

УДК 616.314: 616.314.28

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ПУЛЬПЫ ЗУБОВ И ПЕРИОДОНТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА И БЛОКАТОРА NO-СИНТАЗЫ ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНОМ СТРЕССЕ

Е.Ю. Ермак¹, В.Н. Олесова², В.В. Париков³, Ю.М. Ермак¹, А.К. Кириченко⁴, В.В. Индюков⁵

¹ МБУЗ Городская стоматологическая поликлиника № 5, Красноярск

² Институт повышения квалификации Федерального Управления медико-биологических и экстремальных проблем при Минздравсоцразвития России, Красноярск

³ Стоматологическая клиника "ВОКА", Красноярск

⁴ ГБОУ ВПО "Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого" Минздравсоцразвития России

⁵ МБУЗ Городская стоматологическая поликлиника № 2, Красноярск

E-mail: ermak_stom@mail.ru

EXPEREMENTAL PREVENTION OF STRESS CHANGES OF TOOTH PULP TISSUES AND PERIODONTIUM WITH NITRIC OXIDE DONOR MOLECULES

E.Yu. Ermak¹, V.N. Olesova², V.V. Parilov³, Yu.M. Ermak¹, A.K. Kirichenko⁴, V.V. Indyukov⁵

¹ City Dental Clinic No. 5, Krasnoyarsk, Russia

² The Institute of Improvement of Professional Skills, Federal Management of Medico- Biological and Experimental Problems, Krasnoyarsk,

³ Dentistry Clinic "Voka", Krasnoyarsk, Russia

⁴ Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky;

⁵ City Dental Clinic No. 2, Krasnoyarsk, Russia

В статье приводятся результаты исследования влияния доноров и блокаторов фермента NO-синтазы на морфологическую картину пульпы зубов и тканей периодонта лабораторных животных при стрессорном воздействии. Показано, что донор молекул оксида азота L-аргинин способен ограничивать развитие стресс-реакции и снижать выраженность морфофункциональных нарушений в тканях периодонта и пульпе зубов. Блокатор фермента NO-синтазы L-NNA способствует усилению альтерирующих эффектов стресс-реакции на ткани периодонта и пульпы зубов.

Ключевые слова: оксид азота, эмоционально-болевого стресс, L-аргинин, периодонт.

The research results of influence of donors and anzyme blocker NO-synthesis on morphological state of tooth pulp and periodontium tissues at stress influence on laboratory animals are presented in the article. It is revealed, that nitric oxide donor molecule L-arginine is able to limit the development of stress-reaction and decrease quantity of morphofunctional infrigements in periodontium tissues and teeth stump. Enzyme blocker NO- synthesis L-NNA helps to strengthen alternating effects of stress reaction in periodontium tissue and teeth pulp.

Key words: Nitric oxide, emotionally-painful stress, L-arginine, periodontium.

Введение

Работами отечественных исследователей было показано, что важную роль в повреждении тканей пародонта играют стрессорные воздействия, т.к. в результате активации адренергической и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой систем происходят нарушения различных видов обмена, чрезмерная активация процессов перекисного окисления липидов, расстройства регионарной гемодинамики, что приводит к деструкции клеточных мембран пародонтальных тканей [2, 13].

В предыдущие годы Ф.З. Меерсоном (1981) была выдвинута концепция о стресс-лимитирующих системах организма, которая дала реальную основу для разработки принципов предупреждения чрезмерной активности стресс-реакции и реализации ее патогенных воздействий на различные органы и системы организма [9]. В механизме адаптации наиболее важную роль играют универсальные факторы регуляции физиологических систем и экспрессии генов [6].

Согласно современным представлениям, таким универсальным регулятором является оксид азота (NO) [7, 8]. В организме NO синтезируется из L-аргинина ферментом NO-синтазой. С начала 90-х годов стали появляться доказательства того, что NO вовлечен в регуляцию активности генетического аппарата как на уровне факторов транскрипции, так и на уровне самих механизмов транскрипции и трансляции мРНК [14, 15].

Наконец, после того как были получены данные о значительных изменениях в продукции NO при стрессе и в процессе адаптации к разным факторам, возникло предположение о том, что NO играет важную роль в стрессорных и адаптивных ответах организма [12]. Учеными выдвинута гипотеза о том, что NO участвует в регуляции стресс-реакции, ограничивая ее чрезмерную активацию и ее повреждающие эффекты как на центральном, так и на периферическом уровне [5, 11].

Цель исследования: изучение морфологических особенностей пульпы и периодонта зубов под влиянием эмоционального стресса в ответ на использование активаторов и ингибиторов фермента NO-синтазы в эксперименте.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проведены на 220 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180–220 г в осенне-зимний период. Все исследования на животных проведены с соблюдением требований приказа № 724 Минздрава СССР от 13.11.1984 г. "Правила проведения работ с экспериментальными животными". В качестве

модели стресса выбрана методика эмоционально-болевого стресса путем 6-часовой иммобилизации животных на спине. Всех подопытных животных разделили на 4 основные группы. В первой группе исследовались морфологические особенности пульпы зубов и пародонта крыс без стрессорного воздействия в норме (n=20). Во второй группе изучались морфологические изменения тканей пульпы и пародонта через 39 ч после окончания шестичасовой иммобилизации животных (n=60). В третьей и четвертой группах изучались те же показатели через 39 ч после стрессорного воздействия на фоне введения донора молекул оксида азота – L-аргинина (n=70) либо блокатора фермента NO-синтазы – L-NNA (n=70).

В качестве донора молекул оксида азота (NO) использовалась аминокислота L-аргинин в дозе 200 мг/кг веса за 30 мин до иммобилизации и через 30 мин после окончания стрессорного воздействия. Блокатор фермента NO-синтазы – N-нитро-L-аргинин (L-NNA) в дозе 50 мг/кг вводился за 30 мин до начала иммобилизации и через 30 мин после окончания стрессорного воздействия для снижения продукции NO.

Для морфологического анализа забранный материал фиксировали в забуференном 10%-м нейтральном формалине и заливали парафином по общепринятой методике. Декальцинация блоков проводилась Трилоном Б. Срезы стандартной толщины (5 мкм) окрашивались гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван-Гизону. Морфометрическое исследование выполнялось с использованием измерительной сетки со 100 равноудаленными точками Г.Г. Автандилова для цито-гистостереометрических исследований, накладываемой на фотоснимок на экране монитора произвольно выбранного поля зрения [1]. Методом точечного счета определялись относительные объемы, занимаемые фибробластами, пульпоцитами, аморфным веществом, сосудами, коллагеновыми волокнами, сегментно-ядерными лейкоцитами. Подсчет производился в каждом случае в 20 различных полях зрения при увеличении микроскопа x100.

Полученные данные обрабатывались методом вариационной статистики с помощью программы Statistica 6.0 StatSoft. Различия между группами независимых количественных показателей определялась по U-критерию Манна–Уитни для непараметрических величин по формуле: $U = T - nM(nM+1)/2$, где T – сумма рангов наименьшей из сравниваемых групп. Уровень различий рассматривался как статистически значимый при $p < 0,05$ [4].

Результаты

Ранее нами установлено, что у крыс при эмоционально-болевым стрессе реакция гипофизарно-адреналовой

системы имеет фазный характер [2]. Первый период – от начала стрессорного воздействия и до 36 ч после его окончания – соответствует стадии тревоги и характеризуется повышением уровня кортикостерона в плазме крови крыс и развитием выраженной эозинопенической реакции. Второй период, соответствующий моменту перехода стадии тревоги в стадию резистентности, характеризуется пиком эозинофилии к 39 ч и снижением уровня кортикостерона до показателей контрольной группы. Третий период – начиная с 42 ч – соответствует стадии резистентности и характеризуется постепенной нормализацией биоритма эозинофилов и снижением уровня кортикостерона в крови экспериментальных животных до показателей, близких к норме.

Изменения структуры пульпы зубов и пародонта по степени и распространенности достигали максимальной выраженности к 39 ч после окончания стрессорного воздействия, что соответствует переходу стресс-реакции из стадии тревоги в стадию резистентности [3]. В пульпе зубов они характеризовались разрыхлением слоя одонтобластов, полнокровием, появлением мелких вакуолей. Одонтобласты в области разрыхления оказались деформированы. Данные изменения соответствовали состоянию гидропической (вакуольной, водяночной) дистрофии. Размеры, количество и расположение вакуолей какой-либо системы не имели. В ряде полей зрения встречались группы гиперхромных одонтобластов, которые обнаруживались только в области шейки на язычной поверхности зуба. Основное вещество пульпы отличалось очаговой базофилией и менее компактным расположением волокнистых структур, разделенных оптически пустыми более или менее широкими пространствами. Развившиеся преобразования свидетельствовали в пользу обратимой дезорганизации соединительной ткани – муконидного набухания. Выявленные изменения имели неравномерный характер, занимая не более трети площади пульпы в каждом зубе.

При морфологическом анализе тканей пародонта спустя 39 ч после окончания шестичасовой иммобилизации животных на спине установлено, что количество клеточных элементов периодонта возрастало по направлению к верхушке корня зуба и от центра периодонтальной щели к поверхности цемента. Основную массу клеток периодонтальной щели составляли фибробласты. Они, в основном, имели веретенообразную форму, иногда встречались отростчатые клетки. Наряду с этим наблюдалась миграция небольшого количества нейтрофильных лейкоцитов за пределы сосудов. В окружающей ткани определялся отек с увеличением пространств между коллагеновыми волокнами с некоторым набуханием последних.

Подводя итог результатам морфологического исследования пульпы и периодонта крыс через 39 ч после окончания шестичасовой иммобилизации, можно сделать вывод о развитии существенных гемодинамических расстройств, вызванных стрессом. Установленные нарушения проявлялись неравномерным артериальным и венозным полнокровием, гемостазом, диапедезными кровоизлияниями, умеренным лейкодиapedезом и макрофагальной реакцией. Выявленные структурные изменения были

обратимыми, без дальнейшей отрицательной динамики.

Решая следующие задачи работы, мы изучили возможности ограничения выраженности стрессорных повреждений тканей пульпы зубов и периодонта у животных оксидом азота (NO) путем введения доноров и блокаторов фермента NO-синтазы. Было установлено, что слой одонтобластов в пульпе зубов крыс третьей группы состоит из нескольких слоев. Одонтобласты имели преимущественно грушевидную форму, базофильную мелкозернистую цитоплазму, вытянутые и округлые ядра. В части полей зрения в пульпе резцов в области шейки с язычной поверхности зуба определялись немногочисленные одонтобласты с заметно гиперхромными ядрами. Состав, распределение и количество клеточных элементов центральных отделов пульпы в этой подгруппе мало отличались от таковых в группе сравнения. Сосудистая реакция в виде расширения сосудов и их полнокровия умеренной выраженности наблюдалась во всех случаях данной группы и была неравномерной. В артериях наблюдалось утолщение эндотелия. Сосуды венозной системы оказались расширены более значительно, местами отмечались гемостазы и краевое стояние нейтрофильных лейкоцитов.

В периодонте после стресса на фоне введения молекул оксида азота L-аргинина наблюдалось формирование сосудистого и клеточного ответа. Сосуды были расположены типично для нормального состояния периодонта, т.е. ближе к стенке альвеолы. Эндотелий сосудов не имел признаков дезорганизации, ядра эндотелиальных клеток по структуре не отличались от контроля. Во всех исследуемых группах отмечены полнокровие, диапедезные кровоизлияния и гемостазы. Однако после стрессорного воздействия кровенаполнение сосудов имело неравномерный, преимущественно умеренный характер. Кровоизлияния и стазы крови оказались немногочисленными и выявлялись в небольшом числе наблюдений. Явления стаза в сосудах наблюдались в основном в маргинальном отделе. В сосудах собственно периодонта выявлено краевое стояние нейтрофильных лейкоцитов. Ядра эндотелия в своем большинстве существенно не различались с ядрами нормального эндотелия сосудов периодонта. Целостность эндотелиальной выстилки сосудов не нарушалась.

Изменения клеточного состава характеризовались увеличением размера небольшого числа фибробластов, ядра которых были четко очерчены, а цитоплазма – легко базофильна. Вблизи цемента наблюдалось больше молодых фибробластов, с нечетко контурирующейся цитоплазмой и овальной формы ядрами. Выявлены единичные митозы фибробластов в периодонте, что свидетельствовало о высокой функциональной активности этих клеток. Вокруг кровеносных сосудов располагались единичные лимфоциты, плазмциты, нейтрофилы, эозинофилы. Граница между остеонным и безостеонным слоем альвеолы была четкой. В костной ткани ядра остеонцов располагались эксцентрично, часть костных лакунов оказалась свободной от клеток. По краю альвеолы безостеонный слой был неравномерной ширины, коллагеновые волокна проходили на всю его глубину, границы их различались. Четко прослеживалась и граница перехода

пучков коллагеновых волокон из периодонта в безостеонный слой.

Таким образом, сравнение структурных изменений тканей пульпы и периодонта крысы в условиях активации стресс-лимитирующих систем с контролем показало, что через 39 ч после стрессорного воздействия на фоне введения аминокислоты L-аргинина развиваются очаговая дистрофия одонтобластов, а также сосудистые реакции в виде неравномерного полнокровия, незначительных гемостазов, слабо выраженного лейкодиapedза, участков отека. Индуцированная активация фермента NO-синтазы позволила свести к минимуму гемодинамические расстройства и вызванные этим повреждения структурных компонентов исследуемых тканей.

В четвертой группе животных, которым вводился блокатор NO-синтазы L-NNA, морфологические изменения установлены во всех структурных компонентах пульпы и периодонта. Слой одонтобластов на большем протяжении имел неравномерную толщину, оказался разрыхлен, не обладая четкими границами, сливался с субодонтобластическим слоем. Одонтобласты в участках разрыхления деформировались, приобретали чрезмерно вытянутую и неправильную форму. Во многом это было связано с образованием многочисленных вакуолей, располагавшихся преимущественно в базальной части клеток. Вакуоли имели округлую форму, различную величину, местами сливались, формируя относительно крупные полости, выступающие за пределы слоя одонтобластов (баллонная дистрофия). Число и размер вакуолей оказались значительно больше, чем в других группах. Значительная часть одонтобластов характеризовалась более интенсивной базофилией цитоплазмы по сравнению с нормой.

Кровоизлияния занимали 9,3% площади среза. Трансудация жидкой части крови в основное вещество пульпы сопровождалась отеком основного вещества, который местами достигал выраженной степени. В результате этого часть пучков коллагеновых волокон, расположенных в центральных отделах пульпы, разволокнялась, а строма в целом имела неравномерную плотность. В этих полях зрения волокнистые структуры изменяли тинкториальные свойства в сторону базофилии, что служит проявлением мукоидного набухания. Пучки волокон располагались вдоль оси зуба или под небольшим углом к ней.

Эмиграция лейкоцитов подтверждалась их присутствием в небольшом количестве вблизи сосудов центральной части пульпы. Здесь определялись макрофаги, в цитоплазме которых имелись мелкие вакуоли. Макрофагальная реакция, выявленная у 57,5% животных, отличалась увеличением числа макрофагов в сравнении с другими группами.

При морфологическом исследовании периодонта крыс, подвергнутых иммобилизации, установлено, что после введения блокатора фермента NO-синтазы, так же, как и в контрольной группе, пучки коллагеновых волокон периодонта располагались разнонаправленно. Переплетаясь между собой, они образовывали сеть, пронизывали всю толщу цемента, обеспечивая соединение зуба с периодонтом. Границы коллагеновых волокон на всех уровнях имели не везде четкие контуры, что обусловлено неравномерной степенью выраженности отека. Цемент, подобно таковому в группе контроля, по строению оказался подобен безостеонному слою стенки альвеолы. Кровеносные сосуды располагались как параллельно длинной оси зуба, так и в виде спирали вокруг корня.

Таблица 1

Морфометрические показатели пульпы зуба крысы при иммобилизационном стрессе (M±m)

Структурные компоненты (%)	Контроль (n=20)	Через 39 ч после иммобилизации		
		Без премедикации (n=60)	На фоне введения L-аргинина (n=70)	На фоне введения L-NNA (n=70)
Пульпоциты	14,7±0,49	10,9±1,71	12,2±1,22	7,65±0,98
Аморфное вещество	31,4±0,54	40,1±0,83	34,6±0,73	38,45±0,91
Сосуды	13,1±0,77	19,5±0,65	16,3±0,67	29,7±0,74
Коллагеновые волокна и фибробласты	40,8±0,74	29,2±0,62	36,7±0,58	23,6±0,55
Сегментно-ядерные лейкоциты	0	0,3±1,31	0,2±1,23	0,6±1,54
Количество одонтобластов	8,5±1,87	8,1±1,24	8,2±1,24	6,2±0,53
Толщина слоя одонтобластов, мк	22,3±1,5	23,8±2,35	20,7±1,24	28,9±1,37
Высота одонтобластов, мк	11,4±1,11	13,9±2,08	9±2,24	13,5±1,03
Диаметр сосуда	24,8±2,05	32,3±1,04	29,6±1,24	35,4±1,06

Таблица 2

Морфометрические показатели пародонта крысы при иммобилизационном стрессе (M±m)

Структурные компоненты (%)	Контроль (n=20)	Через 39 ч после иммобилизации		
		Без премедикации (n=60)	Введение донора молекул оксида азота L-аргинина (n=70)	Введение блокатора фермента NO-синтазы L-NNA (n=70)
Аморфное вещество	25,9±0,45	31,4±0,35	28,5±0,54	37,6±0,39
Сосуды	7,8±0,81	14,9±0,43	10,8±0,69	21,4±0,69
Коллагеновые волокна и фибробласты	66,3±0,47	53,6±0,48	60,5±0,32	40,8±0,69
Сегментно-ядерные лейкоциты	0	0,1±1,13	0,2±1,14	0,2±1,69

Около альвеолярной кости определялась более густая сосудистая сеть. В маргинальных отделах периодонта наблюдались сосудистые изменения в виде неравномерной – от умеренной до выраженной – венозной гиперемии, признаков гемостаза, краевого стояния лейкоцитов с явлениями нарастающей клеточной эмиграции.

С целью объективизации полученных результатов в тканях пульпы и пародонта крыс при изучаемых вариантах стрессового воздействия осуществлен морфометрический анализ (табл. 1, 2).

Таким образом, в пульпе и периодонте крыс, подвергшихся иммобилизации на фоне введения блокатора фермента NO-синтазы, развивались очаги повреждения в слое одонтобластов и эндотелии сосудов с гибелью части их клеток. Гемодинамические расстройства сопровождались распространенными гемостоазами, различных размеров кровоизлияниями, отеком, лейкодиapedезом и макрофагальной реакцией. Данные изменения имели более выраженный, чем в других исследуемых группах характер, являясь частью необратимыми.

Заключение

Полученные результаты дают основания считать, что при длительном и тяжелом стрессорном воздействии, сопровождающемся сильным болевым и психоэмоциональным напряжением, в тканях пульпы и периодонта возникают распространенные гемоциркуляторные и очаговые альтеративные изменения. Это создает условия для развития воспаления и нарушения процессов репарации. Представленные нами данные показали, что использование доноров молекул оксида азота L-аргинина способствует ограничению стрессорного повреждения тканей пульпы зубов и периодонта при длительных эмоционально-болевых воздействиях.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии. – М.: Медицина, 1984. – 285 с.
2. Ермак Е.Ю., Париков В.В., Индюков В.В. Одонтогенный стресс. – Красноярск, 2003. – 189 с.
3. Ермак Е.Ю., Париков В.В., Малышев В.В. и др. Морфология пульпы зуба и тканей пародонта при остром иммобилизационном стрессе // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН (Иркутск). – 2000. – № 1 (10). – С. 66–69.
4. Кулаичев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows STADIA 6.0 – М.: Информатика и компьютеры, 1996. – 257 с.
5. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 992–1006.
6. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 1007–1019.
7. Малышев И.Ю., Монастырская Е.А., Смирин Б.В. и др. Гипоксия и оксид азота // Вестн. РАМН. – 2000. – № 9. – С. 44–48.
8. Манухина Е.Б., Машина С.Ю., Власова М.А. и др. Роль свободного и депонированного оксида азота в адаптации к гипоксии сердечно-сосудистой системы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – № 3 (11). – С. 4–11.
9. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика – М.: Наука, 1981. – 278 с.
10. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 4. – С. 485–503.
11. Петрович Ю.А., Терехина Н.А., Реук С.Э. и др. Проксиданты, мексидол и другие антиоксиданты при герпетическом стоматите, гингивостоматите и хроническом генерализованном пародонтите // Российский стоматологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 29–33.
12. Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю. и др. Депонирование оксида азота как фактор адаптационной защиты // Рос. физиол. журн. им. И. Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 4. – С. 447–454.
13. Сухова Т.В. Особенности свободнорадикального окисления, антиоксидантной защиты и состояния нервной системы у больных хроническим генерализованным пародонтитом: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2000. – 40 с.
14. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1411 (2–3). – P. 351–369.
15. Cabrera C., Bohr D. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 206. – P. 77–81.

Поступила 03.06.2011