

TITAR ANTITELA U PLJUVAČCI I SERUMU EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Predrag Lekić, Mirjana Ivanović

Klinika za dečju i preventivnu stomatologiju, Stomatološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Sažetak

U radu je određivan titar antitela na mikroorganizme plaka u toku razvoja eksperimentalne inflamacije gingive pacova različite starosti i imunizovanosti.

Stanje gingive određivano je pre žrtvovanja životinja, a zatim su uzimani uzorci pljuvačke i seruma za određivanje titra antitela na ispitivane mikroorganizme. Najmlađa grupa životinja nije pokazivala znake inflamacije gingive tokom celog eksperimentalnog perioda, dok je intenzivnija inflamacija zabeležena u imunizovanoj grupi starijih pacova. Niske vrednosti antitela u pljuvački pokazuju odsustvo intenzivnije sinteze specifičnih antitela u pljuvački na antigenu stimulaciju mikroorganizama plaka. Titar serumskih antitela bio je najmanji u najmlađe grupe, umeren u starije i najizrazitiji u imunizovane grupe pacova. Izneti rezultati ukazuju da stariji pacovi reaguju intenzivnije na mitogene plaka u odnosu na mlade životinje, te da prethodni kontakt sa antigenima povećava intenzitet imunih reakcija.

Ključne reči: Eksperimentalni model, gingiva, titar antitela, pljuvačka, serum

UVOD

Sasvim je sigurno da dentalni plak predstavlja glavni etiološki faktor koji na tkiva parodontijuma deluje direktnim i indirektnim putem (1, 2). Antigeni plaka stimulišu nastanak lokalnog i sistematskog imunog odgovora, a u cilju eliminacije mikroorganizma i zaštite tkiva domaćina (3, 4). U dentalnom plaku sa inflamirane gingive dokazano je prisustvo sekretornih antitela kao odraz nespecifične zaštite (5). Stimulacija antigenima plaka, u odnosu na nespecifične mitogene, ukazuje na povećanu sintezu odbrambenih elemenata u perifernoj krvi (6). Potenciranje imunih reakcija u prolongiranom trajanju dovodi do nastanka imunopatoloških mehanizama i indirektnog oštećenja potpornog aparata zuba (7).

U ovom radu se u cilju daljeg razjašnjenja mehanizama nastanka i patogeneze oboljenja parodontijuma želelo utvrditi titar antitela na mikroorganizme plaka u toku razvoja eksperimentalne inflamacije gingive pacova različite starosti i imunizovanosti.

MATERIJAL I METODE

U okviru ove studije korišćene su tri grupe od po 11 SPF RT1 Lew/Mo1 pacova, od kojih je jedna grupa bila jedan mesec stara (A), a dve tri meseca (B₁ i B₂). Jedna od dve tromesečne grupe (B₁) bila je imunizovana sa *Fusobacterium nucleatum* ATH 101, *Streptococcus mutans* 6715, *Bacteroides gingivalis* ATCC 33 277 i *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. Eksperimentalnim životinjama su u vodi za piće dodavani tetraciklini (2,5 g tetraciklina i 4,33 g kalijum sorbata na litar vode za piće), a u cilju održavanja klinički zdrave gingive sve do nultog dana razvoja eksperimentalnog gingivitisa. Sa nultim danom razvoja inflamacije gingive 10⁹ ćelija pomenutih vrsta mikroorganizama davno je per os kao i 5% rastvor saharoze, a u cilju akumulacije veće količine plaka i nastanka inflamatornih promena. Nultog, sedmog i četrnaestog dana žrtvovane su po tri, a trećeg po dve životinje. Neposredno pre toga određivano je stanje gingive na gornjim i donjim incizivima indeksom krvarenja po Cowell, Saxton, Sheiham i Wagg-u (8). Nakon procene stanja životinjama je davana inekcija Carbaculina (1 ml), u cilju stimulisanja pojačanog lučenja pljuvačke koja je zatim sakupljana kapilalom. Analize su obavljene odvojeno za svaku životinju fiksacijom u 99% etanolu i spravljanjem razblaženja 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 i 1:1024. Razblaženja su postavljena na pločice sa odvojenim kolonijama pomenutih bakterija i inkubisana u higroforu, a zatim uobičajenim postupkom pripremljena za određivanje titra antitela na fluorescentnom mikroskopu (9).

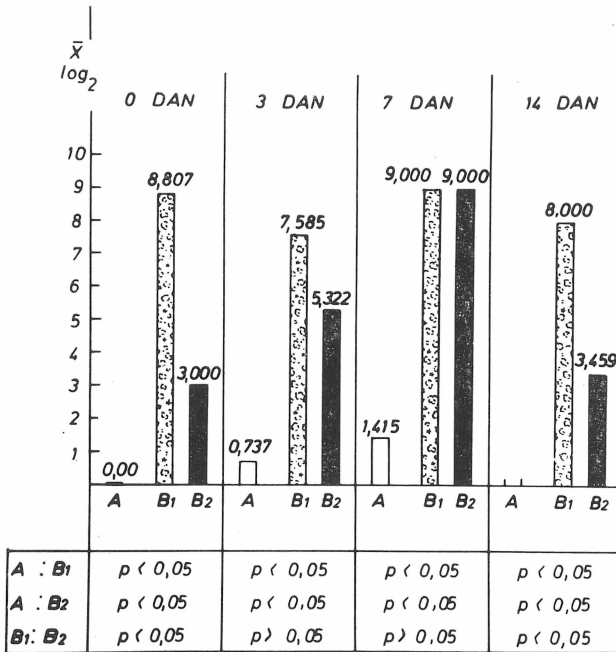
Uzorki krvi su sakupljeni iz aksilarnih krvnih sudova i iz srčane šupljine, odvojeno za svaku životinju. Fiksacija i priprema seruma za analizu titra antitela u ispitivanih životinja obavljena je istom metodom kao i sa uzorcima pljuvačke. Vrednosti titra antitela u serumu i pljuvački izražene su kao srednje vrednosti 10g₂, a dobijeni rezultati obrađeni testom inverzije (Wicoxon-Mann-Whitney »U« test).

Tabela 1. Stanje gingive eksperimentalnih životinja
Table 1. The State of the Gingiva in Experimental Animals

Eksperimentalna grupa	Gingivalni indeks po danima			
	0	3	7	14
A	0	0	0	0
B ₁	0	0,5	1	1
B ₂	0	0,5	0,66	066

REZULTATI I DISKUSIJA

Nultog dana eksperimenta sve životinje su imale zdravu gingivu (tabela 1). Ni jedna od jednomesečnih životinja (grupa A) nije u toku celog eksperimenta pokazala znake razvoja inflamacije, što se inače slaže i sa



Slika 1. Srednje vrednosti titra antitela na fusobacterium nucleatum u pljuvački ispitivanih životinja (izražene kao log₂)

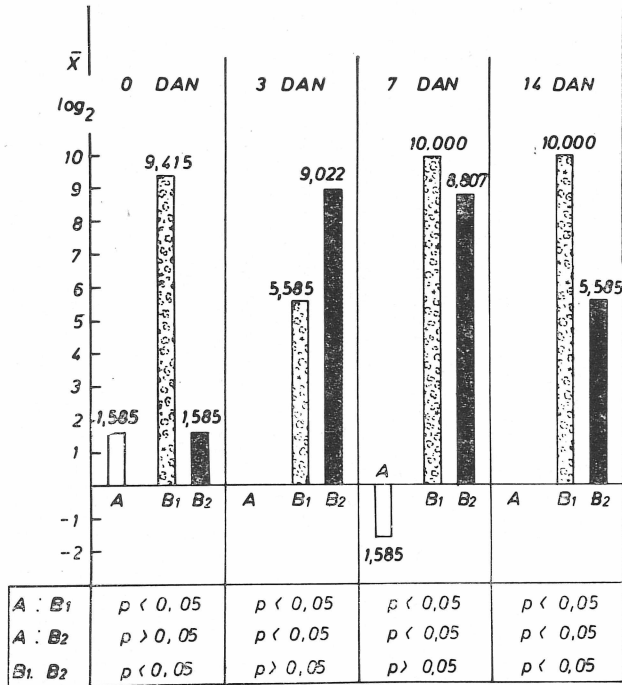
Figure 1. Mean titer values of antibody to *Fusobacterium nucleatum* in the spittle of study animals (expressed as log₂)

nalazima drugih autora (10, 11). Značajno je uočiti da su sve imunizovane (B₁) u odnosu na neimunizovane (B₂) životinje već od sedmog dana pokazivale znake inflamacije, a time i izraženiju inflamatornu reakciju u slučajevima prethodnog kontakta sa odgovarajućim antigenima plaka.

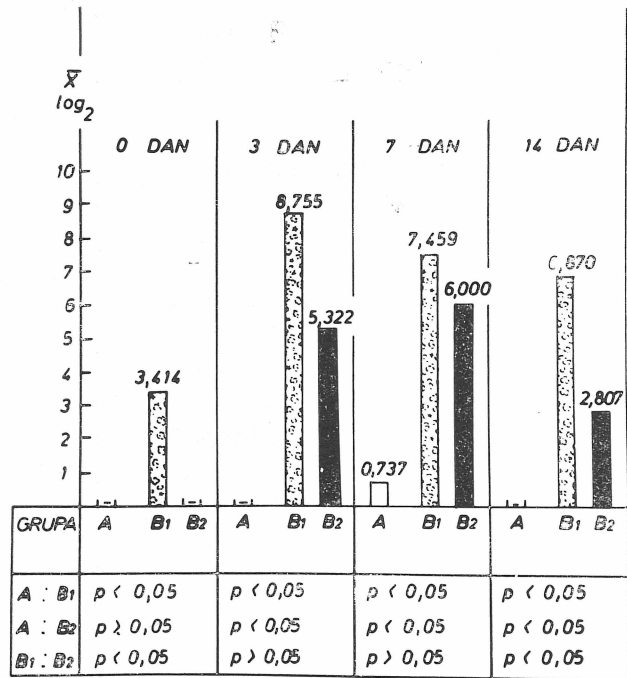
Analiza srednjih vrednosti titra antitela po eksperimentalnim danima i u odnosu na svaki ispitivani mikroorganizam prikazana je na grafikonu 1, 2, 3 i 4. Uočava se da se u toku eksperimentalnog razvoja inflamacije gingive uglavnom nisu značajnije menjale vrednosti titra antitela na *F. nucleatum*, *S. mutans*, *B. gingivalis* i *A. viscosus*. Početnog dana eksperimenta zabeležene su nešto veće vrednosti koje uglavnom variraju ostalih dana ne pokazujući zakonomernosti za bilo koju od ispitivanih grupa.

Sasvim je sigurno da pljuvačka ima višestruku ulogu u zaštiti sluzokože usne duplje, pa i gingivalnog tkiva (10, 11). Pored fizičkog i hemijskog uticaja značajne su i enzimske i imune komponente pljuvačke čije se aktivnosti ogledaju pre svega u eliminaciji ili neutralisanju mikroorganizama usne duplje. Jedan broj autora s toga ističe korelaciju stepena inflamacije gingive i vrednosti antitela u dentalnom plaku, pri čemu je ovo rezultat povećanja pre svega serumskih imunoglobina klase A i G (12,

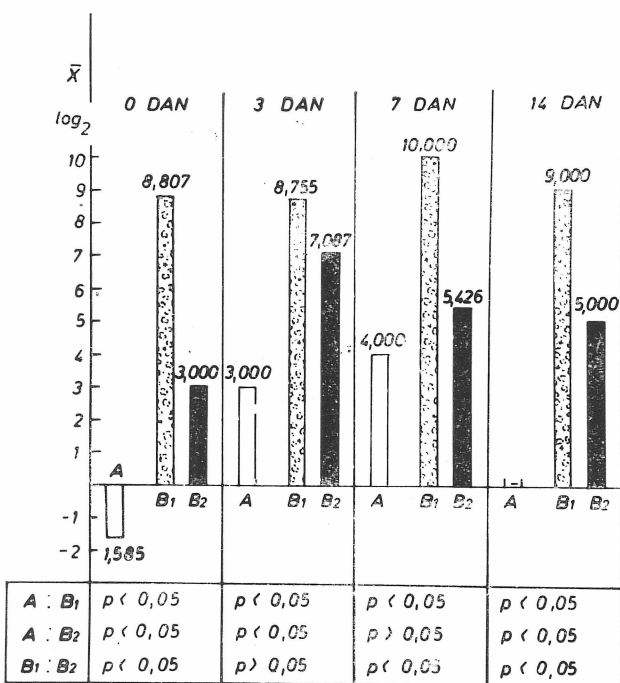
Slika 2. Srednje vrednosti titra antitela na streptococcus mutans u pljuvački ispitivanih životinja (izražene kao log 2)
 Figure 2. Mean titer values of antibody to Streptococcus mutans in the spittle of study animals (expressed as log 2)



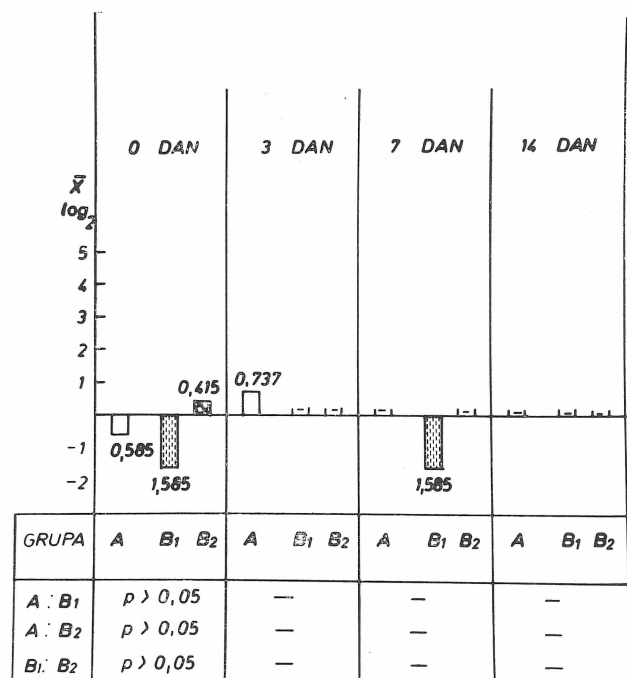
Slika 3. Srednje vrednosti titra antitela na bacteroides gingivalis u pljuvački ispitivanih životinja (izražene kao log 2)
 Figure 3. Mean titer values of antibody to Bacteroides gingivalis in the spittle of study animals (expressed as log 2)



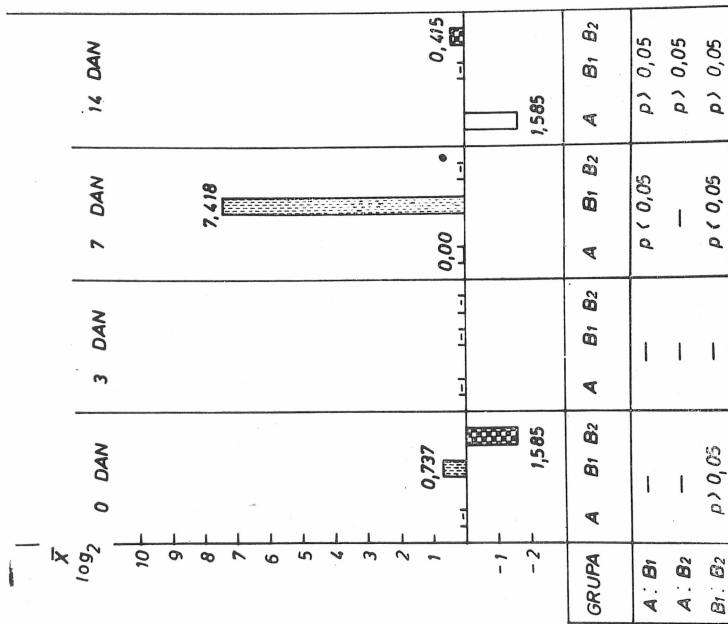
Slika 4. Srednje vrednosti titra antitela na actinomyces viscosus u pljuvački ispitivanih životinja (izražene kao log 2)
 Figure 4. Mean titer values of antibody to Actinomyces viscosus in the spittle of study animals (expressed as log 2)



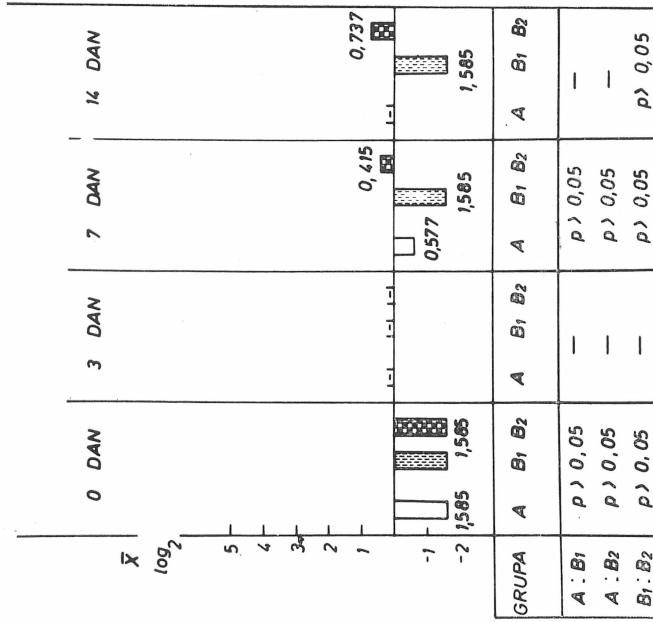
Slika 5. Srednje vrednosti titra antitela na fusobacterium nucleatum u serumu ispitivanih životinja (izražene kao log 2)
 Figure 5. Mean titer values of antibody to Fusobacterium nucleatum in the serum of study animals (expressed as log 2)

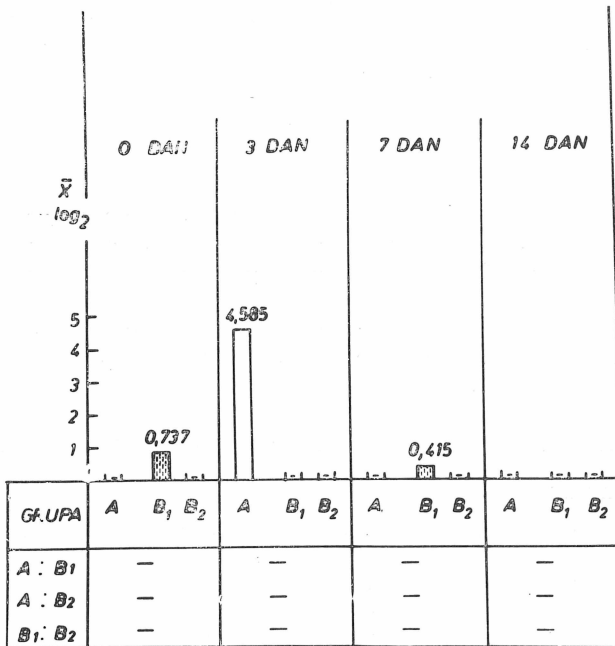


Slika 6. Srednje vrednosti titra antitela na streptococcus mutans u serumu ispitivanih životinja (izražene kao log₂)
 Figure 6. Mean titer values of antibody to Streptococcus mutans in the serum of study animals (expressed as log₂)



Slika 7. Srednje vrednosti titra antitela na bacteroides gingivalis u serumu ispitivanih životinja (izražene kao log₂)
 Figure 7. Mean titer values of antibody to Bacteroides gingivalis in the serum of study animals (expressed as log₂)





Slika 8. Srednje vrednosti titra antitela na actinomyces viscosus u serumu ispitivanih životinja (izražene kao log 2)

Figure 8. Mean titer values of antibody to Actinomyces viscosus in the serum of study animals (expressed as log 2)

Titari antitela u serumu na četiri vrste ispitivanih mikroorganizama, po eksperimentalnim danima i grupama prikazani su slikama 5, 6, 7 i 8. U celini posmatrano titar antitela je pokazivao najniže vrednosti nultog dana eksperimenta da bi se u toku razvoja inflamacije gingive ove vrednosti povećale. Takođe se uočava da su najniže vrednosti zabeležene u najmlađoj grupi životinja (A), usmerene u grupi B₂ i najviše u tromesečnih imunizovanih pacova (B₁). Slični su rezultati Wyss-a i Guggenheim-a (1984) koji su u imunizovane grupe životinja testom imunofluorescence takođe dokazali značajno povećanje titra na inokulisane bakterije u odnosu na kontrolnu grupu (14). Challacombe i Wilton su takođe utvrdili značajno povećanje titra IgG antitela na Actinomyces viscosus u ispitanika sa visokim vrednostima GI u odnosu na osobe sa niskim (15). Značajno je istaći da je grupa tromesečnih neimunizovanih životinja (B₂) imala znatno veći titar antitela u odnosu na jednomesečnu (A), što ukazuje da prethodni i pasivni kontakt sa mikroorganizmima plaka utiče na sistemsko povećanje titra antitela u serumu ispitivanih životinja.

13). Slično tome i izneti rezultati u ovom radu ukazuju na odsustvo povećane sinteze specifičnih antitela u pljuvački na antigenu stimulaciju mikroorganizama dentalnog plaka.

ZAKLJUČAK

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da mitogeni plaka, za razliku od nalaza u pljuvački, stimulišu sintezu specifičnih antitela i sledstvenu pojavu istih u serumu ispitivanih životinja. Prethodni kontakt sa antigenima plaka utiče takođe na nastanak intenzivnijih imunih reakcija praćenih i izraženijim znacima inflamacije gingive, što u produženom vremenskom trajanju može dovesti do daljih oštećenja parodontalnih tkiva.

ANTIBODY TITER IN SALIVA AND SERUM OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Summary

This paper reveals the antibody titer of plaque microorganisms in experimental gingivitis rats of different ages and immunization. Before sacrificing experimental animals status of gingival tissue was assessed. Further on specimens of saliva and serum were taken for antibody titer measurements. None of the young rats developed gingivitis during experiment, where as the adult immunized rats bled on probing. Low values of antibody point out the absence of intensive synthesis of specific antibodies in saliva upon the antigen stimulation of plaque microorganisms. Serum antibody titers were low in young rats, moderate in adult, and high in adult immunized rats. These results indicate that adult rats react stronger to plaque antigens than young rats and that previous contact with the antigens increases the reaction.

Key words: Experimental model, gingiva, antibody titer, saliva, serum

Literatura

1. ĐAJIĆ D, ĐUKANOVIĆ D, ZELIĆ O, URSU I. Parodontopatije, Naučna knjiga, Beograd, 1988.
2. LEKIĆ P, BELOICA D, ZELIĆ O, CEKIĆ D, IVANOVIĆ M. Imunocitohemijski nalaz gingive u laboratorijskih pacova. SGS, 1986; 5:335—342.
3. LEKIĆ P, KNEŽEVIĆ M, CEKIĆ D, BELOICA D, IVANOVIĆ M. Sereologija ćelijskog infiltrata gingive dece predškolskog uzrasta i školske omladine. SGS, 1986; 3:177—182.
4. MATSSON L. Development of gingivitis in pre-school children and young adults. J Clin Periodont, 1978; 5:24—34.
5. LEKIĆ P, ANĐIĆ J. Proteinski sastav dentalnog plaka dece sa zdravom i inflamiranom gingivom. SGS, 1984; 5:365—369.
6. SUZUKI B, SIMS J, SINGER L, PAGE C. Blastogenic responsiveness of human lymphoid cells to mitogens and to homogenates of periodontal pocket bacteria. J Periodont Res, 1984; 19:352—365.
7. MATSSON L. Development of experimental gingivitis at different ages in young individuals. Doctors thesis, Malmö, 1979.
8. COWELL R, SAXTON A, SHEIHAM A, WAGG J. Testing therapeutic measu-

- res for controlling chronic gingivitis in man: A suggested protocol. *J Clinic Periodont*, 1975; 2:231—240.
9. JOHNSON D, ARAUJO M. A simple method of reducing the facing of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods*, 1981; 43: 349—350.
 10. ANĐIĆ J. Glikoproteini pljuvačke kao plakovni materijal. *SGS*, 1976; 1:49—55.
 11. BERTHOLD P. Formation of salivary coating and dental plaque of two different supporting materials. *J Periodont*, 1979; 50:397—404.
 12. LEKIĆ P. Epidemiološka i imunološka istraživanja uticaja plaka u etiologiji oboljenja parodonticijuma u dece. *Magistarski rad*, Beograd, 1982.
 13. BASU M. Salivary IgG and IgA before and after periodontal therapy. *J Periodont Res*, 1976; 11:226—229.
 14. WYSS C, GUGGENHEIM B. Effects of the association of conventional rats infected with *Actinomyces viscosus* Nyl and *Bacteroides gingivalis* W83. *J Periodont Res* 1984; 19:575—577.
 15. CHALLACOMBE SJ, WILTON MA. A study of antibodies and opsonic activity in human cervicular fluid in relation to periodontal disease. *J Periodont Res*, 1984; 19:604—608.