

УДК 616-092

# Морфологическая характеристика клеточных элементов в отпечатках из области контакта дентальных имплантатов с десной

Григорьян А.С.<sup>1</sup>, Орлов А.А.<sup>2</sup>, Рыбалко А.С.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 119021, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д.16

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>3</sup> Стоматологическая клиника «Микроскопная стоматология». 141014, Московская обл., Мытищи, ул. Веры Волошиной, д. 12

В работе были поставлены две задачи: изучить морфологические характеристики клеточных элементов в отпечатках/цитограммах из области контакта дентальный имплантат-десна; проанализировать эффективность морфологической характеристики клеточных элементов в цитограммах для оценки состояния тканевого комплекса этой области в целом. **Методы.** Исследовали морфологию клеточных элементов, содержащихся в отпечатках цитогрaмм из области контакта десна-дентальный имплантат, полученных в динамике в сроки с 1 по 720 сутки от 90 пациентов (из них 44 женщины и 46 мужчин, общее количество имплантатов 223). Пациентам производили дентальные имплантации трех типов: немедленную, одноэтапную и двухэтапную. Оценку состояния тканей периимплантационной зоны производили полуколичественным методом по 4-балльной оценочной шкале, в которой учитывались: проявления клеточной гибели, интенсивность колонизирования клеток микроорганизмами, а также сочетание указанных проявлений патологических реакций. **Результаты.** Проведён анализ морфологических элементов клеточного состава импланто-десневой борозды. Обнаружено, что балльная оценка цитопатологии была выше у пациентов с клиническими проявлениями воспаления тканей вокруг имплантатов. **Заключение.** На основании данных проведенного исследования сделан вывод о высокой информативности данных морфологического исследования цитогрaмм, отражающее состояние тканей периимплантационной зоны.

**Ключевые слова:** цитогрaммы; отпечатки; клеточная смерть; аутофагия; апоптоз; микробная колонизация клеток; лейкоцитарные комплексы.

**Для цитирования:** Григорьян А.С., Орлов А.А., Рыбалко А.С. Морфологическая характеристика клеточных элементов в отпечатках из области контакта дентальных имплантатов с десной. *Патогенез.* 2019; 17(2): 70-75

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2019.02.70-75

**Для корреспонденции:** Рыбалко Алексей Сергеевич **e-mail:** dentmicro@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 21.11.2018

## Morphological characteristics of cellular elements in imprints of the dental implant-gum contact area

Grigoryan A.S.<sup>1</sup>, Orlov A.A.<sup>2</sup>, Rybalko A.S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Timura Frunze Str. 16, Moscow 119021, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>3</sup> Dental Clinic "Microscopic Stomatology", Very Voloshinoy Str. 12, Mytishchi of the Moscow Region 141014, Russian Federation

Imprints/cytograms of the dental implants-gum contact area were used for this study. **Aims:** To analyze morphological characteristics of cellular elements in imprints/cytograms obtained from the area of dental implants-gum contact and to evaluate the efficacy of using cell morphological characteristics of these imprints as a basis for a conclusion about the overall tissue condition in the peri-implant zone. **Methods.** Cytopathological changes, including dystrophic changes and signs of cells death, such as autophagy and apoptosis, were studied. Also, the study focused on leukocytes-platelet aggregation and other manifestations of cytopathology. A 4-score scale was used for assessment of the severity of cytopathological changes, including the number of cellular elements with signs of cell death (autophagy and apoptosis), intensity of microbial colonization in cells, and leukocyte-platelet aggregates. **Results.** Morphological elements of the cell composition in the implant-gingival sulcus were analyzed. **Conclusion.** The study showed a high incidence of signs of autophagy cell death in the cytograms, which was closely correlated with local and systemic pathogenic factors.

**Key words:** cytograms; imprints; cell death; autophagy; apoptosis; microbial colonization of cells; leukocyte complexes.

**For citation:** Grigoryan A.S., Orlov A.A., Rybalko A.S. [Morphological characteristics of cellular elements in imprints of the dental implant-gum contact area]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2019; 17(2): 70-75 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2019.02.70-75

**For correspondence:** Rybalko Alexey Sergrrvich, **e-mail:** dentmicro@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 21.11.2018

## Введение

Кревикулярная жидкость находит в настоящее время широкое применение в качестве объекта исследования для диагностических целей. Показано, что этот субстрат может служить эффективным источником информации о состоянии тканей, прилежащих к зубам, или к дентальным имплантатам [1]. В диагностических методах этого типа обычно используют биохимические маркёры, которые позволяют изучать функциональные нарушения в пародонте при его заболеваниях, либо в тканевых структурах, прилежащих к дентальным имплантатам [2, 3]. Тем не менее, как объект диагностического исследования, кревикулярная жидкость имеет определенные недостатки. В частности, её трудно или практически невозможно отделить от слюны, и это снижает её ценность как «чистого» объекта исследования [4].

Другой подход к исследованию состояния тканевых структур пародонта, а также тканей периимплантационной зоны, ориентируется на характеристики клеточных элементов в области контакта зуб – десна, либо области дентальный имплантат – прилежащие ткани. Метод основывается на изучении морфологических характеристик клеточных элементов в отпечатках/цитограммах из указанной области. Отпечатки получают, прижимая мишень к поверхности исследуемой области, т.е., неинвазивным способом. Важно, что забор отпечатков можно производить у пациентов неоднократно, чем обеспечивается возможность проведения динамических наблюдений.

Важным критерием для оценки состояния клеточных элементов изучаемых тканей являются мультивариантные морфологические проявления клеточной смерти. Одним из таких хорошо изученных видов клеточной смерти, имеющих принципиально важное значение для нормального развития, смены и функционирования клеточных систем тканей человека и животных, является аутофагия, структурно представленная в гистологических препаратах аутофагосомами [5]. Насколько важными признаются исследования, посвященные клеточной смерти, свидетельствует то, что за серию работ, посвященных одной из ее форм, аутофагии, японский исследователь Yoshinori Ohsumi в 2016 г. был удостоен Нобелевской премии по медицине и биологии [6].

В нашей работе объектом исследования явились клеточные элементы в отпечатках из области контакта дентальный имплантат – десна. Мы ставили две задачи:

провести анализ морфологических характеристик клеточных элементов в отпечатках/цитограммах из

области контакта дентальных имплантатов с десной; на основании полученных данных решить вопрос об эффективности морфологических характеристик клеточных элементов в отпечатках/цитограммах из области контакта дентальных имплантатов с десной, как источнике информации о состоянии тканей периимплантационной зоны.

Исследование проводилось в контексте изучения базовых механизмов воспаления, а также перехода воспалительного процесса в стадию реконвалесценции [7, 8].

## Материалы и методы исследования

Исследовали морфологию клеточных элементов, содержащихся в отпечатках цитогрaмм из области контакта десна – дентальный имплантат, полученных в динамике в сроки с 1 по 720 сутки от 90 пациентов (из них 44 женщины и 46 мужчин, общее количество имплантатов 223). Пациентам производили дентальные имплантации трех типов: немедленную, одноэтапную и двухэтапную. Общая характеристика обследованной выборки пациентов приведена в **табл. 1**.

В качестве критерия для оценки состояния тканевого комплекса в области контакта дентальный имплантат – десна использовали наличие в цитограммах клеток с признаками клеточной смерти. Оценку производили по 4-балльной системе, в которой учитывались проявления клеточной гибели, интенсивность колонизирования клеток микроорганизмами, а также сочетание указанных проявлений патологических реакций (**табл. 2**).

На основе данного критерия оценивали связь между признаками повреждения клеток/клеточной смертью и патогенными факторами, выявленными на основании клинических данных.

## Результаты исследования и обсуждение

В нашей работе был осуществлен анализ морфологических характеристик клеточных элементов цитогрaмм. В качестве критериев для оценки их состояния были использованы признаки изменений в клетках, которые можно было квалифицировать как проявления цитопатологии. В этих оценках мы опирались на рекомендации Комитета по номенклатуре клеточной смерти [9].

Одним из частых проявлений клеточной смерти в наших наблюдениях были явления аутофагии, что согласуется с данными литературы [10]. Этот процесс проявлялся в клеточном пространстве образованием аутофагосом. Образование аутофагосом играет важную роль в системе защитных реакций организма

[11]. Функция, которую выполняет аутофагия, состоит в удалении агрегированных или «ошибочно упакованных» и сформированных белков. посредством аутофагии осуществляется очистка клеточных пространств от поврежденных органелл или клеточных компонентов, включая митохондрии и эндоплазматический ретикулум старых и функционально несовершенных клеток [12]. Аутофагия выполняет важную защитную функцию, помогая уничтожению патогенов. Тем самым аутофагия способствует ограничению интенсивности распространения инфекции. В таком качестве она действует как часть иммунитета организма человека и животных [13].

Наряду с этим, аутофагия в определенном смысле является ответом на клеточный стресс, так как с ее помощью регулируются процессы, возникающие при нехватке питательных веществ и нарушениях энергетического баланса в тканях. В частности, на пренатальной стадии аутофагия играет важную роль в развитии эмбриона, поддерживая динамическое равновесие энергетического обеспечения клеток и адекватного расходования ими энергии [14].

Наблюдавшиеся в нашем исследовании аутофагосомы имели характерную структуру. Отчетливо была различима двуслойная мембрана – «визитная карточка» образования этого типа (рис. 1).

Описанные проявления цитопатологии обнаружены в цитограммах пациентов с гепатитом С и сахарным диабетом. Однако встречались они и в случае развития осложнений имплантологических опе-

раций у пациентов без фоновой патологии. Следует отметить, что образование аутофагосом чаще всего отмечалось в лейкоцитах (нейтрофилах), и это было характерно для наблюдений вне зависимости от наличия или отсутствия фоновой патологии.

Размеры аутофагосом колебались в широких пределах. Иногда наблюдались гигантские аутофагосомы, захватывающие не одну клетку, когда в аутофагосому включались до 3-х и даже больше клеток (рис. 2).

Другим типом клеточной смерти, часто встречающимся в материале цитограмм, был апоптоз. Дегенерация клеток в этом случае проявлялась в форме появления апоптозных телец и резкого возрастания количества макрофагов. При этом топически прослеживалось участие в данном процессе тромбоцитов (рис. 3).

Материал, образующийся в области деструкции, имел вид скоплений бесструктурной базофильной субстанции. Интересно, что в таких участках, наряду с описанными бесструктурными остатками материала погибших клеток, можно было видеть двухмембранные аутофагосомы с расположенными рядом тромбоцитами и, что характерно, большое число макрофагов (рис. 4).

Другой частой находкой в цитограммах были эндотелиальные клетки, имеющие характерное булавовидное утолщение на одном конце и вытянутое, иногда извитое, тонкое тело (рис. 5). Их появление свидетельствовало о развитии грануляционной ткани в области контакта дентальный имплантат – десна.

Таблица 1

Общая характеристика пациентов (распределение по видам имплантации; количество и вид имплантаций; данные о фоновой патологии и об осложнениях дентальной имплантации)

Вид имлантации	Количество пациентов, из них: женщин/мужчин	Количество имплантатов	Количество курящих пациентов	Случаи фоновой патологии	Случаи мукозита и периимплантита
Немедленная	28 (ж – 13, м – 15)	39	10	Гепатит С-1 ВИЧ – 1	3
Одноэтапная	47 (ж – 23, м – 24)	144	11		4
Двухэтапная	15 (ж – 8, м – 7)	40	2	Сахарный диабет – 1	1
Всего	91 (ж – 44, м – 46)	223	23	3	8

Таблица 2

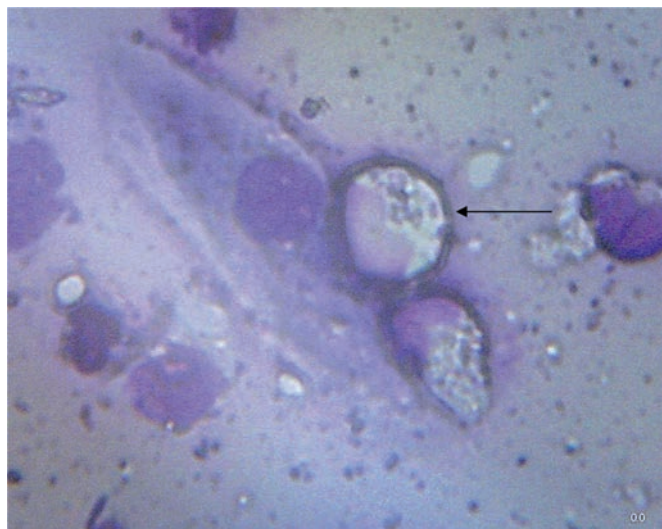
Система балльной оценки состояния тканевого комплекса

Показатели	Баллы
Патологических изменений нет	0
Отдельные клетки (1 – 2 в препарате) с проявлениями цитопатологии (аутофагия, апоптоз, кариолизис)	1
Клетки, преимущественно лейкоциты, с явлениями цитопатологии, кариолизиса, аутофагии, апоптоза + колонизация клеток микроорганизмами определяются в 3–5 полях зрения	2
Большая часть полей зрения занята лейкоцитами, отмечается микробная колонизация клеток, в препаратах наблюдаются явления аутофагии и апоптоза	3
Все поля заняты лейкоцитами, отмечается микробная колонизация клеток, явления кариолизиса в клетках, аутофагии и апоптоза: 5-10 и более полях зрения. Часто обнаруживаются эндотелиальные клетки, а также бесструктурные остатки разрушенных клеток	4

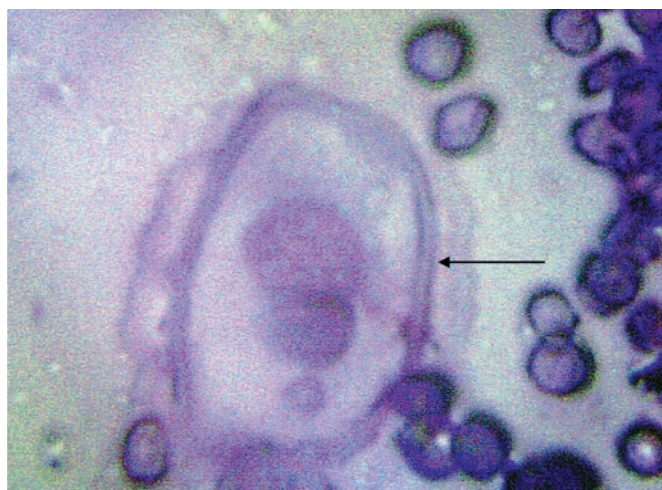
Следует отметить, что изученные цитограммы свидетельствуют о патогенной роли инфекции. Как правило, при цитопатологии наблюдались яркие картины бактериальной колонизации эпителиальных клеток. Микроорганизмы в этом случае чаще всего относились к кокковому типу. Однако изредка можно было наблюдать колонизацию клеток палочковидными бактериями (рис. 6).

Таким образом, как показывает анализ клеточного состава цитограмм, мы наблюдали большинство форм клеточной смерти и широкий набор проявлений цитопатологии, соответствующих данным литературы [8].

В стремлении объективизировать оценку данных визуальных наблюдений мы использовали полуколичественный метод оценки выраженности проявлений цитопатологии по 4-балльной системе (табл. 2), и со-



**Рис. 1.** Эпителиальная клетка и расположенные рядом нейтрофилы с аутофагосомами, имеющими хорошо различимую двухслойную мембрану (одинарная стрелка).  $\times 400$ .

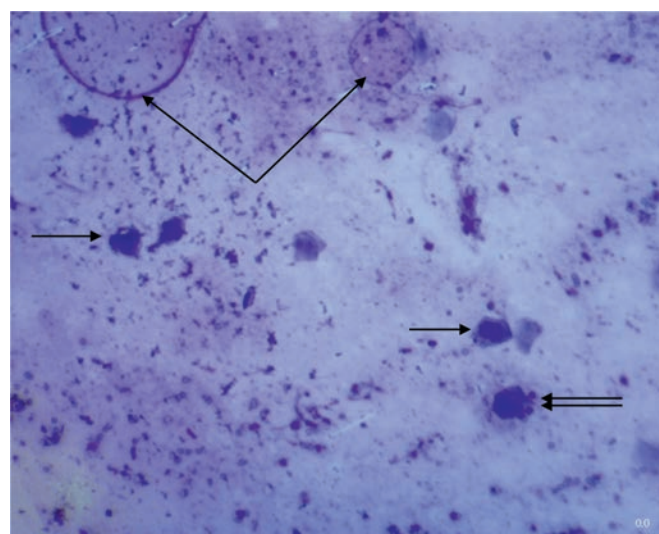


**Рис. 2.** Гигантская аутофагосома с двойной мембраной (черная стрелка) захватывает остатки (ядра) нескольких разрушающихся клеток.  $\times 1000$ .

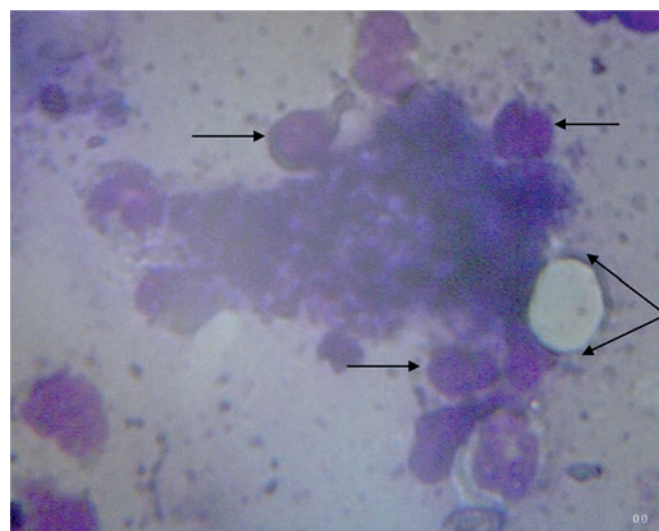
поставили полученные результаты с клиническими данными (табл. 3). Малочисленность групп не позволяет провести корректную статистическую обработку данных, однако из таблицы видно, что у пациентов с наличием патологии балльная оценка цитопатологии явно выше.

### Заключение

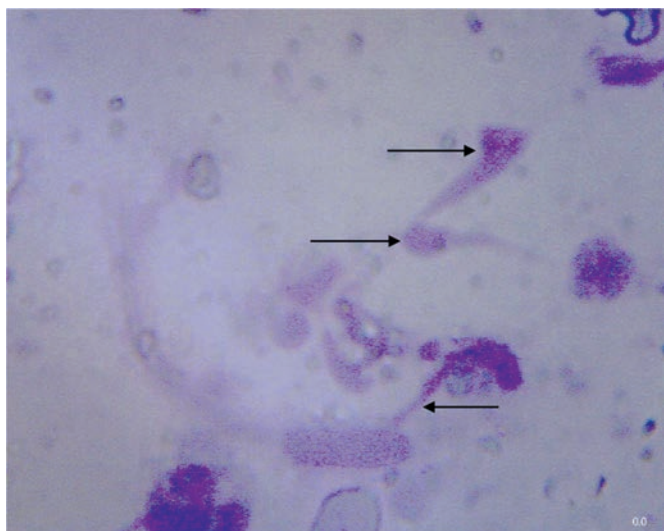
На основании анализа полученных в представленной работе данных можно заключить, что исследование морфологических характеристик клеточных элементов в цитограммах является эффективным источником информации о состоянии тканевых элементов периимплантационной зоны в целом.



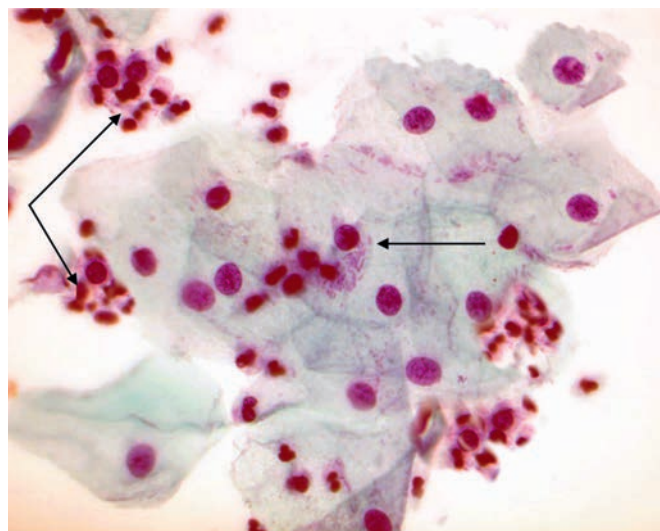
**Рис. 3.** Пациент с гепатитом С, 15 суток после немедленной имплантации. Фрагменты разрушенных клеток, апоптотные тельца (стрелки углом) и макрофаги (одинарные стрелки). На поверхности некоторых из них видны тромбоциты (сдвоенные стрелки).  $\times 100$ .



**Рис. 4.** Пациент с сахарным диабетом, 30 суток после имплантации. Тромбоциты (одинарные стрелки), аутофагосома с двуслойной мембраной (стрелки углом) у разрушенной клетки.  $\times 400$ .



**Рис. 5.** Пациент с сахарным диабетом, 30 суток. Многочисленные эндотелиальные клетки (одинарные стрелки), свидетельствующие о развитии в области имплантации грануляционной ткани. × 400.



**Рис. 6.** Пациент 25 лет, курит, проведена 1-этапная имплантация. В части плоскоэпителиальных клеток обнаруживается колонизация цитоплазмы палочковидными бактериями (одинарная стрелка). Между эпителиальными клетками видны вкрапления из комплексов макрофагов и сегментоядерных лейкоцитов (стрелки углом). × 400.

Таблица 3

Оценка состояния тканевого комплекса в области контакта дентальный имплантат – десна у пациентов разных групп

Вид имплантации	Некурящие пациенты	Курящие пациенты	Пациенты с фоновой патологией	Случаи мукозита и периимплантита у пациентов без фоновой патологии
Немедленная	n = 18 8 чел. – 0 баллов 10 чел. – 1 балл	n = 10 6 чел. – 1 балл 4 чел. – 2 балла	Пациент с гепатитом С – 4 балла	n = 3 1 чел. – 3 балла 2 чел. – 4 балла
Одноэтапная	n = 36 27 чел. – 0 баллов 9 чел. – 1 балл	n = 11 2 чел. – 0 баллов 6 чел. – 1 балл 3 чел. – 2 балла	–	n = 4 4 чел. – 4 балла
Двухэтапная	n = 13 12 чел. – 0 баллов 1 чел. – 1 балл	n = 2 2 чел. – 2 балла	Пациент с сахарным диабетом – 4 балла	1 пациент – 3 балла

### Список литературы / References

1. Faot F., Nascimento G.G., Bielemann A.M., Campão T.D., Leite F.R., Quirynen M. Can peri-implant crevicular fluid assist in the diagnosis of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2015; 86(5): 631-645. DOI: 10.1902/jop.2015.140603
2. Nazar Majeed Z., Philip K., Alabsi A.M., Pushparajan S., Swaminathan D. Identification of Gingival Crevicular Fluid Sampling, Analytical Methods, and Oral Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Dis. Markers.* 2016; 2016: 1804727. DOI: 10.1155/2016/1804727
3. Casado P.L., Canullo L., de Almeida Filardy A., Granjeiro J.M., Barboza E.P., Leite Duarte M.E. Interleukins 1β and 10 expressions in the periimplant crevicular fluid from patients with untreated periimplant disease. *Implant Dent.* 2013; 22(2): 143-150. DOI: 10.1097/ID.0b013e3182818792
4. Ghallab N.A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Arch. Oral Biol.* 2018; 87: 115-124. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.022
5. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007; 21(22): 2861-2873. DOI: 10.1101/gad.1599207
6. Mechanisms for autophagy: 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine. Available at: <https://www.sciencedaily.com/releases/2016/10/161003103237.htm> Retrieved: 07.11.2018
7. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203): 428-435. DOI: 10.1038/nature07201
8. Koh T.J., DiPietro L.A. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 2011; 13: e23. DOI: 10.1017/S1462399411001943
9. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S.,

- Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E.A., Molken- tin J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M.G., Villunger A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018; 25(3): 486-541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
10. Nighot P., Ma T. Role of autophagy in the regulation of epithelial cell junctions. *Tissue Barriers.* 2016; 4(3): e1171284. DOI: 10.1080/21688370.2016.1171284
  11. Deretic V. Autophagy in leukocytes and other cells: mechanisms, subsystem organization, selectivity, and links to innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2016; 100(5): 969-978. DOI:10.1189/jlb.4MR0216-079R
  12. Liu G., Bi Y., Wang R., Wang X. Self-eating and self-defense: autophagy controls innate immunity and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2013; 93(4): 511-519. DOI:10.1189/jlb.0812389
  13. Levine B., Mizushima N., Virgin H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011; 469 (7330): 323-335. DOI: 10.1038/nature09782
  14. Li M., Lee A., Kim K.L., Murray J., Shrinidhi A., Sung G., Park K.M., Kim K. Autophagy Caught in the Act: A Supramolecular FRET Pair Based on an Ultrastable Synthetic Host-Guest Complex Visualizes Autophago-some-Lysosome Fusion. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2018; 57(8): 2120-2125. DOI: 10.1002/anie.201711629

#### **Сведения об авторах:**

*Григорьян Алексей Суменович* — доктор медицинских наук, профессор, консультант отдела общей патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*Орлов Андрей Алексеевич* — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

*Алексей Сергеевич Рыбалко* — врач-стоматолог хирург, ортопед стоматологической клиники «Микроскопная стоматология»