

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫЕ НАРУШЕНИЯ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА У БЕЛЫХ КРЫС С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

Савкина А.А.¹, Ленгерт Е.В.¹, Ермаков А.В.¹, Смышляева И.В.¹, Попыхова Э.Б.¹, Степанова Т.В.¹, Лагутина Д.Д.¹, Иванов А.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru

Экспериментальные модели заболеваний пародонта, используемые на животных, являются важной научной основой для понимания происходящих в тканях пародонтального комплекса патологических процессов, так как данные модели позволяют воспроизводить *in vivo* структурные и функциональные нарушения, характерные для человеческого организма. Распространенной моделью пародонтита является «лигатурная» модель, вызывающая повреждение тканей десны и в дальнейшем приводящая к резорбции альвеолярной кости. Целью настоящего исследования являлось изучение морфологических и микроциркуляторных особенностей, проявляющихся в тканях пародонта у животных с экспериментальным пародонтитом. После снятия лигатуры на 2-й неделе у белых крыс с экспериментальным пародонтитом регистрируются микроциркуляторные нарушения на функциональном уровне, проявляющиеся в виде увеличения перфузионного показателя и амплитуд колебаний во всех регуляторных диапазонах, а также на морфологическом уровне, характеризующиеся сосудистыми и тканевыми реакциями. Данные изменения продолжают прогрессировать и на 3-й неделе эксперимента. Лигатурная модель пародонтита, использованная в данной работе, отражает хронический характер течения пародонтита у людей и в дальнейшем может быть использована для апробации методов лечения, направленных на коррекцию выявленных при данном заболевании нарушений.

Ключевые слова: микроциркуляция, пародонтит, лейкоцитарная инфильтрация, резорбция костной ткани, лигатурная модель.

MORPHOLOGICAL AND MICROCIRCULATOR DISORDERS OF PERIODONTAL TISSUES IN WHITE RATS WITH CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS

Savkina A.A.¹, Lengert E.V.¹, Ermakov A.V.¹, Smyshlyayeva I.V.¹, Popykhova E.B.¹, Stepanova T.V.¹, Lagutina D.D.¹, Ivanov A.N.¹

¹FGBOU VO «Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky Ministry of Health of Russia», Saratov, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru

Experimental models of periodontal diseases used in animals are an important scientific basis for understanding the pathological processes occurring in the tissues of the periodontal complex, since these models allow reproducing *in vivo* structural and functional disorders characteristic of the human body. A common model of periodontitis is the «ligature» model, which causes damage to the gum tissue and subsequently leads to resorption of the alveolar bone. The aim of this study was to study the morphological and microcirculatory features manifested in the periodontal tissues in animals with experimental periodontitis. After removing the ligature at 2 weeks in white rats with experimental periodontitis, microcirculatory disorders are recorded at the functional level, manifested as an increase in the perfusion index and oscillation amplitudes in all regulatory ranges, as well as at the morphological level, characterized by vascular and tissue reactions, these changes continue to progress to 3 week of the experiment. The ligature model of periodontitis used in this work reflects the chronic nature of the course of periodontitis in humans and can later be used to test treatment methods aimed at correcting the identified disorders in this disease.

Keywords: microcirculation, periodontitis, leukocyte infiltration, bone resorption, ligature model.

Пародонтит встречается у большого процента взрослого населения и характеризуется как воспалительное заболевание с разным уровнем агрессивности, поражающее мягкие и твердые ткани, окружающие зубы [1]. Воспалительные изменения анатомической структуры десны, резорбция прилежащей альвеолярной кости, сопровождающаяся потерей клинического

прикрепления, представляют собой основные признаки пародонтита. Кроме того, воспалительные явления при данном заболевании связаны с патологическим ангиогенезом и большим количеством новообразованных кровеносных сосудов.

Многочисленные исследования демонстрируют, что инвазия и дальнейшая жизнедеятельность патогенных микроорганизмов играют доминирующую роль в формировании пародонтита [2, 3, 4]. Распространение чужеродной микробиоты в пародонтальные структуры, выработка гистотоксических ферментов и длительная персистенция приводят к прогрессирующему нарушению микроциркуляции, усилению окислительных процессов и структурной дезорганизации клеточных мембран. Данные деструктивные процессы могут инициировать сложный каскад иммунопатологических реакций, часто проявляющихся в аутоагрессии со стороны иммунной системы.

Изучение функционирования микрососудистого русла пародонта важно, поскольку оно является конечным местом, где обеспечивается транскапиллярный обмен, определяющий метаболизм тканей пародонта.

Экспериментальные модели на животных при заболеваниях пародонта особенно важны для разработки научной основы в целях понимания патологических процессов, так как они позволяют воспроизводить *in vivo* структурные и функциональные нарушения, характерные для человеческого организма. Самая распространенная экспериментальная модель пародонтита – «лигатурная» модель. Лигатуры увеличивают удержание бляшек и вызывают повреждение эпителия десен, усиливая местное воспаление, активацию остеокластов и процесс резорбции кости.

Цель данного исследования – изучение морфологических и микроциркуляторных особенностей, проявляющихся в тканях пародонта у животных с экспериментальным пародонтитом.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводился в соответствии с принципами биоэтики, правилами надлежащей лабораторной практики и конвенциями по защите животных, используемых в экспериментах и для других научных целей (принятыми Советом Европы в 1986 г.) по приказу Минздрава РФ № 267 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Работа выполнена на 20 белых крысах-самцах массой 200–250 г, которые были разделены на две группы по 10 особей в каждой. 1-я группа – контрольная, включающая животных с интактным пародонтом; 2-я группа – сравнения, состоящая из крыс с экспериментальной моделью пародонтита (5 недель). За 10 мин до манипуляции животных

анестезировали путем внутримышечного введения Телазола (ZoetisInc., Испания) из расчета 0,1 мл/кг и Ксиланита (ООО «Нита-Фарм», Россия) в дозе 1 мг/кг веса животного.

При моделировании пародонтита у крыс группы сравнения использовали модификацию лигатурного метода A. Ionel et al. – вшивание полифиламентной нерассасывающейся нити в ткани десны в области центральных резцов нижней челюсти. На 14-е сутки после вшивания лигатуру удаляли.

Мониторинг параметров перфузии десен проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) на анализаторе ЛАКК-ОП (НПП «Лазма», Россия). Для проведения измерений датчик ЛАКК помещали в область десны в точке, расположенной между двумя передними резцами нижней челюсти с вестибулярной стороны. Регистрация перфузии десен длилась 8 мин. При выполнении работы оценивали перфузионный показатель, нормированные амплитуды колебаний перфузии в основных регуляторных частотных диапазонах, включая эндотелиальный, нейрогенный, миогенный, дыхательный и сердечный. Расчет амплитуд колебаний перфузии в указанных диапазонах реализован посредством вейвлет-анализа, нормированные значения определяли как соотношение абсолютной величины амплитуды осцилляций к утроенному среднеквадратическому отклонению перфузии.

Животных сравнительной группы выводили из эксперимента передозировкой препаратов для наркоза на 5-й неделе после наложения лигатуры. Нижняя челюсть забиралась и фиксировалась в 10%-м формалине для гистологического исследования. Комплекс тканей подвергался деминерализации электролитным декальцинирующим раствором («ЭргоПродакшн», Россия) в течение суток. После этого для изготовления препаратов вырезали участок, содержащий ткани поддерживающего аппарата центральных резцов. Комплекс тканей разделялся на 2 части посередине между центральными резцами, которые использовались для изготовления горизонтальных и сагиттальных срезов соответственно. Ткани подвергали спиртовой проводке, после чего заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм, изготовленные с помощью полуавтоматического микротомы RMD 3000 («MtPoint», Россия – Австралия), окрашивали гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Для просветления срезов использовали Bio-Clear («BioOptica», Италия), а для заключения препаратов под покровное стекло применяли Bio-Monht («BioOptica», Италия).

Микроскопию препаратов данной области выполняли с помощью микровизора проходящего света серии μ Vizo-103 (ООО «ЛОМО ФОТОНИКА», Россия). При микроскопии сагиттальных срезов оценивали выраженность воспалительных изменений в деснах, для чего в 5 полях зрения при увеличении объектива 63x производился подсчет клеточных элементов,

включая лейкоциты, в соединительной ткани собственной пластинки слизистой свободной и прикрепленной части десен в области резца.

При микроскопии препаратов горизонтальных срезов оценивали выраженность деструктивных изменений поддерживающего аппарата зуба. Для этого проводили оценку клеточного состава круговой связки зуба и состояния ее сосудов, а также выраженности резорбции костной ткани. Для оценки клеточного состава круговой связки зуба проводили подсчет клеточных элементов в 5 полях зрения при увеличении объектива 63х. При оценке изменений круговой связки зуба также учитывали направление и ход ее волокон. Для оценки выраженности сосудистых нарушений проводили определение соотношения максимального диаметра периваскулярного пространства к максимальному диаметру сосуда. Кроме того, выполняли качественную оценку агрегатного состояния крови в сосудах круговой связки зуба. При оценке резорбции костной ткани проводили качественную оценку состояния альвеолярной кости, а также количественный подсчет клеточности костной ткани при увеличении объектива 40х.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных производили с помощью программы «Statistica 10» (StatSoft, США). Выполняли проверку нормальности распределения полученных данных с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Большинство полученных данных не соответствуют закону нормального распределения. В связи с этим сравнение экспериментальных значений проводилось с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

После снятия лигатуры на 2-й неделе у белых крыс с экспериментальным пародонтизом по сравнению с животными с интактным пародонтом происходило статистически значимое увеличение перфузионного показателя в 1,2 раза. При этом выявлены изменения со стороны активных факторов контроля микроциркуляции, а именно со стороны миогенных колебаний, проявляющиеся статистически значимым увеличением их амплитуд, что указывает на снижение периферического сопротивления сосудов и повышение интенсивности нутритивного кровотока. Кроме того, отмечалось увеличение амплитуд пассивных колебаний кровотока, как дыхательных, указывающих на застойные явления в микроциркуляторном русле, так и сердечных, которые в совокупности с повышением перфузионного показателя отражали развитие смешанной гиперемии десен (рис. 1). Полученные в ходе эксперимента данные согласуются с ранее опубликованными результатами исследования [5], демонстрирующими на 2-й неделе после наложения лигатуры наличие воспалительного процесса в области фронтальных зубов нижней челюсти у белых крыс.

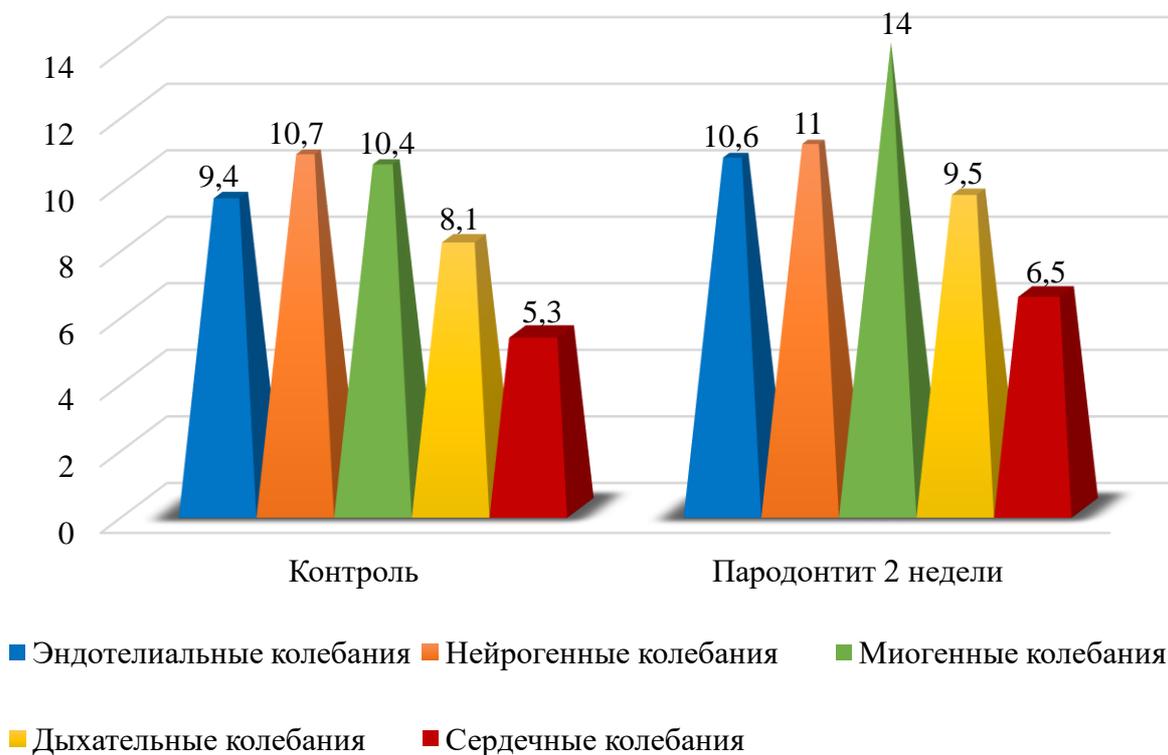


Рис. 1. Изменения параметров микроциркуляции десны у крыс с экспериментальным пародонтитом (2 недели)

На 3-й неделе эксперимента после наложения лигатуры происходило дальнейшее увеличение перфузионного показателя. Показатель перфузии десен у крыс группы сравнения на 37,3% превышал среднюю величину интактного контроля. При этом перфузия значимо превышала значения, зарегистрированные у крыс на 2-й неделе эксперимента. Расстройства модуляция микрокровотока на 3-й неделе были более выражены, чем на 2-й неделе, и проявлялись статистически значимым увеличением амплитуд во всех регуляторных диапазонах (рис. 2). При этом у крыс на 3-й неделе эксперимента достоверно увеличивался вклад амплитуд эндотелиальных и нейрогенных компонентов по сравнению со 2-й неделей эксперимента, что является индикатором снижения сопротивления сосудов.

Таким образом, у крыс группы сравнения при наложении лигатуры происходит развитие воспалительных изменений кровотока десен, которые регистрируются на 2-й неделе эксперимента и усиливаются к 3-й, что свидетельствует о хроническом характере альтерации микроциркуляции пародонта.

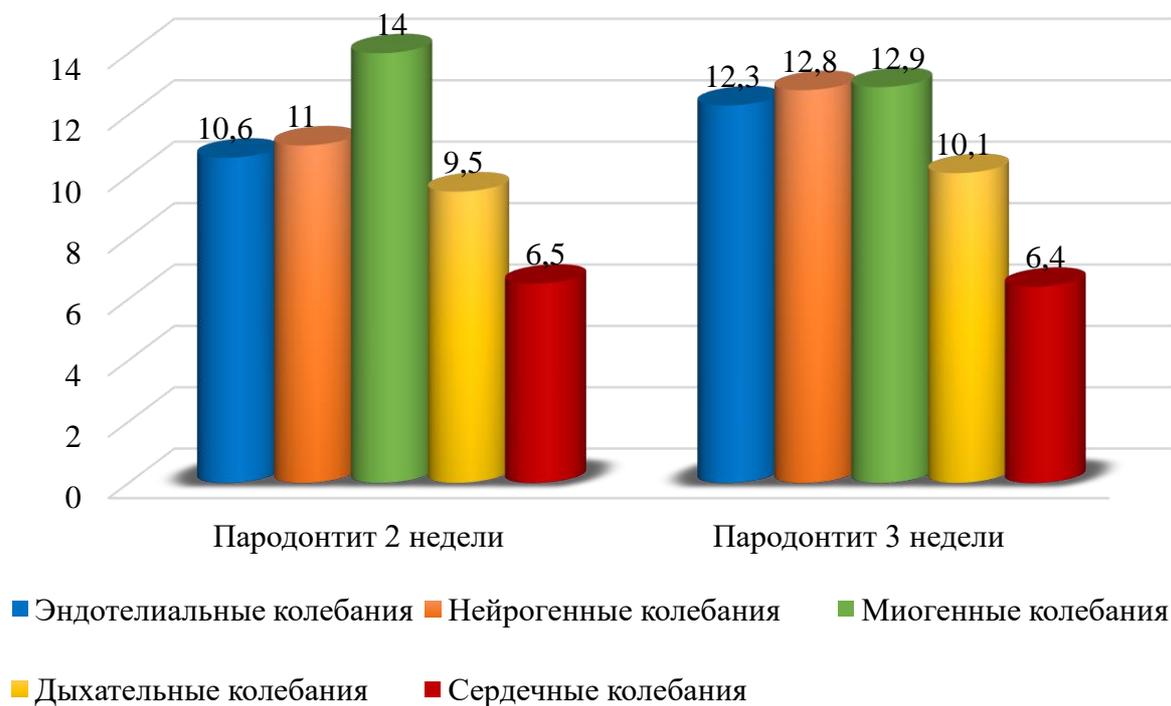


Рис. 2. Изменения параметров микроциркуляции десны у крыс с экспериментальным пародонтитом на 3 неделе по сравнению со 2-й неделей

Гистологический анализ препаратов сагиттального среза у животных сравнительной группы показал, что на 5-й неделе после наложения лигатуры в собственной пластинке десны отмечаются неравномерное кровенаполнение сосудов с преимущественным полнокровием мелких венул, а также отек соединительной ткани. Соединительная ткань собственной пластинки десен инфильтрирована лейкоцитами, преимущественно нейтрофилами и лимфоцитами.

При морфологическом исследовании препаратов поперечного среза отмечаются разволокнение собственной связки зуба, нарушение хода волокон за счет интерстициального отека. Отношение максимальной длины оси периваскулярного пространства к максимальному диаметру сосуда собственной связки зуба у крыс группы сравнения значительно увеличивается, что отражает развитие выраженных периваскулярных отеков. В отдельных сосудах наблюдаются признаки нарушения агрегатного состояния крови – сладж-сепарация крови. Среди клеточных элементов преобладают фибробласты, а число фиброцитов значительно снижается по сравнению с контролем (на 61,5%), что отражает воспалительную активацию и пролиферацию фибробластических элементов.

В костной ткани альвеолы отмечается снижение числа остеоцитов в поле зрения на 19,5%, что обусловлено выраженной лакунарной резорбцией с врастанием соединительной ткани.

Таким образом, на 5-й неделе после наложения лигатуры у крыс группы сравнения отмечаются выраженные воспалительные изменения, характеризующиеся сосудистыми и тканевыми реакциями. Сосудистые реакции проявляются внутрисосудистыми, сосудистыми и внесосудистыми нарушениями. Внутрисосудистые нарушения кровотока в форме сгущения крови в большей степени выражены в сосудах круговой связки зуба. Сосудистые нарушения в форме неравномерного кровенаполнения, свидетельствующего об изменении тонуса сосудистой стенки, наиболее выражены в собственной пластинке слизистой оболочки. Повышение проницаемости сосудистой стенки с формированием отеков как основного признака внесосудистых нарушений отмечаются как в собственной пластинке слизистой, так и в круговой связке зуба. Клеточные воспалительные реакции в форме лейкоцитарной инфильтрации в большей степени характерны для соединительной ткани слизистой десны. В круговой связке и костной ткани альвеолы клеточные реакции проявляются воспалительной активацией и пролиферацией фибробластических элементов. Разрастание соединительной ткани сопровождается резорбцией костной ткани в альвеолярной кости, что характеризует выраженную деструкцию пародонтального комплекса.

Ранее было показано, что морфологическая картина срезов тканей десны у крыс с экспериментальным пародонтитом свидетельствует о развитии значительных дегенеративно-воспалительных изменений, которые проявляются в виде обширной лейкоцитарной инфильтрации и интерстициального отека собственной пластинки десны, а также деструкцией костной ткани альвеолярного отростка нижней челюсти [6]. Вместе с этим полученные нами результаты демонстрируют, что данные изменения не только сохраняются после снятия лигатуры, но и продолжают прогрессировать. Кроме того, указанные изменения сопровождаются выраженными морфологическими признаками нарушений кровотока: сосудистыми, внутри- и внесосудистыми.

Заключение

Полученные данные позволяют заключить, что после наложения лигатуры у крыс на 2-й неделе возникают воспалительные изменения, характерные для пародонтита, на 3-й неделе они продолжают прогрессировать, микроциркуляторные нарушения регистрируются как на функциональном, так и на морфологическом уровне. Лигатурная модель пародонтита, использованная в данной работе, отражает хронический характер течения пародонтита у людей и в дальнейшем может быть использована для апробации методов лечения, направленных на коррекцию выявленных нарушений при данном заболевании.

Список литературы

1. Nazir M.A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J. Health Sci (Qassim)*. 2017. vol. 11. no. 2. P. 72-80.
2. Benachinmardi K.K., Nagamoti J., Kothiwale S., Metgud S.C. Microbial flora in chronic periodontitis: study at a tertiary health care center from north karnataka. *J. Lab Physicians*. 2015. vol. 7. no. 1. P. 49-54.
3. How K.Y., Song K.P., Chan K.G. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*. 2016. vol. 7. P. 53.
4. Mira A., Simon-Soro A., Curtis M.A. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J. Clin Periodontol*. 2017. vol. 44. P. 23–38.
5. Ionel A., Lucaciu O., Moga M., Buhatel D., Ilea A., Tabaran F., Catoi C., Berce C., Toader S., Campian R.S. Periodontal disease induced in Wistar rats - experimental study. *Hum. Vet. Med*. 2015. vol. 7. no. 2. P. 90–95.
6. Ionel A., Lucaciu O., Tabaran F., Berce C., Toader S., Hurubeanu L., Bondor C., Campian R.S. Histopathological and clinical expression of periodontal disease related to the systemic inflammatory response. *Histology and Histopathology*. 2016. vol. 32. no. 4. P. 11803.