

© Коллектив авторов, 2009
УДК 616.311.2-018.73

*И.В. Майбородин, А.Б. Войтович, Е.В. Козлова, И.А. Колмакова, И.А. Притчина,
Д.Н. Ковынцева, И.С. Колесников, Б.В. Шеплев и А.Н. Ковынцева*

ФОРМИРОВАНИЕ ПЛАЗМОЦИТАРНЫХ ИНФИЛЬТРАТОВ В ДЕСНЕ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ВЕРХУШЕЧНЫМ ПЕРИОДОНТИТОМ

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А.И. Шевела) Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru, imai@ngs.ru

Методом световой микроскопии с применением моноклональных антител, выявляющих антиген CD38, исследовали структуру лейкоцитарных инфильтратов десны 80 пациентов различного возраста и пола с хроническим верхушечным периодонтитом. Обнаружено, что в тканях десны практически всех больных с данной патологией присутствует 2 типа лейкоцитарных инфильтратов: инфильтраты с низким содержанием плазматических клеток и большим — нейтрофильных гранулоцитов и структуры с высокой численностью плазмочитов и низкой — нейтрофильных гранулоцитов. В эпителиальной выстилке десны при хроническом верхушечном периодонтите CD38+-клетки отсутствуют. Обсуждаются гистогенез лейкоцитарных инфильтратов в десне при верхушечном периодонтите и значение плазматических клеток в развитии патологического процесса.

Ключевые слова: лейкоциты, плазматические клетки, периодонтит, десна.

Основные морфологические изменения при хроническом верхушечном периодонтите связаны с персистенцией лейкоцитов соединительной ткани периодонта и десны [16, 20].

При изучении лейкоцитов в биоптатах десны пациентов с периодонтитом в некоторых случаях было найдено много В-лимфоцитов (78–87%), Т-лимфоцитов и мононуклеаров (10%). На основании этого, сделано заключение о роли дисбаланса иммунной регуляции в возникновении периодонтита [3, 5]. Тенденция к формированию обширных плазмочеточных инфильтратов может свидетельствовать о невозможности противостоять периодонтопатогенным бактериям [11, 12]. Дефицит некоторых иммуноглобулинов может приводить к продолжительной активации иммунокомпетентных клеток и индукции воспалительного процесса, сопровождающегося лимфогенезом [6, 18].

Согласно данным R. Gillett и соавт. [9], воспалительные инфильтраты десны при хроническом периодонтите можно разделить на 2 группы по различной активности процесса. Когда активность невысока, объем воспаленной соединительной ткани десны небольшой и в ней преобладают малые В-лимфоциты. В случае активации объем пораженных тканей возрастает, и большинство В-клеточной популяции трансформируется в плазмочиты.

В связи с тем, что в десне при хроническом верхушечном периодонтите на препаратах, окрашенных гематоксилином — эозином, случайно были обнаружены лейкоцитарные инфильтраты

с очень высокой численностью клеток, похожих на плазмочиты, целью настоящего исследования было уточнение клеточного состава этих структур с использованием высокоспецифической иммуноцитохимической реакции с антигенным комплексом плазмочитов.

Материал и методы. С хроническим верхушечным периодонтитом были обследованы 40 мужчин и 40 женщин. Возраст больных был в промежутке от 18 до 58 лет: 18–30 лет — 24 пациента (12 мужчин и 12 женщин), 31–40 лет — 24 больных (12 мужчин и 12 женщин), 41–50 лет — 20 человек (10 мужчин и 10 женщин) и старше 51 года — 12 пациентов (6 мужчин и 6 женщин). Гистологический материал был получен на базе ООО «Дента» и ООО «Дентал-Сервис», с которыми в научном плане тесно сотрудничает Центр новых медицинских технологий. Для исследования была использована ткань десны премоляров верхней челюсти, полученная при хирургическом лечении заболеваний периодонта и при удалении зубов по ортодонтическим показаниям. Диагноз хронического верхушечного периодонтита был подтвержден рентгенологически [2], видимые признаки воспаления тканей десны (гингивита) у пациентов данных групп отсутствовали. Все пациенты в течение последнего года до обращения в клинику не имели контакта с производственными вредностями и не принимали лекарственных и пищевых веществ, влияющих на плотность тканей зубов и состояние периодонта. Кроме того, у всех обследованных больных не было признаков сопутствующих заболеваний, изменяющих состояние зубов и периодонтальных тканей.

Биоптаты фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч, обезвоживали в этаноле постепенно возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. На срезах толщиной 5 мкм проводили реакцию с анти-CD38-антителами непрямым иммунопероксидазным методом, использовали

стандартный протокол окраски и набор реагентов Dako reagents kit (Dako, Дания). Выбор данных антител основан на том, что экспрессия CD38 может быть найдена в некоторых незрелых гематопоэтических клетках и зрелых плазмочитах [14]. Продукты иммунопероксидазной реакции визуализировали диаминобензидином, препараты, для более точного определения типа других клеток, докрашивали гемалауном Майера и после дегидратации заключали в полистирол. Гистологические срезы изучали под световым микроскопом при увеличении до 1200 раз.

Для определения структурной организации десны применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. Для изучения показателей размеров инфильтратов (использовали объектив $\times 4$) конечная площадь тестового квадрата была равна $14\,400\text{ мкм}^2$ (сторона квадрата — 120 мкм), при определении цитограммы (применяли объектив $\times 40$) — 144 мкм^2 (сторона квадрата — 12 мкм) [1]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладной статистической программы MS Excel (Microsoft, США). Различия считали значимыми (по критерию Стьюдента) при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. Десна имеет незначительный объем, в ней отсутствует подслизистая основа. Формирование инфильтратов в тканях десны ограничено с одной стороны эпителием, с другой — надкостницей альвеолярного отростка челюсти. Пространственное ограничение возможностей образования плазмочитарных инфильтратов, по-видимому, может приводить к их деформации, они имеют не шарообразную форму (на срезе — круглую), а вытянутую, извилистую или они имеют даже прерывистое строение (рисунок, б, в). Эти деформации усугубляются явлениями склероза тканей десны, которые сопровождают хроническое воспаление и усиливаются с возрастом (см. рисунок, б, в). Соединительнотканые перетяжки еще значительно изменяют форму инфильтратов. В десне при использовании антител к CD38-антигену не были найдены специфически реагирующие объекты в эпителии и между эпителиоцитами, хотя часто большое количество CD38⁺-клеток присутствовали непосредственно под базальной мембраной (см. рисунок, а).

После подсчета клеток, реагирующих с антителами к антигену CD38, во всех инфильтратах десны, были получены данные, свидетельствующие о довольно значительном содержании таких клеточных элементов: $10 \pm 11\%$ от общего числа клеток в инфильтратах и $71 \pm 76\%$ специфически окрашенных клеток на 10^5 мкм^2 площади среза инфильтрата. В некоторых случаях число окрашенных клеток было очень значительным (см. рисунок, а–в): до 30% и $212,76$ клеток на 10^5 мкм^2 .

При изучении гистологических препаратов оказалось, что лейкоцитарные инфильтраты, при-

сутствующие в десне практически всех пациентов с хроническим верхушечным периодонтитом, можно разделить на инфильтраты с низким содержанием плазмочитов и с высоким их содержанием (см. рисунок).

В инфильтратах с низкой концентрацией плазмочитов (см. рисунок, г) последние составляют $0–2\%$, а их численная плотность — до 30 на 10^5 мкм^2 площади среза. В структурах с высокой долей плазмочитов (см. рисунок, а — в) они составляют не менее 10% от общего числа клеток, а их абсолютное количество — более 80 плазмочитов на той же площади среза инфильтрата.

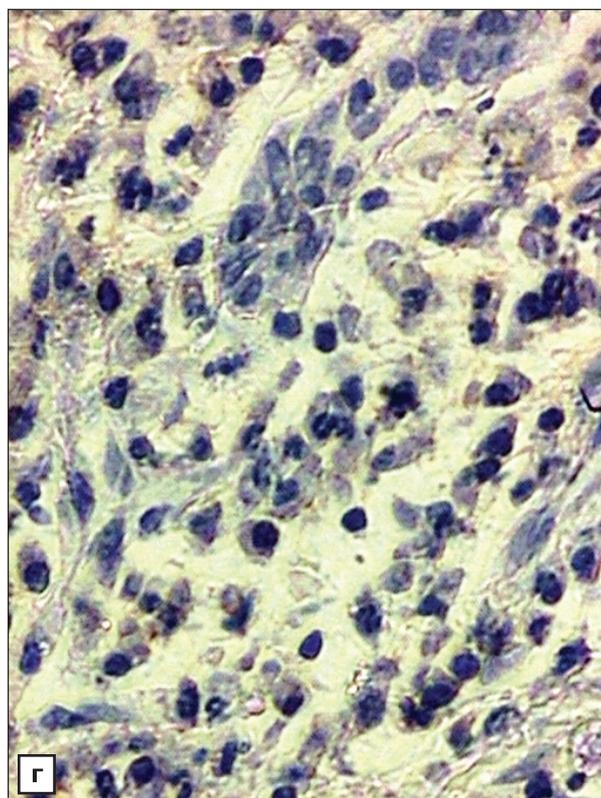
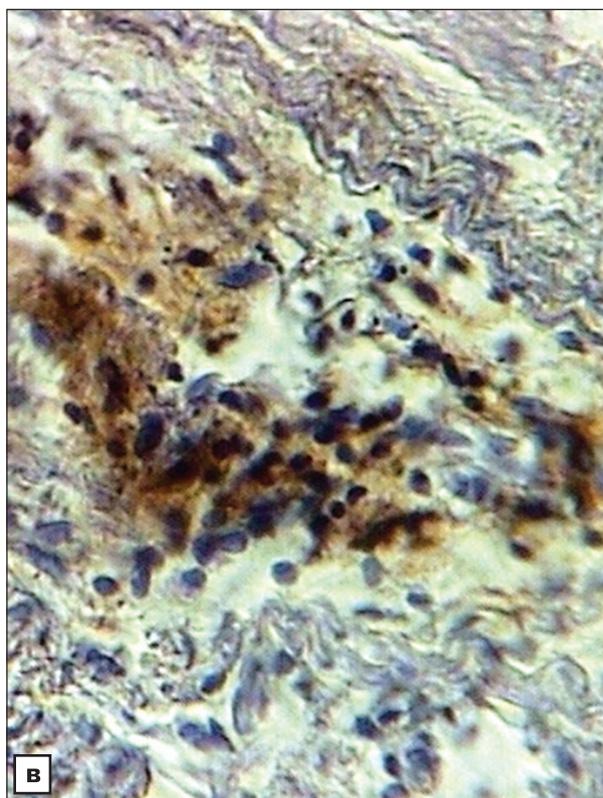
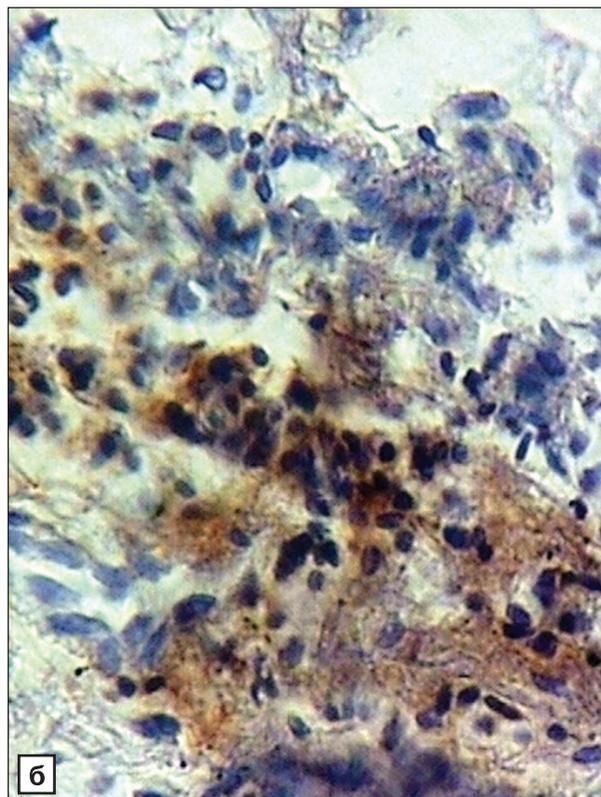
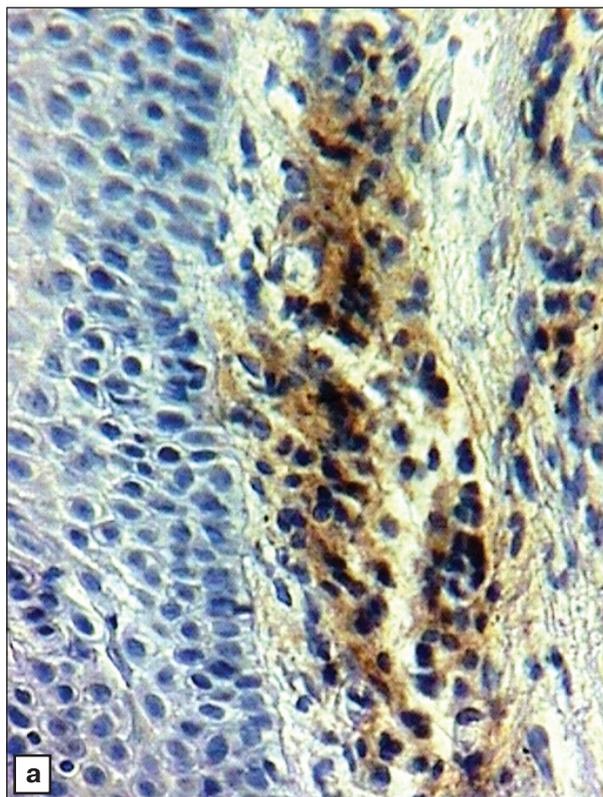
При сравнительном изучении строения таких инфильтратов было обнаружено, что в структурах с высоким содержанием плазмочитов относительное и абсолютное их число ($20 \pm 5\%$ и 145 ± 40 клеток на 10^5 мкм^2 площади среза инфильтрата) было больше в 40 и 32 раза соответственно, чем в инфильтратах с низкой концентрацией плазмочитов. Кроме того, в инфильтратах с высоким содержанием плазмочитов доля и численная плотность нейтрофильных гранулоцитов ($7,7 \pm 2,9\%$ и 55 ± 22 лейкоцита на единице площади среза) были меньше в $4,2$ и $5,2$ раза соответственно, чем в инфильтратах с низким содержанием плазмочитов.

Инфильтраты с высоким содержанием плазмочитов были обнаружены в тканях десны у 22 пациентов из 24 (по $91,7\%$) в возрастных группах $18–30$ и $31–40$ лет, у 18 больных из 20 (90%) — в группе $41–50$ лет и у 11 из 12 (также $91,7\%$) больных старшей возрастной группы.

Обсуждение полученных данных. F. Joachim и соавт. [10] исследовали биоптаты десен 20 пациентов с периодонтитом и 3 добровольцев. В эпителии всех биоптатов не были найдены плазмочиты. Эти клетки встречались очень редко в соединительной ткани здоровых людей. При периодонтитах большая часть плазмочитов располагались глубже нейтрофильных гранулоцитов. Даже при плазмочитарном гингивите плазмочиты присутствовали только в соединительной ткани под эпителием [4, 19].

Возможно, что В-лимфоциты проникают в эпителии и там начинают дифференцировку, но клетки эпителия быстро обновляются. Скорее всего, клетки В-линии, расположенные между эпителиоцитами, погибают вместе с ними, так как созревание плазмочитов происходит значительно медленнее регенерации эпителиальной выстилки.

Специфическое окрашивание плазмочитов и анализ литературы дали возможность сделать вывод, что в эпителиальной выстилке десны паци-



Лейкоцитарные инфильтраты в десне пациентов с хроническим верхушечным периодонтитом.

а — овалный инфильтрат с большим количеством плазмочитов в десне непосредственно под эпителием, в эпителии специфическое окрашивание отсутствует (пациент из возрастной группы 31–40 лет); б — инфильтрат с большим содержанием CD38⁺-клеток в склеротизированной слизистой оболочке у больного из группы 41–50 лет; в — значительная склеротическая трансформация слизистой оболочки, инфильтрат с высокой концентрацией плазмочитов у пациента из группы старше 51 года; г — лейкоцитарный инфильтрат без плазмочитов в слизистой оболочке у пациента из возрастной группы 31–40 лет. Отсутствие реакции с антителами к CD38 в нейтрофильных гранулоцитах, лимфоцитах и других клетках инфильтрата. Окраска с использованием анти-CD38-антител, диаминобензидином и гемалауном Майера. Ув.: а — 380; б, в — 450; г — 600.

ентов с хроническим верхушечным периодонтитом плазмоциты отсутствуют.

Плазмоциты всегда присутствуют в участках хронического воспаления, включая периодонтальные процессы. В биоптатах десны пациентов с периодонтитом, согласно литературным данным, во всех наблюдениях было обнаружено много В-лимфоцитов и плазмоцитов, их доля достигала 90%, а численная плотность — 150 клеток/мм² [3, 7, 8, 13].

Численная плотность плазмоцитов в наших исследованиях превышала представленные в литературе результаты, так как было предпринято изучение количества плазмоцитов только в лейкоцитарных инфильтратах, где их число на единице площади среза инфильтрата значительно больше, чем в среднем во всех тканях десны. Следует отметить, что S.M. Mallison и соавт. [13] исследовали количество плазмоцитов в десне без применения высокоспецифической реакции с антителами к CD38. Они показали, что при совместном действии антигена и адьюванта резко возрастает число плазмоцитов: с 10 до 80–150 клеток/мм². Другие исследователи также отмечали большое число В-лимфо- и плазмоцитов в некоторых лейкоцитарных инфильтратах стромы десны при быстро прогрессирующем периодонтите [7, 8, 15]. A.J. Minic и соавт. [15] обнаружили, что в 60% случаев в лейкоцитарных инфильтратах преобладали плазмоциты, в 20% — было много этих клеток, оставшиеся 20% являлись смешанными воспалительными инфильтратами.

Патогенез периодонтита может зависеть от численности плазмоцитов. Образование обширных плазмноклеточных инфильтратов свидетельствует о невозможности полноценно противостоять периодонтопатогенным бактериям и о предрасположенности к периодонтиту [11, 12].

R.A. Reinhardt и соавт. [17] показали, что В-лимфоциты преобладают в инфильтратах биоптатов десны из активных мест пародонтального процесса, относительно неактивных регионов и полученных от здоровых людей. Отношение Т/В-лимфоцитов было ниже при остром воспалении.

При исследовании воспалительных инфильтратов в десне пациентов с гингивитом, пародонтитом и периодонтитом было обнаружено, что при гингивите у детей младшего возраста преобладают малые лимфоциты, при ювенильном пародонтите более половины клеток были плазмочитами. Образцы при хроническом периодонтите у взрослых можно было разделить на 2 группы, возможно, по различной активности процесса: на фоне невысокой активности преобладают малые В-лимфоциты, при обострении воспаления боль-

шая часть В-клеточной популяции дифференцируется в плазмоциты [9].

В данном исследовании показано, что в десне пациентов с хроническим верхушечным периодонтитом одновременно присутствуют воспалительные инфильтраты с очень малым числом плазмоцитов и высоким — нейтрофильных гранулоцитов и структуры с большим содержанием плазмоцитов и малым — нейтрофильных гранулоцитов.

На основании различий численности плазмоцитов в лейкоцитарных инфильтратах с высоким и низким их содержанием, можно сделать заключение о том, что это не последовательные стадии развития и инволюции одних и тех же инфильтратов, а структуры, абсолютно разные по причинам и способам формирования.

Можно предположить, что сначала в тканях группируются недифференцированные В-лимфоциты, которые не имеют антигенного комплекса, реагирующего с антителами к CD38. Потом, довольно быстро, по мере пролиферации и дифференцировки В-клеток в инфильтратах появляются зрелые и незрелые плазматические клетки, уже имеющие CD38-антиген. Не исключено, что подобные структуры присутствуют в слизистой оболочке десны всех обследованных пациентов независимо от возраста и пола, но не были обнаружены только из-за малого объема биоптированных и изученных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Майбородин И.В., Колмакова И.А., Притчина И.А. и Чупина В.В. Изменения десны при сочетании артериальной гипертензии с периодонтитом. *Стоматология*, 2005, т. 84, № 6, с. 15–19.
2. Майбородин И.В., Притчина И.А., Гаврилова В.В. и др. Состояние тканей периодонта после лечения хронического периодонтита с учетом пола и возраста. *Стоматология*, 2008, т. 87, № 1, с. 31–38.
3. Михалева Л.М., Бархина Т.Г., Шаповалов В.Д. и др. Ультраструктурные аспекты клеточных популяций мягких тканей десны при хроническом воспалительном процессе. *Арх. пат.*, 2001, т. 63, № 6, с. 15–21.
4. Anil S. Plasma cell gingivitis among herbal toothpaste users: a report of three cases. *J. Contemp. Dent. Pract.*, 2007, v. 8, № 4, p. 60–66.
5. Erciyas K., Orbak R., Kavrut F. et al. The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 2006, v. 41, № 3, p. 165–170.
6. Fagarasan S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, v. 308, p. 137–153.
7. Feng L., Feng Y. and Li S. Ultrastructural morphological observation on the plasma cells in periodontitis-affected human

- gingival tissue. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.*, 1997, v. 32, № 5, p. 315–317.
8. Gemmell E., Carter C.L. and Seymour G.J. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, v. 125, № 1, p. 134–141.
 9. Gillett R., Cruchley A. and Johnson N.W. The nature of the inflammatory infiltrates in childhood gingivitis, juvenile periodontitis and adult periodontitis: immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to HLADR. *J. Clin. Periodontol.*, 1986, v. 13, № 4, p. 281–288.
 10. Joachim F., Barber P., Newman H.N. and Osborn J. The plasma cell at the advancing front of the lesion in chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 1990, v. 25, № 1, p. 49–59.
 11. Kinane D.F. and Lappin D.F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol. Scand.*, 2001, v. 59, № 3, p. 154–160.
 12. Lappin D.F., McGregor A.M. and Kinane D.F. The systemic immune response is more prominent than the mucosal immune response in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 2003, v. 30, № 9, p. 778–786.
 13. Mallison S.M. 3rd, Smith J.P., Schenkein H.A. and Tew J.G. Accumulation of plasma cells in inflamed sites: effects of antigen, nonspecific microbial activators, and chronic inflammation. *Infect. Immun.*, 1991, v. 59, № 11, p. 4019–4025.
 14. Medina F., Segundo C., Jimenez-Gomez G. et al. Higher maturity and connective tissue association distinguish resident from recently generated human tonsil plasma cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, v. 82, № 6, p. 1430–1436.
 15. Minic A.J., Zelic O.B. and Bojic P.D. Microscopic analysis of gingival inflammatory infiltrate in periodontal disease. *Acta Stomatol. Croat.*, 1989, v. 23, № 4, p. 281–289.
 16. Mitsuta T., Horiuchi H. and Shinoda H. Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. *J. Periodontol.*, 2002, v. 73, № 5, p. 479–486.
 17. Reinhardt R.A., Bolton R.W., McDonald T.L. et al. In situ lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J. Periodontol.*, 1988, v. 59, № 10, p. 656–670.
 18. Suzuki K., Ha S.A., Tsuji M. and Fagarasan S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin. Immunol.*, 2007, v. 19, № 2, p. 127–135.
 19. Velez I. and Mintz S.M. Soft tissue plasmacytosis. A case report. *N. Y. State Dent. J.*, 2005, v. 71, № 5, p. 48–50.
 20. Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Ann. Periodontol.*, 2001, v. 6, № 1, p. 197–208.

Поступила в редакцию 28.04.08
Получена после доработки 17.08.08

FORMATION OF PLASMA CELL INFILTRATES IN GINGIVA OF PATIENTS WITH CHRONIC APICAL PERIODONTITIS

I.V. Maiborodin, A.B. Voitovich, Ye.V. Kozlova, I.A. Kolmakova, I.A. Pritchina, D.N. Kovintsev, I.S. Kolesnikov, B.V. Sheplev and A.N. Kovintsev

The structure of leukocyte infiltrates in gingiva of 80 patients of various ages and gender with chronic apical periodontitis was studied using light microscopy with the application of monoclonal antibodies detecting CD38 antigen. Gingival tissues of practically of all the patients with periodontitis contained 2 types of leukocyte infiltrates: infiltrates with the low plasma cell content and high numbers of neutrophils and structures with high number of plasmocytes and low concentration of neutrophilic granulocytes. Within the gingival epithelium in patients with chronic apical periodontitis CD38 + cells were absent. The histogenesis of gingival leukocyte infiltrates in chronic apical periodontitis is discussed with the special emphasis on the role of plasma cells in the development of the pathological process.

Key words: *gingiva, periodontitis, leukocytes, plasma cells.*

Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAMS Siberian Branch, Novosibirsk.