

## УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ В НЕРВАХ ЯСЕН У ЩУРІВ ЗІ СПОНТАННОЮ АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ ТА ЇХ МОДИФІКАЦІЇ В УМОВАХ ЗАСТОСУВАННЯ ФАРМАКОТЕРАПІЇ

Надійшла 29.11.12

У щурів лінії SHR з вираженою артеріальною гіпертензією досліджували ультраструктурні зміни в нервових елементах ясен, а також модифікації таких змін у групах тварин з фармакологічною корекцією гіпертензії за допомогою біпрололу, тіотриазоліну та кверцетину. У тварин з підвищеним артеріальним тиском виявлені значні ультраструктурні розлади в мієлінізованих нервових волокнах та інтенсивні апоптотичні зміни нейролемоцитів. У цій ситуації застосований з лікувальною метою тіотриазолін продемонстрував істотну інгібіторну дію щодо апоптозу та нейропротекторні властивості.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** нерви ясен, артеріальна гіпертензія, біпролол, тіотриазолін, кверцетин, ультраструктурні модифікації, апоптоз.

### ВСТУП

Артеріальна гіпертензія є провідним симптомом низки надзвичайно поширених захворювань серцево-судинної системи. Стабільне підвищення артеріального тиску супроводжується судинно-нервовою дистрофією в багатьох тканинах. Така патологія в тканинах пародонта часто призводить до розвитку генералізованого пародонтиту і втрати зубів, причому це відбувається у людей соціально активного віку [1]. Впровадження в останні роки нових бета-адреноблокаторів для лікування артеріальної гіпертензії дозволило досягати ефективного зниження артеріального тиску, але не дало змоги повністю уникати розвитку супутніх негативних (у тому числі нейродегенеративних) змін в органах і тканинах організму [2].

Нейродегенеративні зміни в тканинах ротової порожнини і, зокрема, в нервовому апараті ясен у пацієнтів з артеріальною гіпертензією продовжують залишатися проблемою, що заслуговує на значну увагу нейрофізіологів і клініцистів. У зв'язку із викладеним визначення перспектив застосування тих або інших видів фармакоterapiї для зменшення кількості та виразності небажаних ускладнень у перебігу лікування артеріальної гіпертензії, в числі котрих значне місце посідає генералізований пародонтит, є, безумовно, актуальним [3–6].

При цьому доцільним виглядає тестування ефективності застосування бета-адреноблокаторів у комплексі з препаратами, які відносять до групи так званих метаболічних агентів.

Вважається, що зручною та адекватною моделлю для тестування антигіпертензивних ефектів лікарських засобів є спонтанна артеріальна гіпертензія (САГ) у щурів лінії SHR, яка значною мірою відповідає особливостям артеріальної гіпертензії у людей [7, 8]. Зважаючи на викладене вище, ми визначили ультраструктурні зміни в нервах ясен у щурів із САГ. Такі зміни вивчалися у тварин, що не піддавалися будь-якій фармакоterapiї, а також у SHR-щурів, яким вводили бета-адреноблокатор біпролол або окремо, або в комплексі з метаболічними препаратами кверцетином і тіотриазоліном.

### МЕТОДИКА

Дослідження було виконано на 60 молодих статевозрілих (вік 100 діб) щурах-самцях лінії SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) та окремій групі із п'яти нормотензивних щурів лінії WKR (normotensive Wistar-Kyoto Rats) такого самого віку. Тварини із САГ були поділені на шість груп по 10 щурів у кожній. Перша група була контрольною, щурам другої групи вводили біпролол, третьої – тіотриазолін, четвертої – кверцетин. Твари-

<sup>1</sup> Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ (Україна).

Ел. пошта: Timur\_X007@i.ua (О. В. Черкасова).

нам п'ятої групи вводили біпролол у комплексі з кверцетином, а шостої – біпролол з тіотриазоліном.

Біпролол (інша назва – бісопролол) є високо-ефективним кардіоселективним бета-адреноблокатором [7], гіпотензивна дія якого після одноразового введення триває протягом доби, причому фізіологічний циркадний ритм артеріального тиску зберігається. Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаоксифлавонон) є флавоноїдною сполукою рослинного походження із широким спектром позитивних фармакологічних (зокрема, антиоксидантних) ефектів [3]. Тіотриазолін (морфоліній-3-метил-1,2,3-триазолін-5-міацетат) є синтетичним метаболітним препаратом антиоксидантної та протиішемічної дії [4].

Всі зазначені фармакологічні препарати додавали до їжі (тіотриазолін та кверцетин у дозах 25, біпролол – у дозі 20 мг/кг). Тривалість досліду складала 90 днів. У всіх щурів до початку експерименту і через 90 днів вимірювали артеріальний тиск (мм рт. ст.) на хвостовій артерії за допомогою відповідного приладу. Вірогідність різниць між досліджуваними показниками оцінювали за критерієм Ст'юдента; такі різниці вважали вірогідними при  $P < 0.05$ .

Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили у відповідності до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), а також положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей (Страсбург, 1985).

Забір матеріалу (біоптатів тканин ясен) для наступного електронномікроскопічного дослідження здійснювали під ефірним наркозом. Отримані зразки обробляли за загальноприйнятою методикою. Дослідження було виконано на базі відділу електронної мікроскопії (науковий керівник – проф. Л. О. Стеченко) Інституту проблем патології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця МОЗ України. Ультратонкі зрізи вивчали під електронним мікроскопом при збільшеннях на екрані від 2000 до 30000 та фотографували.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

До початку експерименту артеріальний тиск у нормотензивних щурів становив у середньому  $104.5 \pm 5.5$  мм рт. ст. і практично не змінювався по закінченню терміну спостережень (через 90 днів –  $108.6 \pm 5.6$  мм рт. ст.). У щурів із САГ першої (контроль-

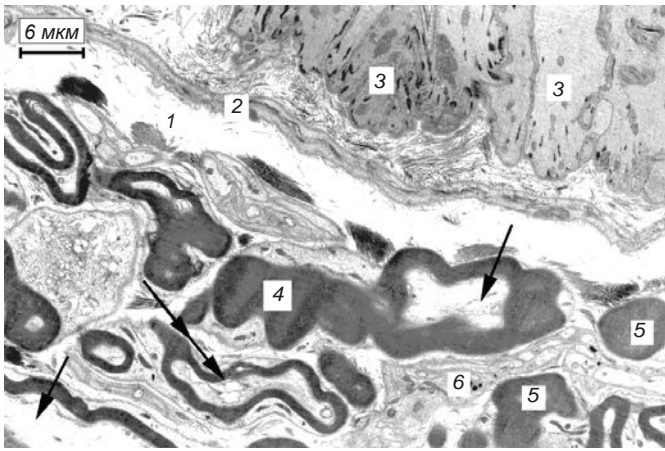
ної) групи артеріальний тиск дорівнював  $152.5 \pm 5.5$  мм рт. ст. і також майже не змінювався через 90 днів ( $157.2 \pm 5.3$  мм рт. ст.). Ці обидва значення були істотно вищими, ніж відповідні показники у нормотензивних щурів ( $P < 0.05$ ). Застосування біпрололу протягом 90 днів (друга група) призводило до зменшення середнього значення артеріального тиску із  $148.5 \pm 6.5$  (перша доба експерименту) до  $120.5 \pm 5.5$  мм рт. ст. Таке зменшення артеріального тиску у щурів із САГ в умовах застосування біпрололу було статистично вірогідним. Ізольоване застосування тіотриазоліну та кверцетину (третья та четверта групи) не впливало статистично значуще на показники артеріального тиску у щурів із САГ.

У власній пластинці слизової оболонки ясен нормотензивних щурів виявлялися дрібні гілки нервів, до складу яких входили безмієлінові або/та мієлінізовані волокна. Периневрій був побудований з одного-двох шарів епітеліоїдних клітин видовженої і плоскої форми, розташованих у дублікатурі розвинутої базальної мембрани та з'єднаних щільними контактами. У цитоплазмі клітин периневрія спостерігалися численні піноцитозні пухирці. Поверхня нервових волокон також була вкрита базальною мембраною. Між зовнішньою базальною мембраною та базальною мембраною периневрія розташовувався щілиноподібний периневральний простір, заповнений колагеновими волокнами. Колагенові волокна також були розподілені в епіневрії (між нервовими волокнами).

Поблизу зазначених нервів можна було спостерігати макрофаги, цитоплазма яких мала помірну електронну щільність і була заповнена окремими вакуолями, дрібними первинними лізосомами та численними вторинними лізосомами різних розмірів і різної електронної щільності.

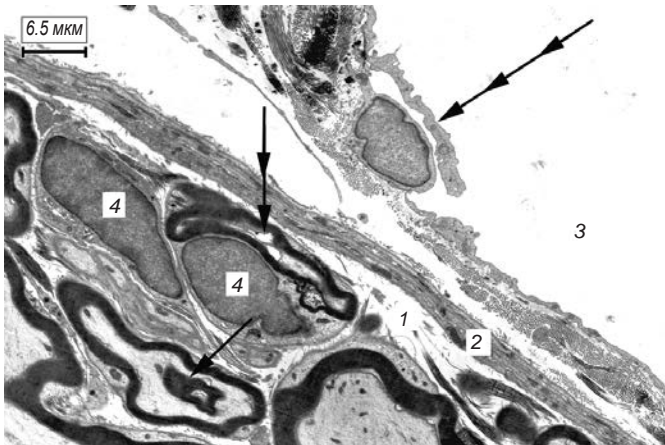
Для нервів ясен щурів із САГ першої (контрольної) та четвертої (щури, які одержували тільки кверцетин) SHR-груп характерними були значний ендоневральний та більш виражений периневральний (точніше, субпериневральний) набряки. Ультраструктура мієлінізованих волокон демонструвала значні зміни порівняно з нормою; у той же час модифікації в безмієлінових нервових волокнах були відносно помірними.

Особливо виразним виглядав субпериневральний набряк у паравазальних нервах ясен щурів першої (контрольної) групи. Периневральний простір у цих випадках був різко розширеним у ділянці прилягання до аномально скорочених (з контрактурними змінами) міоцитів артерій та артеріол (рис. 1)



**Р и с. 1.** Ультраструктурні зміни в періартеріолярному нерві ясен щура лінії SHR першої (контрольної) групи. 1 – периневральний простір; 2 – периневрій; 3 – міоцити артеріоли; 4 – сегментація потовщеної ділянки мієлінової оболонки; 5 – відокремлені фрагменти мієлінової оболонки; 6 – безмієлінове нервово волокно. Стрілками відмічені зони тотального лізису мікротрубочок і нейрофіламентів осьового циліндра, подвійною стрілкою позначені вакуолі в аксоплазмі осьового циліндра.

і доволі помірним у ділянці прилягання до стінки лімфатичних капілярів чи лімфатичних посткапілярів (останні відрізнялися від лімфатичних капілярів тільки наявністю клапанів) (рис. 2). Ступінь ультраструктурних змін мієлінізованих нервових волокон виглядав зумовленим ступенем субпериневрального набряку і в періартеріальних та періартеріолярних нервах залежав від стану міоцитів (їх надмірного або помірного скорочення) стінок артерій та артеріол.



**Р и с. 2.** Ультраструктурні зміни в перилімфатичному нерві ясен щура першої (контрольної) групи. 3 – просвіт лімфатичного посткапіляра; 4 – ядро нейролемоцита. Потрійною стрілкою відмічений відокремлений фрагмент мієлінової оболонки в аксоплазмі осьового циліндра. Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.

Домінуючими змінами у щурів першої та четвертої груп було порушення конфігурації мієлінізованих нервових волокон та їх осьових циліндрів. Поздовжні перетини таких волокон переважно мали „хвилясту” форму завдяки наявності випинань та інвагінацій (рис. 1). Внутрішній і зовнішній контури мієлінових оболонок були, як правило, чіткими та рівними і (у більшості випадків) конгруентними один щодо одного (рис. 2; 3). Товщина мієлінової оболонки по периметру волокна варіювала; її потовщені ділянки були сегментованими (рис. 1). Відокремлені фрагменти можна було бачити як в ендоневральній сполучній тканині, так і в цитоплазмі осьового циліндра (рис. 2). У більшості мієлінізованих нервових волокон визначався помітний періаксолемальний набряк з появою вакуолей. Останні були переважно видовженої форми та заповнені електроннопрозорим вмістом. Такі вакуолі відтісняли осьові циліндри або глибоко проникали в їх цитоплазму (рис. 2; 3). У деяких осьових циліндрах порушувалась орієнтація мікротрубочок і нейрофіламентів та спостерігався їх локальний або навіть тотальний лізис (рис. 1).

У щурів першої та четвертої груп ультраструктура більшості безмієлінових нервових волокон зазнавала мінімальних змін. Лише в деяких із них спостерігалися вогнищеве просвітлення аксоплазми та різке розширення цистерн агранулярного ендоплазматичного ретикулула. Нейролемоцити (клітини Шванна) не демонстрували істотних морфологічних змін. Ядра лемоцитів найчастіше мали округлу або овальну форму з поодинокими негли-



**Р и с. 3.** Вакуолі (відмічені стрілками) в аксоплазмі осьового циліндра мієлінових волокон нерва ясен щура третьої групи. 1 – ядро нейролемоцита.

бокими інвагінаціями. Однорідний дрібногранулярний хроматин середньої електронної щільності був рівномірно розподілений по перетину ядер. В окремих нейролемоцитах спостерігалися розширення і деформація елементів апарату Гольджі, дегрануляція цистерн ендоплазматичного ретикулума та їх вакуольна трансформація, локальне руйнування мітохондріальних крист, порушення цілісності внутрішньої мітохондріальної мембрани.

Застосування біпрололу (ізольоване або в комплексі із кверцетином, друга та п'ята групи щурів) в істотній мірі знімало явища субпериневрального та ендоневрального набряку мієлінізованих волокон, але натомість з'являлися грубі зміни клітин периневрія, мієлінових оболонок, осьових циліндрів та нейролемоцитів.

У нервах ясен щурів другої та п'ятої груп відмічалася деградація (аж до повного зникнення) базальної мембрани, що в нормі оточує кожний шар периневральних клітин. Такі ж самі процеси відбувалися з базальною мембраною окремих нервових волокон (рис. 4; 5). У тих ділянках нервів, де клітини периневрія перебували в стані розпаду, периневрій як такий був повністю зруйнованим.

Товщина і конфігурація мієлінової оболонки порушувалися, її внутрішній і зовнішній контури часто втрачали конгруентність. При цьому мієлінові оболонки дисоціювалися; у них були наявними міжламелярні щілини різних розмірів (рис. 4, А). На окремих ділянках таких оболонок на тлі деформації спостерігалася гомогенізація пластинок, які втрачали чіткість, а самі оболонки набували „повстеподібного” різко осміофільного вигляду. В інших ді-

лянках мієлінових оболонок формувалися відносно відокремлені фрагменти з концентрично розміщеними пластинками.

У мієлінових оболонках утворювалися численні глибокі інвагінації, які відшнуровувалися та особливо вирізнялися в аксоплазмі осьових циліндрів на тлі тотального лізису мікротрубочок і нейрофіламентів (рис. 5). Деякі глибокі інвагінації мієлінової оболонки мали галузистий вигляд і відтискали аксони або розділяли їх на окремі фрагменти (клазмосоми) (рис. 4, А).

В аксоплазмі осьових циліндрів нервових волокон спостерігалися локальні підвищення електронної щільності гіалоплазми та збільшення ступеня структурованості (підвищення осміофільності) мікротрубочок і нейрофіламентів (рис. 4, А). У більшості осьових циліндрів тонка організація цитоскелета порушувалася, а в окремих циліндрах визначався тотальний лізис мікротрубочок і нейрофіламентів (рис. 5).

У безмієлінових нервових волокнах аксоплазма мала нерівномірну електронну щільність. У межах окремих ділянок кількість мікротрубочок і нейрофіламентів була різко зниженою.

Нейролемоцити нервів щурів другої та п'ятої експериментальних груп демонстрували виразні апоптотичні зміни (рис. 4, Б). Ранніми морфологічними проявами останніх є ущільнення ядра, конденсація та зморщений вигляд цитоплазми [9, 10]. У подальшому суперконденсований осміофільний хроматин утворює в ядрі скупчення у вигляді звивистих пластів. Ядра апоптотичних нейролемоцитів були деформованими з наявністю глибоких інвагінацій та перетяжок, які на пізніших стадіях

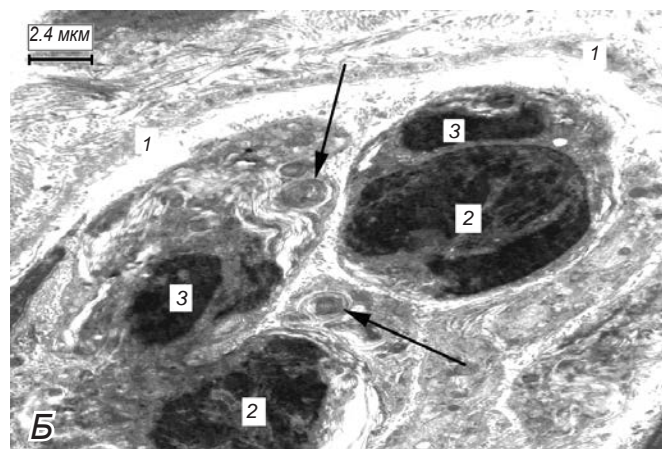


Рис. 4. Ультраструктурні зміни у нерві ясен щура четвертої групи.

На А: 1 – підвищення структурованості мікротрубочок і нейрофіламентів осьового циліндра. Стрілкою відмічений фрагмент мієлінової оболонки з концентрично розміщеними пластинками. На Б: 1 – залишки зруйнованого периневрія; 2 – ядро апоптотичного нейролемоцита; 3 – фрагмент ядра апоптотичного тіла, що формується. Стрілками відмічені фрагменти осьового циліндра.

фрагментувалися. Випини ядра відшнуровувалися (зі збереженням ядерної оболонки). Внаслідок цього ядра розділялися на декілька частин, кожна з яких вміщувала брилки суперконденсованого хроматину (Б). Локуси конденсованої цитоплазми в ділянках групування органел (разом з фрагментами ядра) відокремлювалися з формуванням обмежених мембраною апоптозних тіл.

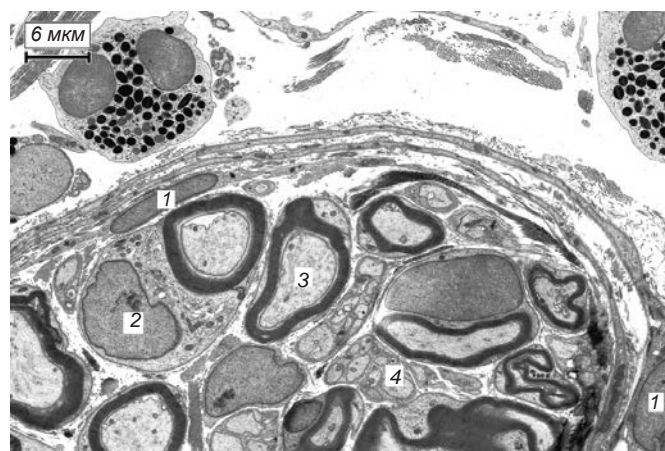
Поділені на апоптозні тіла нейролемоцити, класомосомальні залишки осьових циліндрів та фрагменти мієлінової оболонки через зруйнований периневрій потрапляли в аморфний матрикс сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки ясен і, очевидно, піддавалися фагоцитозу. Про це свідчила характерна ультраструктура наявного в цитоплазмі макрофагів фагоцитованого матеріалу (рис. 5).

У деяких фагоцитованих апоптозних тілах були присутні плямоподібні включення високої електронної щільності, а в інших – плямоподібні електроннопрозорі включення (рис. 5). Це (а також поява в цитоплазмі макрофагів жирових крапель), ймовірно, віддзеркалює етапи перетравлення деградованого і, відповідно, фагоцитованого мієліну. Слід підкреслити наступне: макрофаги, які фагоцитували залишки нервових волокон, істотно відрізнялися за морфологією первинних і вторинних лізосом від аналогічних клітин нормотензивних щурів. У межах другої та п'ятої груп щурів подібні макрофаги також відрізнялися від макрофагів власної пластинки слизової оболонки ясен іншої локалізації.

Ультраструктурні зміни нервів ясен щурів тре-



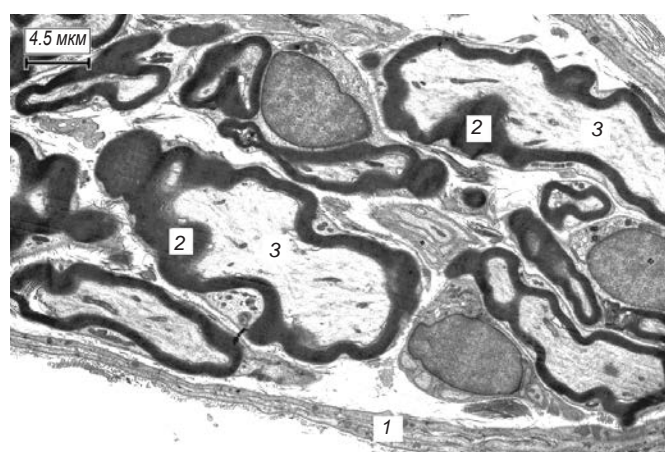
**Рис. 5.** Залишки фагоцитованих апоптозних тіл (відмічені стрілками) в цитоплазмі макрофага ясен щура четвертої групи. 1 – тотальний лізис мікротрубочок і нейрофіламентів осьового циліндра мієлінованого нервового волокна; 2 – залишки зруйнованого периневрія.



**Рис. 6.** Нормалізація ультраструктури нерва ясен у щура другої групи.

1 – ядро периневральної клітини; 2 – ядро нейролемоцита; 3 – мієлінізоване, 4 – безмієлінове нервові волокна.

тьої та шостої експериментальних груп (котрим вводили тіотриазолін) виглядали доволі помірними (рис. 6; 7). Такі зміни спостерігалися головним чином у мієлінізованих нервових волокнах. Подібні нервові волокна у щурів шостої групи (котрі одержували біпролол з тіотриазоліном) відрізнялися характерною звивистістю мієлінової оболонки та нерівномірним розподілом мікротрубочок і нейрофіламентів осьового циліндра. Розподіл цих елементів у щурів третьої групи (яким вводили тільки тіотриазолін) був рівномірнішим. Наведені дані свідчать про антиапоптозну (зокрема, щодо нейролемоцитів), мієліностабілізуючу (щодо мієлінової



**Рис. 7.** Помірні ультраструктурні зміни в нерві ясен щура шостої групи.

1 – периневрій; 2 – звивистість мієлінової оболонки; 3 – нерівномірний розподіл мікротрубочок і нейрофіламентів.

оболонки, похідної від нейролемоцитів), нейростабілізує (зокрема, щодо мікротрубочок і нейрофіламентів осевого циліндра) та бар'єрозберігає (зокрема, щодо структур периневрального бар'єра) дію тіотриазоліну. Загалом наші спостереження вказують на істотну лікувальну, а в умовах застосування біпрололу – протекторну дію тіотриазоліну щодо описаної нами патології нервів ясен щурів зі стабільно підвищеним кров'яним тиском. Характерною особливістю згаданої патології є розвиток значних негативних змін у нейролемоцитах (апоптоз останніх) і значні порушення структури мієлінової оболонки мієлінізованих волокон. Ця оболонка, як відомо [11], знаходиться в синергічній взаємодії з осевим циліндром нервового волокна і, зокрема, з його цитоскелетом.

Порівнюючи дані про структурні зміни нервів з описаними вище змінами епітелію, кровоносних та лімфатичних судин ясен у щурів лінії SHR [5, 6], ми можемо стверджувати, що у щурів із САГ досить яскраво виражена судинно-нервова дистрофія ясен. Така дистрофія є ознакою розвитку специфічного дистрофічно-запального процесу, а саме генералізованого пародонтиту, котрий у людей є серйозним ускладненням при артеріальній гіпертензії. Варто, проте, застережити, що впродовж терміну експерименту (90 днів) нам не вдалося зареєструвати у щурів таких характерних для людини ознак генералізованого пародонтиту, як утворення пародонтальних кишень, рухомість і випадіння зубів. Це свідчить про те, що в умовах нашого експерименту у щурів лінії SHR ми досліджували лише «розтянуту в часі» першу стадію розвитку генералізованого пародонтиту. Вона характеризується певною стабільністю структурних і клінічних проявів; у людей відповідні зміни можуть бути значно драматичнішими. З огляду на зазначене, одержані експериментальні дані вказують на необхідність профілактики, своєчасного виявлення та комплексного лікування генералізованого пародонтиту в осіб з есенціальною артеріальною гіпертензією; при цьому доцільним виглядає комбіноване застосування бета-адреноблокаторів і метаболічних препаратів.

У контексті викладеного вище слід підкреслити, що в представленому дослідженні ми вперше виявили лікувальний (антиапоптозний) ефект засто-

сування тіотриазоліну. Дія цього агента забезпечує збереженість упорядкованої структури нервових елементів ясен та лікувальний і нейропротекторний ефекти згаданого препарату при його сумісному застосуванні з біпрололом у комплексній фармакотерапії артеріальної гіпертензії в умовах експерименту на тваринах. Отримані дані одночасно свідчать про досить істотні апоптогенні властивості біпрололу. Протективні та лікувальні властивості кверцетину при його комплексному застосуванні з біпрололом виявилися в усякому разі значно слабшими, ніж такі у тіотриазоліну.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. А. В. Борисенко, М. Ю. Антоненко, Л. Ф. Сідельнікова, *Практична пародонтологія*, Доктор Медіа, Київ (2011).
2. Ю. И. Сиренко, “Лечение специальных групп пациентов с артериальной гипертензией”, *Лики*, № 6, 19-22 (2004).
3. О. А. Вигівська, “Дослідження антигіпоксичних властивостей препаратів кверцетину”, *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*, **11**, № 1, 41-44 (2007).
4. И. А. Мазур, Н. А. Волошин, В. А. Визир, *Тиотриазолин, тиоцетам, тиодарон в лечении сердечно-сосудистой патологии*, Печат. мир, Запорожье (2012).
5. І. С. Чекман, А. В. Борисенко, М. Ю. Антоненко та ін., “Ультраструктурні зміни артерій та артеріол ясен у щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією за умов її корекції біпрололом, тіотриазоліном та кверцетином”, *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*, **18/19**, № 2, 61-65 (2008).
6. І. С. Чекман, А. В. Борисенко, М. Ю. Антоненко та ін., “Вплив біпрололу, тіотриазоліну та кверцетину на структурні зміни ясен у щурів із спонтанною артеріальною гіпертензією”, *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*, **18/19**, № 3, 54-58 (2008).
7. Р. С. Довгань, “Антигіпертензивна ефективність біпрололу у щурів з спонтанною артеріальною гіпертензією”, *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця*, **11**, №1, 49-51 (2007).
8. І. С. Чекман, Я. М. Корнійкова, Р. С. Довгань, “Спонтанна артеріальна гіпертензія у щурів: патогенетичні механізми розвитку”, *Лики*, № 1/2, 10-15 (2007).
9. G. Hacker, “The morphology of apoptosis,” *Cell Tissue Res.*, **301**, 5-17 (2000).
10. G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, et al., “Classification of the Nomenclature committee on cell death,” *Cell Death Differ.*, **16**, 1-3 (2009).
11. Ю. А. Челишев, В. Г. Черепнев, К. И. Сайтуков, “Апоптоз в нервной системе”, *Онтогенез*, № 2, 118-129 (2001).