

УДК 616-091.0:616-002.153:616-092.9

*И.В. Ковач, Л.И. Кравченко, В.В. Гаргин\**

*Днепропетровская медицинская академия*

*\*Харьковский национальный медицинский университет*

## **АКТИВНОСТЬ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ АФТОЗНОМ СТОМАТИТЕ**

Исследовали активность индуцибельной фракции синтазы оксида азота (iNOs) в мягких тканях ротовой полости экспериментальных животных при моделировании хронического рецидивирующего афтозного стоматита. Выявлено, что при данном заболевании формируется комплекс эрозивно-язвенных изменений с сопутствующими воспалительными, дистрофическими, дисциркуляторными процессами, сопровождающимися повышением активности iNOs более чем в 2 раза – с  $(0,21 \pm 0,05)$  до  $(0,79 \pm 0,06)$  у. е. Степень активности iNOs более выражена в зонах, непосредственно прилегающих к зонам эрозий, очагах формирования язвенных дефектов.

**Ключевые слова:** хронический рецидивирующий афтозный стоматит, синтаза оксида азота, гистология, эксперимент.

Хронический рецидивирующий афтозный стоматит относится к группе хронических воспалительных язвенных заболеваний слизистой оболочки ротовой полости [1, 2]. Первоначально данное состояние было описано Иоганном фон Микулич-Радецким в 1898 году [2]. При хроническом рецидивирующем афтозном стоматите формируются одна или несколько болезненных эрозий и (или) язв в различных регионах слизистой оболочки полости рта [3]. Такие поражения окружены эритематозным венчиком, в то время как другие участки слизистой оболочки полости рта остаются неизменными. При этом наиболее распространенными зонами поражений являются участки, покрытые неороговевающим эпителием [3, 4].

Последнее десятилетие характеризуется пристальным изучением роли нарушения обмена оксида азота, в частности эндотелиальной фракции синтазы оксида азота (eNOs), при патологических процессах ротовой полости [5, 6]. При этом относительно хронического рецидивирующего афтозного стоматита существуют данные, как подтверждающие, так и опровергающие роль eNOs в его развитии [5, 7]. С нашей точки зрения, в сложившейся ситуации целесообразным яв-

ляется изучение активности другой фракции синтазы оксида азота, а именно индуцибельной (iNOs), учитывая имеющееся предложение рассматривать уровень оксида азота как маркер активности течения хронического рецидивирующего афтозного стоматита [8].

Целью настоящего исследования явилось выявление активности индуцибельной фракции синтазы оксида азота в мягких тканях ротовой полости экспериментальных животных при моделировании хронического рецидивирующего афтозного стоматита.

**Материал и методы.** Для морфологического изучения состояния тканей слизистой оболочки ротовой полости при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите в целях исключения влияния соматической патологии и социальных факторов нами поставлен эксперимент на 8 экспериментальных животных (кроли-самцы голландской породы в возрасте 9 месяцев), у которых путем sensibilization вызывали развитие эрозивно-язвенных поражений ротовой полости по типу афтозных поражений при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите. После рутинной проводки фрагменты мягких тканей ротовой полости со сформировавшимися эрозиями и язвами окрашивали гематоксилином

© И.В. Ковач, Л.И. Кравченко, В.В. Гаргин, 2015

и эозином, пикрофуксином по ван Гизону. Иммуногистохимическое исследование проводили постановкой непрямо́й иммунопероксидазной реакции с моноклональными антителами к индуцибельной фракции NO-синтазы фирмы Thermo scientific (РФ). Реакцию визуализировали с помощью набора UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo scientific, РФ).

Микропрепараты изучали на микроскопе «Olympus BX-41» (Япония) с последующей обработкой программой «Olympus DP-soft version 3.2», с помощью которой определяли интенсивность иммуногистохимических реакций и проводили морфометрическое исследование.

**Результаты и их обсуждение.** При осмотре слизистой ротовой полости животных, у которых проводилась сенсibilизация тканей, выявлены язвенные дефекты округлой или овальной формы диаметром до 5 мм с западающей поверхностью, покрытой белесоватым налетом. При изучении гистологических препаратов животных данной группы определено, что слизистая ротовой полости покрыта многослойным плоскоклеточным неороговевающим эпителием, за исключением поверхности десны, где эпителий ороговевающий. В препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, выявляются некротические, преимущественно эрозивные, повреждения (рис. 1), но встречаются и язвенные дефекты.

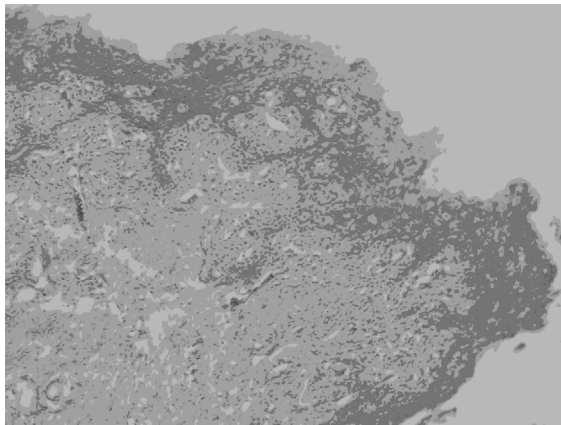


Рис. 1. Резкое очаговое истончение плоскоклеточного эпителия, множественные эрозии. Наличие эозинофилов в составе воспалительного инфильтрата как в эпителии, так и в собственной пластинке слизистой. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Толщина плоскоклеточного эпителия неоднородная, наблюдаются участки как его истончения до одного–двух рядов клеток, так и неравномерного утолщения, при этом последние встречаются как вокруг язвенных дефектов, так и в отдалении (рис. 2).

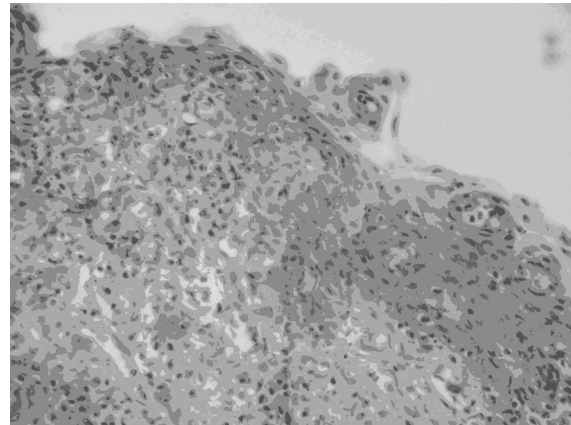


Рис. 2. Резкое истончение эпителиального пласта в результате некробиотических процессов. Обилие апоптотических частичек. Воспалительный инфильтрат представлен преимущественно эозинофилами,  $\times 400$

Многослойный плоский эпителий местами был значительно истончен, с участками атрофии и некроза, достигавшими в некоторых местах подслизистой основы. Между участками атрофии многослойный плоский эпителий неравномерно утолщен вследствие пролиферации клеток зернистого, шиповатого и – в меньшей мере – базального слоев, умеренно выраженного папилломатоза. При этом в таких участках эпителия наблюдаются активные признаки пролиферации (рис. 1, 2).

В результате пероксидазной реакции с индуцибельной фракцией NO-синтазы в исследуемой группе выявлено выраженное окрашивание с наличием зон большей и меньшей интенсивности, закономерность распределения которых выявить только на препаратах с индуцибельной фракцией NO-синтазы не удается. При этом в эпителиальном пласте появляются зоны активности индуцибельной фракции (рис. 3). При цитометрическом исследовании установлено увеличение активности реакции с  $(0,21 \pm 0,05)$  у. е. в группе интактных животных до  $(0,79 \pm 0,06)$  у. е. в исследуемой группе ( $p < 0,05$ ).

При сопоставлении препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, по ван

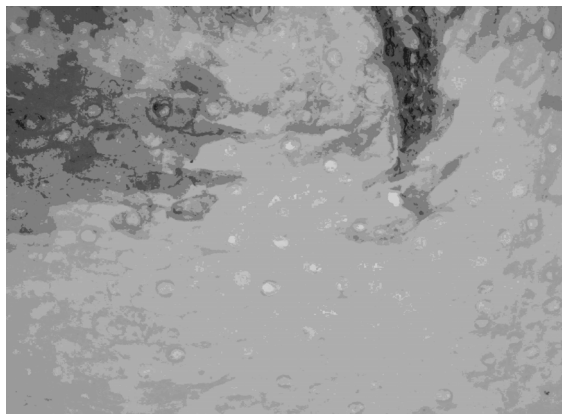


Рис. 3. Фокус активной индуцибельной NO-синтазы в толще эпителиального пласта. Пероксидазная реакция с моноклональными антителами к индуцибельной NO-синтазе,  $\times 400$

Гизону, с результатами иммуногистохимического исследования мы выявили, что степень активности индуцибельной фракции NO-синтазы наиболее выражена в зонах, непосредственно прилегающих к зонам эрозий, очагах формирования язвенных дефектов, где встречаются участки, соответствующие  $(0,93 \pm 0,07)$  у. е.

Результаты нашей работы сочетаются с ранее опубликованными данными о том, что при некоторых формах хронического рецидивирующего афтозного стоматита увеличивается активность оксида азота [8]. Более того, высказывается предположение, что именно активность оксида азота может служить критерием активности стоматита, поскольку данное заболевание характеризуется наличием периодов обострения и ремиссии. В случае выявления факта, свидетельствующего о том, что повышение активности оксида азота предшествует обострению, можно использовать его как обоснование для проведения профилактических мероприятий, направленных на предупреждение развер-

нутой клинической картины хронического рецидивирующего афтозного стоматита.

Безусловно, такие данные могут противоречить сложившемуся представлению о благоприятном эффекте оксида азота. Но в данном случае, учитывая, с одной стороны, исключение генной детерминированности активности эндотелиальной фракции синтазы оксида азота [7], а с другой – наши данные, касающиеся повышения активности тканевой индуцибельной синтазы оксида азота, в сочетании с известными данными о неблагоприятных последствиях для тканей [9] именно активности данной фракции можно предположить, что именно повышение активности iNOs ведет к увеличению уровня NO при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите.

Таким образом, описанные нами морфологические изменения в тканях слизистой оболочки ротовой полости принято рассматривать как эрозивно-язвенные проявления при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите с развитием сопутствующих воспалительных, дистрофических процессов при нарушении микроциркуляции, метаболических расстройств, в развитии которых принимает активное участие индуцибельная NO-синтаза.

#### Вывод

При хроническом рецидивирующем афтозном стоматите формируется комплекс эрозивно-язвенных изменений с сопутствующими воспалительными, дистрофическими и дисциркуляторными процессами, сопровождающимися повышением активности индуцибельной синтазы оксида азота более чем в 2 раза – с  $0,21 \pm 0,05$  до  $0,79 \pm 0,06$  у. е. Степень активности индуцибельной фракции NO-синтазы более выражена в зонах, непосредственно прилегающих к зонам эрозий, и в очагах формирования язвенных дефектов.

#### Список литературы

1. *McCullough M. J.* Recurrent aphthous stomatitis revisited: clinical features, associations, and new association with infant feeding practices? / M. J. McCullough, S. Abdel-Hafeth, C. Scully // *J. Oral Pathol. Med.* – 2007. – V. 36. – P. 615–620.
2. *Slebioda Z.* Recurrent aphthous stomatitis: genetic aspects of etiology / Z. Slebioda, E. Szponar, A. Kowalska // *Postepy Dermatol. Allergol.* – 2013. – V. 30 (2). – P. 96–102.
3. *Talacko A. A.* The patient with recurrent oral ulceration / A. A. Talacko, A. K. Gordon, M. J. Al-dred // *Aust. Dent. J.* – 2010. – V. 55, suppl. 1. – P. 14–22.

4. *Slebioda Z.* Etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis and the role of immunologic aspects: literature review / Z. Slebioda, E. Szponar, A. Kowalska // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). – 2014. – V. 62 (3). – P. 205–215.

5. The significance of serum nitric oxide levels in Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis / M. Yildirim, V. Baysal, H. S. Inaloz, D. Doguc // J. Dermatol. – 2004. – V. 31 (12). – P. 983–988.

6. Decreased nitric oxide production in patients with Behçet's disease / A. Orem, B. Vanizor, G. Cimsit [et al.] // Dermatology. – 1999. – V. 198. – P. 33–36.

7. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms are not associated with recurrent aphthous stomatitis / J. A. Karasneh, R. Baszrafshani, M. Thornhill, W. E. Ollier // Arch. Oral Biol. – 2009. – V. 54 (6). – P. 583–587.

8. Increased nitric oxide production in patients with Behçet's disease: is it a new activity marker? / C. Evereklioglu, Y. Turkoz, H. Er [et al.] // J. Am. Acad. Dermatol. – 2002. – V. 46 (1). – P. 50–54.

9. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase / X. Q. Wei, I. G. Charles, A. Smith [et al.] // Nature. – 1995. – V. 1, № 375 (6530). – P. 408–411.

***I.V. Ковач, Л.І. Кравченко, В.В. Гаргін***

#### **АКТИВНІСТЬ ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ РЕЦИДИВУЮЧОМУ АФТЗНОМУ СТОМАТИТІ**

Досліджено активність індукцибельної фракції синтази оксиду азоту (iNOs) у м'яких тканинах ротової порожнини експериментальних тварин при моделюванні хронічного рецидивуючого афтозного стоматиту. Виявлено, що при даному захворюванні формується комплекс ерозивно-виразкових змін із супутніми запальними, дистрофічними та дисциркуляторними процесами, що супроводжуються підвищенням активності iNOs більш ніж у два рази –  $(0,21 \pm 0,05)$  до  $(0,79 \pm 0,06)$  у. о. Ступінь активності iNOs більш виражений у зонах, безпосередньо прилеглих до зон ерозій, осередках формування виразкових дефектів.

**Ключові слова:** хронічний рецидивуючий афтозний стоматит, синтаза оксиду азоту, гістологія, експеримент.

***I.V. Kovac, L.I. Kravchenko, V.V. Gargin***

#### **THE ACTIVITY OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN CHRONIC RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS**

The activity of inducible nitric oxide synthase (iNOs) have been studied in soft tissues of the oral cavity of experimental animals in the modeling of chronic recurrent aphthous stomatitis. It was revealed, that the complex of formed changes in this disease as erosive and ulcerative with concomitant inflammatory, degenerative, dyscirculatory processes is accompanied by increasing of iNOs activity more than twice – from  $0,21 \pm 0,05$  to  $0,79 \pm 0,06$  standard units. Degree iNOs activity was more pronounced in the areas adjacent to areas of erosion and formation of ulcers.

**Keywords:** chronic recurrent aphthous stomatitis, nitric oxide synthase, histology, experiment.

*Постула 09.12.15*