

Зміни функціональної активності тромбоцитів у щурів при експериментальному порушенні стану сполучної тканини пародонта

В. Ф. Черемісіна

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Мета роботи – вивчення функціональної активності тромбоцитів при пародонтиті.

Матеріали та методи. Експерименти здійснили на 20 білих нелінійних щурах-самцях масою $320,0 \pm 30,0$ г. Експериментальний пародонтит моделювали за методом Л. В. Пешкової. Кров для дослідження агрегації тромбоцитів брали шприцом із серця. Індуковану агрегацію тромбоцитів досліджували з використанням комп'ютеризованого аналізатора агрегації тромбоцитів «SOLAR 2110». Як індуктор використовували аденозиндифосфат (АДФ) у концентрації 2,5 мкмоль/л і 10,0 мкмоль/л. Запис агрегатограм виконували при 37 °С протягом 10 хв. Зразки тканин пародонта фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Зневоднювали у спирті концентрації, що збільшується, проводили через хлороформ, хлороформ-парафін і заливали в парафін. Зрізи завтовшки 4–6 мкм виготовлені на санному мікротомі та забарвлені гематоксилін-еозином та за Ван-Гізеном.

Результати. Аналіз агрегатограм показав зменшення функціональної активності тромбоцитів у щурів з експериментальним пародонтитом при концентраціях індуктора агрегації 2,5 мкмоль/л та 10,0 мкмоль/л. Зниження ступеня агрегації тромбоцитів і швидкості агрегації порівняно з контролем спостерігали при концентрації індуктора 2,5 мкмоль/л у групі щурів з експериментальним пародонтитом. Під час мікроскопічного дослідження констатували порушення гістоархітекtonіки сполучної тканини пародонта. У прошарках сполучної тканини спостерігали розширення дрібних капілярів, а в деяких препаратах – переповнені кров'ю судини, що свідчило про порушення мікроциркуляції крові, зрив регуляторних механізмів репарації та вихід патологічного процесу на системний рівень. Не останню роль у цих процесах відіграла взаємодія клітин сполучної тканини з тромбоцитами.

Висновки. У щурів з експериментальним пародонтитом відбувається зниження агрегаційної активності тромбоцитів. Порушення стану сполучної тканини пародонта проявляються перебудовою судинного басейну, розладом мікроциркуляції крові, зривом регуляторних механізмів репарації, виходом патологічного процесу на системний рівень.

Ключові слова:

тромбоцити, пародонтит, сполучна тканина.

Запорізький медичний журнал. – 2018. – Т. 20, № 4(109). – С. 553–556

DOI:
10.14739/2310-1210.2018.4.135325

E-mail:
cheremishav1@gmail.com

Изменения функциональной активности тромбоцитов у крыс при экспериментальном нарушении состояния соединительной ткани пародонта

В. Ф. Черемисина

Цель работы – изучение функциональной активности тромбоцитов при пародонтите.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 20 белых нелинейных крысах-самцах массой $320,0 \pm 30,0$ г. Экспериментальный пародонтит моделировали методом Л. В. Пешковой. Кровь для исследования агрегации тромбоцитов брали шприцем из сердца. Индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали с использованием компьютеризованного анализатора агрегации тромбоцитов «SOLAR 2110». В качестве индуктора использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 2,5 мкмоль/л и 10,0 мкмоль/л. Запись агрегатограмм проводили при 37 °С в течение 10 мин. Образцы тканей пародонта фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Обезвоживали в спирте возрастающей концентрации, проводили через хлороформ, хлороформ-парафин и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–6 мкм были изготовлены на санном микротоме и окрашены гематоксилін-еозином и по Ван-Гизону.

Результаты. Анализ агрегатограмм показал уменьшение функциональной активности тромбоцитов у крыс с экспериментальным пародонтитом при концентрациях индуктора агрегации 2,5 мкмоль/л и 10,0 мкмоль/л. Снижение степени агрегации тромбоцитов и скорости агрегации по сравнению с контролем наблюдали при концентрации индуктора 2,5 мкмоль/л в группе крыс с экспериментальным пародонтитом. При микроскопическом исследовании констатировали нарушение гистоархитекtonіки соединительной ткани пародонта. В слоях соединительной ткани наблюдали расширение мелких капилляров, а в некоторых препаратах – переполненные кровью сосуды, что свидетельствовало о нарушении микроциркуляции крови, срыве регуляторных механизмов репарации и выходе патологического процесса на системный уровень. Не последнюю роль в этих процессах играло взаимодействие клеток соединительной ткани с тромбоцитами.

Выводы. У крыс с экспериментальным пародонтитом происходит снижение агрегационной активности тромбоцитов. Нарушения состояния соединительной ткани пародонта проявляются перестройкой сосудистого бассейна, расстройством микроциркуляции крови, срывом регуляторных механизмов репарации, выходом патологического процесса на системный уровень.

Ключевые слова:

тромбоциты, пародонтит, соединительная ткань.

Запорожский медицинский журнал. – 2018. – Т. 20, № 4(109). – С. 553–556

Changes in the functional activity of thrombocytes in rats with experimental disruption of the periodontal connective tissue

V. F. Cheremisina

Objective. The aim was to study the functional activity of platelets in periodontitis.

Materials and methods. Experiments were performed on 20 white nonlinear male rats weighing 320.0 ± 30.0 g. Experimental periodontitis was modeled by the method of L. V. Peshkova. Blood for the study of platelet aggregation was taken by a syringe from the heart. Induced platelet aggregation was examined using a Computerized Platelet Aggregation Analyzer SOLAR 2110.

Key words:

platelets, periodontitis, connective tissue.

Zaporozhye medical journal
2018; 20 (4), 553–556

Adenosine diphosphate (ADP) was used as an inducer at 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ concentration. The resulting aggregation was recorded at 37 °C for 10 min. Samples of periodontal tissues were fixed in a 10 % neutral-buffered formalin solution, dehydrated in an ascending concentration series of alcohol, followed by chloroform, chloroform-paraffin and embedded into paraffin. Sections 4–6 microns thick were cut on a sliding microtome and stained with hematoxylin-eosin and van Gieson's stain.

Results. Analysis of aggregograms revealed a decrease in the functional activity of platelets in rats with experimental periodontitis at aggregation inducer concentrations of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and 10.0 $\mu\text{mol/L}$. Reduction in the degree of platelets aggregation and aggregation rate were observed at an inducer concentration of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ in a group of rats with experimental periodontitis in comparison with the control. Microscopic examination showed a violation of the connective periodontal tissue histoarchitectonic. Dilatation of small capillaries in the connective tissue layers and in some preparations microvascular congestion were observed which indicated a violation of blood microcirculation, failure of repair regulatory mechanisms and the pathological process's reaching the systemic level. The interaction of connective tissue cells with platelets played a significant role in these processes.

Conclusions. Decrease in thrombocytes aggregation activity is observed in rats with experimental periodontitis. Changes in the periodontal connective tissue manifested by the vascular pattern transformation, microcirculation violations, disruption of repair regulatory mechanisms and the pathological process's reaching the systemic level.

Надзвичайно важливо своєчасно діагностувати ступінь процесів фіброзування органів і тканин, оскільки це має загальноомедичне значення. Особливу зацікавленість у цьому аспекті викликає використання дослідження агрегації тромбоцитів [1]. Однак механізми взаємопов'язаного функціонування системи сполучної тканини та тромбоцитів при захворюваннях пародонта не вивчено.

Відомо, що в запально-репаративних реакціях беруть участь різні популяції клітин, і на різних етапах запалення регулюється розвиток наступних подій у клітинах. Відбувається послідовний перехід від однієї до іншої популяції [2]. Спочатку ініціюється посилення агрегації тромбоцитів, відбувається дегрануляція тромбоцитами речовин, серед яких є сполуки, що мають прямий стимулювальний вплив на клітини, які синтезують колаген, тромбоцитарний фактор росту, ендотеліальний фактор росту тощо. Як наслідок, при вираженому запальному процесі в сполучній тканині відбуваються розлади функції тромбоцитів: порушується адгезія, агрегація пластинок і реакція вивільнення [1].

Мета роботи

Вивчення функціональної активності тромбоцитів при пародонтиті.

Матеріали і методи дослідження

Експерименти виконали на 2 групах (по 10 тварин у кожній) білих нелінійних щурів-самців масою $320,0 \pm 30,0$ г.

Експериментальний пародонтит моделювали за методом [3]. Кров для дослідження агрегації тромбоцитів брали шприцом із серця.

Індуковану агрегацію тромбоцитів досліджували з використанням комп'ютеризованого аналізатора агрегації тромбоцитів «SOLAR 2110» (Білорусь). Як індуктор використовували аденозиндифосфат (АДФ) у концентрації 2,5 мкмоль/л та 10,0 мкмоль/л. Запис агрегатограм виконували при 37 °C протягом 10 хв. Наступний аналіз агрегаційної кривої включав визначення таких показників:

- 1) ступінь агрегації – максимальний % світлопропускання плазми;
- 2) час досягнення максимальної швидкості агрегації – час досягнення максимального % світлопропускання;

3) швидкість агрегації, яку розраховували через 30 с після початку агрегації тромбоцитів [4].

Зразки тканин пародонта фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Зневоднювали в спирті концентрації, що зростає, проводили через хлороформ, хлороформ-парафін і заливали в парафін. Зрізи завтовшки 4–6 мкм виготовлені на санному мікротомі та забарвлені гематоксилін-еозином та за Ван-Гізоном.

Експериментальні маніпуляції виконали відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986), «Загальних принципів експериментів на тваринах», які схвалені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та вимог «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (2012) [5].

Статистично результати дослідження опрацювали непараметричним методом за допомогою U-критерія Манна–Уїтні [6]. Вірогідними вважали результати при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Аналіз агрегатограм показав зменшення функціональної активності тромбоцитів у щурів з експериментальним пародонтитом при концентраціях індуктора агрегації 2,5 мкмоль/л та 10,0 мкмоль/л, що виражається у зменшенні максимального ступеня та швидкості агрегації, а при більшій концентрації індуктора агрегації, крім того, і часу досягнення максимальної швидкості агрегації. Під час дослідження агрегатограм АДФ індукованої агрегації в усіх тварин спостерігали однохвильовий тип кривої (рис. 1, 2).

Зниження ступеня агрегації тромбоцитів і швидкості агрегації порівняно з контролем спостерігали при концентрації індуктора 2,5 мкмоль/л у групі щурів з експериментальним пародонтитом. Час досягнення максимальної швидкості агрегації тромбоцитів не відрізнявся від контролю (табл. 1).

При концентрації індуктора 10,0 мкмоль/л у щурів з пародонтитом виявили зниження як ступеня агрегації тромбоцитів і швидкості агрегації порівняно з контролем, так і часу досягнення максимальної швидкості агрегації (табл. 2).

Під час мікроскопічного дослідження констатували порушення гістоархітеконики сполучної тканини пародонта. В окремих мікропрепаратах сполучна тканина пародонта утворювала широкі фіброзні поля, інфіль-

Таблиця 1. Показники агрегації тромбоцитів у щурів з експериментальним пародонтитом при концентрації АДФ 2,5 мкмоль/л ($X \pm S_x$, $n = 10$)

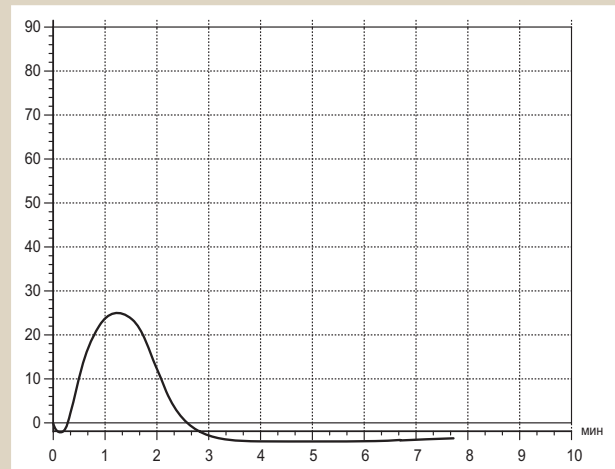
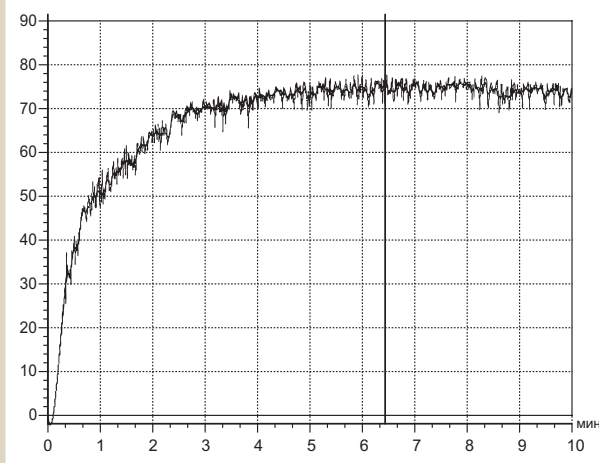
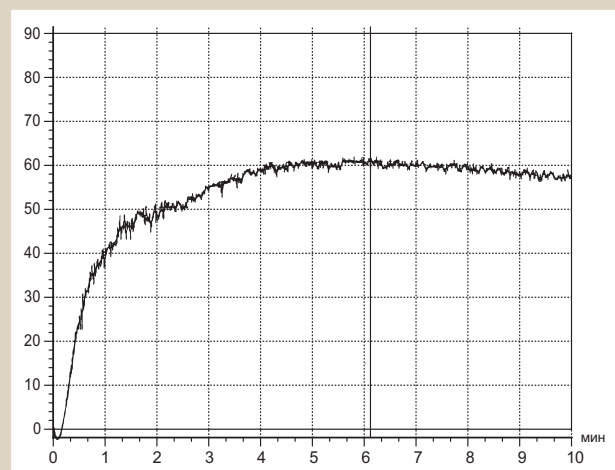
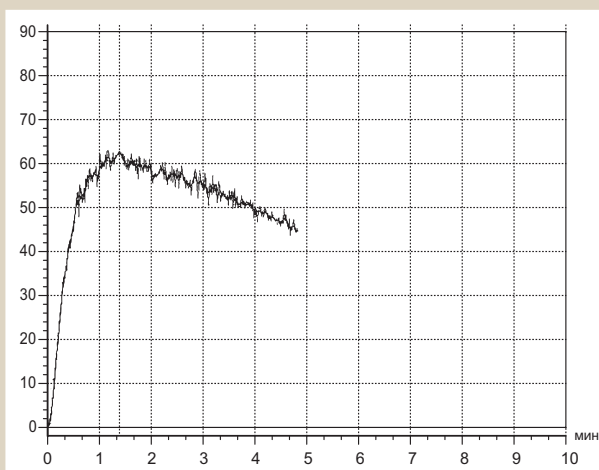
Групи тварин	Показники агрегації			
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, с	Швидкість агрегації, %/хв	Кількість тромбоцитів, тис./мкл
Контроль	48,90 ± 10,57	67,20 ± 3,70	65,50 ± 13,41	236,54 ± 3,41
Щури з пародонтитом	6,55 ± 0,35*	62,50 ± 4,03	22,45 ± 1,19*	243,15 ± 3,69

*: $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 2. Показники агрегації тромбоцитів у щурів з експериментальним пародонтитом при концентрації АДФ 10,0 мкмоль/л ($X \pm S_x$, $n = 10$)

Групи тварин	Показники агрегації			
	Ступінь агрегації, %	Час досягнення максимальної швидкості агрегації, с	Швидкість агрегації, %/хв	Кількість тромбоцитів, тис./мкл
Контроль	87,30 ± 10,27	270,40 ± 32,25	79,50 ± 10,43	226,60 ± 10,09
Щури з пародонтитом	64,88 ± 1,55*	264,25 ± 26,87	56,30 ± 1,74*	214,20 ± 4,14

*: $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою тварин.

**Рис. 1.** Агрегатограма здорового щура та щура з пародонтитом при концентрації АДФ 2,5 мкмоль/л.**Рис. 2.** Агрегатограма здорового щура та щура з пародонтитом при концентрації АДФ 10,0 мкмоль/л.

тровані лімфоцитами та гістocyрними елементами. У прошарках сполучної тканини спостерігали розширення дрібних капілярів, а в деяких препаратах – переповнені кров'ю судини, що свідчило про порушення мікроциркуляції крові, зрив регуляторних механізмів репарації

та вихід патологічного процесу на системний рівень. Не останню роль у цих процесах відігравала взаємодія клітин сполучної тканини з тромбоцитами.

Виявлені порушення агрегаційної здатності тромбоцитів у кінці експерименту можна пояснити тим, що

у сполучній тканині у процесі захворювання знижується кількість фібриногену, що синтезується і бере участь у процесах первинної, зворотної агрегації, зв'язуючись з рецепторами в мембрані тромбоцитів – глікопротеїдами та активованими тромбоцитами. При зниженні рівня фібриногену плазми та тромбоцитів послаблюється утворення мікроагрегатів, зворотних і незворотних агрегатів. Крім того, при фіброзуванні та склерозуванні сполучної тканини відбувається збільшення рівня циклічних нуклеотидів у тромбоцитах, що знижує їхню агрегаційну активність [7].

Висновки

1. У щурів з експериментальним пародонтитом відбувається зниження агрегаційної активності тромбоцитів.

2. Порушення стану сполучної тканини пародонта проявляються перебудовою судинного басейну, розладом мікроциркуляції крові, зривом регуляторних механізмів репарації, виходом патологічного процесу на системний рівень.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні агрегаційної здатності тромбоцитів при гінгівіті й альвеоліті, а також порівняльному оцінюванні вивчених патологій.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

Відомості про автора:

Черемісіна В. Ф., канд. мед. наук, доцент каф. технології парфюмерно-косметичних засобів, Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна.

Сведения об авторе:

Черемисина В. Ф., канд. мед. наук, доцент каф. технологии парфюмерно-косметических средств, Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина.

Information about author:

Cheremisina V. F., MD, PhD, Associate Professor, Department of Technology of Perfumery and Cosmetics, National Pharmaceutical University, Kharkiv, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 06.12.2017

Після доопрацювання / Revised: 28.12.2017

Прийнято до друку / Accepted: 15.01.2018

Список літератури

- [1] Выготская Я.И. Приобретенные тромбоцитопатии / Я.И. Выготская, Ю.С. Король, Н.Ф. Бужерак // Мистецтво лікування. – 2006. – №1. – С. 23–25.
- [2] Воспаление. Руководство для врачей / под. ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
- [3] Пешкова Л.В. Спонтанное поражение тканей пародонта у крыс в условиях вивария, как модель пародонтита / Л.В. Пешкова // Вісник стоматології. – 1997. – №2. – С. 163–168.
- [4] Патент 77372 Україна, МПК 601N 33/86 (2006.01). Спосіб оцінки агрегаційної активності тромбоцитів / С.Б. Павлов, Н.М. Бабенко, М.В. Кумечко, Л.В. Черних. Патент від 11.02.2013 // Бюлетень. – № 3. – С. 3–4.
- [5] Общие этические принципы экспериментов на животных: материалы I Национального конгресса по биоэтике, 2001. – К.: НАНУ. – 16 с.
- [6] Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.

- [7] Ягода А.В. Влияние интерферона-α на агрегацию и систему циклических нуклеотидов тромбоцитов при хронических вирусных заболеваниях печени / А.В. Ягода, П.В. Корой // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65. – №5. – С. 46–49.

References

- [1] Vygot'skaya, Ya. I., Korol', Yu. S., & Buzherak, N. F. (2006). Priobretennyye trombocitopatii [Acquired thrombocytopeny]. *Mystetstvo likuvannya*, 1, 23–25 [in Russian].
- [2] Serov, V. V., & Paukov, V. S. (Eds.). (1995). *Vospalenie: Rukovodstvo dlya vrachej [Inflammation: a guide for doctors]*. Moscow: Medicina [in Russian].
- [3] Peshkova, L. V. (1997). Spontannoe porazhenie tkanej parodonta u kryс v usloviyakh vivariya, kak model' parodontita [Spontaneous destruction of periodontal tissues in vivarium conditions, as a model of periodontitis]. *Visnyk stomatolohii*, 2, 163–168. [in Russian].
- [4] Pavlov, S. B., Babenko, N. M., Kumechko, M. V., & Chernykh, L. V. (patentee) (2013). Patent 77372 Ukraine, MPK 601N 33/86 (2006.01). Sposib otsinky ahrehatsiinoi aktyvnosti trombocytiv [Patent 77372 Ukraine, MPK 601N 33/86 (2006.01). A method for evaluating the aggregative activity of platelets]. *Biuletyn*, 3, 3–4. [in Ukrainian].
- [5] (2001). Obschie e'ticheskie principy e'ksperimentov na zhivotnykh. *Proceedings of the I National Congress on Bioethics*. Kyiv: NANU. [in Russian].
- [6] Gubler, Ye. V., & Genkin, A. A. (1973). *Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh [Application of nonparametric statistical criteria in biomedical research]*. Leningrad: Medicina. [in Russian].
- [7] Yagoda, A. V., & Koroi, P. V. (2002). Vliyanie interferona na agregatsiyu i sistemu ciklicheskih nukleotidov trombocytov pri khronicheskikh virusnykh zabollevaniyakh pecheni [Effect of interferon-α on the thrombocyte aggregation and cyclic nucleotide system of patients with chronic viral hepatitis]. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 65(5), 46–49. [in Russian].