УДК: 616.314.-089.29-635-089.22

Порівняльна характеристика показників клітинного циклу букального епітелію в осіб з інтактними зубними рядами та при використанні часткових знімних пластинкових протезів з акриловим базисом

Comparative Characteristics of the Cellular Cycle Buccal Epithelium Rates in Patients with Intact Tooth Rows and Using of Partial Removable Prostheses with the Acrylic Resin Bases

Беляєв Е.В., доц., к.мед.н., Одуд М.П., асп.
Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
Beliaiev E.V., Odud M.P.
M. I. Pirogov Vinnitsya National Medical University

Адреса для кореспонденції:
Одуд Мар'яна Петрівна
e-mail: mariana.odud@mail.ru

Мета: *Провести порівняльний аналіз клітинного циклу букального епітелію в осіб з інтактними зубними рядами та при лікуванні пацієнтів із частковою відсутністю зубів, які користуються частковими знімними пластинковими протезами з акрилових пластмас.* ***Методи:*** *У дослідженні взяли участь 18 осіб віком 36–60 років — 12 клінічно здорових, без дефектів зубних рядів та 6 пацієнтів, які користувалися протезами з акриловим базисом терміном до 3 -х років. Досліджували букальний епітелій слизової оболонки порожнини рота, оскільки поверхневий епітелій є основним структурно-функціональним компонентом слизової оболонки. Вміст ДНК у ядрах клітин букального епітелію визначали методом проточної цитометрії.* ***Результати:*** *Дослідили стан ядерної (нуклеарної) ДНК та проліферативну активність клітин букального епітелію в осіб з інтактними зубними рядами. Встановили високу проліферативну активність букального епітелію в осіб з інтактними зубними рядами — більшість клітин у фазі синтезу ДНК, G2/M (63,69%) та у стані з фрагментованою ДНК (Sub-GOG1; 15,21%). В осіб із частковою адентією, які користуються частковими знімними пластинковими протезами з базисом із акрилових пластмас, виявили початкові ознаки зроговіння, що підтверджує зменшення клітин у фазі S+G2/M.* ***Висновки:*** *На фоні застосування часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами виявили негативні зміни клітинного циклу — збільшення клітин в інтервалі Sub-G1, а також їх зменшення в інтервалі S+G2/M.*

Ключові слова: *клітини букального епітелію, ДНК-цитометрія, часткові знімні пластинкові протези.*

Purpose: *Comporative analysis of of the cellular cycle buccal epithelium in patients with intact tooth rows and in the treatment of partial loss teeth and using partial removable prostheses.* ***Methods:*** *The study involved 18 persons, aged 36–60 years — 12 patients were examined clinically healthy, with no defects dentition and 6 patients who used partial removable dentures. The study examined the buccal epithelium served the oral mucosa of persons because the surface epithelium is the basic structural and functional components of the mucosa. DNA content in the nuclei of human buccal epithelium cells was determined by flow cytometry.* ***Results:*** *The status of the nuclear DNA and cell proliferation of buccal epithelium in patients with infact dentition are determined. Found that the proliferative activity of buccal epithelium in patients with infact dentition is high-greater namber of cells were in the phase of DNA synthesis, G2/M (63,69%) and in the state with fragmented DNA (Sub-GOG1; 15,21%). According to a study in persons with partial loss teeth and usening partial removable dentures of base made of acrylic resin found signs that indicate the beginning of the process keratinization, as evidenced by the redaction of cells in phase S+G2/M.* ***Conclusions:*** *On the background of partial removable dentures with acrylic bases found negative changes in the cellular cycle, which consisted in increasing the range of cells in Sub-G1, and reduce the range of cells in S+G2/M.*

Key words: *cells of buccal epithelium, DNA-cytometry, partial removable dentures.*

ВСТУП

Підвищення ефективності лікування часткової відсутності зубів залишається однією із важливих проблем у клінічній ортопедичній стоматології [1, 2]. Технології знімного протезування постійно удосконалюються. За останні роки розроблено багато сучасних методик протезування при частковій відсутності зубів, створено нові базисні матеріали. Як основний матеріал для виготовлення часткових знімних пластинкових протезів найчастіше використовують акрилові пластмаси, що мають оптимальні експлуатаційні властивості, однак при їх застосуванні виникає патологічна реакція слизової оболонки порожнини рота [3, 4], зумовлена токсичними, механічними, термічними, інфекційними факторами. Враховуючи лише поодинокі дослідження з визначення показників клітинного букального епітелію в межах норми та при використанні часткових знімних протезів з акриловим базисом методом ДНК-цитометрії, винятково актуальним є встановлення цих показників в осіб різної статі та віку.

На сьогодні важливе місце серед діагностичних методів займає метод проточної цитометрії, оскільки пошук неінвазійних тестів для виявлення ранніх форм змін клітин слизової оболонки є актуальним завданням сучасної стоматології. Мета роботи — провести порівняльний аналіз клітинного циклу букального епітелію в обстежених з інтактними зубними рядами та при лікуванні пацієнтів із частковою відсутністю зубів, які користуються частковими знімними пластинковими протезами з акрилових пластмас.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Для визначення проліферативної активності за інтервалами клітинного циклу, стану фрагментації ядерної ДНК епітеліальних клітин слизової оболонки, автори обстежили 18 осіб віком 36–60 років. Серед них 12 клінічно здорових осіб без дефектів зубних рядів та 6 осіб, які користувалися протезами з акриловим базисом. Критеріями виключення з обстеження були: особи з наявністю тяжких соматичних захворювань, паління, обтяжений алергологічний анамнез, протезний стоматит, хронічний генералізований пародонтит у стадії загострення, відмова пацієнтів від участі. Досліджували букальний епітелій слизової оболонки порожнини рота, оскільки це основний структурно-функціональний компонент слизової оболонки.

Вміст ДНК в ядрах клітин букального епітелію визначали методом проточної цитометрії. Цей метод є сучасною технологією швидкого оптичного вимірювання параметрів клітин, їх органел і внутрішніх процесів. Застосування цього методу дозволило провести високоточні дослідження проліферативної активності за інтервалами клітинного циклу та станом фрагментації ядерної ДНК (апоптоз) клітин букального епітелію. Для проточної цитометрії суспензію з ядер клітин букального епітелію отримували за допомогою спеціального розчину для дослідження ядерної ДНК, аналізу плоїдності, клітинного циклу, CyStain DNA («Partec», Німеччина), який дозволяє одночасно отримати ядерну суспензію і виконати флуоресцентне забарвлення діамідінофеніліндолом (DAPI) нуклеарної ДНК. У дослідженні використовували багатофункціональний проточний цитометр Partec PAS («Partec», Німеччина) в Науково-дослідному центрі Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Для збудження флуоресценції DAPI – УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії аналізу підлягало 10 тис. подій [5, 6].

Цитометричний аналіз клітин виконували з використанням програмного забезпечення FloMax, виділяючи Sub-GOG1 ділянки на ДНК-гістограмах-RN1 перед піком GOG1, що вказує на ядра клітин із вмістом ДНК <2c (це відсоток ядер клітин у стані апоптозу). S+G2/M% — показник проліферації (проліферативний індекс), що більші його значення, то інтенсивніша проліферація, і навпаки, — що менші значення, то менша проліферативна активність. Статистичну обробку результатів дослідження проводили обчислюючи середню арифметичну величину (M), середню похибку середньої арифметичної величини (m), середню похибку (t), достовірність різниць результатів (p). Якщо коефіцієнт вірогідності був меншим за 0,05, результати вважали достовірними.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані дані показників клітинного циклу букального епітелію осіб контрольної групи підтверджують високу інтенсивність оновлення клітин у нормі. На це вказує значний відсоток подій в інтервалі Sub-G1 — 15,51% від усіх зареєстрованих. Цей інтервал характеризує апоптоз, який у цьому випадку є одним із механізмів оновлення клітин епітелію. За даними дослідників [7], апоптоз є механізмом, що обмежує поширення соматичних мутацій, запобігаючи розвитку паранеопластичних процесів, однак водночас обов'язковою є динамічна рівновага із клітинами, що проліферують. Важливо, що понад половина клітин перебували в інтервалі S+G2/M, який характеризує активно проліферуючу частину клітинного субстрату (63,69%), що забезпечує постійне оновлення.

Отож більшість клітин букального епітелію в нормі, у синтетичній фазі або на етапі інтенсивної підготовки до переходу у цю фазу. Порівнюючи дані із

Таблиця 1. Відсоток клітин букального епітелію у різних фазах клітинного циклу в осіб з інтактними зубними рядами (M±m, %)

Інтервали клітинного циклу	Жінки, n=6	Чоловіки, n=6	Об'єднані показники, n=12
Sub-G1	14,91±3,23	15,51±3,12	15,21±3,18
G0G1	13,30±4,11	14,73±2,32	14,01±3,65
S+G2/M	64,94±6,72	62,44±5,92	63,69±6,23

Таблиця 2. Показники клітинного циклу у групі із застосуванням часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами та контрольній групі (M±m)

Інтервали клітинного циклу	Група часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами, n=6	Контрольна група, n=12
Sub-G1	27,90±5,34*	15,21±3,18
G0G1	11,63±6,12	14,01±3,65
S+G2/M	51,35±7,38*	63,69±6,23

*Примітка: *статистично достовірна різниця (p<0,05) за критерієм Вілкоксона щодо контрольної групи*

показниками інших досліджень, автори констатували схожість результатів, отриманих із застосуванням різних методик, хоча деякі дослідники відзначають низький проліферативний потенціал епітеліоцитів за результатами імуногістохімічного дослідження [8]. У цьому дослідженні проводили оцінку біоптату ясен, букального епітелію, чим обґрунтовували розбіжність результатів. За нашими даними, менша частка клітин в осіб контрольної групи перебувала в неактивній фазі G0G1 (14,01±3,65), більшість клітин — в активних фазах ділення і порушення цих інтервалів може суттєво впливати на стан слизової оболонки порожнини рота. З огляду на це, проблема апоптозу та проліферативної активності клітин слизової оболонки порожнини рота досі недостатньо вивчена та потребує деталізації.

Отримані показники дозволяють охарактеризувати клітинний цикл букального епітелію, підтверджують високу інтенсивність проліферації та оновлення в нормі, що дозволяє підтримувати рівновагу в слизовій оболонці порожнини рота і забезпечує належне її функціонування. Усталеним є положення, що співвідношення клітин букального епітелію на різних етапах диференціювання залежить від глибини ураження слизової оболонки порожнини рота [9].

При дослідженні цитометричних показників букального епітелію із застосуванням часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами констатували суттєве збільшення клітинних подій в інтервалі Sub-G1 (табл. 2), що вказувало на вірогідне збільшення апоптозу клітин букального епітелію внаслідок застосування пластинкових протезів. Також відзначали достовірне зменшення подій в інтервалі S+G2M, що підтверджувало зменшення проліферативного потенціалу клітин букального епітелію. Згідно з отриманими даними, при застосуванні акрилових знімних пластинкових протезів у клітинах букального епітелію спостерігали початкові ознаки процесу зроговіння, що підтвердило зменшення клітин у фазі S+G2/M. Виявлене авторами підвищене зроговіння клітин букального епітелію є ознакою певного розладу поділу, що не дозволяє повноцінно виконувати бар'єрну функцію та створює передумови для багатьох функціональних розладів. За наявності ознак зроговіння букальний епітелій поступово втрачає свої захисні властивості, зокрема регенераторну здатність кератиноцитів — основну бар'єрну функцію клітин. Враховуючи виявлені порушення на тлі застосування часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами припускають їх безпосередній негативний вплив на складний механізм функціонування слизової оболонки порожнини рота.

За отриманими даними, акрилові знімні пластинкові протези негативно впливають на поділ клітин букального епітелію. Порівнюючи результати досліджень у групі із застосуванням часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами із показниками контрольної групи (табл. 2), відзначали суттєве (p<0,05) збільшення клітинних подій в інтервалі Sub-G1. Це вказує на вірогідне збільшення апоптозу клітин букального епітелію на тлі застосування цього типу протезування практично в 1,8 раза. Паралельно спостерігали достовірне (p<0,05) зменшення подій на 12,5% в інтервалі S+G2/M щодо контрольної групи, що підтвердило зменшення проліферативного потенціалу клітин букального епітелію.

ВИСНОВКИ

Застосування ДНК-цитометрії як методу оцінки клітинного циклу дозволило провести порівняльний аналіз клітинного циклу букального епітелію в нормі та при лікуванні часткової адентії з використанням часткових знімних пластинкових протезів з акрилових пластмас. На сьогодні ДНК-цитометрія є одним з найточніших методів діагностики та встановлення порушень ДНК на молекулярному рівні для різних типів клітин. Проліферативна активність

букального епітелію висока, більшість клітинних подій перебуває в інтервалах S+G2/M (63,69%) та Sub-G1 (15,21%). На тлі застосування часткових знімних пластинкових протезів з акриловими базисами виявили негативні зміни клітинного циклу — збільшення клітин в інтервалі Sub-G1 та їх зменшення в інтервалі S+G2/M.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Маслов О.В. Зміна показників біоценозу порожнини рота при виникненні контактних протезних стоматитів / О.В. Маслов // Одеський медичний журнал. — 2003. — №3. — С. 72–74.
2. Лабунець В.А. Фактори, що визначають потребу населення у повному знімному протезуванні / В.А. Лабунець, Т.В. Дієва, Е.В. Дієв // Одеський медичний вісник. —2002. — №6. — С. 107–110.
3. Лепилин А.В. Влияние сьемных пластиночных протезов, изготовленных из акриловых пластмасс, на структурно-функциональные свойства клеточных мембран слизистой оболочки полости рта / А.В. Лепилин, В.И. Рубин, А.Г. Прошин // Стоматология. — 2003. — №2. — С. 51–54.
4. Варес Э.Я. Акриловые пластмассы должны быть устранены из практики зубного протезирования: дорогу термопластам медицинской чистоты / Э.Я Варес, В.А. Нагурный, Л.С. Аллахвердиева // Вісник стоматології. — Одеса. — 2004. — №1. — С. 105–107.
5. Darzynkiewicz Z. Use of flow and laser-scanning cytometry in analysis of cell death / Z. Darzynkiewicz, X. Li, E. Bedner // Methods Cell Biol. — 2001. — №66. — P. 69–109.
6. Kamentsky L.A. Laser scanning cytometry // Methods Cell Biol., — 2001. — №63. — P. 51–81.
7. Carey J.L. McCoy J.P., Keren D. Flow cytometry in clinical diagnosis // ASCP Press. — 2007. — Chicago, IL. — 384 p.
8. Осипова Ю.Л. Воспалительные заболевания пародонта при неэрозивной форме гастроэзофагеальной рефлюксной болезни: клинические и иммуноморфологические аспекты / Ю.Л. Осипова, Н.В. Булкина, А.Ю. Кропотина // Фундаментальные исследования. — 2012. — №2 (Ч. 2). — С. 325–327.
9. Хайдуков С.В. Применение проточной цитометрии для исследования функциональных особенностей клеток иммунной системи / С.В Хайдуков, С.В. Сибиряк, А.В. Зурочка, Л.В. Рябова, В.А. Черешнев // Аллергология и иммунология. —2008. — Т. 9, №2. — С . 199–204.

REFERENCES

1. Maslov, O.V. (2003). Zmina pokaznykiv biocenozu porozhnyny rota pry vynyknenni kontaktnyh proteznyh stomatytiv. *Odeskyi Medychnyi Zhurnal,* Vol. 3, 72–74 (in Ukrainian).
2. Labunets, V.A., Diieva, T.V., & Diiev, E.V. (2002). Faktory, shcho vyznachaiut potrebu naselennia u povnomu znimnomu protezuvanni. *Odeskyi medychnyi visnyk*, Vol. 6, 107–110 (in Ukrainian).
3. Lepilin, A.V., Rubin, V.I., & Proshin, A.G. (2003). Vlijanie s'emnuh plastynochnuh protezov, izgotovlennuh iz akrilovyh plastmass, na strukturno-funkcional'nue svojstva kletochnuh membran slizistoj obolochki polosti rta. *Stomatologija*, Vol. 2, 51–54 (in Russian).
4. Vares, Je.Ja., Nagurnyj, V.A., & Allahverdieva, L.S. (2004). Akrylovye plastmassu dolzhnu byt' ustranenu iz praktiki zubnogo protezirovanija. Dorogu termoplastam medicinskoj chistoty. *Visnyk stomatologii*, Odesa, Vol. 1, 105–107. (in Russian).
5. Darzynkiewicz, Z., Li, X., & Bedner, E. (2001). Use of flow and laser-scanning cytometry in analysis of cell death. *Methods Cell Biol,* 66, 69–109 [in English].
6. Kamentsky, L.A. (2001). Laser scanning cytometry. Methods Cell Biol., 63, 51–81 (in English).
7. Carey, J.L. McCoy, J.P., & Keren, D. (2007). *Flow cytometry in clinical diagnosis*. Chicago, IL: ASCP Press, 384 (in English).
8. Osipova, Ju.L. (2012). Vospalitel'nye zabolevanija parodonta pry nejerozivnoj forme gastrojezofageal'noj refljuksnoj bolezni: klinicheskie i immunomorfologicheskie aspekty. *Fundamental'nye issledovanija,* Vol. 2, 325–327 (in Russian).
9. Hajdukov, S.V., Sibirjak, S.V., Zurochka, A.V., Rjabova, L.V., & Chereshnev, V.A. (2008). Primenenie protochnoj cytometrii dlja issledovanija funkcyonal'nyh osobennostej kletok immunnoj sistemy. *Allergologija i immunologija,* Vol. 9, 2, 199–204 (in Russian).

Стаття надійшла в редакцію 9 червня 2015 року