

УДК 599.323.45 + 591.431.4]-092:57.042
DOI: 10.26435/UC.V014(29).208

В.В. Глинкин, И.В. Василенко, Т.О. Зайка

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ЗУБА КРЫСЫ КАК РЕЗУЛЬТАТ СТРЕССА ОРГАНИЗМА

В последнее время все больше ученых склонны считать, что не последнее место в возникновении кариеса играет стресс. При этом особое внимание необходимо уделить определенному стрессу, а именно дистрессу, оказывающему отрицательное воздействие на весь организм в целом и в частности на состояние твердых тканей зуба [1]. Изучая вопросы возникновения кариеса, В.Р. Окушко выдвинул две гипотезы. Первая: пульпа осуществляет регуляторные воздействия на эмаль, являясь передаточным и исполнительным звеном в большом регуляторном контуре, замыкающемся на уровне целостного организма. Вторая: пульпа сама является центром, в котором замыкается малый регуляторный контур, принадлежащий зубу как относительно автономной саморегулирующейся системе [7]. Возникает вопрос, какие процессы происходят в зубе в результате стресса, и какую роль при этом играет пульпа? Ответ на этот вопрос врачу позволит более тщательно провести диагностику и спрогнозировать вероятность возникновения и течение патологического процесса.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить морфологические особенности процессов, протекающих в зубе в результате воздействия на организм крысы стрессовых факторов, церебропротекторов и антидепрессантов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании было использовано 6 крыс – контрольная группа получали физиологический раствор, 6 – получали R-86 с имипрамином по 5 мг/кг и вызвали стресс, 6 – вызывали воспаление и получали R-86 с имипрамином по 5 мг/кг. Всего 18 животных.

Уровень депрессивности крыс оценивали путем регистрации параметров показателей плавательного теста Порсолта (ПТП) [11]. Крыс помещали в плексигласовый цилиндр диаметром 46 см и высотой 45 см заполненный водой (температура 23-25оС) до уровня 30 см от дна. В пер-

вый день продолжительность плавания – 15 мин (претест); через 24 часа крыс помещали в воду на 6 мин и регистрировали основные параметры поведения с помощью видеосъемки и хранили их в виде отдельного файла. Поведение иммобилизации характеризовалось вертикальным расположением крыс, отсутствием движений, передние лапы прижаты к груди, задние лапы вытянуты, голова держалась над водой. Чем больше продолжительность иммобилизации, тем выше уровень депрессивности животных.

Самцы 1 группы получали имипрамин 5 мг/кг и R-86 (спиро-[индол-3,1'-пиррол[3,4-спиррола]) 5 мг/кг внутривентриально. Депрессивный синдром моделировали по методу SunP. [13]. Для этого крыс ежедневно на протяжении пяти дней подвергали воздействию плавательного стресса, помещая животных в воду на протяжении 10 мин после определения исходных показателей ПТП. Через 24 часа, 10 и 20 суток после последнего сеанса плавания определяли время иммобилизации. R-86 и имипрамин вводили внутривентриально в дозе 5 мг/кг один раз в сутки, начиная с первого дня после прекращения пятидневной стрессогенной процедуры. Контрольным животным вводили равный объем растворителя (0,9% раствор NaCl). У контрольных и опытных животных через 24 часа и на 10-й и 20-й дни после прекращения стрессогенной процедуры регистрировали изменения параметров ПТП и предпочтения потребления раствора сахарозы. Каждая серия поведенческих исследований выполнена на 6 крысах.

У самцов 2 группы для моделирования депрессии было вызвано хроническое асептическое воспаление путем подкожного введения крысе в мягкие ткани спины флавогена (0,5 мл 9% раствора уксусной кислоты) с одновременным внутривентриальным введением реополи-

глюкина (300 мг/кг) [8]. Уже на 1-е сутки в месте инъекции кислоты развивалась воспалительная реакция, а очаги некроза образовывались к концу 3 суток. Никаких препаратов животное не принимало.

Для морфологического исследования использовали биоптат центрального резца трупа самца белой беспородной крысы 7-8 месяцев, весом 200-250 г, полученный в результате хирургического удаления зуба у трупа крысы.

Материал фиксировали в 10% растворе формалина. Время фиксации 24 часа при комнатной температуре. После этого приступали к декальцинации 10% азотной кислотой на протяжении 4-6 суток, меняя декальцинирующую жидкость каждые сутки. После окончания декальцинации объекты тщательно промывали в проточной воде и проводили обезвоживание при комнатной температуре в спиртах возрастающей концентрации: 1 проведение – 70% спирт, 2-е – 80%, 3-5-е – 96%. На каждое проведение уходило сутки. Обезвоживание в спиртах имеет целью подготовить ткани к пропитыванию парафином. Это обезвоживание носило предварительный характер и обезвоженные спиртом зубы подвергали дополнительной обработке, помещая в среду, которая способна смешиваться со спиртом и является хорошим растворителем парафина. Для этих целей использовалась промежуточная среда хлороформ. Исследуемый материал трижды помещали в хлороформ по 45 минут. Хлороформ меняли во избежание излишнего насыщения его спиртом и жирами. Это делали с целью более легкого пропитывания объекта исследования парафином. После этого готовляли смесь из хлороформа и предварительно растопленного парафина (50/50) в термостате при температуре 37°C в течение 30-40 мин. За-

ливку объекта в формочку с паропластом проводили в термостате при температуре 62°C 2 раза по 45 мин. После заливки объект остывал в воде. Из застывшего парафина вырезали блоки соответственно заключенным объектам. Срезы из полученного материала нарезали на микротоме МПС-2 толщиной 4-5 мкм и натягивали на стекла. Сушили 12 часов при температуре 37°C. Высушенным срезам проводили депарафинизацию, затем окрашивали гематоксилином и эозином. После этого заключали срезы [6]. Материал изучали с помощью светового микроскопа OlympusBX-40.

Исследования проводились с согласия комиссии по биоэтике ГОУ ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО от 15.11.2016 г. № 43/16 Министерства Здравоохранения ДНР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования на белых беспородных крысах показали, что различные формы стресса и их сочетания вызывают изменения не только в различных органах, но и в зубочелюстной системе. В частности, исследуя центральные резцы крыс, нами было установлено, что в пульпе внешне не измененных зубов наблюдалось пролиферативное воспаление с разрастанием волокнистой соединительной ткани, близкой к рубцовой (рис. 1.). Пролиферация фибробластов.

Разрастание волокнистой соединительной ткани преобладало в центральной части пульпы, а по периферии пульповой камеры наблюдали клеточный инфильтрат, внедряющийся местами в плотные ткани зуба – дентинные каналы. Есть участки грануляционной ткани. Клеточный инфильтрат в пульпе представлен в основном лимфоцитами, реже плазмоцитами,

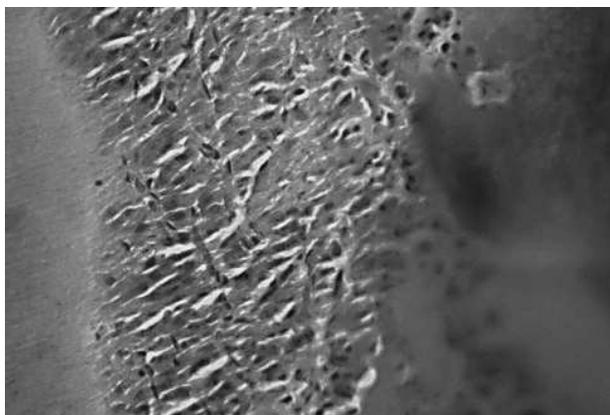


Рис. 1. Пролiferативное воспаление в пульпе зуба с размножением фибробластов. Окраска гематоксилином и эозином, ×400.

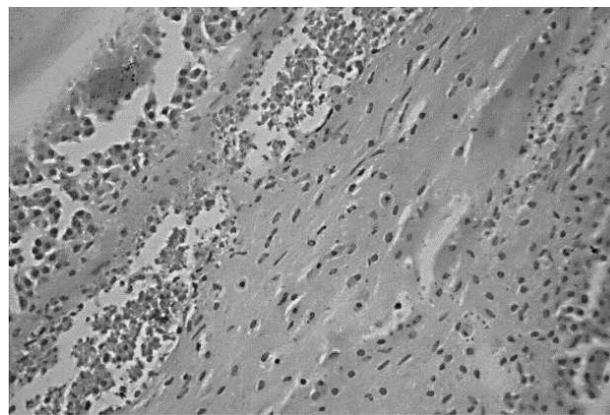


Рис. 2. Хронический фиброзный пульпит в стадии обострения: на границе между пульпой и дентином полиморфноклеточный инфильтрат. Некроз. Окраска гематоксилином и эозином, ×400.

единичными сегментоядерными клетками – нейтрофилами. Одноядерный экссудат. Клетки расположены пристеночно по границе пульповой камеры (рис. 2.). На границе между пульпой и дентином безъядерные клетки. Некроз. Выраженная пролиферация одонтобластов. Воспалительная гиперемия сосудов (рис. 3.). Дентинные канальцы не визуализированы.

Периодонт был либо без патологических изменений, представлен волокнистой соединительной тканью с фибробластами, коллагеновыми волокнами, либо же в тканях периодонта наблюдали хроническое воспаление с разрастанием молодой и созревающей грануляционной ткани с малым количеством клеток воспалительного инфильтрата. Видны фибробласты. Периодонтальная щель местами расширена. Эти явления морфологически свидетельствовали о хроническом фиброзном пульпите.

Анализируя полученные данные мы обратили внимание на пролиферацию фибробластов. Фибробласты секретируют не только предшественники коллагена и эластина, но и мукополисахариды – сложные биополимеры, являющиеся углеводной частью протеогликанов, образующих соединительнотканый матрикс. Покрывая поверхность клеток, протеогликаны играют важную роль в ионном обмене, дифференцировке тканей, иммунных реакциях. Углеводной частью протеогликанов являются гликозаминогликаны, связанные с белком в молекулах протеогликанов. Одним из типов гликозаминогликанов являются гиалуроновые кислоты – несulfированные гликозаминогликаны, содержащиеся во многих биологических жидкостях, в частности в слюне. Гиалуроновая кислота принимает участие в пролиферации и миграции клеток, продуцируется некоторыми бактериями, в том числе стрептококками, участвует во взаимодействии с поверхностными рецепторами клеток [12]. Сегодня уже поднимается вопрос о возможной вакцинации против зубного кариеса, основанной на связанных с вирулентом иммуномодулирующих внеклеточных белках, продуцируемых кариесогенными бактериями *S. sobrinus*, *S. mutans*. Поверхностные рецепторы, при определенных условиях, специфично реагируют изменением своей пространственной конфигурации на присоединение к ней молекулы определённого химического вещества, передающего внешний регуляторный сигнал и, в свою очередь, передают этот сигнал внутрь клетки или клеточной органеллы нередко при помощи так называемых вторичных посредников или трансмембранных ионных токов. Мембранные рецепторы в свою очередь связаны с системами внутриклеточных посредников и из-

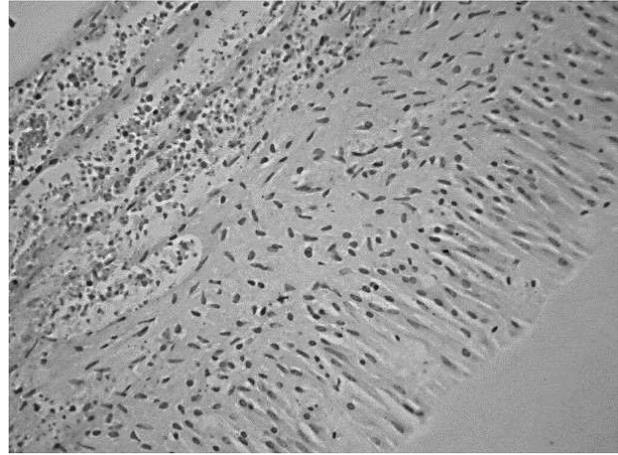


Рис. 3. Хронический фиброзный пульпит. В пульпе сосуды расширены. Волокнистая соединительная ткань. Выраженная пролиферация одонтобластов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$.

менения их конформации приводят к запуску цепного каскада биохимических реакций, изменяющих функциональное состояние клетки.

Плазмоциты – это основные клетки, продуцирующие антитела, участвуют в гуморальном иммунном ответе. В плазмоцитах содержатся хемокиновые рецепторы, являющиеся ключевыми аминокислотами, определяющими трехмерную структуру белка. Одной из основных функций хемокинов является контроль клеточной миграции. Имея 4 цистеина, образующих 2 внутримолекулярные дисульфидные связи хемокины участвуют в пространственной модификации белков. А поскольку зуб является живым организмом, то процесс минерализации в нем может протекать только на белковой матрице, функцию которой выполняет кальций-связывающий белок, фиксированный на волокнах амелогенинов, которые ориентируют ход кристаллизации, обеспечивая упорядоченность и равномерность структуры эмали и последовательность ее формирования [10]. И это нас возвращает к теориям А.Э. Шарпенака, Шатца и Мартина. В основу своей теории А.Э. Шарпенак положил обеднение эмали белками в результате их ускоренного распада и замедления ресинтеза, что действительно приводит к возникновению кариеса. Замедление ресинтеза обусловлено отсутствием или низким содержанием некоторых аминокислот, а усиление протеолиза может являться следствием стресса. Шатц и Мартин считали, что минеральные и органические компоненты эмали находятся в тесной биохимической связи, которая может быть нарушена в результате проникновения в эмаль различных химических агентов, в частности протеолитических ферментов.

В клеточном инфильтрате содержались единичные нейтрофилы. Их основная задача – противомикробная защита, выполняется с помощью хемотаксиса (мобилизации и миграции), фагоцитоза микроорганизмов и внутриклеточного уничтожения и переваривания. В ходе стресса происходит подавление нейтрофилопоэза, в организме ощущается дефицит нейтрофилов. Вследствие этого, воспалительный процесс в условиях стресса может приобретать затяжной характер, что также является одним из механизмов снижения резистентности организма [2]. Собственно, это мы и наблюдали в пульпе. Воспалительный процесс носил хронический характер. А если учесть, что и с основной задачей, ввиду малого количества, эти клетки будут плохо справляться, то повышается вероятность активизации микроорганизмов биопленки зуба и запуском механизмов иммунного ответа.

Наибольшее число в клеточном инфильтрате составили лимфоциты – основные клеточные элементы иммунной системы. В- и Т-лимфоциты являются истинными иммунокомпетентными клетками. В-лимфоциты созревают в плазматические клетки, вырабатывающие антитела, т.е. участвуют в гуморальном и клеточном иммунитете [9]. Большое количество лимфоцитов свидетельствует о развивающемся в условиях стресса лимфоцитозе, что, вероятно, означает выброс в кровь тимусных и костномозговых лимфоцитов, которые должны заселить Т- и В-зоны в периферических лимфоидных органах [5]. Антигензависимый этап лимфопоэза в условиях стресса, наоборот, угнетается, о чем свидетельствует инволюция белой пульпы селезенки. Дисбаланс между антигеннезависимой и антигензависимой пролиферацией и дифференци-

ровкой лимфоцитов при стрессе приводит к нарушению иммунных реакций [3].

Нами был обнаружен по периферии пульповой камеры клеточный инфильтрат, внедряющийся местами в плотные ткани зуба. По имеющимся данным при кариесе в дентинные каналы проникают лимфоциты и одонтобласты, отростки дендритных макрофагов, являющиеся антигенпрезентирующими элементами при развитии в пульпе зуба иммунной реакции. Кроме того, мы наблюдали выраженную пролиферацию одонтобластов. Учеными была выдвинута гипотеза, относящая кариес к аутоиммунным заболеваниям. Возможно, что источником первичной сенсибилизации являются вторичные, приобретенные аутоантигены, возникающие в фиссурных зонах зубов под воздействием определенных физико-химических или инфекционных факторов [4]. Суть этого явления заключается в том, что это происходит не повсеместно, а в отдельно взятом небольшом участке. Это наводит на мысль, что именно в этом участке впоследствии развивается кариозное поражение. И начинается оно не снаружи зуба, а с изменений в клеточной структуре тканей пульпы (что схематично можно изобразить: пульпа → дентин → эмаль), предположительно на ионном уровне. И включение местной иммунной системы в развитие патологического процесса может происходить только посредством влияния пульпы зуба на дентин и эмаль.

Выводы

В результате воздействия различных видов стресса на организм крысы патоморфологические изменения происходят в тканях зуба, в частности в пульпе зуба и носят пролиферативно-дистрофический характер.

В.В. Глинкин, Василенко И.В., Зайка Т.О.

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ЗУБА КРЫСЫ КАК РЕЗУЛЬТАТ СТРЕССА ОРГАНИЗМА

В статье представлены данные патоморфологических исследований зубов крыс, подвергавшихся различным формам стресса, в результате которых произошли изменения в зубочелюстной системе, в частности в зубе и периодонте. Исследуя центральные резцы крыс, нами было установлено, что в пульпе внешне не измененных зубов наблюдалось пролифератив-

ное воспаление с разрастанием волокнистой соединительной ткани, близкой к рубцовой, пролиферация фибробластов и одонтобластов. Изменения, происходящие в тканях зуба, в частности в пульпе, носят пролиферативно-дистрофический характер.

Ключевые слова: стресс, пульпа зуба, морфологические изменения.

V.V. Glinkin, Vasilenko IV, Zayka TO

SEI HPE «M. Gorky Donetsk National Medical University», Donetsk

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN A RAT'S TOOTH TISSUES AS A RESULT OF BODY STRESS

The article presents data of pathomorphological studies of rats' teeth subjected to various forms of stress, as a result of which changes occurred in the dentoalveolar system, in particular in the tooth and periodontium. Investigating rats' incisors, we found that in the pulp of apparently unchanged teeth, proliferative inflammation

was observed with proliferation of fibrous connective tissue, close to scarring, proliferation of fibroblasts and odontoblasts. Changes occurring in the tissues of the tooth, particular in the pulp, are proliferative-dystrophic in nature.

Key words: stress, dental pulp, morphological changes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болячин А. Стресс и... кариес. Совершенство. 2016; 1: 58.
2. Васильева Л.С. Закономерности развития и пути коррекции воспалительного процесса при стрессе и активации стресс-лимитирующих систем организма: автореф. дис. ...доктор мед. наук. Иркутск; 1995. 32.
3. Громыхина Н.Ю., Повещенко А.Ф. Влияние простагландина E2 на гемопоэтические клетки костного мозга и селезенки. Гематология и транс-физиология. 1986; 11: 34-37.
4. Костиленко Ю.П., Бойко И.В. Структура эмали и проблема кариеса. Полтава; 2007. 56.
5. Макарова, О. А. Стресс-индуцированные нарушения в системе крови и их коррекция медиаторами и метаболитами стресс-лимитирующих систем: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск; 2003. 21.
6. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. Л.: Медицина; 1969. 423.
7. Окушко В.Р. Клиническая физиология эмали зуба. К.: Здоров'я; 1984. 64.
8. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. Нестероидные противовоспалительные средства. Киев: Здоров'я; 1975. 440.
9. Царев ВН., ред. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта: Учебник. Москва : ГЭОТАР-Медиа; 2013. 576.
10. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия: Учебное руководство. М.: Мед. лит.; 2010. 603.
11. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioural despair in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. Eur J Pharmacol. 1978; 51 (3): 291-294.
12. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. Eur. J. Cell. Biol. 2004; 83 (7): 317-325.
13. Sun P., Wang F., Wang L., Zhang Y., Yamamoto R., Sugai T. et al. Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. J. Neurosci. 2011; 31 (45): 16464-16472.

REFERENCES

1. Bolyachin A. Stress i... karies [Stress and ... caries]. Sovershenstvo. 2016; 1: 58 (in Russian).
2. Vasileva L.S. Zakonomernosti razvitiya i puti korrektsii vospalitelnogo protsessa pri stresse i aktivatsii stress-limitiruyuschih sistem organizma [Regularities of development and way of correction of inflammatory process at a stress and activation a stress – the limiting systems of an organism]: avtoref. dis. ...doktor med. nauk. Irkutsk; 1995. 32 (in Russian).
3. Gromyihina N.Yu., Poveschenko A.F. Vliyanie prostaglandina E2 na gemopoeticheskie kletki kostnogo mozga i selezenki [Influence of E2 prostaglandin on haemo poetic cells of marrow and spleen]. Gematologiya i trans-fuziologiya. 1986; 11: 34-37 (in Russian).
4. Kostilenko Yu.P., Boyko I.V. Struktura emali i problema kariesa [Structure of enamel and problem of caries]. Poltava; 2007. 56 (in Russian).
5. Makarova, O. A. Stress-indutsirovannyye narusheniya v sisteme krovi i ih korrektsiya mediatorami i metabolitami stress-limitiruyuschih sistem [The stress-induced violations in the system of blood and their correction by mediators and metabolites a stress – the limiting systems]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Irkutsk; 2003. 21 (in Russian).
6. Merkulov G.A. Kurs patologicheskoy tehniki [Course of the pathological equipment]. L.: Meditsina; 1969. 423 (in Russian).
7. Okushko V.R. Klinicheskaya fiziologiya emali zuba [Clinical physiology of enamel of tooth]. K.: Zdorov'ya; 1984. 64 (in Russian).
8. Trinus F.P., Mohort N.A., Klebanov B.M. Nesteroidnyie protivovospalitelnyie sredstva [Non-steroidal anti-inflammatory drug]. Kiev: Zdorov'ya; 1975. 440 (in Russian).
9. Tsarev VN., red. Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya polosti rta [Microbiology, virology and immunology of an oral cavity]: Uchebnik. Moskva : GEOTAR-Media; 2013. 576 (in Russian).
10. Chirkin A.A., Danchenko E.O. Biohimiya: Uchebnoe rukovodstvo [Biochemistry: Manual]. M.: Med. lit.; 2010. 603 (in Russian).
11. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioural despair in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. Eur J Pharmacol. 1978; 51 (3): 291-294.
12. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. Eur. J. Cell. Biol. 2004; 83 (7): 317-325.
13. Sun P., Wang F., Wang L., Zhang Y., Yamamoto R., Sugai T. et al. Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. J. Neurosci. 2011; 31 (45): 16464-16472.