

*Н. Г. Кравцова-Кухмар, Н. В. Шаковец, Т. В. Кидясова*

## **КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ДЕСНЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИНГИВИТА**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

*Самое распространенное заболевание тканей периодонта у детей – гингивит. Для изучения патогенетических процессов, происходящих при этом заболевании, а также для разработки новых лекарственных форм необходима экспериментальная модель гингивита. Наиболее часто для моделирования гингивита используют препараты на основе фосфолипазы А, содержание которой в яде гадюки составляет 32–59,8 %. Целью работы является оценка клинико-морфологических изменений в тканях десны при экспериментальном гингивите, вызванном препаратом «Випраксин». Для моделирования экспериментального гингивита было отобрано 20 животных, которым однократно инъекционно в подслизистый слой десны вводили препарат «Випраксин», представляющий собой водный раствор яда гадюки, в объеме 0,2 мл. На 6-е сутки от начала эксперимента у всех крыс проводился забор биопсии для проведения гистологического исследования. У всех крыс визуально отмечалось покраснение десневого края, отечность и сглаженность контура, при дотрагивании определялась кровоточивость. В гистологических препаратах была обнаружена дезинтеграция клеток шиповатого и зернистого слоёв эпителия, сглаженность сосочков собственной пластинки соединительной ткани, набухание и разволокнение волокнистых структур, полнокровие сосудов. В зависимости от степени выраженности изменений в тканях десны нами были выделены 3 группы активности протекания воспалительного процесса: легкая, средняя и тяжелая. При использовании препарата «Випраксин» отмечаются все клинические и морфологические изменения, характерные для воспалительного процесса, что позволяет использовать его для моделирования экспериментального гингивита.*

**Ключевые слова:** *экспериментальный гингивит, яд гадюки, пчелиный яд, фосфолипаза.*

*N. G. Krautsova-Kukhmar, N. V. Shakavets, T. V. Kidyasova*

## **CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN GUM DURING THE MODELING OF EXPERIMENTAL GINGIVITIS**

*Gingivitis is the most common disease of periodontal tissues in children. An experimental model of gingivitis is necessary to study the pathogenetic processes occurring in this disease, as well as to develop new dosage forms. Drugs based on phospholipase A are used to model gingivitis, its content in viper venom is 32–59.8 %. The aim of the work is to evaluate the clinical and morphological changes in the gum tissues in experimental gingivitis caused by the drug «Vipraxin». 20 animals were selected to simulate experimental gingivitis. They were injected once into the submucosal layer of the gum with the drug «Vipraxin», which is an aqueous solution (0,2 ml) of viper venom. All rats were biopsied for histological examination on the 6th day from the beginning of the experiment. Redness of the gingival margin, puffiness and smoothness of the contour were visually noted in all rats. Also bleeding was determined while probing. The histological preparations revealed disintegration of the cells of the spiny and granular layers of the epithelium, smoothness of the papillae of the connective tissue lamina proper, swelling and loosening of the fibrous structures, and vascular fullness. 3 groups of activity of the inflammatory process depending on the degree of severity of changes in the gum tissues: mild, moderate and severe. All clinical and morphological changes match to the inflammatory process in case of using the drug «Vipraxin». This drug can be used for modeling experimental gingivitis.*

**Key words:** *experimental gingivitis, viper venom, bee venom, phospholipase.*

Наиболее распространенным заболеванием тканей периодонта в детском возрасте является гингивит. Гингивит – это обратимая и не деструктивная форма заболеваний периодонта без потери зубодесневого прикрепления, к характерным признакам которого относят покраснение тканей десны, ее отек и кровоточивость [1]. Для исследования патогенетических процессов, происходящих в тканях десны при воспалительном процессе, а также для разработки новых эффективных лечебных и профилактических препаратов необходимо иметь соответствующую экспериментальную модель гингивита.

В настоящее время существует 7 моделей развития гингивита с различными механизмами развития: моделирование гингивита у крыс при помощи аппликаций фосфолипазой А2 или пчелиным ядом, протаминавая модель гингивита, моделирование гингивита при помощи липополисахарида, перекисная модель гингивита, моделирование гингивита при помощи гепатотоксинов, дисбиотическая модель гингивита, модель асептического воспаления [2]. Все они имеют свои преимущества и недостатки.

Наиболее часто для моделирования экспериментального гингивита используют препараты, в состав которых входит фосфолипаза А2 (ФЛА2) – кальций-зависимый фермент. Фосфолипаза А2 (ФЛА2) играет пусковую роль в развитии патологических процессов в организме. Она способна гидролизовать фосфолипиды, в результате чего образуется лизолецитин, который обладает цитолитическим действием: за счёт очень высоких поверхностно-активных свойств он разрывает гидрофобные связи, обеспечивающие взаимодействие липидов и белков. Происходит разрушение или модифицирование плазматической и внутриклеточной мембраны многих клеток (эритроцитов, тучных клеток), что способствует значительному нарушению их функционирования. Фосфолипаза А2 выделяет из фосфолипидов молекулу полиненасыщенной жирной кислоты – арахидоновой, являющейся субстратом для циклооксигеназ, под действием которых образуется множество биологически активных соединений эйкозаноидов, которые участвуют в процессе воспаления [2, 3].

На основании патогенетической роли ФЛА2 было предложено использовать аппликации с этим ферментом на ткани полости рта экспериментальных животных (крыс) с целью воспроизведения воспалительно-дистрофических изменений. Было

установлено, что аппликации раствором ФЛА2 различного происхождения на периодонт крыс вызывают увеличение маркеров воспаления и дистрофию альвеолярной кости животных [2].

Высокое содержание фосфолипазы А2 отмечается в ядах животного происхождения, а именно в пчелином яде и яде гадюки. Пчелиный яд представлен сложной смесью различных активных пептидов, а также биологически активных аминов. В составе пчелиного яда содержание фосфолипазы А2 составляет 12 %. Немаловажное значение в поддержании воспаления имеет гиалуронидаза (1–3 %), которая способна катализировать гидролитическое расщепление основного компонента соединительной ткани – гиалуроновой кислоты, способствуя таким образом проникновению и распространению в ткани других биологически активных токсических веществ яда, стимулируя воспаление [3–5].

В настоящее время пчелиный яд выпускается только в виде сырого порошка (т. к. сам яд в виде желтоватой жидкости быстро высыхает во внешней среде), поэтому для моделирования экспериментального гингивита необходимо использовать гель на 2,5 %-ной карбоксиметилцеллюлозе, благодаря которой он удерживается на поверхности десны, что позволяет пролонгировать действие ФЛА2. Несмотря на плотную консистенцию, его нахождение на десне животных не всегда длительно из-за слизывания и проглатывания. Аппликацию на десну крыс осуществляют в течение двух дней однократно. Максимально выраженные воспалительно-дистрофические и дисбиотические процессы в десне крыс наблюдаются на 7–8 день после нанесения пчелиного яда.

Яд гадюки отличается от пчелиного яда более высоким содержанием фосфолипазы А2. По данным ряда авторов ее содержание в нем составляет 32–59,8 % [6], что позволяет достичь желаемого эффекта меньшим количеством препарата и в более ранние сроки. Также в состав змеиного яда входят гиалуронидаза, металлопротеазы и другие белки, поддерживающие воспаление [5, 7]. Использование яда гадюки имеет некоторые преимущества. Существует готовая лекарственная форма – препарат «Випраксин» [8], который не требует дополнительных разведений. Также он легко дозируется, его введение в подслизистый слой позволяет создать депо препарата, тем самым длительно воздействовать на ткани десны при одно-

кратном использовании, не вызывая повреждения костной ткани. Экспериментальный гингивит развивается на 5-е сутки после инъекции препарата, что позволяет уменьшить сроки проведения эксперимента.

**Цель работы** – оценить клинико-морфологические изменения в тканях десны в условиях развития экспериментального гингивита с помощью препарата «Випраксин».

**Материалы и методы.** При проведении экспериментального исследования соблюдались принципы биоэтики в соответствии со следующими регламентирующими документами: «Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [9], «Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» [10], «Правила работы с экспериментальными животными» (утверждены Ученым советом МГМИ от 24.04.1996) [11]. Протокол исследования был утвержден на заседании этической комиссии УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Для проведения эксперимента были отобраны 20 самцов белой крысы линии Wistar в возрасте 3 месяцев. Они были случайным образом разделены на 2 группы: группа № 1 ( $n = 10$ ) – интактные животные, группа № 2 ( $n = 10$ ) – группа животных с экспериментальным гингивитом. Все они находились на стандартном рационе питания.

Для получения экспериментального гингивита животному однократно инъекционно в подслизистый слой десны вводили препарат «Випраксин», представляющий собой водный раствор яда гадюки, в объеме 0,2 мл. Во избежание травматического повреждения места введения препарата после инъекции животное не кормили в течение 30–40 минут. У всех крыс проводился забор биопсии для проведения гистологического исследования на 6-е сутки от начала эксперимента. Для этого иссекались ткани десны в области нижнего резца справа размером 1,0×1,0 см. Материал фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, после чего заливали в парафин. Срезы толщиной 5–6 микрон окрашивали эозином и гематоксилином. Микропрепараты исследовались с помощью микроскопа «Ломо», микрофотографии изготавливались с использованием цифровой камеры «Levenhuk».

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования установлено, что у животных группы № 1 десна имела нежно-розовое окрашивание тканей, без нарушения формы и контура, кровоточивость отсутствовала. В гистологических препаратах десны животных многослойный плоский ороговевающий эпителий свободной части десны преимущественно равномерно тонкий, очагово утолщен и дифференцирован на слои. Базальный слой представлен 1–2 рядами низких кубических или удлинённых клеток, иногда с везикулярной цитоплазмой, местами расположенных в виде «частокола» (рисунок 1). Соединительнотканная сосочка собственной пластинки слизистой преимущественно широкие и низкие, отдельные – тонкие и удлинённые, за счет чего формируется соответствующая микроструктура. Клетки шиповатого слоя расположены неравномерно в 1–3 ряда, имеют полигональную форму, ближе к поверхности десны расстояние между клетками увеличивается. Клетки зернистого слоя образуют 3–4 ряда, имеют веретенообразную форму, ядра клеток уплощены, локально фрагментированы или не визуализируются на границе с роговым слоем. Ближе к поверхности десны цитоплазма клеток этого слоя становится слабо-базофильной, светлеет. Отмечаются очаги утолщения данного слоя с гипертрофией зернистых клеток и везикуляцией их цитоплазмы. Эпителиоциты рогового слоя плоские, вытянутые, с выражено просветлённой цитоплазмой без ядер, представляют собой роговые чешуйки, соединённые между собой выростами плазмолеммы, образуют равномерно тонкий слой, выраженный более чётко в свободной части десны. Встречаются очаги гиперкератоза. Соединительнотканная основа десны – собственная пластинка слизистой оболочки (СПСО) полости рта, представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью в поверхностном слое (сосочковом) и плотной волокнистой неоформленной соединительной тканью глубже (сетчатый слой). Клеточный состав обоих слоёв немногочисленный, представлен преимущественно фибробластами и фиброцитами. Рядом с фибробластами обнаруживаются фибриллярные структуры – коллагеновые и эластические волокна. В рыхлой волокнистой ткани редко встречаются клетки лимфоцитарного ряда и лейкоциты. Чаще можно обнаружить гистиоциты. В зоне собственной пластинки обнаруживаются все элементы микроциркуляторного русла: артериолы, прекапиллярные артериолы, капилляры, постка-

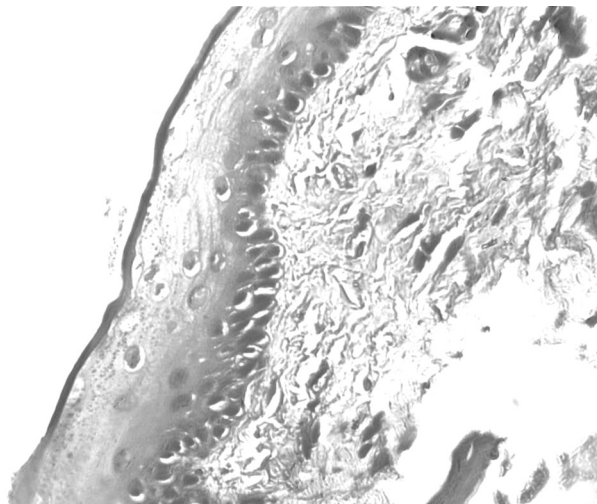


Рисунок 1. Слизистая оболочка свободной и прикреплённой десны интактной крысы. Микрофотографии гистологического препарата. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: ×400

пиллярные венулы, венулы. У венул наблюдается истончение эпителиальной выстилки. Капилляры расположены группами или изолированно, просвет артериол и венул – без элементов крови (рисунок 1).

При использовании препарата «Випраксин» у всех животных группы № 2 гингивит развился на 6-е сутки от начала эксперимента. Клинически при визуальном осмотре у всех крыс опытной группы определялось значительное покраснение десневого края, его отечность и сглаженность контура, при дотрагивании отмечалось наличие кровоточивости в течение 10 секунд. Десневой сосочек между нижними центральными резцами был значительно отечен, гиперемирован с синюшным оттенком. В гистологических препаратах отмечается разная степень вовлечения тканей в воспалительный процесс. Структурные изменения были выявлены в базальном и шиповатом слоях многослойного плоского ороговевающего эпителия десны. Отмечена очаговая дезинтеграция клеток базального слоя, внутриклеточный отек эпителия шиповатого слоя с явлениями кариолиза (рисунок 2).

В СПСО наблюдается сглаженность соединительнотканых сосочков, умеренное, местами выраженное венозное полнокровие, присутствуют мелкоочаговые диапедезные кровоизлияния, клетки эндотелия округлой формы, набухшие (рисунок 3).

Установлена диффузная клеточная инфильтрация круглоклеточными элементами, сегментоя-

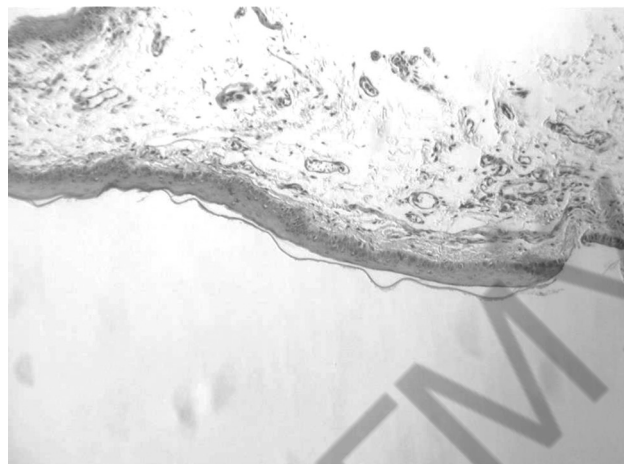


Рисунок 2. Слизистая оболочка десны крысы на 6-е сутки после начала эксперимента. Везикуляция цитоплазмы базальных эпителиоцитов. Дезинтеграция клеток шиповатого и зернистого слоёв эпителия. Внутриклеточный очаговый отёк шиповатого слоя эпителия. Венозное полнокровие. Микрофотография гистологического препарата. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: ×200

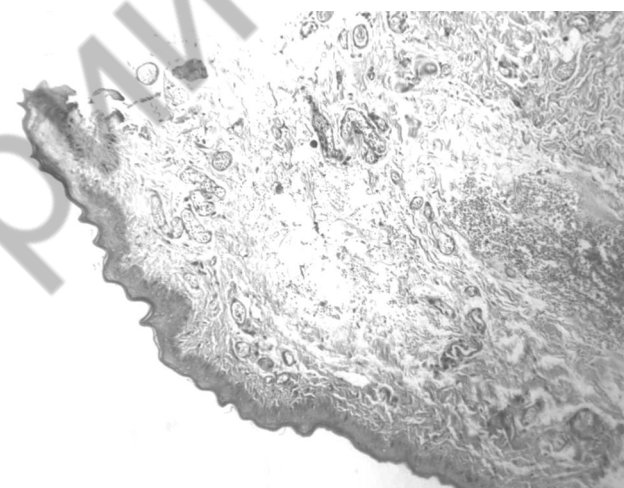


Рисунок 3. Слизистая оболочка десны крысы на 6-е сутки после начала эксперимента. Сглаженность сосочков СПСО. Отек и инфильтрация клетками лимфоцитарного ряда. Микрофотография гистологического препарата. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение: ×400

дерными лейкоцитами, гистиоцитами с развитием периваскулярной клеточной реакции, отёком, набуханием и разволокнением волокнистых структур с частичной фрагментацией (рис. 4, 5).

В зависимости от степени выраженности изменений в тканях десны нами были выделены 3 группы активности протекания воспалительного процесса:

группа 1 – десна с воспалением легкой степени активности: в гистологических препаратах тканей десны выявляются структурные изменения эпителиоцитов базального слоя в виде везикуля-

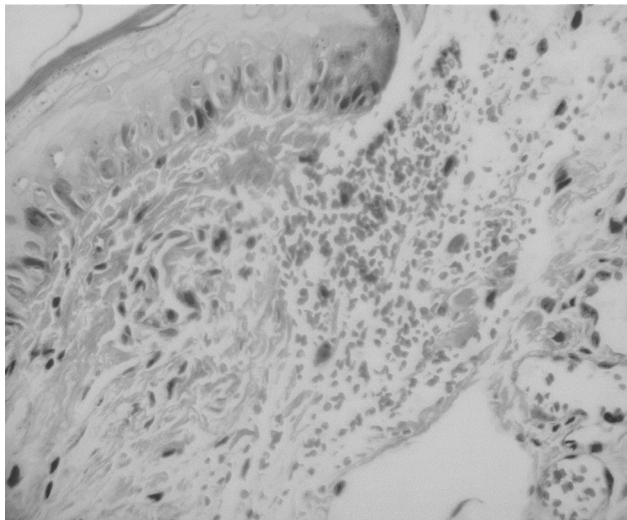


Рисунок 4. Очаговые диапедезные кровоизлияния на 6-е сутки после окончания эксперимента. Микрофотография гистологического препарата. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение:  $\times 200$

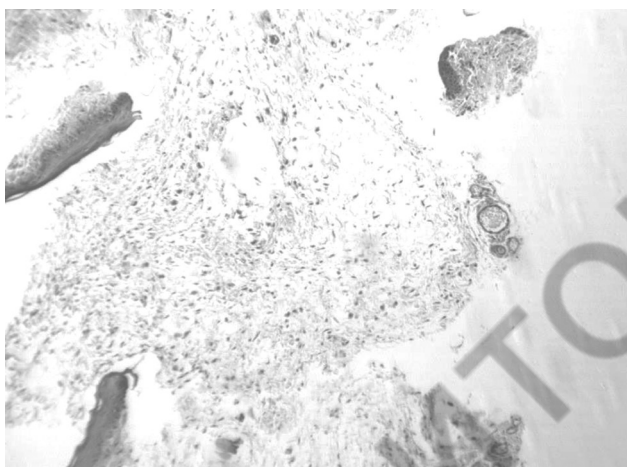


Рисунок 5. Слизистая оболочка десны крысы на 6-е сутки после начала эксперимента. Венозное полнокровие. Набухание и разволокнение волокнистых структур. Микрофотография гистологического препарата. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение:  $\times 200$

ции цитоплазмы. Клетки шиповатого и зернистого слоёв локально дезинтегрированы. Отмечается лёгкая сглаженность сосочков поверхностного слоя СПСО, которая незначительно отёчна, инфильтрована единичными лимфоцитами, лейкоцитами, тучными и плазматическими клетками, наблюдается выраженное полнокровие единичных сосудов соединительной ткани;

группа 2 – десна с воспалением умеренной степени активности: в гистологических препаратах тканей десны отмечается внутриклеточный крупноочаговый отёк шиповатого слоя, ядра клеток местами сдвинуты на периферию. Появляет-

ся выраженная локальная сглаженность сосочков поверхностного слоя СПСО, отёк, значительная инфильтрация клетками лимфоцитарного ряда. Появляются участки разволокнения и фрагментации волокнистых структур. Многочисленные кровеносные сосуды полнокровны;

группа 3 – десна с воспалением тяжелой степени активности: в гистологических препаратах тканей десны в базальном слое и прилегающих слоях шиповатого слоя эпителия отмечается мелкоочаговая инфильтрация круглоклеточными элементами, лейкоцитами, выраженная локальная дезинтеграция клеток базального и шиповатого слоёв эпителия, уменьшение количества слоёв клеток (до 1–2) шиповатого слоя. Локальная пролиферация эпителия. Значительная сглаженность сосочков поверхностного слоя СПСО, выраженная клеточная инфильтрация, разволокнение и фрагментация волокнистых структур, полнокровие большого количества сосудов.

**Выводы.** При моделировании гингивита с использованием препарата «Випраксин» в тканях десны присутствуют все клинические и морфологические изменения, характерные для воспалительного процесса, что позволяет использовать данную модель для оценки патогенетических процессов, происходящих в тканях десны, а также для разработки новых эффективных лечебных и профилактических препаратов.

### Литература

1. Терехова, Т. Н. Детская терапевтическая стоматология. – Минск: Новое знание, 2017. – 495 с.
2. Левицкий, А. П. Экспериментальные методы воспроизведения гингивита // Инновации в стоматологии. – 2013. – № 1. – С. 2–6.
3. Короткевич, И. Г. Структурно-функциональные свойства и биологическая активность метилина из яда пчел // Труды БГУ. – 2016. – № 11 (ч. 1). – С. 101–109.
4. Коноплева, М. М. Лекарственное сырье животного происхождения и иные природные продукты // Вестник фармации. – 2012. – № 1 (55). – С. 74–82.
5. Giulia Zanetti Variability in venom composition of European viper subspecies limits the cross-effectiveness of anti-venoms // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – P. 1–10.
6. Xiao, H., Pan H., Liao K. et al. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development // BioMed Research International. – 2017. – P. 1–10.
7. Капустин, М. А. Сравнительные исследования белков и пептидов яда змей герпетофауны Вьетнама и Беларуси. – Режим доступа: <http://iboch.bas-net.by/files-iboch/belleki/Kapustin.pdf> (03.02.2021)
8. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2007. – 342 с.

9. Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. – 2018.

10. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.* – 2020.

11. Денисов, С. Д., Морозкина Т. С. Требования к научному эксперименту с использованием животных // *Здравоохранение.* – 2001. – № 4. – С. 40–42.

### References

1. *Terehova, T. N. Detskaja terapevticheskaja stomatologija.* – Minsk: Novoe znanie, 2017. – 495 s.

2. *Levickij, A. P. Jeksperimental'nye metody vosпроизведения gingivita // Innovacii v stomatologii.* – 2013. – № 1. – P. 2–6.

3. *Korotkevich, I. G. Strukturno-funkcional'nye svojstva i biologicheskaja aktivnost' metilina iz jada pchel // Trudy BGU.* – 2016. – Vol. 11 (ch. 1). – P. 101–109.

4. *Konopleva, M. M. Lekarstvennoe syr'e zhivotnogo proishozhdenija i inye prirodnye produkty // Vestnik farmacii.* – 2012. – № 1 (55). – P. 74–82.

5. *Giulia Zanetti Variability in venom composition of European viper subspecies limits the cross-effectiveness of antivenoms // Scientific Reports.* – 2018. – Vol. 8. – P. 1–10.

6. *Xiao, H., Pan H., Liao K. et al. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development // BioMed Research International.* – 2017. – P. 1–10.

7. *Kapustin, M. A. Sravnitel'nye issledovanija belkov i peptidov jada zmej gerpetofauny V'etnama i Belarusi.* – Access of mode: <http://iboch.bas-net.by/files-iboch/belleki/Kapustin.pdf> (03.02.2021)

8. *Mashkovskij, M. D. Lekarstvennye sredstva.* – M.: Novaja volna, 2007. – 342 s.

9. *Mezhdunarodnye rekomendacii (jeticheskij kodeks) po provedeniju mediko-biologicheskikh issledovanij s ispol'zovaniem zhivotnyh.* – 2018.

10. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes.* – 2020.

11. *Denisov, S. D., Morozkina T. S. Trebovanija k nauchnomu jeksperimentu s ispol'zovaniem zhivotnyh // Zdravoohranenie.* – 2001. – № 4. – P. 40–42.

Поступила 16.03.2021 г.