

## Влияние криоапликации на фрактальную организацию ультраструктуры мягких тканей пародонта в зоне деструкции и пеньумбра

UDC 612.826.4.53:615.832.9

V.S. MARCHENKO\*, L.N. MARCHENKO, N.YU. YERMAKOVA, I.V. SLETA, B.P. SANDOMIRSKY

## Effect of Cryoapplication on Fractal Organization of Ultrastructure of Parodontium Soft Tissues in Destruction and Penumbra Zones

Методами электронной, оптической, лазерной микроскопии в сочетании с компьютерной морфометрией доказана морфологическая информативность фрактальной размерности для оценки общего состояния тканей ротовой полости. Показано, что применение дозированного криовоздействия ведет к усилению трансцитоза, повышению лабильности, фрактализации ультраструктурных элементов гематосаливарного барьера.

**Ключевые слова:** пародонт, гематосаливарный барьер, криоапликация, пеньумбра, лазерная микроскопия, ультраструктура, трехмерная реконструкция, фрактал.

Методами електронної, оптичної, лазерної мікроскопії в поєднанні з комп'ютерною морфометрією доведена морфологічна інформативність фрактальної розмірності для оцінки загального стану тканин ротової порожнини. Показано, що застосування дозованого криовпливу веде до посилення трансцитозу, підвищення лабільності, фракталізації ультраструктурних елементів гематосаливарного бар'єра.

**Ключові слова:** пародонт, гематосаливарний бар'єр, криоаплікація, пеньумбра, лазерна мікроскопія, ультраструктура, тривимірна реконструкція, фрактал.

With the methods of electron, optical, laser microscopy in combination with computer morphometry there has been proved morphological informativeness of fractal dimensions to estimate a general state of the tissue of oral cavity. It has been shown that the application of dosed cryoeffect leads to the strengthening of trans-cytosis, increase in lability, fractalization of ultra-thin elements of hematosalivary barrier.

**Key words:** parodontium, hematosalivary barrier, cryoapplication, penumbra, laser microscopy, ultrastructure, 3D reconstruction, fractal.

Современные технологии и фундаментальные исследования криомедицины обусловили широкое применение криовоздействий в комплексном лечении стоматологических заболеваний воспалительного, дистрофического и опухолевидного характера (гипертрофический гингивит, генерализованный пародонтит, эпюлис и др.) [3]. В диагностике и патогенезе такого рода заболеваний современная теоретическая медицина всё чаще использует основные парадигмы теории детерминированного хаоса и фрактальной морфологии [12].

Криовоздействие практически лишено противопоказаний, не отражается на общем состоянии пациента, являясь методом выбора у больных с тяжёлыми соматическими и системными заболеваниями (гемофилия, тромбоцитопеническая пурпура, геморрагический васкулит и др.) [3]. В то же время в криохирургии не уделяют должного внимания наличию вокруг ядра криодеструкции обширной пограничной зоны умеренно охлаждённой ткани, которую можно определить как гипотермическая пеньумбра (полутень). В области пеньумбры

Contemporary technologies and fundamental studies of cryomedicine have stipulated a wide application of cryoeffects in a combined treatment of dental diseases of inflammatory, dystrophic and tumor character (hypertrophic gingivitis, generalized periodontitis, epulis etc.) [3]. In diagnostics and pathogenesis of these diseases the modern theoretical medicine has used more often the main paradigms of the theory of determined chaos and fractal morphology [12].

Cryoeffect is practically deprived of contraindications, does not affect a patient general state, being the selection method for patients with severe somatic and system diseases (hemophilia, thrombopenic purpura, hemorrhagic vasculitis etc.) [3]. At the same time in cryosurgery there has not been paid a proper attention to the presence of a wide boundary zone of moderately cooled tissue around the cryodestruction core, which may be defined as hypothermal penumbra (half-shade). In penumbra area in a whole there are kept an energetic metabolism and mainly functional but not structural changes are present [1]. Penumbra is a basic target of stroke therapy [1], including use of hypother-

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:  
(+38057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная  
почта: marchik@list.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 372  
7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: marchik@list.ru

в целом сохраняется энергетический метаболизм и присутствуют в основном функциональные, а не структурные изменения [1]. Пенумбра – главная мишень терапии инсульта [1], в том числе с использованием гипотермии как воздействия *ultima ratio*. Но при криодеструкции пенумбра, возможно, сама является “терапевтической зоной” лечебной гипотермии, стимулируя регуляторные системы организма. Это положение основывается на анализе достоверных данных об использовании гипотермии в практической стоматологии и экспериментальном обосновании потенциальной эффективности холодových воздействий для нормализации стресс-зависимых нарушений в мягких тканях пародонта [3, 6, 7]. В этих случаях механизм лечебного действия охлаждения может быть обусловлен способностью стимулировать реактивность организма, повышать его структурную и функциональную лабильность с помощью регуляции проницаемости гистогематических барьеров, в частности гематосаливарного барьера (ГСБ). Концепция ГСБ была разработана в конце прошлого столетия [15] и ее продолжают плодотворно развивать [6, 7, 14]. В последние десятилетия в биологии и медицине формируется новое научное направление, которое позволяет количественно оценивать общий уровень упорядоченности или хаотичности, по сути лабильности функциональной архитектоники систем организма по показателям фрактальной размерности [4, 8, 9, 17]. Фрактальный анализ хорошо зарекомендовал себя в физиологии [9, 16], морфологии [4, 5] и медицине [17], например при изучении микроциркуляторного русла органов и тканей в норме и патологии [11, 20]. Морфологическим фракталом можно назвать объект со сложной иерархией структур, которая состоит из частей, статистически подобных целому. По Хаусдорфу размерность фрактала больше евклидовой (топологической) и, как правило, дробная [8, 9]. Типичным примером фракталоподобного образования может быть сердечно-сосудистая система, в частности ее микрогемациркуляторное звено – основа всех гистогематических барьеров.

Цель работы – определение фрактальных особенностей структурно-функционального состояния элементов гистогематического барьера и трехмерной архитектоники мягких тканей пародонта крыс после криоапликации.

### Материалы и методы

Все манипуляции с животными (белые крысы массой 200–250 г) проводили после внутрибрюшинной инъекции тиопентала натрия для обеспечения состояния поверхностного наркоза.

Криоапликацию слизистой оболочки внутренней поверхности щеки и края твердого неба выполняли с помощью автономного криоапликатора

as the effect of *ultima ratio*. However during cryodestruction the penumbra is likely hypothermia “therapeutic zone” itself, that is it stimulates regulatory systems of an organism. This notion is based on the analysis of statistically significant data about the use of hypothermia in practical dentistry and experimental substantiation of potential efficiency of cold effects for normalization of stress-dependent disorders in soft tissues of parodontium [3, 6, 7]. In these cases the mechanism of therapeutic effect of cooling may be stipulated with the ability of stimulation of an organism reactivity, increasing of functional lability by means of regulation of permeability of histohematic barriers, in particular hematosalivary barrier (HSB). Conception of HSB was developed at the end of last century [15] and its development has succeeded [6, 7, 14]. During recent decades in biology and medicine there has been formed a new scientific trend enabling to quantitatively assess total degree of order or chaos, actually lability of functional architecture of organism systems on the indices of fractal dimensions [4, 8, 9, 17]. Fractal analysis has recommended itself well in physiology [9, 16], morphology [4, 5] and medicine [17], for example when studying the microcirculatory channels of organs and tissues in the norm and pathology [11, 20]. The object with a complicated hierarchy of structures, consisting of the parts statistically similar to the whole may be called morphological fractal. According to Hausdorff the dimensions of fractal is bigger than Euclid one (topological) and as a rule it is fractional [8, 9]. The typical example of fractal-like formation may be cardiovascular system, in particular its microhemocirculating link, the base of all histohematic barriers.

The research aim is to examine fractal peculiarities of structural and functional state of elements of histohematic barrier and 3D architecture of soft tissue of rat's parodontium after cryoapplication.

### Materials and methods

All manipulations with animals (white rats of 200–250 g weight) were performed after intraperitoneal injection of sodium thiopentalum to provide the state of surface narcosis.

Cryoapplication of buccal inner mucus and margins of hard palate was done with autonomous cryoapplicator KD-3 (Institute of Low temperature Physics and Engineering, Kharkov) with 2 mm copper nozzle at  $-120^{\circ}\text{C}$  for 1 min.

Microhemocirculation of gums was examined *in vivo* with the methods of biomicroscopy [11] (microscope LUMAM K-1 (LOMO, USSR), sodium fluorescein (Makrokhim, Russia) as a dye) and confocal microscopy (microscope LSM META 510 (Carl Zeiss, Germany), 3,3-dimethyl oxycarbocyanin iodide (Serva, USA) as a dye) [11].

The samples of parodontium soft tissues from the cryodestruction center zone (CZ) and boundary area,

КД-3 (ФТИНТ НАН Украины) с медной насадкой диаметром 2 мм, температурой  $-120^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин.

Микрогемодиализацию десен изучали *in vivo* методами биомикроскопии [11] (микроскоп Люмам К-1 (ЛОМО, СССР), краситель – флюоресцеин натрия (“Макрохим”, Россия) и конфокальной микроскопии (микроскоп LSM META 510 (Carl Zeiss, Германия), краситель – 3,3-диметилдиксикарбонина йодид (Serva, США).

Образцы мягких тканей пародонта из зоны ядра криодеструкции (ЗД) и пограничной области – зоны пены (ЗП) для оптической микроскопии полутонких срезов и трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов брали на 14-е сутки после криоаппликации. Препарирование проводили в соответствии с общепринятыми методами и рекомендациями [2]. Ткани фиксировали 3%-м глутаральдегидом и 1%-м буферным раствором четырехоксида осмия. Образцы тканей обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне, заключали в смесь смол эпон-аралдит. Серийные полутонкие срезы (0,5 мкм) изготавливали на ультрамикротоме УМТП-6 (“SELMI”, Украина), окрашивали основным фуксином и метиленовым синим, ультратонкие срезы – на ультрамикротоме УМТП-4 (“SELMI”, Украина), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование осуществляли с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К (“SELMI”, Украина).

Для морфометрической обработки данных использовали компьютерную систему анализа FRAM [10, 13]. В математическую среду FRAM перенесли фрагменты изображений биообъектов (рис. 1). Цифровые изображения сканировали методом “скользящего окна”. В каждом окне  $W$  ( $16 \times 16$  или  $48 \times 48$ ) вычисляли фрактальные размерности ( $D$ ) и среднее значение для всего изображения. Придавая определенным диапазонам  $D$  условную окраску, строили селективное изображение (рис. 1).

Для расчета  $D$  в окне  $W$  изображение представляли в трехмерном виде ( $3D\ W$ ), в качестве “высоты” использовали нормированную на максимальное значение яркость точек в зависимости от их координат в окне сканирования. Окна  $W$  разбивали на квадраты разного размера и во всех квадратах вычисляли площадь поверхности части трехмерного представления изображения, ограниченной этими квадратами, “методом призмы” [10]. Далее проводили линейную аппроксимацию логарифмической зависимости площади поверхности трехмерного представления изображения от стороны квадрата, который ее ограничивает, и вычисляли  $D$  [8].

penumbra zone (PZ) for optical microscopy of semi-thin slices and transmission electron microscopy were derived to the 14<sup>th</sup> days after cryoapplication. The preparation was performed in accordance with generally accepted methods and recommendations [2]. The tissues were fixed with 3% glutaraldehyde and 1% buffer solutions of osmium tetroxides. The tissue samples were dehydrated in ethanol of ascending concentration and absolute acetone, embedded into epon-araldite resin mixture. Serial semi-thin sections ( $0.5\ \mu\text{m}$ ) were done with ultramicrotome UMTP-6 (SELMI, Sumy, Ukraine), stained with basic fuchsin and methylene blue, ultrathin sections were performed with ultramicrotome UMTP-4 (SELMI, Ukraine), contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The viewing and photographing were carried out using electron microscope PEM-125K (SELMI, Ukraine).

For morphometric processing of the data there was used computer analysis system FRAM [10, 13]. Into mathematical medium FRAM there were removed the image fragments of biological objects (Fig. 1). Digital images were scanned with the method of “sliding window”. In each window  $W$  ( $16 \times 16$  or  $48 \times 48$ ) there were counted fractal dimensions ( $D$ ) and mean for the whole image. Assigning to certain ranges  $D$  color code, there was designed a selective image (Fig. 1).

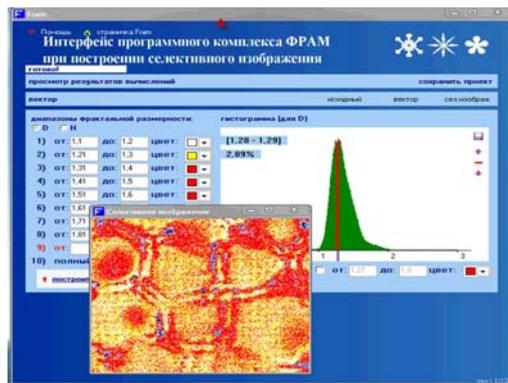
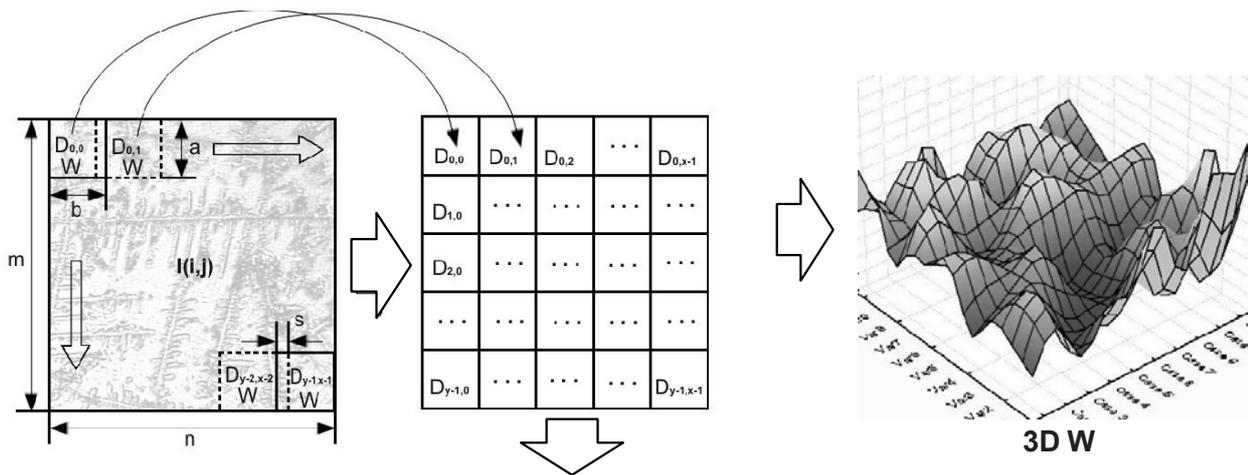
To calculate  $D$  in the window  $W$  the image was of  $3D$  appearance ( $3D\ W$ ) as the “height” there was used normalized to maximum brightness value of spots depending on their coordinates in scanning window. Windows  $W$  was divided into squares of different sizes and in all the squares there was counted the surface area of the part of  $3D$  image presentation, limited with these squares, “prism method” [10]. Later there was performed the linear approximation of surface area logarithm dependence of  $3D$  image presentation from the square side, limiting it and  $D$  was calculated [8].

During interpretation of the data there was taken into account the statement of the theory of generalized Brownian motion, wherein there is involved the value  $H$ , associated to  $D$  by simple ratio:  $H = 2 - D$  [8]. The system is considered to be persistent (stable) at  $1 > H > 0.5$ , anti-persistent (inclined to rearrangements) at  $1 < H < 0.5$  and random at  $H = 0.5$ .

## Results and discussion

Our morphological studies testified to the fact that in control animals the structure of epithelium of oral cavity was typical and visually did not change after cryoapplication (Fig. 2).

The performed fractal analysis by scanning of images of basal, thorned, granular and horny epithelium layers on semi-thin sections (Fig. 2) have shown that in horny layer the area with the dimensions of lines, close to Euclid one ( $D \sim 1.0$ ) are surrounded with



**Рис. 1.** Основные этапы построения селективных изображений при фрактальном анализе в математической среде FRAM.

**Fig. 1.** Main stages of designing the selective images during fractal analysis in mathematical environment FRAM.

При интерпретации данных учитывали положение теории обобщенного броуновского движения, в которой фигурирует величина  $H$ , связанная с  $D$  простым соотношением:  $H = 2 - D$  [8]. Считается, что система является персистентной (стабильной) при  $1 > H > 0,5$ , антиперсистентной (склонной к перестройкам) при  $0 < H < 0,5$ , а случайной при  $H = 0,5$ .

### Результаты и обсуждение

Наши морфологические исследования свидетельствовали, что у контрольных животных структура эпителия ротовой полости имела типичное строение и визуально не претерпевала изменений после криоапликации (рис. 2).

Фрактальный анализ, проведенный путем сканирования изображений базального, шиповатого, зернистого и рогового слоев эпителия на полутонких срезах (рис. 2) показал, что в роговом слое области с размерностью линий, близкой к евклидовой ( $D \sim 1,0$ ), окружены фрактальными областями ( $D \sim 1,2$ ) в персистентном (самоподдерживающемся) диапазоне с вкраплениями антиперсистентных участков, численность которых увеличивается в зернистом и шиповатом слоях. Базальный слой эпителия отличается более контрастными участками с антиперсистентной размерностью ( $D \sim 1,7$ ) в персистентном окружении, которое свидетельствует о перестроечных процессах в структуре этого ростового слоя.

fractal areas ( $D \sim 1.2$ ) in persistent (self-maintaining) range with inclusions of anti-persistent sites, the number of which rises in granular and thorned layers. Basal epithelium layer is distinct in more contrast sites with anti-persistent dimensions ( $D \sim 1.7$ ) in persistent environment, testifying to rearrangement processes in the structure of this growth layer.

Connective tissue on the index  $D \sim 1.25$  is quite heterogenous, but in a whole it is stable, equally persistent in preparations derived with different methods of microscopy at differing in ten and hundred times magnifications (Fig. 3).

After cryoapplication tissue structural lability increases on criterion  $D$ , but it remains in stable, persistent area. Selective images of the samples testify that cryoapplication in both PZ and DZ does not significantly change general geometry of tissue at the level of group of cells (scanning window  $16 \times 16$ , Fig. 2). However at the level of epithelium layers (window  $48 \times 48$ , Fig. 2) fractal analysis reveals strong differences in tissue structure, but which can not be found visually. So, after cryoapplication in PZ in contrast to DZ, epithelial cristas are anti-persistent, inclined to rearrangements, regeneration and recovery. In CZ the keratic layer is anti-persistent, there the rearrangement tendencies will lead to hyperkeratosis and destruction.

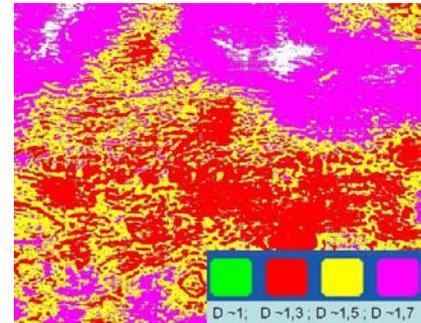
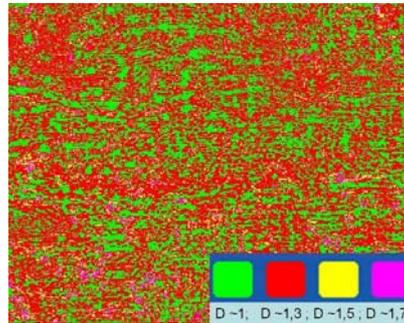
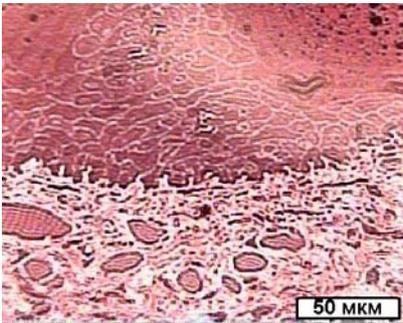
Fractal analysis of electron microscopic images of soft tissues confirmed the regularities obtained at light optic level. So, in all the samples of tissue (CZ and

Микроскопия  
Microscopy

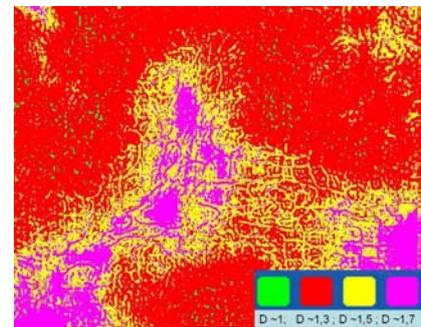
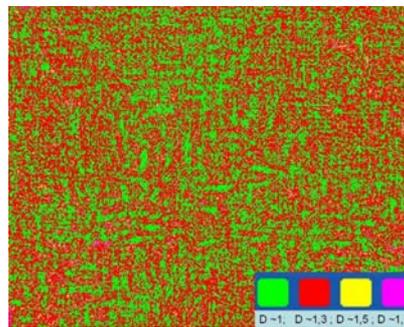
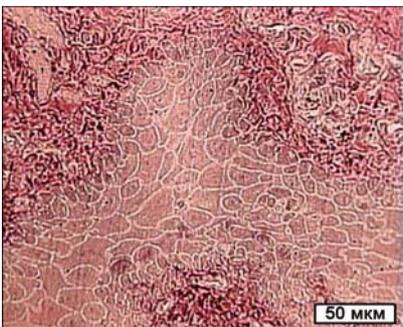
Селективное изображение  
(окно сканирования 16×16 точек)  
Selective image  
(scanning window 16×16 points)

Селективное изображение  
(окно сканирования 48×48 точек)  
Selective image  
(scanning window 48×48 points)

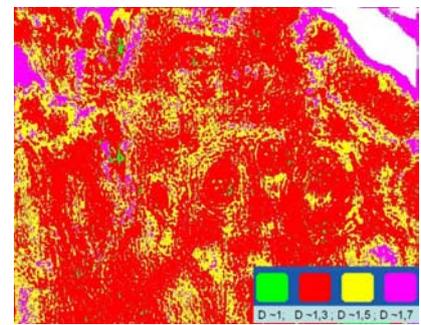
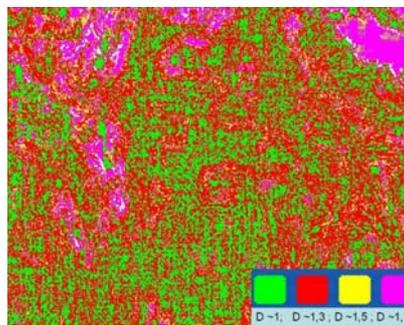
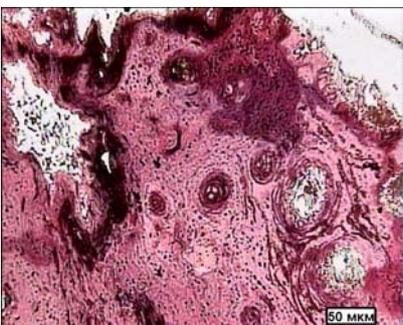
**Контроль Control**



**Криоапликация ЗП Cryoapplication (PZ)**



**Криоапликация ЗД Cryoapplication (CZ)**



**Рис. 2.** Микроскопический и фрактальный анализ влияния криоапликации на состояние эпителия и соединительной ткани десен крыс.

**Fig. 2.** Microscopic and fractal analysis of cryoapplication effect on epithelium state and connective tissue of rat's gums.

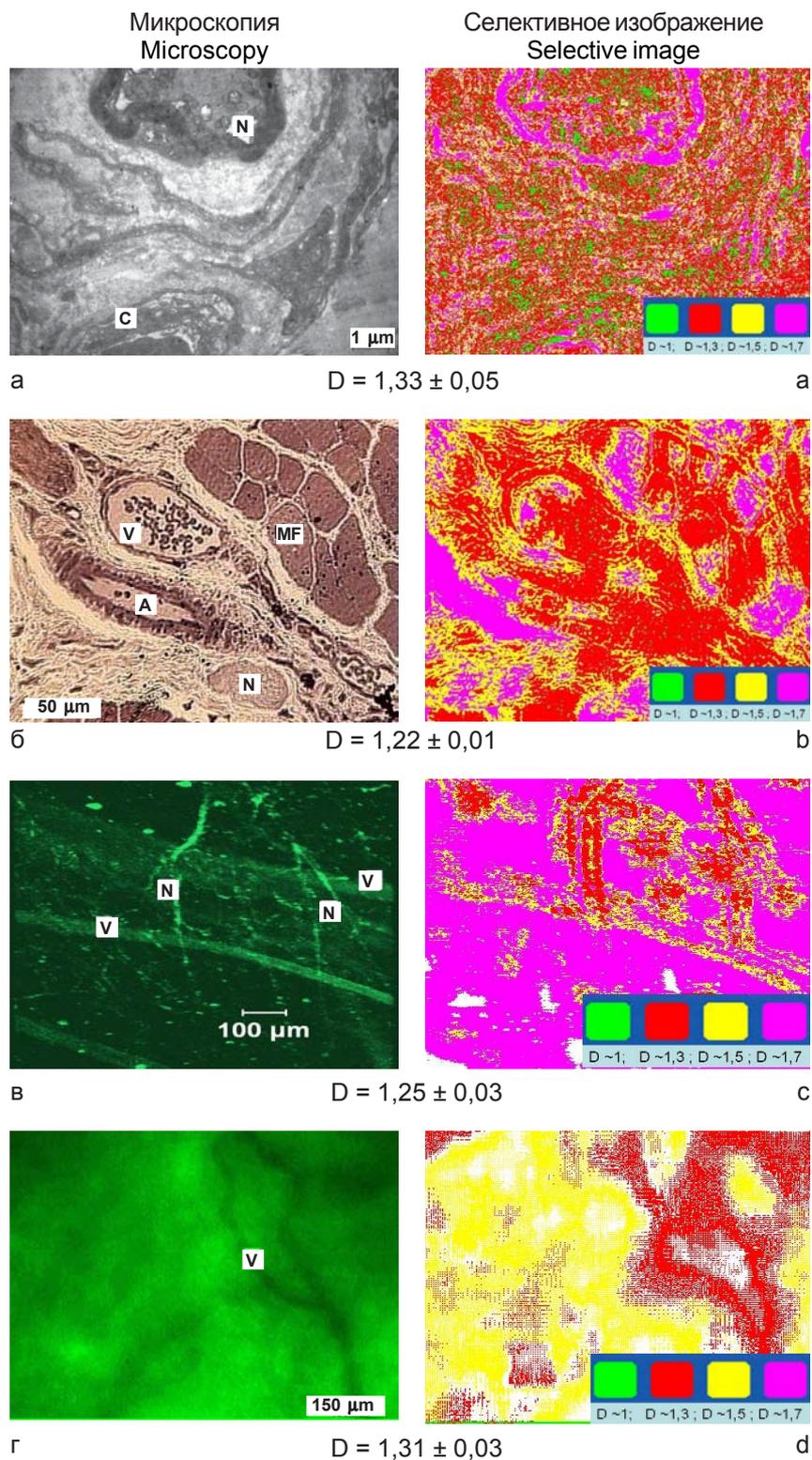
Соединительная ткань по показателю  $D \sim 1,25$  довольно неоднородна, но в целом устойчива, одинаково персистентна на препаратах, получаемых разными методами микроскопии при отличающихся в десятки и сотни раз увеличениях (рис. 3).

По критерию  $D$  после криоапликации повышается структурная лабильность ткани, при этом среднее значение  $D$  возрастает, но остаётся в устойчивой, персистентной области. Селективные изображения образцов свидетельствуют, что криоапликация как в ЗП, так и в ЗД существенно не изменяет общую геометрию ткани на уровне

Рис. 4). Basal cells are located on a continuous basal membrane and bound with it by semi-desmosomes and between themselves and the ones of thorned layer they are connected by gap junctions and desmosomes on peculiar plasmalemma outgrowth of microvilli type. Microvilli fill quite a wide intercellular space. Nuclei of basal cells with 1-2 large nucleoles of irregular shape contain predominantly euchromatin. In cytoplasm there are found free ribosomes, separate cisterns of endoplasmic reticulum and non-numerous mitochondria with electron dense

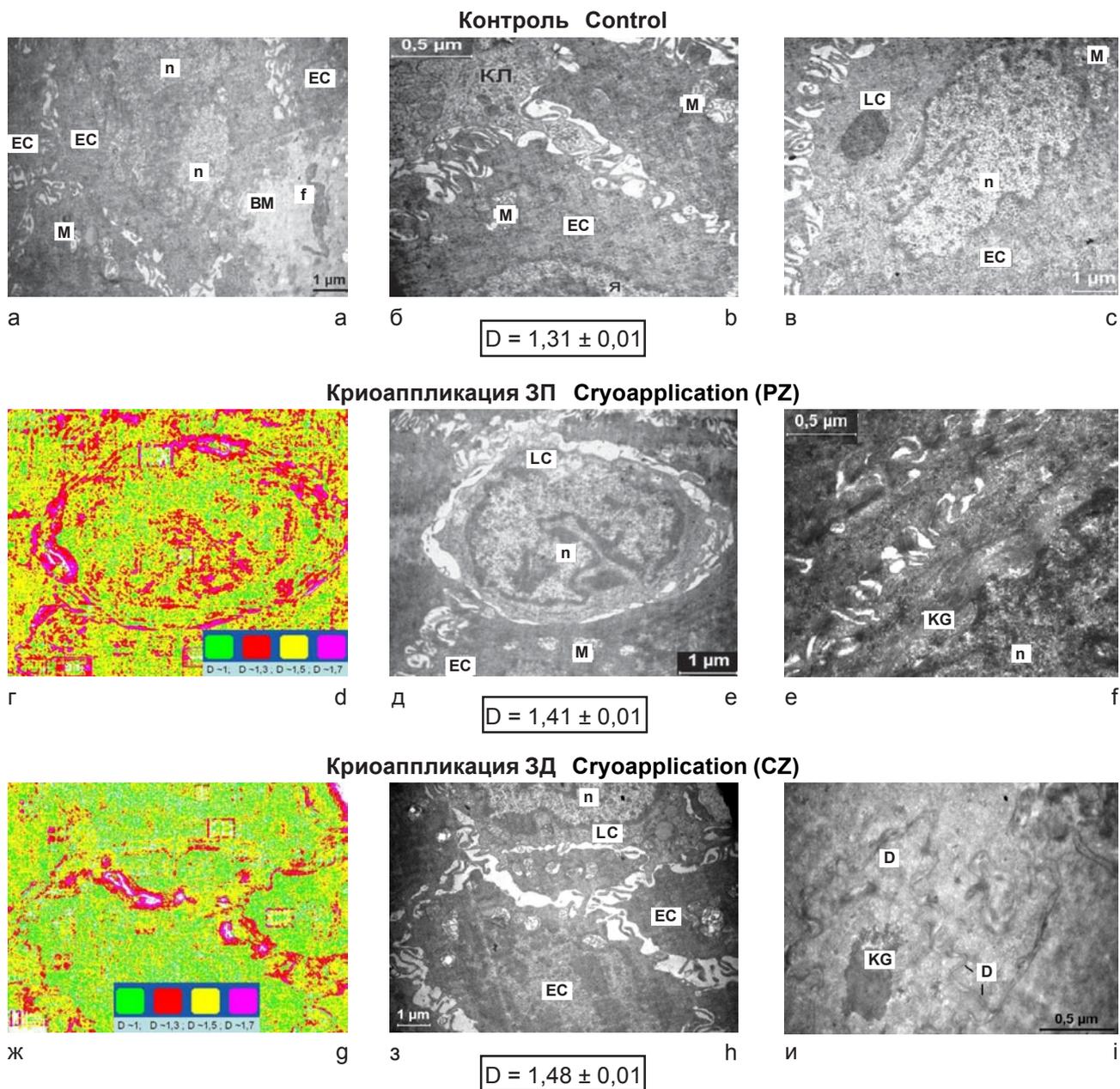
группы клеток (окно сканирования 16×16, см. рис. 2). Однако, на уровне слоёв эпителия (окно сканирования 48×48, см. рис. 2) фрактальный анализ обнаруживает кардинальные различия в структуре ткани, тем не менее, не выявляемые визуально. Так, после криоапликации в зоне пенумбра, в отличие от зоны деструкции, эпителиальные гребешки антиперсистентны, склонны к перестройкам, регенерации и восстановлению. В зоне криодеструкции антиперсистентен роговой слой, в котором тенденции к перестройке чреваты гиперкератозом и разрушением.

Фрактальный анализ электронно-микроскопических изображений мягких тканей пародонта подтвердил полученные на светооптическом уровне закономерности. Так, во всех образцах ткани (ЗК и ЗП) после криоапликации визуально не выявлено никаких существенных ультраструктурных особенностей, которые не отвечали бы норме (рис. 4). Базальные клетки расположены на непрерывной базальной мембране и связаны с ней полудесмосомами, а между собой и клетками шиповатого слоя – щелевыми соединениями и десмосомами на своеобразных выростах плазмолеммы типа микроворсинок, заполняющих довольно широкое межклеточное пространство. Ядра базальных клеток с 1-2 крупными ядрышками неправильной формы содержат преимущественно эухроматин. В цитоплазме обнаруживаются свободные рибосомы, отдельные цистерны эндоплазматического ретикулума и немногочисленные митохондрии с электроплотным матриксом и короткими кристами (рис. 4, а). Эпителиоциты шиповатого слоя имеют полигональную форму, образуют выросты – микроворсинки в широкие межклеточ-



**Рис. 3.** Микроскопический и фрактальный анализ фрагментов микрососудов и нервных волокон соединительной ткани контрольных крыс: а – электроннограмма; б – полутонкий срез; в – конфокальная микроскопия; г – биомикроскопия; А – артериола; V – венула; С – капилляр; MF – мышечные волокна; N – нервное волокно.

**Fig. 3.** Microscopic and fractal analysis of fragments of microvessels and nerve fibers of connective tissue of control rats: a – electron micrograph; b – thin slice; c – confocal microscopy; d – biomicroscopy; A – arteriole; V – venule; C – capillary; MF – muscle fibers; N – neural fibre.



**Рис. 4.** Электронно-микроскопический и фрактальный анализ влияния криоапликации на состояние эпителия десны крыс: а, б, в, д, е, з, и – электронограммы; г, ж – селективные изображения электронограмм; ВМ – базальная мембрана; D – десмосомы; EC – эпителиальные клетки; KG – кератогиалиновая гранула; LC – клетка Лангерганса; М – митохондрии; TF – тонофибриллы; f – отростки фибробластов; n – ядро.

**Fig. 4.** Electron microscopy and fractal analysis of cryoapplication effect on epithelium state of rat's gums: a, b, c, e, f, h, i – electron patterns; d, g – selective images of electron patterns; BM – basal membrane; D – desmosomes; EC – epithelial cells; KG – keratohyaline granule; LC – Langerhans cell; M – mitochondria; TF – tonofibrils; F – fibroblast tails; n – nucleus.

ные пространства, а также цитоплазматические выпячивания, контактирующие с выростами соседних клеток с помощью десмосом, которые связаны с пучками тонофиламентов (рис. 4, б).

Эпителиоциты зернистого слоя уплощенные, имеют мелкие гранулы кератогиалина и большое число розеток гликогена в цитоплазме, тогда как микроворсинок значительно меньше, чем в шиповатом слое. Количество органелл в эпителиоцитах при приближении к роговому слою прогрессивно

matrix and short cristae (Fig. 4a). Epitheliocytes of thorned layer are of polygonal shape and form the outgrowings, microvilli into wide intercellular spaces, as well as cytoplasm invagination contacting with the outgrowth of adjacent cells by means of demosomes, bound with the bunches of tonofibrils (Fig. 4b).

Epitheliocytes of granular layer are flattened, have small granules of keratohyaline and a big number of glycogen rosettes in cytoplasm, meanwhile the number of microvilli is significantly lower if compared with the

уменьшается. Тонкофибриллы распадаются на короткие тонкие филаменты, плазмолемма утолщается, межклеточные пространства сокращаются (рис. 4, в).

Повышение структурной лабильности, индуцированное охлаждением, скорее всего обусловлено “фрактализацией” геометрии сложного “лабиринта” межклеточного пространства эпителиоцитов всех стадий развития. На электронно-микроскопическом уровне сохраняется закономерность, отмеченная на селективных изображениях светоптических препаратов: антиперсистентные микроучастки всегда ограничены персистентными (рис. 4, г, ж). Эпителиальный слой, как физический барьер, становится более гибким, открытым к адаптационным изменениям, но остается надежной преградой для проникновения в организм антигенов, аллергенов, канцерогенов и т. п. После криоаппликации достоверно активируются также специфические иммунные механизмы, которые обеспечиваются взаимодействием антигенпрезентирующих клеток с разными популяциями лимфоцитов. Так, основными антигенпрезентирующими клетками в эпителии ротовой полости являются дендритные клетки Лангерганса (рис. 4, б). Они имеют большое ядро с инвагинациями кариолеммы и относительно большим содержанием гетерохроматина. В цитоплазме обнаруживаются развитые органеллы, многочисленные промежуточные филаменты, довольно специфические гранулы Бирбека (Birbeck). Эти клетки расположены в базальном или шиповатом слое эпителия, а разветвленные отростки могут проникать или не проникать в высшие слои в зависимости от состояния интерцеллюлярного пространства, геометрия которого существенно изменяется после криовоздействия. Для ЗП и ЗК характерны сложная архитектура межклеточных связей, фрактализация интерцеллюлярного пространства (рис. 4, г–и). Можно предположить, что такие ультраструктурные особенности будут способствовать повышению эффективности иммунных механизмов ГСБ [18, 19].

Кроме эпителиальных элементов ГСБ, важной составляющей барьерных механизмов являются эндотелиальные элементы микрососудистого русла. Проведены соответствующие эксперименты по изучению ультраструктурных коррелятов проницаемости ГСБ. Наиболее важные изменения при воздействии холода происходят на поверхности эндотелиоцитов. На внутреннем и внешнем контурах микрососудов увеличиваются численность инвагинаций, количество микровиллей и эндоцитозных везикул разных размеров, что является признаком повышения функциональной активности ГСБ. По нашему мнению, изменения, которые наблюдаются на поверхности эндотелиоцитов, вмес-

thorned layer. The number of organelles in epitheliocytes when approaching to horny layer progressively reduces. Tonofibrillas decay into short thin filaments, plasmollemma is getting thicker, intercellular spaces decreases (Fig. 4).

The rise in structural lability, induced by cooling, likely stipulated by geometry “fractalization” of complicated “labyrinth” of intercellular space of epitheliocytes of all the developmental stages. At electron microscopic level there is kept the regularity noticed on selective images of light optical preparations: antipersistent microsites always are limited with persistent ones (Fig. 4d, g). Epithelial layer as physical barrier is getting more flexible, open to adaptation changes, but remains a reliable obstacles for penetration of antigens, allergens, cancerogens *etc.* into an organism. After cryoapplicaton there are statistically activated also the specific immune mechanisms, provided by the interaction of antigen-presenting cells with different lymphocyte populations. So, the main antigen-presenting cells in oral epithelium are dendrite Langerhans cells (Fig. 4b). They have a big nucleus with invaginations of karyolemma and relatively high content of heterochromatin. In cytoplasm there are found the developed organelles, multiple intermediate filaments, quite specific Birbeck granules. These cells are located in basal and thorned epithelium layers, and branched-out outgrowings may penetrate or not into the upper layers depending on the state of intercellular space, geometry of which significantly changes after cryo-effect. For PZ and CZ a complicated architecture of intercellular bonds, fractalization of intercellular space are characteristic (Fig. 4d–k). One may suppose that these ultrastructure features will contribute to the increased efficiency of immune mechanisms of HSB [18, 19].

In addition to epithelial elements of HSB, an important component of barrier mechanisms are endothelial elements of microvascular channel. There have been carried out corresponding experiments on study of ultrastructural correlates of HSB permeability. The most important changes in the effect of cold occur on the surface of endotheliocytes. On inner and outer contours of microvessels the number of invaginations, microvilli and endocytosis vesicles of different sizes increase, that is the sign of rising functional activity of HSB. On our opinion, the alterations observed on the surface of endotheliocytes along with a rise of the pool of endocytosis vesicles testify to the intensification of pinocytosis processes, total quantitative index of which is fractal dimension (Table). In electron microimages we have observed all the stages of formation of pinocytosis vesicles, starting from invagination of luminal membrane, formation of open and closed vesicles, attached to luminal membrane; appearance of free pinocytosis vesicles, fusion between themselves; for-

те с увеличением пула эндоцитозных везикул свидетельствуют об интенсификации процессов пиноцитоза, суммарным количественным показателем которого является фрактальная размерность (таблица). На электронных микрофотографиях мы наблюдали все этапы формирования пиноцитозных везикул, начиная с инвагинации люминальной мембраны, образования открытой и замкнутой везикул, прикрепленных к люминальной мембране; появления свободных пиноцитозных пузырьков; слияния их между собой; формирования каналов из слившихся везикул и заканчивая прикреплением везикул к аблюминальной мембране с последующей рециклизацией. Фрактальный анализ показал, что ультраструктура капилляров в области ЗК более лабильна, чем в ЗП, но общая функциональная геометрия остается стабильной, персистентной (таблица).

Описанные изменения ультраструктуры гистогематических барьеров мягких тканей пародонта, по нашему мнению, могут способствовать повышению проницаемости ГСБ. Действительно, после криовоздействия скорость кровообращения практически не изменяется, в то же время наблюдается выход люминесцентного красителя в перикапиллярный интерстиций.

Динамика фрактальных размерностей ультраструктурных элементов ГСБ после криоаппликации, возможно, отвечает установленной ранее закономерности [9], присущей гематоэнцефалическому барьеру: персистентность структуры ( $D \sim 1,3$ ) способствует проникновению адреналина и норадреналина, антиперсистентность ( $D \sim 1,7$ ) – ацетилхолина. Что касается других гистогематических барьеров, дальнейшие исследования покажут, насколько общими или специфическими являются их фрактальные структурно-функциональные особенности.

### Выводы

Следует отметить, что новейшие методики подтверждают основные положения несколько забытой концепции гематосаливарного барьера. Важной составной частью, первым и последним его защитным рубежом является структурно-функциональный комплекс тканей пародонта. Связанный соединительно-тканной “паутиной”, пронизанный “эндокринным деревом” эндотелия кровеносных капилляров, он формирует сложную гармонию геометрии интер- и трансцеллюлярного пространства, трехмерная организация которого

Морфометрические показатели эндотелиоцитов капилляров после криоаппликации  
Morphometric indices of capillary endotheliocytes after cryoapplication

Участок Area	Количество инвагинаций Number of invaginations	Количество микровиллей Number of microvilli	Количество везикул Number of vesicles	Размерность Dimension
Контроль Control	$10 \pm 3$	$14 \pm 4$	$54 \pm 8$	$1,31 \pm 0,01$
Зона пenumбра Penumbra zone	$16 \pm 3^1$	$25 \pm 6^1$	$74 \pm 9^1$	$1,37 \pm 0,008^{1,2}$
Зона деструкции Destruction zone	$18 \pm 4^1$	$26 \pm 5^1$	$78 \pm 12^1$	$1,43 \pm 0,009^{1,2}$

**Примечание:** <sup>1</sup> – различия по сравнению с контролем достоверны ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> – различия между зонами пenumбра и деструкции достоверны ( $p < 0,05$ ).

**Note:** <sup>1</sup> – statistically significant differences if compared with the control ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> – statistically significant differences between penumbra and destruction zones ( $p < 0,05$ ).

mation of channels of fused vesicles and finally the adhesion of vesicles to abluminal membrane with following recyclization. Fractal analysis has show that ultrastructure of capillaries in the CZ area is more labile than in CZ, but total functional geometry remains stable, persistent (Table).

The described changes of ultrastructure of histohe-matic barriers of parodontium soft tissues on our opinion may contribute to a rise in HSB permeability. Actually after cryoeffect the blood circulation rate does not practically change, at the same time there is observed a release of luminescent dye into pericapillary interstitium.

Dynamics of fractal dimensions of ultrastructural elements of HSB after CA likely corresponds to previous regularity [9], inherent to blood brain barrier; persistence of the structure ( $D \sim 1,3$ ) contributes to penetration of adrenalin and noradrenalin, and antipersistence ( $D \sim 1,7$ ) does for acetylcholine. As for the other histohe-matic barriers the further studies will demonstrate how general or specific are their fractal structural and functional peculiarities.

### Conclusions

It should be noted that the novel methods confirm the main statements of a forgotten concept of hematosalivary barrier. An important component, the first and the last protective boundary of HSB is structural and functional complex of parodontium tissues. Bound with connective tissue “cobweb”, penetrated with an “endocrine tree” of blood capillary endothelium, it forms a complicated harmony of geometry of inter- and transcellular space, 3D organization of which statistically appears as “self-like”, vividly demonstrating the

статистически выглядит “самоподобной”, наглядно демонстрирует преимущества фрактальных и необходимость новых парадигм функциональной морфологии. Особая роль в реализации базовых функций ГСБ принадлежит эпителию слизистой оболочки ротовой полости. Его многослойная динамическая структура является не только мощным защитным барьером, но и чувствительным показателем наличия патологических процессов в организме. Спектр фрактальных размерностей может быть естественной количественной шкалой этого морфофизиологического индикатора, первым реагирующим на малейшие сенсорные, в том числе температурные воздействия, способные как стабилизировать, так и разбалансировать установочные точки гомеостаза.

### Литература

1. Бондарева Т.А., Ибатуллин М.М., Михайлов И.М., Хайрулин Р.Н. МРТ-динамика объема очагов острой ишемии в головном мозге // Неврологический вестник.– 2008.– Т. XL, Вып. 3.– С. 5–8.
2. Гайер Г. Электронная гистохимия.– М.: Мир, 1974.– 488 с.
3. Грохольський А.П., Кодола М.А., Бургонський В.Г., Чайковський Ю.Б. Нетрадиційні методи лікування в стоматології.– Київ: Здоров'я, 1995.– 376 с.
4. Загоруйко Г.Е., Скидан И.Г. Проблемы и перспективы развития методов количественного анализа фрактальных биологических структур // Вісник проблем біології і медицини.– 2007.– Вип. 2.– С. 102–107.
5. Исаева В.В., Чернышев А.В., Шкуратов Д.Ю. Фракталы и хаос в морфологии организма // Вестник ДВО РАН.– 2001.– №2.– С. 71–79.
6. Малышева Г.В., Марченко В.С., Бабичук Г.А. Гематосаливарный барьер при стресс-индуцированном вегетативном дисбалансе и гипотермической сенсорной стимуляции // Світ медицини та біології.– 2006.– №4.– С. 45–51.
7. Малышева Г.В. Терморегуляторные механизмы активации гематоэнцефалического и гематосаливарного барьеров при холодовом купировании стресс-индуцированных поражений пародонта // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 487–490.
8. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. – М.: Ин-т компьютер. исследований, 2002.– 656 с.
9. Марченко В.С. Функціональна архітектура гематоенцефалічного бар'єра в центральних механізмах терморегуляції при гіпотермії і гібернації // Науковий вісник НАУ.– 2008.– №126.– С. 88–97.
10. Марченко Н.В., Дюбко Т.С., Марченко В.С. и др. Применение фрактального анализа при оценке изменения макроструктуры дегидратированных биологических жидкостей // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 315–326.
11. Олещиренко А.А., Луценко Д.Г., Слета И.В., Марченко В.С. Применение метода фрактального анализа для оценки структурно-функционального состояния печени крыс *in vivo* // Бюл. эксперимент. биологии и медицины.– 2009.– Т. 147, №2.– С. 237–240.
12. Орел В.Е., Сівкович С.О., Зотіков Л.О. та інш. Теорія хаосу та злоякісні лімфоми // Журн. АМН України.– 2006.– Т. 12, №2.– С. 209–228.
13. Попов В.И., Медведев Н.И., Рогачевский В.В. и др. Трехмерная организация синапсов и астроглии в гиппокампе крыс и сусликов: новые структурно-функциональные

advantages of fractal and need new paradigm of functional morphology. A special role in realization of base functions of HSB belongs to the epithelium of oral mucous. Its multilayer dynamic structure is not only powerful protective barrier, but also sensitive index of the presence of pathological processes in an organism. The spectrum of fractal dimensions may be natural quantitative scale of this morphophysiological indicator, the first responding to the slightest sensory, including temperature effects, capable both to stabilize and misbalance the homeostasis set points.

### References

1. Bondareva T.A., Ibatullin M.M., Mikhaylov I.M., Khajrulin R.N. MRT-dynamics of volumes of foci of acute ischemia in brain // Nevrologicheskiy Vestnik.– 2008.– Vol. XL, Issue 3.– P. 5–8.
2. Geyer G. Electron microscopy.– Moscow: Mir, 1974.– 488 p.
3. Grokholskiy A.P., Kodola M.A., Burgonskiy V.G., Chaykovsky Yu.B. Non-traditional methods of treatment in dentistry.– Kyiv: Zdorov'ya, 1995.– 376 p.
4. Zagoruyko G.E., Skidan I.G. Problems and perspectives of development of methods of quantitative analysis of fractal biological structures// Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.– 2007.– Issue 2.– P. 102–107.
5. Isaeva V.V., Chernyshev A.V., Shkuratov D.Yu. Fractals and chaos in organism morphology// Visnyk DVO RAN.– 2001.– N2.– P. 71–79.
6. Malysheva G.V., Marchenko V.S., Babychuk G.A. Hematosalivary barrier at stress-induced vegetative disbalance and hypothermic sensor stimulation// Svit Meditsyny ta Biologii.– 2006.– N4.– P. 45–51.
7. Malysheva G.V. Thermoregulatory activation mechanisms of BBB and hematosalivary barrier at cold arresting of stress induced parodontium lesions // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 487–490.
8. Mandelbrot B. Fractal geometry of nature.– Moscow, 2002.– 656 p.
9. Marchenko V.S. Functional architecture of blood brain barrier in central mechanisms of thermoregulation at hypothermia and hibernation// Naukovyy Visnyk NAU.– 2008.– N126.– P. 88–97.
10. Marchenko N.V., Dyubko T.S., Marchenko V.S. et al. Application of fractal analysis to estimate macrostructure changes of dehydrated biological fluids // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 315–326.
11. Olefirenko A.A., Lutsenko D.G., Sleta I.V., Marchenko V.S. Application of fractal analysis method to estimate structural and functional state of rat's liver *in vivo* // Bul. Eksp. Biol. Med.– 2009.– Vol. 147, N2.– P. 237–240.
12. Orel V.E., Sivkovich S.O., Zotikov L.O. et al. Theory of chaos and malignant lymphoma // Zhurn. AMN Ukrainy.– 2006.– Vol. 12, N2.– P. 209–228.
13. Popov V.I., Medvedev N.I., Rogachevsky V.V. et al. Three dimension organization of synapses and astroglia in rat's and ground squirrel's hippocampus: new structural and functional paradigms of synapsis activity // Biofizika.– 2003.– Vol. 48, issue 2.– P. 289–308.
14. Starokadomsky P.L. Cheek pouches of hamster as model for studying penetration of oral mucous membrane // Fiziolog. Zhurn.– 2006.– Vol. 52, N1.– P. 101–105.
15. Physiology of histohematic barriers: Manual on physiology.– Moscow: Nauka, 1977.– 575 p.
16. Glenn R.W., Robertson H.T., Yamashiro S., Bassingthwaite J.B. Applications of fractal analysis to physiology// J. Appl. Physiol.– 1991.– Vol. 70, N6.– P. 2351–2367

- парадигмы работы синапса // Биофизика.– 2003.– Т. 48, Вып. 2.– С. 289–308.
14. *Старокадомський П.Л.* Защичні мішки хом'яка як модель для дослідження проникності слизової оболонки порожнини рота // *Фізіолог. журн.*– 2006.– Т. 52, №1.– С. 101–105.
  15. *Физиология гистогематических барьеров:* Рук-во по физиологии.– М.: Наука, 1977.– 575 с.
  16. *Glenny R.W., Robertson H.T., Yamashiro S., Bassingthwaight J.B.* Applications of fractal analysis to physiology // *J. Appl. Physiol.*– 1991.– Vol. 70, N6.– P. 2351–2367
  17. *Heymans O., Fissette J., Vico P. et al.* Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? // *Med. Hypotheses.*– 2000.– Vol. 54, N3.– P. 360–366.
  18. *Idoyaga J., Cheong C., Suda K. et al.* Cutting Edge: Langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II Products *in vivo* // *J. Immunol.*– 2008.– Vol. 180, N6.– P. 3647–3650.
  19. *Kissenpfennig A., Ant-Yahia S., Clair-Moninot V. et al.* Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function // *Mol. Cell. Biol.*– 2005.– Vol. 25, N1.– P. 88–99.
  20. *Lapi D., Marchiafava P.L., Colantuoni A.* Geometric characteristics of arterial network of rat pial microcirculation // *J. Vasc. Res.*– 2008.– Vol. 45, N10.– P. 69–77.
  17. *Heymans O., Fissette J., Vico P. et al.* Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? // *Med. Hypotheses.*– 2000.– Vol. 54, N3.– P. 360–366.
  18. *Idoyaga J., Cheong C., Suda K. et al.* Cutting Edge: Langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II Products *in vivo* // *J. Immunol.*– 2008.– Vol. 180, N6.– P. 3647–3650.
  19. *Kissenpfennig A., Ant-Yahia S., Clair-Moninot V. et al.* Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function // *Mol. Cell. Biol.*– 2005.– Vol. 25, N1.– P. 88–99.
  20. *Lapi D., Marchiafava P.L., Colantuoni A.* Geometric characteristics of arterial network of rat pial microcirculation // *J. Vasc. Res.*– 2008.– Vol. 45, N10.– P. 69–77.

*Accepted in 18.08.2009*

*Поступила 18.08.2009*