

Ю.О. Бурега

Кафедра пропедевтичної та хірургічної стоматології ЗДМУ

**СТАНОВЛЕННЯ ТА РЕАКТИВНІСТЬ СТРУКТУР ПЕРІОДОНТУ
ЩУРІВ В РАНЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ
ВНУТРІШНЬОУТРОБНОЇ АНТИГЕННОЇ ДІЇ**

Робота є фрагментом НДР кафедри анатомії людини, оперативної хірургії і топографічної анатомії і кафедри гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету «Лектингістохімічна характеристика морфогенезу органів і тканин в ранньому постнатальному періоді в нормі і експерименті» (2008-2013, № держ. реєстрації 0109U 003986).

Ключові слова: періодонт, фібробласт, щурі, лімфоцит, антиген.

Вступ. Захворювання пародонту являють собою патологічні стани, що вражають понад 90% населення із залученням порушень на рівні структур, що реалізують функцію підтримуючого апарату зуба. Імунна система організму складається з вродженого та набутого імунітету, що спроможній забезпечити захист періодонтальної тканини від дії антигенів та визначається як місцевий імунітет. Даний процес, насамперед, контролюється імунокомпетентними клітинами – лімфоцитами [8,9]. Одночасно існує ряд питань, які потребують нового рішення та уточнення деяких теоретичних уявлень про роль лімфоцитів, як регулятора механізмів становлення, розвитку та реактивності структур періодонту. До цього часу недостатньо вивчені процеси проліферації, диференціювання та функціональної активності клітин сполучної тканини періодонтального простору, можливі їх співвідношення, що дозволить в значній мірі поглибити знання не тільки про структуру періодонту, але й про механізми місцевої імунної відповіді на дію антигену. Проведення досліджень в галузі імуноморфології є пріоритетним напрямком науки. Однією зі складових цього напрямку є вивчення морфології та реактивності періодонту, як імунного бар'єру в ранньому постнатальному періоді в нормі та після внутрішньоутробної антигенної дії, що має першочергове значення для створення ефективних методів етіопатогенетичного впливу на захворювання пародонту і вдосконалення методів ефективної терапії.

Мета дослідження. Встановити особливості формування та реактивності структур періодонту щурів в ранньому постнатальному періоді після внутрішньоутробної антигенної дії.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводились на 224 щелепах 112 білих лабораторних щурів. Тварини були розділені на 3 групи: 1 група – інтактні щури, 2 група – щури, яким на 18-ту добу плідного розвитку введено 0,05 мл розчину антигену в навколоплідні води, 3 група – контрольна, тваринам якої на 18-ту добу плідного розвитку виконано навколоплідне введення 0,9% розчину хлориду натрію. Для вивчення

особливостей морфогенезу структур періодонту, на тлі дії антигену на плід обрано модель черезматкового черезоболонкового введення антигену в навколоплідні води [5]. Забій тварин здійснювали на 1-шу, 5-ту, 7-му, 11-ту, 14-ту, 30-ту, 45-ту добу постнатального життя. Фрагменти щелеп брали на рівні молярів. Підрахунок клітин (фібробласти, фіброцити, лімфоцити) проводили за допомогою модифікованої окулярної сітки Глаголева на умовній одиниці площі з перерахуванням отриманих даних на 10000 мкм². Забарвлення гематоксиліном та еозіном. Збільшення мікроскопа – (ок. 10х, об 100х). Вираховували співвідношення і фібробласт-фіброцит, фібробласт-лімфоцит у структурах періодонтального простору. PNA⁺ лімфоцити виявлялись за допомогою лектингістохімічної реакції з застосуванням лектину арахісу (PNA). Візуалізацію ділянок зв'язування лектину проводили у системі діамінобензидин-перекис водню. При роботі з експериментальними тваринами керувалися «Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.1986). Обробку отриманих числових результатів проводили за допомогою статистичних методів з використанням комп'ютерної програми STATISTICA[®] for Windows 6.1 (StatSoft Inc., США, № ліцензії AXXR712D833214FAN5). Порівнювані результати вважали достовірними при $p < 0,05$, що є загальноприйнятим для біологічних і медичних досліджень.

Результати дослідження та їх обговорення. У новонароджених інтактних тварин структури періодонту знаходяться на стадії органогенезу. На гістологічних зрізах періодонт представлений концентрично розташованими клітинами з фенотиповими ознаками фібробластів. Ширина періодонтального простору в антигенпреміюваних тварин достовірно менша. В інтактній групі щурів дентин кореня зуба візуалізується еозинофільною смужкою, розташованою між рядами фібробластів, що відмежовує фібробласти періодонту від фібробластів пульпи зуба. В експериментальних тварин структури кореня не сформовані. Отримані дані вказують на затримку формування і становлення періодонту та кореня зуба у тварин, які зазнали дії антигену в антенатальному періоді. На 5-ту добу життя в експериментальних тварин встановлено різке підвищення проліферативної активності та диференціювання фібробластів у періодонтальному просторі, про що свідчить збільшення ширини періодонту, в порівнянні з попереднім строком спостереження, і зменшення різниці між результатами антигенпреміюваних та інтактних тварин. В інтактній групі щурів 5-ої доби життя продовжують активно формуватись структури кореня зуба, на що вказує поява цементу на фоні майже п'ятикратного збільшення ширини, що займає дентин, відносно новонароджених. У вакцинпреміюваних тварин ширина дентину достовірно зменшена, а цемент кореня зуба не сформований, що відображає виникнення дисбалансу в процесах формування і становлення структур періодонту після дії антигенів. На 7-му добу післянатального розвитку не виявлено різниці в показниках досліджуваних структур між антигенпреміюваними та інтактними тваринами. Це означає, що в експериментальній групі щурів

активність проліферативних процесів знижується відносно інтактної групи. Після переходу тварин на змішаний тип харчування значно зростає навантаження на опорно-утримуючий апарат зуба, що призводить до компенсаторного покращення васкуляризації та посилення секреторної функції фібробластів, збільшення кількості колагенових волокон і, як наслідок, – збільшення ширини періодонту на 30% відносно попереднього терміну спостереження. Різниці в показниках між інтактною та антигенпреміюваною групою не виявлено. У експериментальних тварин не встановлено змін у формуванні структур періодонту та кореня зуба, що дозволяє забезпечити стабільність зуба при підготовці зубо-щелепного сегменту до вживання твердої їжі. З переходом на природний тип харчування значно зростає навантаження на періодонт, збільшується ширина періодонтального простору, що забезпечує нормальне функціонування пародонту в умовах підвищеного механічного впливу. На 45-ту добу життя в усіх групах спостереження виявляється остаточне формування кістки альвеоли, збільшення ширини періодонтального простору, посилення васкуляризації, відбувається потовщення і просторова орієнтація волокон періодонту. Отримані в роботі результати щодо формування структур періодонту частково співпадають з даними щодо формування капсули кульшового та колінного суглобу після внутрішньоутробної дії антигенів не вірусної природи, отриманих в роботах [3,7], та відображають реактивність сполучної тканини на дію антигену в антенатальному періоді.

Для вивчення механізмів порушення формування, становлення та диференціювання структур періодонту і кореня зуба на фоні дії антигенів було проведено аналіз їх клітинного складу. У новонароджених антигенпреміюваних тварин кількість періодонтальних фібробластів менша, порівняно з інтактною групою, і складає $206,1 \pm 1,4$, фіброцитів – $0,2 \pm 0,07$, відповідно. Проте вміст лімфоцитів серед клітин періодонту достовірно вищий ($8,1 \pm 0,1$). Фібробластно-лімфоцитарний коефіцієнт в групі експериментальних тварин нижчий від коефіцієнта інтактної групи і дорівнює 25,4 відносно 31,7. Таким чином, при вивченні клітинної складової періодонтального простору виявлено статистично вірогідне підвищення кількості лімфоцитів у групі експериментальних тварин з 1-ї до 7-ї доби життя порівняно з інтактною групою. Динаміка вмісту лімфоцитів у періодонті протягом досліджуваних термінів знаходиться у взаємозв'язку з показниками кількості фібробластів, про що свідчать зміни значень фібробластно-лімфоцитарного коефіцієнта. Встановлено, що кількість фібробластів і фіброцитів періодонтального простору характеризується зворотно-пропорційною залежністю у бік зменшення в період новонародженості, а потому – компенсаторне зростання їх чисельності у вакцинпреміюваних щурів, починаючи з 5-ї до 14-ї доби життя в порівнянні з інтактними тваринами.

В періодонті щурів, спостерігається хвилеподібна динаміка розподілу PNA+ лімфоцитів. З періоду новонародженості до 7-ї доби післянатального життя відмічається збільшення вмісту PNA+ лімфоцитів. Проте, в групі

антигенпреміюваних тварин їх кількість достовірно вища ($4,2 \pm 0,1$, $p < 0,05$) порівняно з тваринами інтактної групи. З 11-ї до 14-ї доби післянатального розвитку у сполучній тканині періодонтального простору виявляється різке зменшення вмісту PNA+ лімфоцитів у всіх групах тварин, але у вакцинпреміюваних тварин кількість PNA+ лімфоцитів залишається дещо вищою. В структурах періодонту до 45-ї доби включно зберігається тенденція поступового зниження кількості лімфоцитів із залишками β -D-галактози. Вміст PNA+ лімфоцитів на момент закінчення експерименту в усіх групах щурів не відрізняється. Схожа динаміка розподілу PNA+ лімфоцитів в сполучній тканині була описана раніше в роботах [3,4,7], і підтверджує роль лімфоцитів в морфогенезі органів.

Згідно концепції «Лімфоцит – фактор морфогенезу» [1,2], вплив антигенного навантаження в антенатальному періоді призводить до міграції з тимуса плодів імунологічно незрілих PNA+ лімфоцитів, які не гинуть, а надходять в лімфоїдні та нелімфоїдні органи. У цих органах змінюються темпи і терміни формування місцевої імунної системи та становлення морфофункціональних одиниць на фоні збільшеного вмісту лімфоцитів, що неодноразово підтверджувалось різними авторами [2,3,4].

Таким чином антигенне навантаження в антенатальному періоді приводить до збільшення вмісту лімфоцитів, а серед них PNA+ лімфоцитів у структурах періодонту. Достовірне збільшення кількості незрілих лімфоцитів призводить до зміни мітотичної активності клітин та порушенню співвідношення «фібробласт – фіброцит», що впливає на синтетичну активність фібробластів та неспроможність забезпечувати механічний бар'єр в структурах періодонту, і, як наслідок, до неповноцінної реалізації амортизуючої та сенсорної функцій під час навантажень. Описані зміни можуть бути підґрунтям для виникнення запальних процесів, порушення формування щелеп і, в подальшому, – прикусу у дітей.

ВИСНОВКИ

1. У новонароджених антигенпреміюваних щурів імунна система структур періодонтального простору представлена малими, середніми та великими лімфоцитами, Т-лімфоцитами, та імунологічно незрілими PNA+лімфоцитами.
2. Імунологічно незрілі лімфоцити зникають протягом 14 діб після народження.
3. Внутрішньоутробний вплив антигену призводить до збільшеного вмісту PNA+лімфоцитів, що супроводжується змінами мітотичної активності клітин та порушенню співвідношення «фібробласт – фіброцит» протягом першого тижня після народження.
4. Різниця в кількісному складі лімфоцитів, а також співвідношення «фібробласт – фіброцит» структур періодонтального простору, після введення антигену, нівелюється на 30-ту добу постнатального розвитку.

Перспективи подальших розробок. Враховуючи зміни темпів у формуванні та становленні структур періодонту, збільшення кількості внутрішньоепітеліальних лімфоцитів, підвищення мітотичної активності

клітин в групі антигенпреміюваних тварин, для вивчення змін синтетичної активності фібробластів на тлі дії антигену в антенатальному періоді, виникла необхідність вивчити особливості розподілу вуглеводовмісних сполук у структурах періодонтального простору.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волошин Н. А. Лимфоцит – фактор морфогенеза / Н. А. Волошин // Запорожский медицинский журнал.– 2005.– № 2.– С. 122.
2. Волошин Н. А. Внутриутробная антигенная стимуляция как модель для изучения морфогенеза органов / Н. А. Волошин, Е. А. Григорьева, О. Г. Куц [и др.] // Морфологические ведомости.– 2006.– № 1 – 2.– С. 57 – 59.
3. Григор'єва О. А. Експериментальне моделювання синдрому недиференційованої дисплазії сполучної тканини шляхом порушення антигенного гомеостазу в системі мати-плацента-плід / О. А. Григор'єва, М. А. Волошин // Патологія. – 2011. – Т. 8, № 2. – С. 39–42.
4. Куц О. Г. Методика вивчення популяції $\gamma\delta$ -Т-лімфоцитів із використанням панелі лектинів / О. Г. Куц, М. А. Волошин // Вісник морфології. – 2010. – № 16 (1). – С. 76–81.
5. Пат. 63020 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання внутрішньоутробної дії антигенів / Волошин М.А., Матвейшина Т.М., Грінівецька Н.В., Бурега Ю.О., Таланова О.С.; заявник та патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. –№01 02218 ; заявл. 25.02.11 ; опубл. 26.09.11, Бюл. №18.
6. Сырцов В. К. Периферические органы иммунной системы / В. К. Сырцов, Н. А. Волошин, Е. Г. Алиева // Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. – 2011. – Вип. XXIV, № 1. – С. 8–11.
7. Федотченко А. В. / Особливості розподілу колагенових волокон І-го та ІІІ-го типів в капсулі кульшового суглобу в постнатальному періоді А. В. Федотченко, О. О. Молчанов, А. В. Ситова // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики.– 2010.–Т. 2.– С. 21.
8. Raayan A. Kayal. (2013) The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. Published online 2013 Sep 17.doi: 10.1155/2013/639368.
9. Sansonetti PJ et al. (2011) Antigen-specific CD8(+) T cells fail to respond to Shigella flexneri. Infect Immun. 2011 May;79(5):2021-30. doi: 10.1128/IAI.00939-10. Epub 2011 Feb 28.

Стаття надійшла до друку: 21.05.2015 р.

Ю.О. Бурега

Кафедра пропедевтичної та хірургічної стоматології ЗДМУ

СТАНОВЛЕННЯ ТА РЕАКТИВНІСТЬ СТРУКТУР ПЕРІОДОНТУ ЩУРІВ В РАНЬОМУ ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОЇ АНТИГЕННОЇ ДІЇ

Структури періодонту в нормі забезпечують високий механічний опір жувальному навантаженню при вживанні твердої їжі. Антигенна дія в

антенатальному періоді призводить до збільшення вмісту лімфоцитів, а серед них PNA+ лімфоцитів у структурах періодонту. Достовірне збільшення кількості незрілих лімфоцитів викликає зміни мітотичної активності клітин та порушенню співвідношення «фібробласт – фіброцит», що впливає на синтетичну активність фібробластів та неспроможність забезпечувати механічний бар'єр в структурах періодонту, і, як наслідок, до неповноцінної реалізації амортизуючої та сенсорної функцій під час навантажень. Описані зміни можуть бути підґрунтям для виникнення запальних процесів та неопластичних процесів при дії навіть непатогенних чинників, порушення формування щелеп і, в подальшому, – прикусу у дітей.

Ключові слова: періодонт, фібробласт, щурі, лімфоцит, антиген.

Ю.А. Бурега

Кафедра пропедевтической и хирургической стоматологии

**РАЗВИТИЕ И РЕАКТИВНОСТЬ СТРУКТУР ПЕРИОДОНТА КРЫС В
РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ
ВНУТРИУТРОБНОГО АНТИГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ**

Структуры периодонта в норме обеспечивают высокую механическую защиту пародонта. Антигенная нагрузка в антенатальном периоде приводит к увеличению содержания лимфоцитов, а среди них PNA + лимфоцитов в структурах периодонта. Достоверное увеличение количества незрелых лимфоцитов приводит к изменению митотической активности клеток и нарушению соотношения «фибробласт - фиброциты», что влияет на синтетическую активность фибробластов и неспособность обеспечивать механический барьер в структурах периодонта, и, как следствие, к неполноценной реализации амортизирующей и сенсорной функций во время нагрузок. Описанные изменения могут быть основанием для возникновения воспалительных процессов и неопластических процессов при воздействии даже непатогенных факторов, нарушение формирования челюстей и, в дальнейшем, - прикуса у детей.

Ключевые слова: периодонт, фибробласт, лимфоцит, крысы, антиген.

Yu. Burega

Department of Dental Propedeutic and Surgery Dentistry

**DEVELOPMENT AND REACTIVITY OF RAT'S PERIODONTAL
STRUCTURES IN EARLY POSTNATAL PERIOD AFTER FETAL
ANTIGEN ACTION**

Aim - to determine the condition and reactivity features of rats' periodontal structures in early postnatal period in normal and after fetal antigenic action

The object of the research was 224 jaws specimen of white laboratory rats. Rats divided into three groups. First group is intact rats. Second group is rats, which were introduced 0,05 ml solution of antigen in the amniotic fluid on the 18th day of pregnancy [1], the third group – control, the animals were introduced intrauterine 0,05 ml of physiological solution on the 18th day of pregnancy. For the study of gums formation features after antigen's action on the fetus, chosen the

model of transuterine, transmembrane introduction of antigen in amniotic waters [1,2]. The antigen was rare (killed) split - vaccine Vaxigrip 2009. Keeping the animals and experiments were carried out accordingly to regulations of European convention about the defense of spine animals', which are used due to the experimental and other scientific aims (Strasbourg, 18.03.86), law of Ukraine "Animal Protection from Cruel Appeal" (№ 1759 from 15.09.2009). The animals' killing and taking of the material done from 13-00 till 14-00 on the 1st, 5th, 7th, 11th, 14th, 30th, 45th day of postnatal life. Processing of the obtained numerical results conducted through statistical methods - STATISTICA® for Windows 6.1 (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Comparison of variables performed using Student's test. To verify existence of relationship between obtained variables used correlation analysis (Pearson coefficient of correlation). The difference between the variables was considered statistically significant at the $p \leq 0,05$.

Thus, antigenic antenatal influence leads to the lymphocytes increase content and among its PNA+ lymphocytes in periodontal structures. Significant quantity increase of immature lymphocytes leads to changes of cells mitotic activity and to violation correlation "fibroblast – fibrocyte", that influence on fibroblasts synthetic activity and disability to provide mechanical barrier in periodontal structure and to inadequate realization of cushioning and sensory functions during loads. Described changes can be a basis for appearance of inflammation processes, jaw formation infringement and, in the future – kids malocclusion.

Key words: epithelial cells, lymphocytes, gums, rat, antigen.