

А.В.Кувшинов, Н.К.Сугак

Морфологическое обоснование применения метода фотодинамической терапии для лечения заболеваний периодонта

*Белорусский государственный медицинский университет
Белорусская медицинская академия последипломного образования*

В работе представлены результаты экспериментального исследования эффективности метода фотодинамической терапии для лечения заболеваний периодонта, а именно его морфологическая часть. Ключевыми препаратами являются: ткани здоровой десны, экспериментальный периодонтит без лечения, экспериментальный периодонтит с лечением методом ФДТ и фотодинамический ожог. Анализ морфологических изменений показал, что в тканях периодонта лабораторных животных основной группы происходит резкое уменьшение интенсивности воспалительного процесса, гибель бактериальной и грибковой флоры, восстановление целостности зубодесневого соединения, прекращение процессов рассасывания костных балок, усиление микроциркуляции, активация пролиферации тучных клеток и увеличение количества эозинофильных лейкоцитов. Ключевые слова: фотодинамическая терапия, экспериментальный периодонтит, морфологическое исследование.

Целью данной работы является изучение и описание микроморфологических изменений, возникающих в периодонтальных тканях лабораторных животных при моделировании воспалительного процесса и проведении фотодинамической терапии. Морфологическая оценка осуществлялась в рамках комплексного экспериментального исследования, которое включало проведение визуального осмотра, инструментальных проб и микробиологического контроля. В работе были использованы 125 лабораторных животных (крысы линии Вистар), разделенных на 5 следующих групп по 25 животных в каждой:

- 1) животные со здоровым периодонтом;
- 2) животные с экспериментальным периодонтитом, лечение которым не проводилось;
- 3) животные с экспериментальным периодонтитом, которым проводилась лазеротерапия;
- 4) животные с экспериментальным периодонтитом, которым проводилась фотодинамическая терапия;
- 5) животные, которым осуществлялось облучение периодонтальных тканей лазером по схеме, используемой для ФДТ, но без применения фотосенсибилизатора.

Курс лазеротерапии включал 10 процедур, выполняемых ежедневно. Параметры используемого излучения были следующими: длина волны 670 нм, плотность мощности 125 мВт/см², продолжительность процедуры 4 минуты, доза 30 Дж/см².

Фотодинамическая терапия проводилась по разработанной нами методике: на высушенную поверхность десны наносилась мазевая форма препарата-фотосенсибилизатора и равномерно распределялась кисточкой до тонкой однородной пленки. По истечении времени экспозиции (7-10 минут), которое необходимо для диффузии препарата, излишки мази удалялись, а поверхность обработанных тканей облучалась лазером. Параметры лазерного излучения были следующими: длина волны 670 нм, плотность мощности 125 мВт/см², доза 50 Дж/см². Остатки мази, не вступившей в реакцию, удалялись струей воды. Процедура проводилась двукратно с интервалом в 3 дня [1].

В качестве фотосенсибилизатора использовалась мазевая форма препарата «Фотолон», разработанного на базе научно-фармацевтического центра РУП «Белмедпрепараты» [2, 3, 4]. Лазерное облучение осуществлялось с использованием аппарата лазерного терапевтического «Родник-1», созданного сотрудниками Института физики НАН Беларуси [5].

В качестве объекта для морфологического исследования были выбраны животные первой (здоровый периодонт), второй (экспериментальный периодонтит без лечения), и четвертой (ФДТ) групп. Выведение из опыта животных четвертой группы осуществлялось на 7-е сутки после проведения лечения. Сроки моделирования воспаления и выведения из опыта животных 2 и 4 групп были одинаковыми.

Необходимым этапом определения оптимальных параметров процедуры, является использование заведомо чрезмерных доз. Увеличение времени экспозиции фотосенсибилизатора до 20 минут, а дозы излучения до 100 Дж/см² приводит к ожоговому поражению поверхности десны, которое клинически проявляется побелением слизистой, образованием эрозий и язв, развитием периостальной реакции. Ниже представлена также фотография и описание микроскопической картины фотодинамического ожога.

Методика выполнения гистологического исследования

Работа с морфологическим материалом осуществлялась по следующей методике. Эвтаназия животных проводилась путем введения летальных доз тиопентала. После вычленения, передние фрагменты челюстей крыс фиксировали в 10% нейтральном формалине, затем декальцинировали в 5% азотной кислоте. После 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 5-6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографии проводили с помощью светового микроскопа DMLS с программным обеспечением и компьютером ИВА (производитель «Leica», Германия).

Описание полученных результатов

Описание препаратов осуществлялось послойно: эпителий, собственная пластинка слизистой оболочки (сосочковый и сетчатый слои), зубодесневое

соединение, кость, кровеносные и лимфатические сосуды, нервные окончания.

1 группа (нормальный периодонт)

Десна покрыта слизистой оболочкой, которая выстлана многослойным плоским эпителием с признаками очагового ороговения (рис. 1). Роговой слой преимущественно узкий.

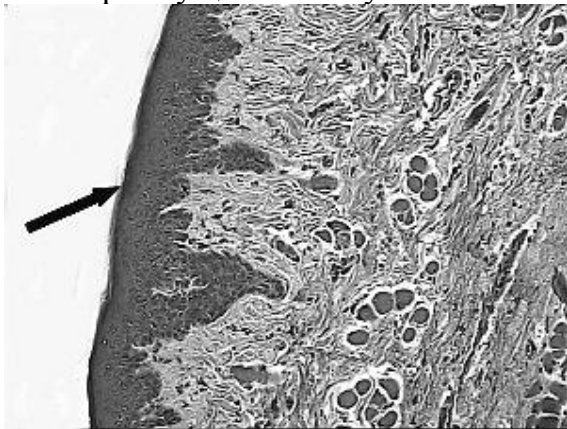


Рис. 1. Многослойный плоский ороговевающий эпителий десны: узкий роговой слой (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, х 200

Эпителиоциты базального слоя расположены в 1-2 ряда, имеют овальную либо цилиндрическую форму, светло-базофильную цитоплазму и округлое ядро, богатое хроматином. Шиповатый слой занимает большую часть поперечника. Клетки, формирующие его, полигональной формы, с округлым светлым ядром, содержащим мелкие глыбки хроматина. Эпителиоциты зернистого слоя преимущественно уплощенной формы, в цитоплазме отдельных клеток содержится небольшое количество гиперхромных гранул кератогиалина полиморфных размеров.

Собственная пластинка слизистой оболочки десны располагается под эпителием, отделена от него базальной пластинкой и представлена рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью. С одной стороны собственная пластинка образует сосочки, вдающиеся в эпителиальный пласт (рис.1), с другой непосредственно сращена с надкостницей челюсти. Сосочки становятся больше в той части десны, которая непосредственно прилежит к зубу (рис.2).

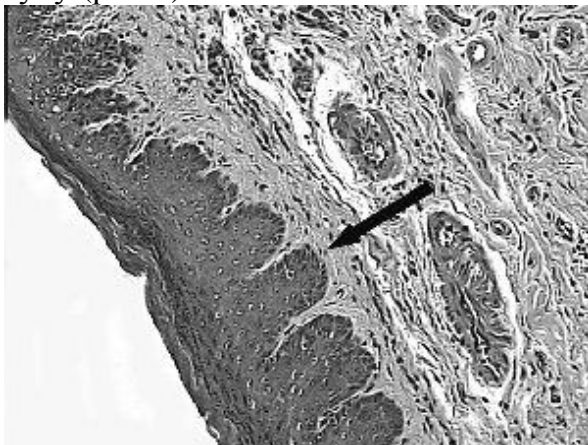


Рис. 2. Многослойный плоский ороговевающий эпителий десны: сосочки собственной пластинки слизистой оболочки (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, х 200

В собственной пластинке определяются немногочисленные лимфоциты, плазматические клетки, эозинофильные лейкоциты, макрофаги, а также скопления тучных клеток (клеточные элементы системы местного иммунного надзора) (рис. 3).

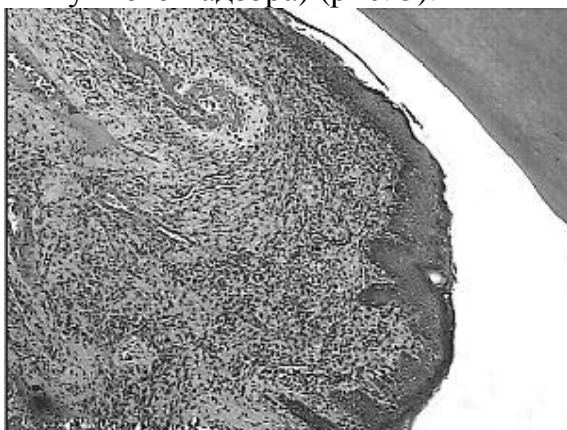


Рис. 3. Слизистая оболочка десны. Окраска гематоксилином и эозином, х100
В собственной пластинке слизистой оболочки много кровеносных и лимфатических сосудов, нервных окончаний. Микроциркуляторное русло умеренно полнокровно, в венах и капиллярах определяются скопления эритроцитов.

Зубодесневое соединение, образованное благодаря сращению многослойного плоского эпителия десны с кутикулой шейки зуба, состоятельно, без признаков нарушения целостности (рис. 4).

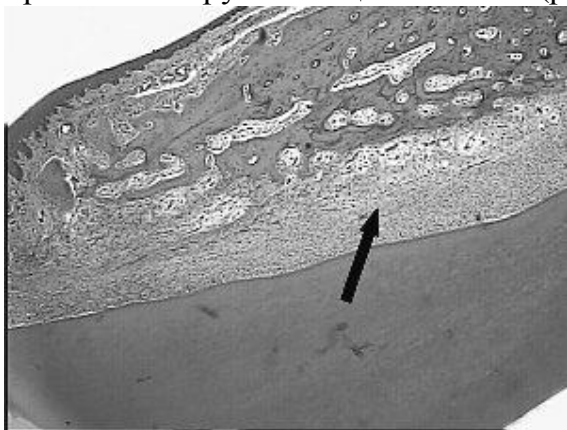


Рис. 4. Зубодесневое соединение (стрелка) без признаков нарушения целостности. Окраска гематоксилином и эозином, х50

Вокруг зуба располагается плотная оформленная соединительная ткань, которая между шейкой зуба и стенкой лунки формирует циркулярную зубную связку (рис. 5).



Рис. 5. Циркулярная зубная связка (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, x200

Коллагеновые волокна циркулярной зубной связки с одной стороны распространяются в альвеолярную кость, с другой – проникают цемент корня зуба.

2 группа (Экспериментальный периодонтит без лечения)

На участках десны, непосредственно прилежащих к зубу, эпителий отсутствует, собственная пластинка слизистой оболочки покрыта гнойно-некротическим детритом. Также имеет место образование зубочелюстных карманов, в которых также определяется гнойно-некротический детрит.

Гнойно-некротический детрит состоит из фрагментов некротизированных эпителия и поверхностных отделов собственной пластинки слизистой оболочки десны, фибрина, многочисленных нейтрофильных лейкоцитов, большая часть которых находится в состоянии распада, эритроцитов, макрофагов (в том числе сидерофагов). В зоне детрита также определяются колонии кокков (рис. 6) и скопления мицелия грибов. Тонкие нити мицелия окрашиваются эозинофильно, располагаются концентрически, образуя шаровидные либо овальные скопления (рис. 7).

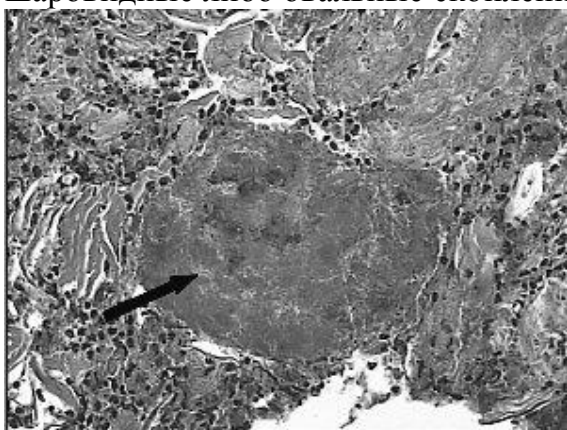
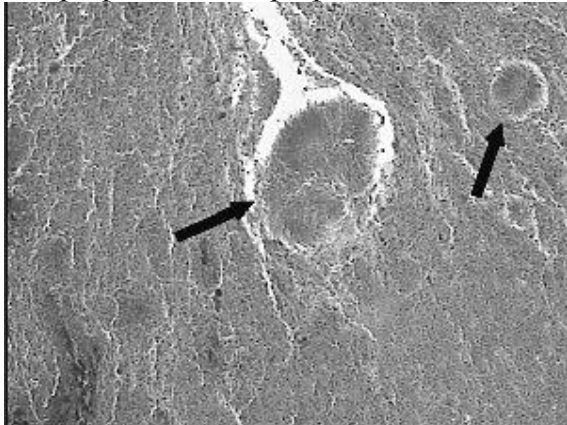


Рис. 6. Колонии микробов (стрелка) в зоне гнойнонекротического детрита зубочелюстного кармана. Окраска гематоксилином и эозином, x400

Рис. 7. Мицелий грибов (стрелки) в зоне гнойнонекротического детрита зубочелюстного кармана. Окраска гематоксилином и эозином, x400

Собственная пластинка слизистой оболочки десны, прилежащая к зубу, отечна, диффузно инфильтрирована полиморфноядерными лейкоцитами,

немногочисленными лимфоцитами, плазматическими клетками. В слизистой оболочке определяются также тканевые базофилы в большом количестве, макрофаги и сидерофаги.



Микроциркуляторные сосуды расширены, полнокровны, в венулах и капиллярах видны скопления эритроцитов, в просвете некоторых сосудов наблюдаются фибриновые тромбы. Следует отметить также наличие пролиферативно-экссудативного васкулита, базальная мембрана микрососудов утолщенная и разрыхленная. Все это ведет к повышенной проницаемости сосудов: отмечается диапедез эритроцитов, миграция лейкоцитов через стенку сосудов, отек и воспалительная инфильтрация ткани (рис. 8).

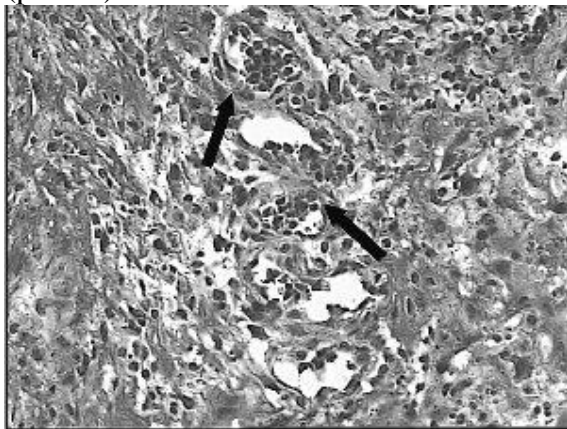


Рис. 8. Васкулиты (стрелки) собственной пластинки слизистой оболочки десны. Окраска гематоксилином и эозином, х400

В области периодонта также выявляются серозный отек, выраженная воспалительная инфильтрация (в составе инфильтрата преобладают полиморфноядерные лейкоциты, часть из них – с признаками распада), расширение и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, васкулит, лейкодиапедез (рис. 9).

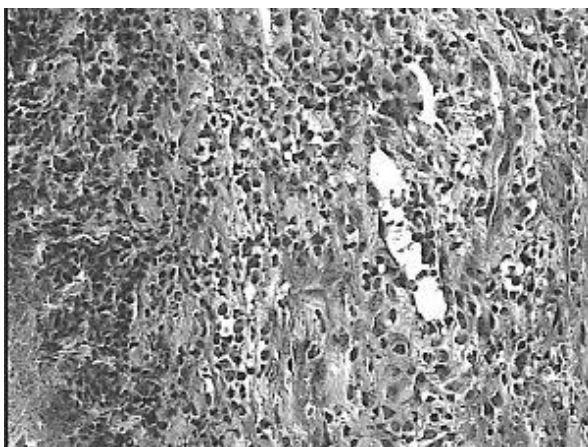


Рис. 9. Периодонтит. Окраска гематоксилином и эозином, х400

Отмечается распространенное повреждение костных балок челюсти в виде остеокластического и бесклеточного рассасывания. Остеокласты характеризуются крупными размерами, эозинофильной цитоплазмой и содержат несколько ядер. Данные клетки располагаются в выемках, образованных в результате лизиса костных балок (рис. 10).

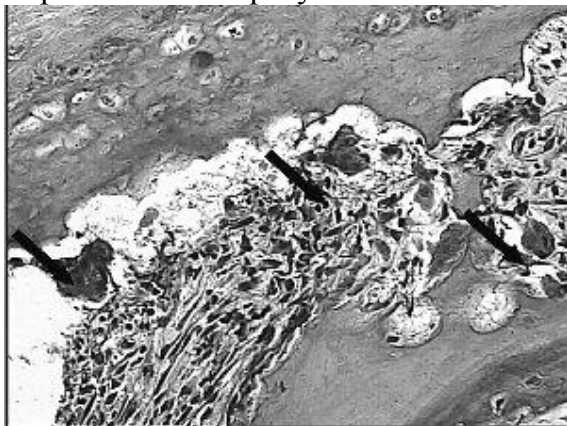


Рис. 10. Признаки остеокластического рассасывания альвеолярной кости: остеокласты (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, х400

Характерна активация апоптотической гибели клеток костного мозга. Вокруг костных балок определяются скопления мицелия грибов, в этих зонах также выявляются признаки деструкции костных балок (рис. 11, 12).

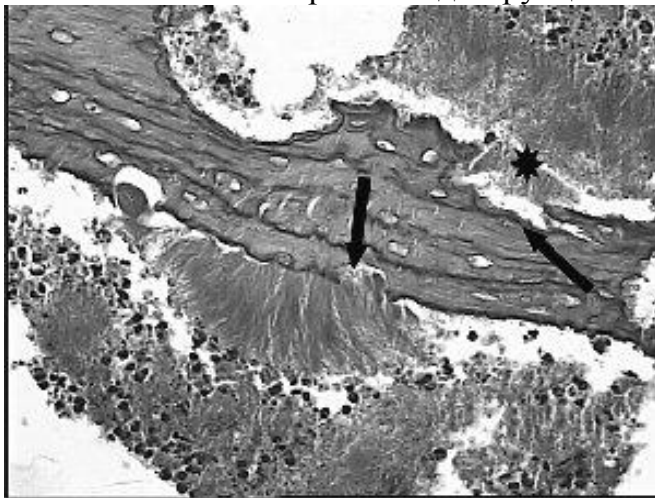


Рисунок 11 - Скопления мицелия грибов (звездочки) вокруг балок альвеолярной кости с их очаговой деструкцией (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, x400

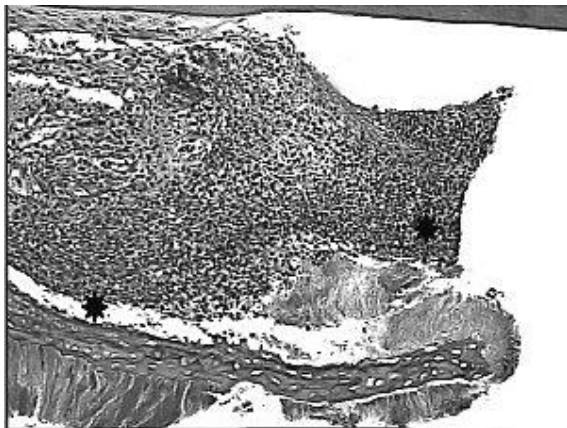


Рисунок 12 - Резко выраженный гнойный периодонтит со скоплениями мицелия грибов (звездочки), деструкцией альвеолярной кости. Окраска гематоксилином и эозином, x50

В перифокальной зоне выявляются признаки пролиферации эпителия, гипер- и паракератоз, очаговая инфильтрация эпителия полиморфноядерными лейкоцитами и лимфоцитами (рис. 13, 14).

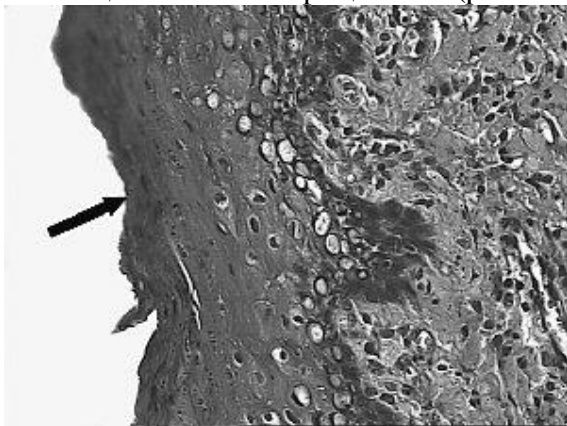


Рисунок 13 – Паракератоз (стрелка) десны. Окраска гематоксилином и эозином, x400



Рисунок 14 – Дистрофические (стрелка) и воспалительные изменения эпителия десны в перифокальной зоне. Окраска гематоксилином и эозином, x100

В собственной пластинке слизистой оболочки десны перифокальной зоны сохраняются серозный отек и воспалительная инфильтрация, однако, менее выраженные, чем в прилежащих к зубу участках. В составе инфильтрата определяются немногочисленные полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты, единичные сидерофаги.

Сосуды микроциркуляторного русла нерезко расширены, полнокровны (рис. 15).

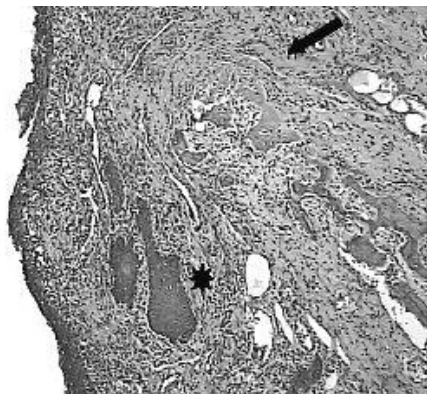


Рисунок 15 - Воспаление собственной пластинки слизистой оболочки десны, погружной рост эпителия (звездочка), истончение балок альвеолярной кости (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, x100

В собственной пластинке слизистой оболочки выявляются тучные клетки в большом количестве.

Фотодинамический ожог

В зоне фотодинамического воздействия выявляется некроз эпителия и подлежащих отделов собственной пластинки слизистой оболочки с образованием язв, покрытых широким слоем гнойно-некротического детрита (рис. 16).

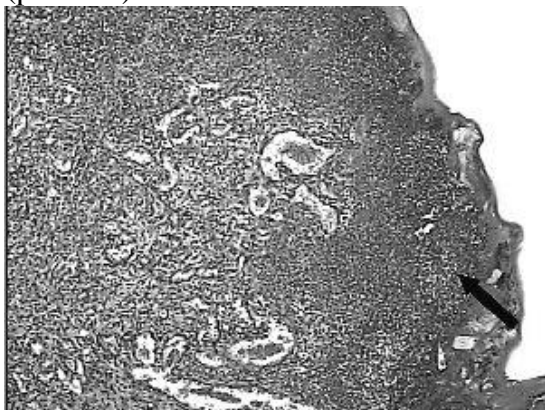


Рисунок 16 - Некроз эпителия и подлежащих отделов собственной пластинки слизистой оболочки десны с образованием язв, покрытых широким слоем гнойно-некротического детрита (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, x100

Гнойно-некротический детрит представлен фрагментами некротизированных эпителия и собственной пластинки слизистой оболочки десны, фибрином, многочисленными полиморфноядерными нейтрофильными лейкоцитами, большая часть которых находится в состоянии распада, эритроцитами. В зоне детрита очагово определяются единичные колонии кокков.

Подлежащая собственная пластинка слизистой оболочки десны резко отечна и выражено диффузно инфильтрирована полиморфноядерными нейтрофильными лейкоцитами (часть клеток находится в состоянии распада), в составе воспалительного инфильтрата определяются также лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги и сидерофаги (преимущественно периваскулярно) (рис. 17).

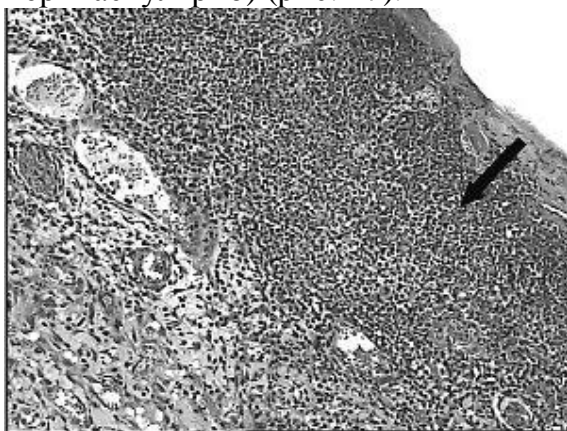


Рисунок 17 - Некроз и выраженная диффузная воспалительная инфильтрация поверхностных отделов слизистой оболочки десны (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, x200

Микроциркуляторные сосуды верхних отделов собственной пластинки слизистой оболочки десны резко расширены, в венулах и капиллярах видны скопления эритроцитов, сепарация плазмы (рис. 18), в просвете отдельных сосудов определяются фибриновые тромбы.

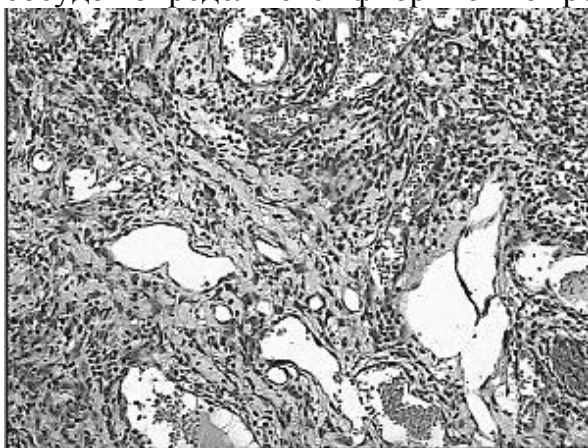


Рисунок 18 - Расширение сосудов и воспаление собственной пластинки слизистой оболочки десны. Окраска гематоксилином и эозином, x200

Базальная мембрана некоторых микрососудов утолщена и разрыхлена. Имеют место также эритро- и лейкодиapedез, характерен экссудативно-пролиферативный васкулит (рис. 19).

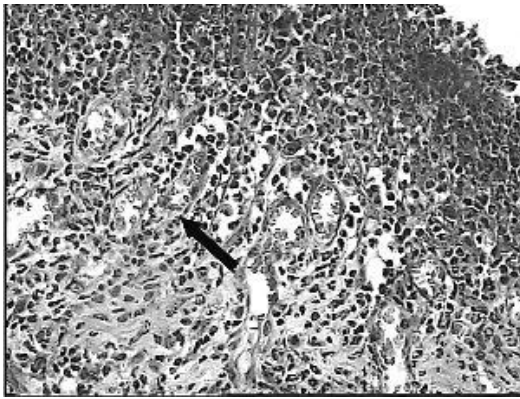


Рисунок 19 - Васкулиты (стрелка) собственной пластинки слизистой оболочки десны. Окраска гематоксилином и эозином, x400

В то же время отмечается и макрофагальная реакция в виде инфильтрации ткани макрофагами, как моноцитоидного типа, так и крупными макрофагами с пенистой цитоплазмой. Макрофаги расположены большей частью вокруг сосудов. Отмечается относительно большое содержание тучных клеток, часть из них несет признаки дегрануляции.

В средних и нижних отделах собственной пластинки слизистой оболочки десны имеет место пролиферация эндотелия с формированием новых капилляров, а также пролиферация перицитов и фибробластов, т.е. признаки формирования грануляционной ткани. Капилляры преимущественно мелкие, с узкими просветами, без элементов крови в просветах, окружены клеточными элементами соединительной ткани, в том числе значительным количеством тучных клеток (рис. 20).

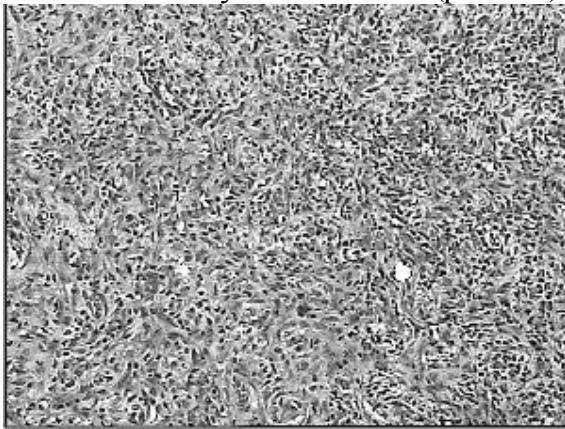


Рисунок 20 - Признаки формирования грануляционной ткани в собственной пластинке слизистой оболочки десны. Окраска гематоксилином и эозином, x200

Наблюдается беспорядочное расположение новообразованных капилляров, отсутствие вертикальных капиллярных петель и ориентированного расположения клеточных элементов. Характерны множественные мелкие кровоизлияния в периваскулярную строму (рис. 21).

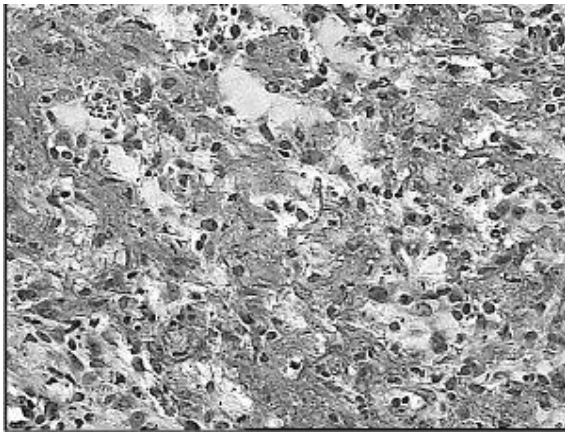


Рисунок 21 - Множественные мелкие кровоизлияния в собственную пластинку слизистой оболочки десны. Окраска гематоксилином и эозином, x400

В перифокальной зоне выявляются нерезкая пролиферация эпителия, очаговый гипер-и паракератоз, инфильтрация эпителиального пласта лимфоцитами и полиморфноядерными лейкоцитами. В собственной пластинке слизистой оболочки десны выявляются нерезкий серозный отек и воспалительная инфильтрация. В составе инфильтрата определяются немногочисленные полиморфноядерные лейкоциты, лимфоциты, макрофаги и единичные сидерофаги. Сосуды микроциркуляторного русла несколько расширены. В собственной пластинке слизистой оболочки выявляется большое количество тучных клеток, эозинофильные лейкоциты.

4 группа (Экспериментальный периодонтит после проведения ФДТ)

Десна на участках, непосредственно прилежащих к зубу, покрыта нерезко утолщенным эпителием с признаками пролиферации клеток базального слоя, очаговым гипер-и паракератозом (рис. 22).

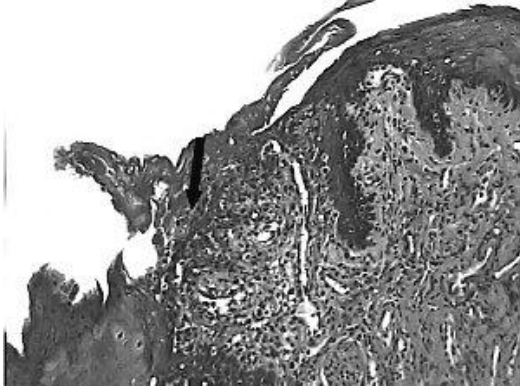


Рисунок 22 - Изменения эпителия десны: неравномерная ширина, очаговый гиперкератоз (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, x200

Зубочелюстные карманы определяются очагово, мелкие, содержат скудное количество некротического детрита с немногочисленными клеточными элементами в состоянии распада. Колонии кокков и скопления мицелия грибов не определяются (рис. 23).

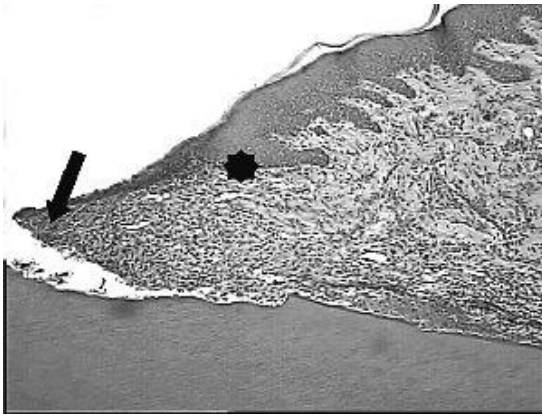


Рисунок 23 - Мелкий зубочелюстной карман (стрелка), скудное воспаление в собственной пластинке слизистой оболочки десны (звездочка). Окраска гематоксилином и эозином, x100

В собственной пластинке слизистой оболочки десны, прилежащей к зубу, сохраняется нерезкий отек. Воспалительная инфильтрация определяется очагово, выражена слабо, инфильтрат представлен преимущественно лимфоцитами и плазматическими клетками, в его составе определяются в небольшом количестве макрофаги. В слизистой оболочке определяются также тканевые базофилы и эозинофильные лейкоциты в значительном количестве (рис. 24).

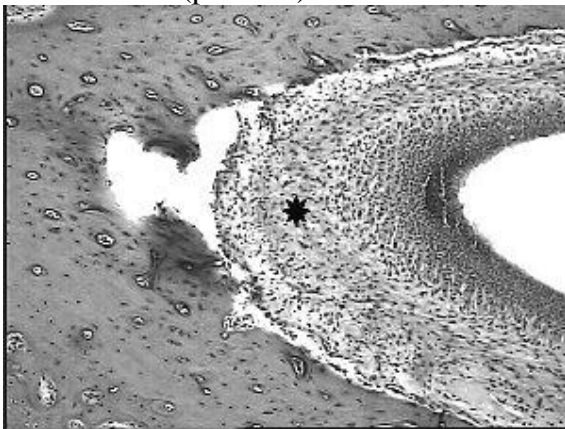


Рисунок 24 - Серозный отек и умеренно выраженное воспаление собственной пластинки слизистой оболочки десны в области корня зуба (звездочка). Окраска гематоксилином и эозином, x100

Микроциркуляторные сосуды собственной пластинки слизистой оболочки десны нерезко расширены, умеренно полнокровны, в венах и капиллярах определяются скопления эритроцитов и сепарация плазмы. Стенки сосудов не утолщены.

В области периодонта также сохраняются нерезкий серозный отек, слабо выраженная воспалительная инфильтрация (в составе инфильтрата определяются лимфоциты, плазматические клетки), нерезкое расширение и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (рис. 25).

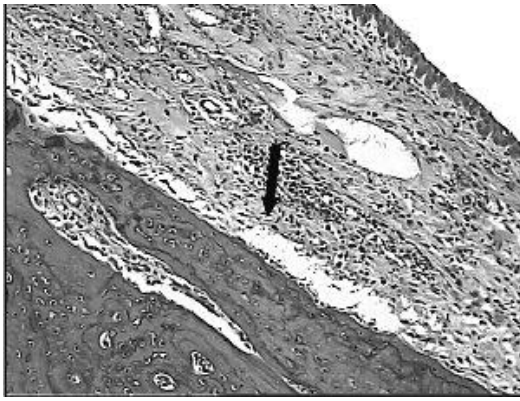


Рисунок 25 - Очаговый периодонтит (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, x200

Признаки резорбции костных балок отсутствуют, определяются единичные остеокласты.

В перифокальной зоне выявляются признаки очаговой пролиферации эпителия, нерезкий гиперкератоз, очаговая инфильтрация эпителия лимфоцитами. В собственной пластинке слизистой оболочки десны сохраняются серозный отек и слабо выраженная воспалительная инфильтрация. В составе инфильтрата определяются лимфоциты, плазматические клетки, единичные макрофаги и сидерофаги. Микроциркуляторное русло нерезко полнокровно (рис. 26).



Рисунок 26 - Очаговое воспаление в собственной пластинке слизистой оболочки десны перифокальной зоны (звездочка). Окраска гематоксилином и эозином, x100

В собственной пластинке слизистой оболочки выявляются тучные клетки в большом количестве.

Таким образом, моделирование воспалительного процесса в тканях периодонта приводило к возникновению следующих морфологических изменений: умеренно выраженного гнойно-некротического гингивита и гнойного периодонтита, нарушения целостности зубодесневого соединения, образования периодонтального (зубодесневого) кармана, остеокластического и бесклеточного рассасывания костной ткани. В области воспалительного инфильтрата и в составе гнойно-некротического детрита зубодесневого кармана выявлялись скопления колоний микробов и мицелия грибов. В зонах

локализации остеокластов, а также массивных периостальных скоплений мицелия грибов определялись признаки деструкции костных балок.

Фотодинамическое воздействие в дозах в 2 раза превышающих оптимальные (период экспозиции мази 20 минут, доза излучения 100 Дж/см²) вызывало структурные изменения периодонта, характеризующиеся выраженным распространенным гнойно-некротическим гингивитом и гнойным периодонтитом (в зоне воспалительного инфильтрата определялись единичные колонии микроорганизмов), нарушением целостности зубодесневого соединения, образованием зубодесневого кармана, очаговым остеокластическим рассасыванием костной ткани. Также выявлялось новообразование капилляров в глубоких отделах собственной пластинки слизистой оболочки, увеличение количества тучных клеток, макрофагов и эозинофильных лейкоцитов.

При анализе морфологических изменений в тканях десны экспериментальных животных 4 группы (ФДТ), установлено, что на фоне лечения происходят резкое уменьшение интенсивности воспалительного процесса в периодонте, гибель бактериальной и грибковой флоры, восстановление целостности зубодесневого соединения, прекращение процессов рассасывания костных балок, усиление микроциркуляции (вазодилатация, раскрытие резервных капилляров), активация пролиферации тучных клеток и увеличение количества эозинофильных лейкоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки десны.

Выводы

1. Результаты морфологического исследования свидетельствуют, что ФДТ обладает выраженными бактерицидным и фунгицидным, противовоспалительным, трофическим, иммуномодулирующим эффектами.
2. Метод ФДТ оказывает выраженный лечебный эффект, что позволяет рекомендовать его к применению в клинической практике.

Литература

1. Наумович, С.А., Кувшинов, А.В. Фотодинамическая терапия в лечении заболеваний периодонта // Белорусский медицинский журнал. – Минск, 2007.-№1. – с. 71-75.
2. ВФС РБ 0550-2001. Временная фармакопейная статья «Фотолон 0,025 г, 0,05 г и 0,1 г для инъекций». Издание официальное. Министерство здравоохранения Республики Беларусь. Фармакопейный Комитет. – Минск, 2001.
3. Каплан, М.А., Петров, П.Т., Царенков, В.М., Цыб, А.Ф. Опыт клинического применения нового фотосенсибилизатора Фотолон // Международная научная конференция: «Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника». Минск, 14-16 ноября 2001. С.57-58. – Минск, 2001.
4. Philipp, С.М., Muller, U., Urban, P., Berlien, Н.Р. Chlorin-e6-(Fotolon)-PDT – Clinical experiences in the treatment of intraepithelial carcinoma (Morbus Bowen) // Materials of international conference «Photodynamic Diagnosis and Therapy in Clinical Practice». – Brixen, 2006. – P.40.

5. Плавский, В.Ю. , Мостовников, В.А., Мостовникова, Г.Р. и др. Современные тенденции в разработке аппаратуры для низкоинтенсивной лазерной терапии // Лазерно-оптические технологии в биологии и медицине. – Минск, 2004. – с. 62-73.