom tkivu pulpe izrazio u  $\mu\text{g}\%$ , te za IgG ta vrijednost iznosi 38,9  $\mu\text{g}\%$ , za IgA 9,1 mg%, a za IgM 4,0  $\mu\text{g}\%$ .

Rezultati ispitivanja kako kvalitativnim tako i kvantitativnim metodama koje su različite od metode kojom smo se mi koristili, prilično su podudarni s našim nalazima. Ako se uspoređuju kvalitativni nalazi, onda se može uočiti pretežnost stanica koje sadrže IgG u odnosu na IgA i IgM stanice. Kvalitativne metode koje su se primjenjivale bez obzira na to u kojim jedinicama su vrijednosti imunoglobulina izražene, također pokazuju podudarnost s našim rezultatima. Najviše vrijednosti količine imunoglobulina koje smo dokazali u kronično upalnom pulpnom tkivu su one za IgG (84,3 mg/g proteina), dok su količine IgA (4,4 mg/g proteina) i količine IgM (1,4 mg/g proteina) uočljivo niže u odnosu na količine IgG. Osim toga, važno je istaknuti da je IgG zastupljen u svakom ispitivanom uzorku tkiva, dok je postotna zastupljenost IgM u svega 8% slučajeva.

Dominantnost IgG može se primijeniti za praćenje lokalnog upalnog procesa i aktivnost imunog sustava. Predominacija IgG može djelomično pripadati odgovoru na bakterijsku invaziju i mikroorganizme koji dovode do antigenog izazova. Imunoglobulin A ima ulogu u destrukciji bakterija pomoću polimorfonuklearnih leukocita služeći kao opsonizirajuće protutijelo (10). Ipak, uloga imunoglobulina u odnosu na zaštitu i doprinos razvoju patogeneze kroničnog pulpitisa nije sasvim razumljiva. Kombinacija IgA s antigenom može osigurati blokiranje antigena te tako spriječiti oslobađanje upalnih čimbenika koji su štetni za domaćine. Međutim, premda upala početno pomaže lokalnoj obrani, imunološki posredovano privlačenje polimorfonuklearnih leukocita i oslobađanje upalnih medijatora može imati daleko više štetnog djelovanja za domaćine nego početna antigena stimulacija. IgA i IgG protutijela su vrlo djelotvorna u neutralizaciji bakterijskih toksina. U kompleksu s protutijelom toksini postaju prihvatljivi za fagocitozu, te tako budu eliminirani iz tkiva gdje su oslobođeni.

Znatno veće količine imunoglobulina G u odnosu na količine IgA i IgM dokazane u našim ispitivanjima uzoraka upalnog tkiva, mogu upućivati na ireverzibilnost upalnog procesa u pulpnom tkivu. Dominantnost IgG, nadalje, mogla bi značiti da destruktne promjene koje su započele u pulpnom tkivu ne mogu biti zaustavljene, te da dolazi do nepovratnih oštećenja pulpnog tkiva, što s kliničkog stajališta zahtijeva neophodnu eksciziju pulpnog tkiva. Ova naša hipoteza u skladu je s Hahnovom (11) koji se koristio metodom različitom od naše, ali je uočio da u reverzibilnoj grupi upalnog pulpnog tkiva 90% čine limfociti T, koji mogu prekinuti upalni proces. Karakteristika ireverzibilne grupe upalnog pulpnog tkiva je veći broj limfocita B, a plazma stanica u ireverzibilnoj grupi odgovorna je za imunopatološke promjene u pulpnom tkivu.

Kronična upala, kao što je poznato, posljedica je akutne upale. Ukoliko akutne reakcije ne uspiju odstraniti ili neutralizirati štetne činioce, akutna upala poprima kronični oblik. Novija saznanja upućuju na važnu ulogu imunoloških reakcija u nastanku kronične upale. Štetni činioci postaju antigeni tih istih štetnih čimbenika, koji pobuđuju imunološke reakcije, a one dovode do sekundarnog oštećenja tkiva, koje je u vezi sa stvaranjem protutijela.

Reakcije preosjetljivosti izazivaju oštećenja koja mogu biti lokalna, blaga i popravljiva ili



teža pa i generalizirana. Reakcije preosjetljivosti rezultat su djelovanja humoralnih i celularnih čimbenika. Oštećenja nastaju kada su efektori suviše aktivirani ili je regulacija njihove aktivnosti poremećena. Do oštećenja u reakcijama preosjetljivosti može doći prvenstveno ovim mehanizmima:

- a) aktiviranjem mastocita i bazofila s IgE
- b) aktiviranjem sustava komplemenata fagocita i k-stanica protutijelima IgG i IgM
- c) aktiviranjem limfocita T

Tako se imunološke reakcije dijele na tip I., II., III. i IV. Tip I. su anafilaktičke reakcije, tip II. citotoksične reakcije preosjetljivosti ovisne o protutijelima, tip III. reakcije preosjetljivosti uzrokovane imuno-kompleksima i tip IV. su reakcije kasne preosjetljivosti.

Protutijela razreda IgG i IgM mogu se spajati s antigenima u staničnim stijenkama ili s antigenima u tjelesnim tekućinama. U oba slučaja mogu nastati upalne reakcije i oštećenja tkiva zbog aktiviranja i celularnih efektor. Od humoralnih efektor najvažniji je sustav komplementa koji jednom aktiviran dovodi do mnogih bioloških učinaka a uzrokuje oslobađanje iz mastocita i bazofila, pospješuje fagocitozu i uzrokuje citolizu (12).

Na osnovi rezultata o dokazanim količinama imunoglobulina u ispitivanju uzoraka kronično upalnog pulpnog tkiva može se zaključiti da u tim tkivima postoje uvjeti za indukciju humoralnog imunog odgovora. S obzirom na dominantnost količine IgG moguće je pretpostaviti udio imunoloških reakcija tipa II. i III. u patogenezi kroničnih pulpitisa. S kliničkog stajališta to znači neophodnu potrebu za ekstirpacijom pulpnog tkiva.

---

#### QUANTITATIVE EVALUATION OF THE IMMUNOGLOBULIN G, A AND M IN THE HUMAN DENTAL PULP

##### Summary

*The presence of immunoglobulins G, A and M was studied in human dental pulps using a quantitative method of radial immunodiffusion. Valid data on the amounts of IgG, IgA and IgM were obtained on the basis of measured concentrations of immunoglobulins in each pulp sample and their correlation with total protein concentrations. The results indicated IgG to be present in 100%, IgA in 15% and IgM in 8% of 13 pulp samples affected by chronic inflammation. The mean values of IgG, IgA and IgM thus determined were 84.3, 4.4 and 1.4 mg/g protein, respectively. In intact pulp tissue, however, no presence of immunoglobulins G, A and M could be detected using the same method as above. The results obtained suggested the possibility of local synthesis of immunoglobulins in chronically inflamed pulp tissue, indicated that nonspecific inflammatory reaction may have occurred concurrently with some specific immunologic reactions. The predominance of IgG pointed to immunologic reactions of early types II and III hypersensitivity.*

Key words: immunoglobulins, pulp tissue

---

Adresa autora:  
Address for correspondence:

Greta Škaljac-Staudt  
Zavod za dentalnu patologiju  
Stomatološkog fakulteta  
u Zagrebu  
41000 Zagreb  
Gundulićeva 5

**Literatura**

1. STASHENKO P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:89-96.
2. PERKOVIĆ DD., FILERY ED. Identification of bacteria in immunopathologic mechanisms of human dental pulp. *Oral Surg* 1984; 57:652-661.
3. LAFKOWITZ P., HOLDERBACH J. Study of the human dental pulp using immunofluorescence. *J. Endodon* 1977; 3:144-146.
4. SPEER ML., MADONIA VJ., HEUER MA. Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. *J. Endodon* 1977; 3:418-423.
5. PULVER WH., TAUBMAN MA., SMITH DJ. Immune Components in Normal and Inflamed Human Dental Pulp. *Archs Oral Biol* 1977; 22:103-111.
6. HONJO H., TSUBAKIMOTO H., UTSUMI N., TSUTSUI M. Localization of Plasma Proteins in Human Dental Pulp. *J Dent Res* 1970; 49:888.
7. SELTZER S. *Endodontology Philadelphia: Lea and Febiger*, 1988; 417-425, 195-232.
8. JONTELL M., GUNVAJ MN., BERGENHOLTZ G. Immunocompetent Cells in the Normal Dental Pulp. *J. Dent Res* 1987; 66:1149-1153.
9. ANDŽIĆ J. *Osnovi oralne fiziologije i biokemije*. Beograd: Naučna knjiga, 1981; 175-250.
10. PEKOVIĆ DD, ADAMKIEWICZ VW, Gontsky M. Immunoglobulins in Human Dental Caries. *Archs Oral Biol* 1988; 33:135-137.
11. HAHN C., FALKLER AW., SIEGEL MA. A Study of T and B cells in Pulpal Pathosis. *J. Endodon* 1989; 15:20-26.
12. DEKARIS D. u: *Imunološka preosjetljivost*. Gamulin S., Marušić M., Krvavica S. *Patofiziologija*. Zagreb: Jumea, 1988; 485-489.