

Метод моделирования экспериментального периодонтита у животных

Белорусский государственный медицинский университет¹

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»²

Разработана экспериментальная модель периодонтита у крыс, наиболее соответствующая изменениям периодонта при хронических формах периодонтита у людей.

Ключевые слова: болезни периодонта, клинические и морфологические исследования на животных.

Повышение эффективности ранней диагностики и лечения болезней периодонтита является одной из актуальных задач современной стоматологии. Болезни периодонта являются одной из наиболее важных проблем современной стоматологии. По данным экспертов ВОЗ (1990) - у лиц в возрасте от 35 до 44 лет уровень болезней периодонта составляет от 65 до 98%, а в возрасте 13 – 19 лет - от 55 до 95%. В Республике Беларусь болезни периодонта выявлены у 92,5 % в возрасте 35-44 года. Полиэтиологичность болезней периодонта породило большое количество методов комплексного лечения с учетом звеньев патогенеза [2].

Анализ литературы показал, что расстройство микроциркуляции занимает одно из ведущих мест в патогенезе воспалительных болезней периодонтита, которое регистрируется еще на доклиническом этапе. Учитывая, что система микроциркуляции является основным звеном, обеспечивающим метаболический гомеостаз в органах и тканях, в последнее время при изучении патогенеза периодонтита всё больше внимания уделяют состоянию сосудов микроциркуляторного русла, которые обеспечивают тканей периодонта. Основным в развитии микроциркуляторных нарушений является расстройство капиллярного кровотока, обычно начинающееся со снижения его интенсивности, и заканчивающееся развитием капиллярного стаза микроциркуляторного русла. В

связи с этим, всестороннее изучение кровоснабжения тканей периодонта приобретает важное значение [1, 3, 5].

Обоснования и поиск новых эффективных способов диагностики, терапии и профилактики болезней периодонтита представляется весьма актуальной задачей современной стоматологии [6-8].

Цель исследования – разработать экспериментальную модель периодонтита у крыс, наиболее соответствующую изменениям периодонта при хроническом периодонтите у людей.

Материал и методы. Эксперименты проведены на рандомбредных белых крысах обоего пола, содержащихся в стационарных условиях вивария БелМАПО на полноценном стандартном пищевом рационе согласно установленным нормам (табл. 1). Для питья животных использовались автопоилки. Кормление производилось в фиксированное время. В аналогичных условиях содержались животные контрольной группы.

Таблица 1.

Лабораторные животные, используемые в эксперименте и условия их содержания

| | |
|------------------------------|---|
| Вид | Крысы |
| Линия | Рандомбредные |
| Пол | Самцы и самки |
| Масса тела | 213-247 г |
| Количество в группе | 10 |
| Источник получения | Питомник вивария Бел МАПО |
| Период акклиматизации | 2 недели |
| Индивидуальная идентификация | Окраска различных участков шерстного покрова спиртовым раствором пикриновой кислоты |
| Метод деления | Рандомизированный отбор (основной признак - масса |

| | |
|------------------------------|---|
| на группы | животных) |
| Количество животных в клетке | 5 |
| Размеры клетки | 52x30x24 см |
| Материал клетки | Пластик с проволочной крышкой |
| Основной рацион | Зерно, овощи, крупяные каши с добавкой молока и кисломолочных продуктов |
| Источник воды | Водопроводная |
| Температура воздуха | +22-24 С. |
| Влажность воздуха | 40-45% |

До начала эксперимента животные находились под карантинным наблюдением в течение двух недель в виварии. Для эксперимента выбирали активных животных с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающих корм. В день начала экспериментов проводили дополнительное обследование и взвешивание животных. Распределение по группам наблюдения проводилась в зависимости от пола и массы тела. Изучали ткани периодонта у 5 контрольных животных, а у 60 – с наложением лигатуры в области зубов нижней челюсти.

Все исследования проводились в соответствии с правилами по работе с экспериментальными животными [4]. Все манипуляции выполнялись с соблюдением принципов биоэтики на наркотизированных животных. Для введения в наркоз использовали смесь 1 мл 0,005% р-ра фентанила и 2 мл 0,25% р-ра дроперидола. После наркотизации животных фиксировали на спине на специальных станках для быстрого и стандартизированного выполнения манипуляций.

Экспериментальное моделирование воспаления в тканях периодонта выполняли на 60 крысах линии рандомбредных с массой тела 213-247 г. Сущность метода состояла в наложении лигатуры (шелковой нити) в области зубов нижней челюсти в специально высверленных бороздках вокруг шейки каждого зуба. Бороздки располагали на 1-2 мм выше десневого края. Наложение лигатур в таком местоположении обуславливало нарушение микроциркуляции, образование микробного налета и развитие воспаления в тканях периодонта, а также препятствовало механическому снятию данных лигатур животными.

По истечении срока наблюдения животных (опытных и контрольных) выводили из эксперимента путем мгновенной декапитации с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутривенного тиопенталового наркоза из расчета 1 мл 5% тиопентала натрия на 100 грамм веса животного. Забор материала для микроскопических исследований проводили через каждые сутки в течение 10 дней. До и после наложения лигатур у экспериментальных животных каждые сутки в течение 10 дней в тканях периодонта проводили оценку клинического и морфологического состояния тканей десны. Все животные были распределены на контрольную и основную группы. При этом основная группа состояла из 10 подгрупп в зависимости от сроков наблюдения (1 – 10 сутки).

Оценку клинического состояния тканей периодонта проводили по определению цвета, плотности десневого края, кровоточивости при зондировании, образованию и измерению глубины периодонтальных карманов. О состоянии животных судили по следующим критериям: общее состояние животных, особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покровов, окраска видимых слизистых оболочек.

Морфологические исследования проводили на материале слизисто-надкостничного лоскута (14-15мм²) отростка нижней челюсти в области наложения лигатур. Иссеченные участки десны крысы фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 48 часов. Затем промывали в проточной воде в течение 24 часов, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 96,

абсолютный спирт). Далее материал проводили через спирт-хлороформ, хлороформ, хлороформ-парафин и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование микропрепаратов и изготовление их микрофотографий проводили с помощью микроскопа DMLS с программным обеспечением («Leica», Германия).

Результаты исследования. Контрольная группа. Клинические и морфологические исследования показали, что состояние тканей периодонта было в пределах нормы в сроках наблюдения соответствующих эксперименту.



Рис.1. Клиническая картина десны крысы в первые сутки соответствует норме.

Основная группа. В 1-е сутки после наложения лигатур (I подгруппа). Клиническое исследование. У экспериментальных животных отмечено хорошее клиническое состояние десны без патологических изменений (Рис. 1).

Микроскопическое исследование выявило следующее: эпителий слизистой в свободной и прикрепленной частях десны относительно равномерно тонкий, очагово утолщен, в большей степени в свободном сегменте. Эпителиальные гребешки преимущественно широкие и низкие, отдельные удлинены, соответствующую структуру имеют и соединительнотканые (СТ) сосочки собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО). Базальная мембрана прослеживается нечетко. Выявляются неравномерной толщины все слои эпителия. Базальный слой представлен 1-2 рядами низких кубических или удлинённых гиперхромных клеток, местами расположенных в виде частокола; отдельные базальные клетки с везикулярной цитоплазмой. Шиповатые клетки расположены неравно в 1-2-3 ряда, полиочагово отмечается элиминация шиповатых клеток, и в таких участках клетки зернистого слоя примыкают к базальному. Зернистые клетки по большей части удлинённые с обилием в их цитоплазме пылевидных гранул кератогиалина, ядра таких клеток не прослеживаются или выявляются их «тени». Полиочагово отмечается заметное утолщение данного слоя, гипертрофия зернистых клеток, везикуляция цитоплазмы, фрагментация ядер и обилие мелких и, преимущественно, глыбчатых гранул кератогиалина. Роговой слой равномерно тонкий, клетки в нем неразличимы. Выявляются очаги усиленного ортокератоза (гиперкератоза) с формированием по наружной поверхности кистозноподобных углублений в эпителии, заполненных роговыми массами. Собственная пластинка слизистой оболочки представлена неоформленной соединительной тканью, более рыхлой в сосочковом слое и нечетко отграниченным сетчатым слоем, представленным плотной неоформленной СТ, с более объемными коллагеновыми волокнами (КВ). СТ обоих слоев малоклеточная, выявляются в основном фиброциты и фибробласты, а также единичные лимфоциты, гистиоциты, плазматические клетки, эозинофильные моноциты. В толще СПСО выявляются расположенные «гнездно» или изолированно (по одиночке) диффузно разбросанные артериальные капилляры без компонентов крови и с набухшими

эндотелиоцитами. Встречаются единичные венозные капилляры, слабо полнокровные; периадвентициты весьма малочисленные (Рис. 2, ув.200).

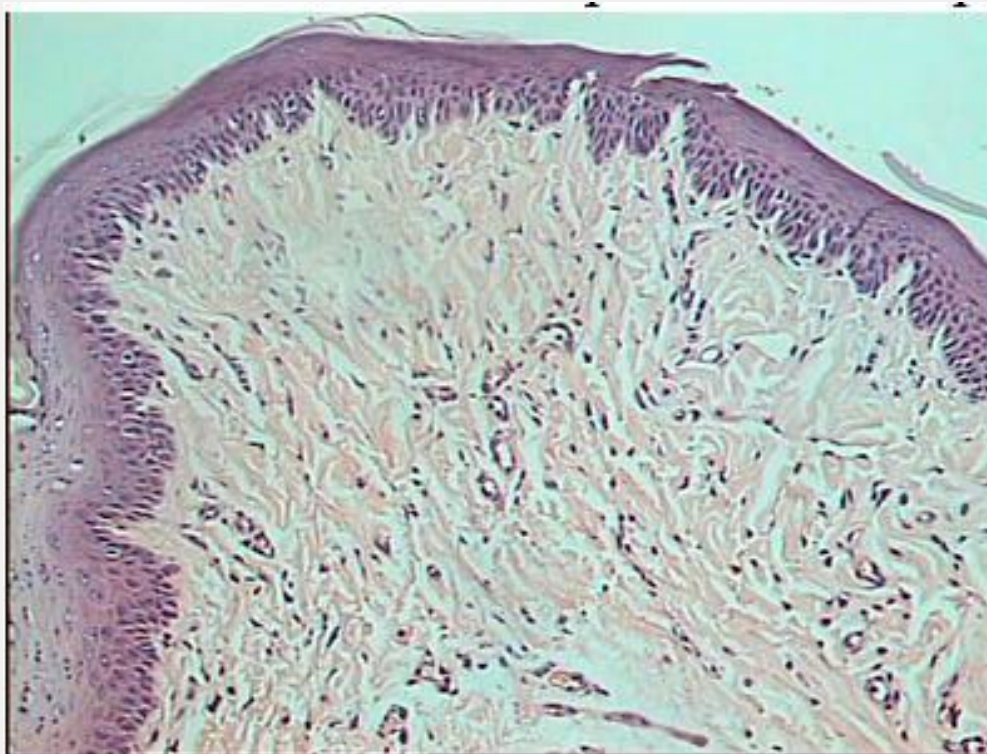


Рис. 2. Слизистая оболочка свободной и прикрепленной десны в первые сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

На 2-е и 3-е сутки после наложения лигатур (II и III подгруппы), а также по большей части в IV подгруппе (4-е сутки после наложения лигатур) клинические и морфологические показатели соответствовали таковым I подгруппы.

На 4-е сутки после наложения лигатур (IV подгруппа). Клиническое исследование. У экспериментальных животных выявлены отложения зубного налета в области лигированных зубов у десневого края. Кровоточивости при зондировании не отмечали. При микроскопическом исследовании у 2-х животных из 6 - очаговое венозное полнокровие от умеренного до выраженного, слабовыраженный периваскулярный отек (Рис. 3, ув.200).

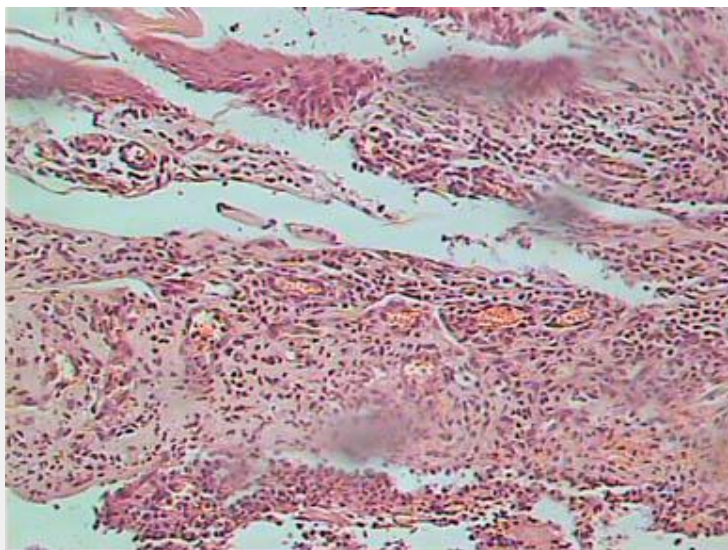


Рис. 3. Морфологические признаки тканей периодонта у экспериментальных животных на 4-е сутки после наложения лигатур. Очаговое венозное полнокровие от умеренного до выраженного, слабовыраженный периваскулярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.200.

На 5-е сутки после наложения лигатур (V подгруппа) у экспериментальных животных выявлены зубной налет, который покрывал половину поверхности коронки зуба и кровоточивость при зондировании. Десна бледно-розового цвета. Гистологически выявлено, что в свободном и прикрепленном сегментах десны отмечается сглаженность эпителиальных гребешков и, соответственно, СТ-сосочков СПСО; выявляются очаги везикуляции цитоплазмы базофильных клеток, элиминации шиповатых и зернистых клеток (в свободном сегменте); минимально-выраженный ортокератоз (Рис. 4, ув.100). Базальная мембрана не прослеживается. Отек и разволокнение сосочкового (преимущественно) и (в меньшей мере) сетчатого слоев СПСО. Незначительное и неравномерное увеличение количества объемных фибробластов, встречаются единичные в поле зрения (ув. 10x40) лимфоциты, моноциты, гистиоциты, плазматические клетки. В отечной СПСО выявляются цепочки и изолированно полнокровные венозные и артериальные капилляры (до 5-6 в поле зрения; ув. 10x40), отмечается выраженное набухание эндотелиоцитов в таких капиллярах и десквамация отдельных клеток (Рис. 5, ув.400).

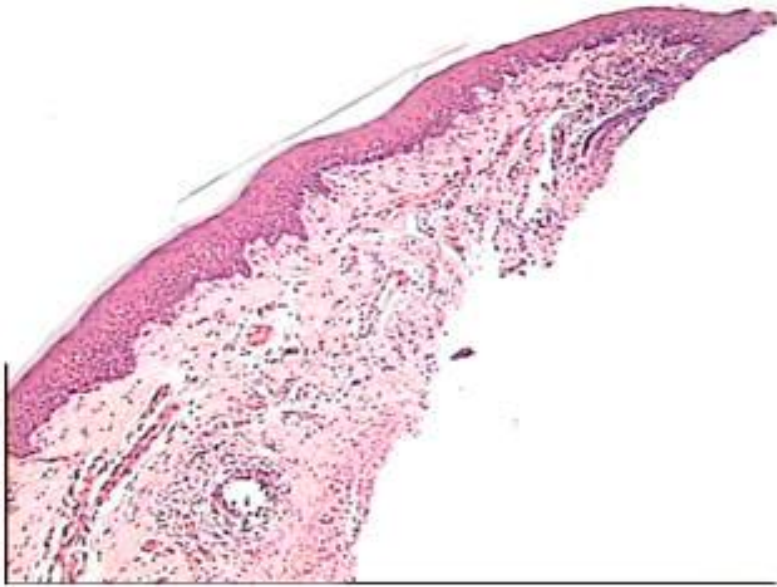


Рис. 4. Морфологические признаки начала воспаления в слизистой оболочке десны на 5 сутки после наложения лигатур. Очаги везикуляции цитоплазмы базофильных клеток, элиминации шиповатых и зернистых клеток (в свободном сегменте); минимально-выраженный ортокератоз. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

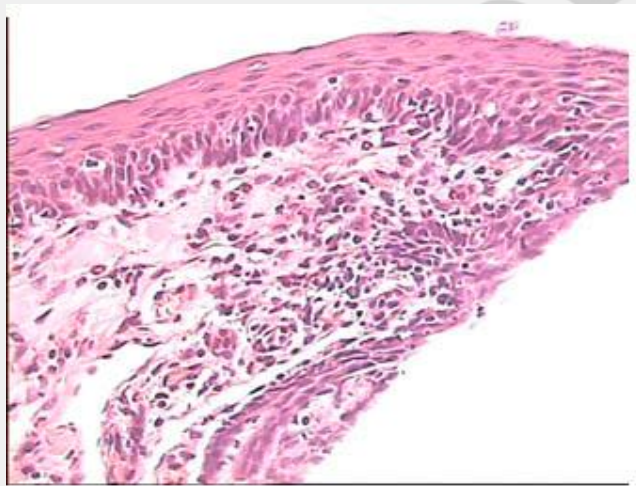


Рис. 5. Морфологические признаки начала воспаления в десне на 5-е сутки после наложения лигатур. Выраженное набухание эндотелиоцитов в таких капиллярах и десквамация отдельных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

На 6-е сутки после наложения лигатур (VI подгруппа). Клиническое исследование. Зубные отложения покрывали всю поверхность зуба. Десна в области исследуемых зубов отечна, гиперемирована. Межзубной сосочек увеличен в размере, сформирован зубодесневой карман, кровоточащий при зондировании. Микроскопически отмечены сглаженность эпителиальных гребешков десны, отек и разволокнение сосочкового и сетчатого слоев СПСО. Количество клеточных элементов соединительной ткани (фибробластов, гематогенных клеток) в сравнении с животными V подгруппы несколько увеличено (Рис. 6, ув.200).

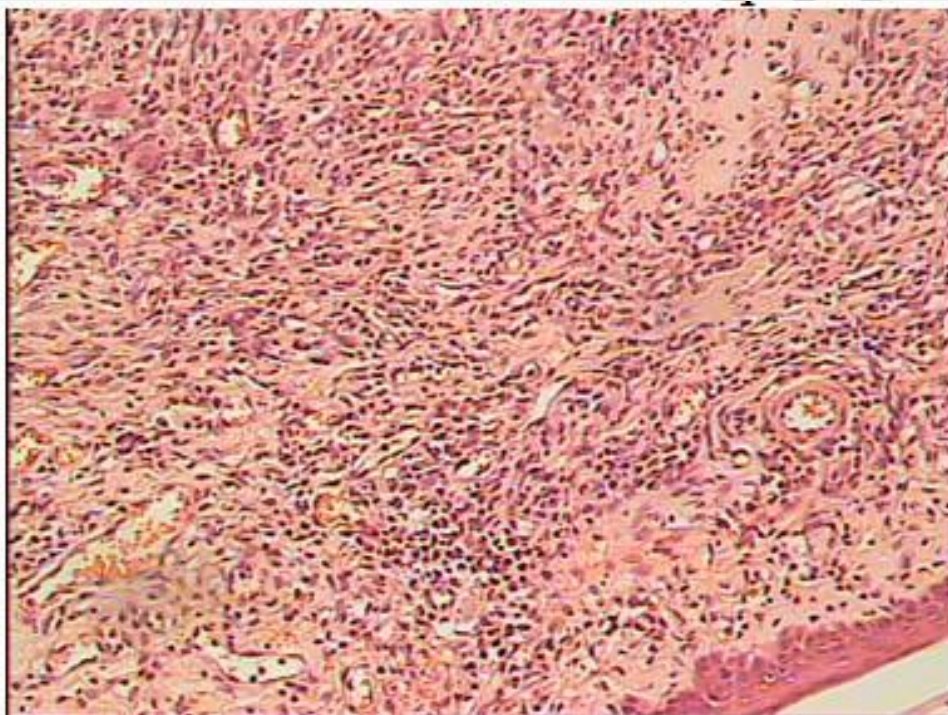


Рис. 6. Морфологические признаки начала воспаления в десне на 6-е сутки после наложения лигатуры. Отмечено сглаженность эпителиальных гребешков десны, отек и разволокнение сосочкового и сетчатого слоев СПСО. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

На 7-е сутки после наложения лигатур (VII подгруппа) клинические и морфологические изменения десны соответствовали показателям VI подгруппы.

VIII группа (8-е сутки после наложения лигатур) и IX подгруппа (9-е сутки после наложения лигатур) клинические и морфологические изменения пародонта были сходны. Клиническое исследование. Зубные отложения в

области исследуемых зубов покрывают всю поверхность зуба. Десна отечна с синюшным оттенком, обнаружено ее флатация. Отмечен зубодесневой карман, кровоточивость при зондировании. При микроскопическом исследовании отмечалось следующее: очаговая элиминация шиповатых и зернистых клеток, вакуолизация цитоплазмы сохранившихся клеток. Базальная мембрана по большей части не прослеживалась. Эпителий свободной части и прикрепленной части десны в зоне десневой борозды набухший, с признаками дисконнекции. Значительное увеличение количества фибробластов, особенно в прикрепленной части десны, очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация, редкие СЯЛ (Рис. 7, ув.200). Очаговая трансформация эндотелиоцитов в эпителиоидные клетки, увеличение количества капилляров синусоидного типа. Очаговое выраженное полнокровие сосудов МЦР.

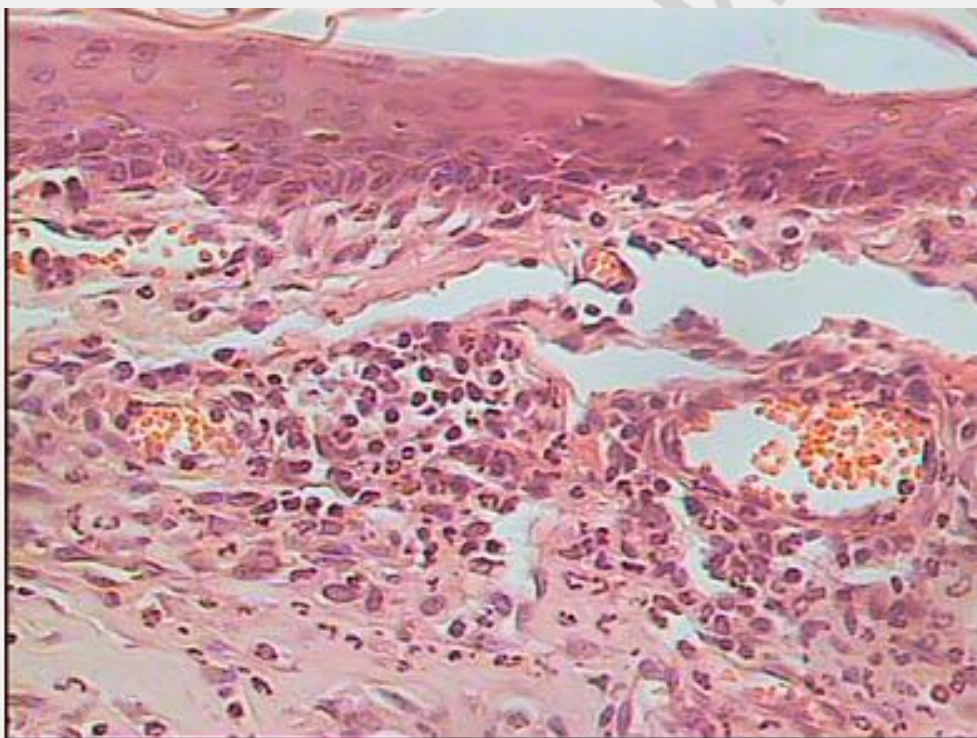


Рис. 7. Морфологические признаки начала воспаления в десне на 8-е сутки после наложения лигатуры. Увеличенное количество фибробластов, очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрации. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.



Рис. 8. Клиническая картина воспаления в десне экспериментальных животных на 10-е сутки после наложения лигатур.

На 10-е сутки после наложения лигатур (X подгруппа). Клиническое исследование. В области наложения лигатур отмечены выраженные признаки воспаления тканей периодонта у экспериментальных животных (Рис. 8). Десна синюшная, отечная, кровоточит при зондировании. Отмечен периодонтальный абсцесс с гнойным экссудатом. Клиническая картина соответствовала периодонтиту. Микроскопические исследования выявили следующее: эпителий десны неравномерно истончен за счет элиминации шиповатых и зернистых клеток, везикуляция цитоплазмы сохранившихся клеток; роговой слой тонкий однородный. Неравномерная слабо выраженная пролиферация базальных клеток, дисконфлексация их. БМ прослеживается нечетко; эпителиальные гребешки и СТ-сосочки выявляются очагово, единичные и слабо выражены (Рис. 9, ув.100). Эпителий свободной части десны в зоне десневой борозды набухший, дистрофичный, с признаками дисконфлексации

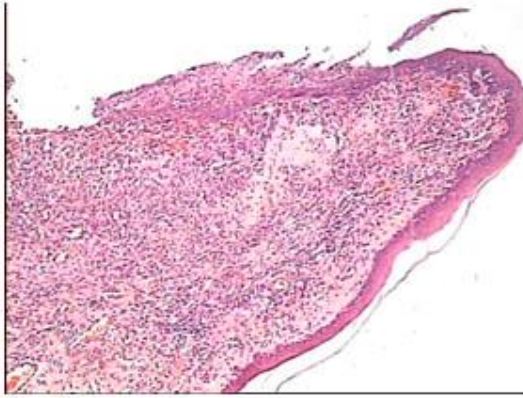


Рис.9.

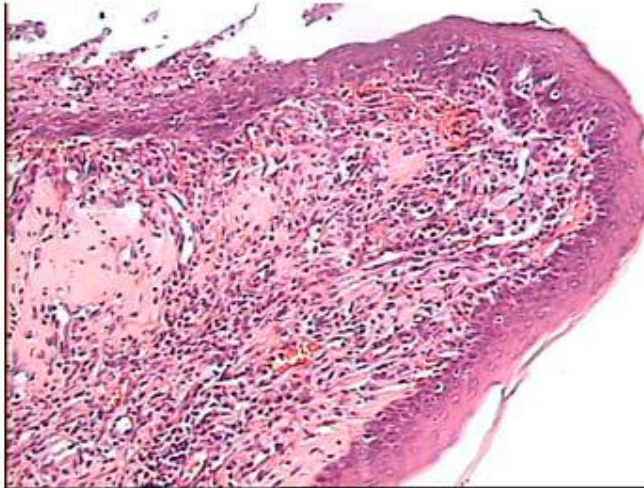


Рис.10.

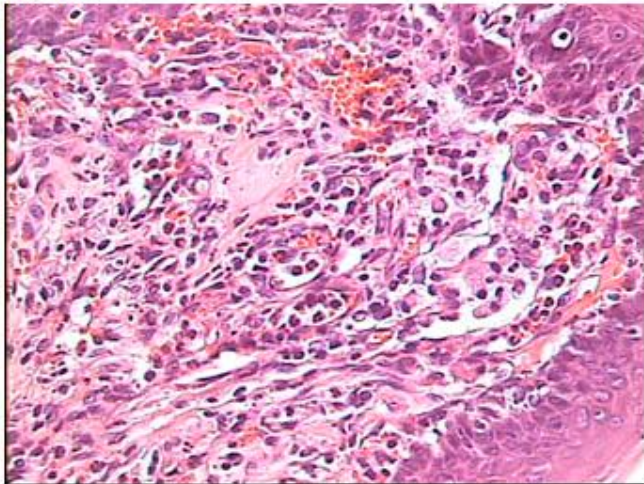


Рис.11.

Рис. 9-11. Морфологические признаки воспаления тканей периодонта у экспериментальных животных на 10-е сутки после наложения лигатур. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100-400.

и. В области сегмента прикрепленной части десны эпителий резко утолщен, гипертрофирован, клетки в состоянии дистрофии; очаги полосовидного некроза, выраженная инфильтрация СЯ гранулоцитами (Рис. 10, ув.200). БМ не

прослеживается. Дистальнее, в зоне прикрепленной десны, эпителий разрушен, выявляются распространенные инкапсулированные абсцессы, в том числе и поднадкостничные. Капсула абсцесса трехслойная: внутренняя – пиогенная, средняя – сосудистая, наружная – фиброзно-гигантоклеточная. СПСО: деление на сосочковый и сетчатый слои не прослеживается. В зоне свободной части десны и по краю десневой борозды выявляются очаги гомогенизации волокнистой ткани. По большей части отмечается выраженная гиперплазия фибробластов (фиброплазия), диффузно-очаговая инфильтрация лимфоцитами и моноцитами, среди которых встречаются малочисленные СЯ гранулоциты, плазматические и тучные клетки, макрофаги; выявляются многочисленные, в основном синусоидного типа капилляры и мелкие венулы с агрегацией в просвете последних эритроцитов и СЯ гранулоцитов (Рис. 11, ув.400). В зоне прикрепленной десны и, особенно, в участках микроабсцессов, процесс фиброплазии резко нарастает, увеличивается количество синусоидных и сформированных капилляров, мелких венул, выявляются очаги интенсивной инфильтрации лимфоцитами, моноцитами, неравномерная распространенная и выраженная инфильтрация СЯ гранулоцитами, а также по всей площади срезов – трансформация эндотелиоцитов в эпителиоидные клетки и обилие многоядерных гигантских клеток, в т.ч. в надкостнице (фиброзно-сосудистая гигантоклеточная гранулема). В цитоплазме гигантских клеток встречаются СЯЛ (Рис. 11, ув.400). Встречаются островки незрелых (резко базофильных) формирующихся костных балок среди клеточно-волокнистой остеогенной ткани.

Заключение. Таким образом, разработана экспериментальная модель периодонтита. Первые морфологические признаки начала воспаления у экспериментальных животных возникли на 5-е сутки после наложения лигатур, при отсутствии воспаления в десне. Развившиеся признаки воспаления тканей периодонта у экспериментальных животных по всем исследуемым критериям (клинический и морфологический) были выявлены на 10-е сутки, что соответствовало периодонтиту.

Таким образом, разработанная модель экспериментального периодонтита у крыс отличается следующими особенностями:

- Простотой воспроизведения воспалительных изменений;
- Кратковременностью развития периодонтита, поскольку начало и полное развитие клинико-морфологических проявлений занимает 5-10 суток;
- Наиболее полным соответствием клинико-морфологических признаков таковым у больных людей, страдающих хроническим периодонтитом;
- Предлагаемая модель может быть использована для оценки эффективности различных способов лечения периодонтита: терапевтических, хирургических, физиотерапевтических и др.

Литература

1. Грудянов, А. И. Заболевания пародонта / А. И. Грудянов. М., 2009. 336 с.
2. Дедова, Л. Н. Диагностика болезней пародонта: учеб.-метод. пособие / Л. Н. Дедова; Белор. госуд. мед. унив. Минск, 2004. 70 с.
3. Логинова, Н. К. Функциональная диагностика в стоматологии / Н. К. Логинова, Е. К. Кречина, С. Н. Ермолаев. М., 2007. 120 с.
4. Обезболивание животных в эксперименте: метод. рек. М., 1985. 54 с.
5. Орехова, Л. Ю. Заболевания пародонта / Л. Ю. Орехова. М., 2004. 432 с.
6. Рубникович, С. П. Применение цифровой динамической спекл-анемометрии в диагностики поверхностного кровотока тканей ротовой полости / С. П. Рубникович // Стоматологический журнал. 2007. № 3. С. 26–28.
7. Фомин, Н. А. Новые возможности исследования кровотока мягких тканей ротовой полости / Н. А. Фомин, С. П. Рубникович, Н. Б. Базылев // ИФЖ. 2008. Т. 81. № 3. С. 508–517.
8. Fomin, N. Speckle Photography for Fluid Mechanics Measurements / N. Fomin. Berlin: Springer Verlag, 1998. 248 p.