

МОРФОЛОГИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС НА 14 СУТКИ ПОСЛЕ КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ И СИСТЕМНОГО ЛЕЧЕНИЯ ЭКСТРАКТАМИ СЕЛЕЗЕНКИ И ПЧЕЛИНОГО ПОДМОРА

Ермакова Н.Ю., Чиж Н.А., Шкодовская Н.Ю., Сынчикова О.П., Марченко Л.Н.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Ермакова Н.Ю., Чиж Н.А., Шкодовская Н.Ю., Сынчикова О.П., Марченко Л.Н. Морфология слизистой оболочки полости рта лабораторных крыс на 14 сутки после криовоздействия и системного лечения экстрактами селезенки и пчелиного подмора // Украинський морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №1. – С. 28-31.

Методами оптичної та електронної мікроскопії вивчено вплив системного лікування екстрактами селезенки і пчелиного підмору на структуру слизової оболонки порожнини рота крыс після криовоздействия.

Показано, що самопроизвольная регенерация мягких тканей протекает медленнее в зоне, находящейся непосредственно под аппликатором. Регенерация тканей СОПР, подвергавшихся криовоздействию с последующим внутрибрюшинным введением препарата «Экслин» и апи-экстракта, полностью завершается к 14-м суткам наблюдения в обеих исследованных зонах без образования грануляционной ткани.

Ключевые слова: криовоздействие, регенерация, слизистая оболочка полости рта, экстракты селезенки и пчелиного подмора

Ермакова Н.Ю., Чиж М.О., Шкодовська Н.Ю., Синчикова О.П., Марченко Л.М. Морфологія слизової оболонки порожнини рота лабораторних щурів на 14 добу після кріоаплікації та системного лікування екстрактами селезінки і бджолиного підмору // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №1. – С. 28-31.

Методами оптичної та електронної мікроскопії вивчений вплив системного лікування екстрактами селезінки і бджолиного підмору на структуру слизової оболонки порожнини рота щурів після кріоаплікації.

Показано, що спонтанна регенерація м'яких тканин протікає повільніше в зоні, що перебувала безпосередньо під аплікатором. Регенерація тканин СОПР, що піддавалися кріовпливу з наступним внутрішньоочеревинним введенням препарату «Ексліні» і апи-екстракту, повністю завершується до 14-ї доби спостереження в обох досліджених зонах без утворення грануляційної тканини.

Ключові слова: кріовплив, регенерація, слизова оболонка порожнини рота, екстракти селезінки й бджолиного підмору

Yermakova N.Yu., Chizh N.A., Skodovskaya N.Yu., Synchikova O.P., Marchenko L.N. Morphology of oral cavity mucous of laboratory rats to the 14th day after cryoeffect and systemic treatment with spleen and dead bee extracts // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №1. – С. 28-31.

With the methods of optic and electron microscopy there was studied the effect of systemic treatment with the extracts of pig's spleen (PSE) and dead bees (DBE) on oral cavity mucous structure (OCMS) of rats after cryoeffect.

It has been shown that spontaneous regeneration of soft tissues proceeds slower in the zone located directly under the applicator. Regeneration of tissues of OCMS subjected to cryoeffect with following intraperitoneal introduction of "Exslyn" preparation and apiextract completely stops to the 14th observation day in both studied zones without formation of granulation tissue.

Key words: cryoeffect, regeneration, oral cavity mucous, extracts of spleen and dead bees.

Слизистую оболочку полости рта (СОПР) называют своеобразным индикатором наличия патологических процессов в организме. Это обусловлено тем, что СОПР существенно отличается от других слизистых оболочек по морфологическим и гистохимическим признакам [1,2]. Эпителию СОПР принадлежит ведущая роль в реализации защитных механизмов, к которым относятся высокая ферментативная активность, наличие в неороговевающей эпителии большого количества гликогена, высокая интенсивность обменных процессов и его способность к быстрым перестройкам. 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]. Как было показано ранее [4,5] экстракты, полученный из подмора пчел и селезенки поросят, являются комплексными препаратами, в состав которых входят эффективные антиоксиданты – флавоноиды, каротиноиды и витамины. Эти соединения в сочетании с аминокислотами и низкомолекулярными пептидами, содержащимися в экстрактах, определяют их выраженное антиоксидательное и биостимулирующее действие [6].

Целью настоящего исследования явилось изучение структуры слизистой оболочки полости рта крыс после криовоздействия при самопроизвольной регенерации, а также при регенерации тканей на фоне применения системного лечения экстрактами селезенки поросят («Экслин») и пчелиного подмора (апи-экстракт).

Материалы и методы. Криоповреждение слизистой оболочки было выполнено 18 крысам-самцам массой 320-350 г линии Вистар. Все экспе-

рименты выполнялись согласно правил международных нормативов по биоэтике [7]. Повреждение слизистой оболочки внутренней поверхности щеки и края твердого неба производили под ингаляционным наркозом парами эфира с помощью автономного криоапликатора КД-3 с медной насадкой диаметром 2мм, работающего на жидком азоте, время экспозиции составляло 60 сек. На протяжении 14 сут животным I-й контрольной группы интраабдоминально вводили 0,5 мл 30% этилового спирта, приготовленного на 0,9% растворе NaCl. Животным II-й группы внутрибрюшинно вводили экстракт селезенки («Экслин»), животным III-й группы производили внутрибрюшинное введение апи-экстракта. Способы получения и биологическая активность препаратов изложены в [5,6].

После окончания срока эксперимента (14 сут) животных контрольной и опытных групп подвергли эвтаназии. Для гистологического и электронно-микроскопического исследования проводили резекцию участка твердого неба с отсепарированной слизистой оболочкой. Полученные фрагменты фиксировали 2 %-ным глутаральдегидом на фосфатном буфере Миллонига (рН 7,3 - 7,4) и в 1 %-ом растворе четырехоксида осмия. После обезвоживания спиртами возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне фрагменты ткани заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Полутонкие (0,5 мкм) срезы окрашивали основным фуксином и метиленовым синим. Исследование и фотографирование препаратов проводили при помощи микроскопа «ЛЮМАМ МП-4» и видеокамеры «Panasonic WV CP-470». Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме УМПП-7, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Ультраструктуру клеток исследовали с помощью электронного микроскопа «ПЭМ-125К» при ускоряющем напряжении 75 кV, снабженного системой съема и анализа изображения САИ - 01А (АО «SELM», г. Сумы) на базе ССД камеры DX-2 и пакета программ фирмы «КАРРА», Германия.

Результаты и их обсуждение. В контрольной группе животных после криодеструкции при внутрибрюшинном введении физиологического раствора наблюдается интенсивное течение процессов регенерации всех структурных компонентов слизистой оболочки. При этом обнаруживается деление клеток эпителия, появление молодых форм эпителиоцитов в пиповатом слое, нарушение процессов ороговения. Однако, имеют место очаговые скопления лимфоцитов, что свидетельствует о реакции перифокального воспаления, особенно в зоне контакта с криоапликатором (рис.1). В соединительной ткани наблюдается появление малодифференцированных форм фибробластов, а также разрыхление и отечность базальных мембран. В некоторых кровеносных сосудах среднего и крупного калибра отмечается стаз эритроцитов. Для данных экспериментальных условий характерно появление скоплений капилля-

ров в субэпителиальном слое на периферии зоны криоапликации.

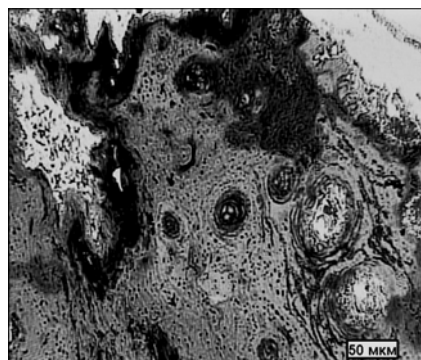


Рис. 1. Структура многослойного плоского эпителия СОПР крысы на 14 сутки после криоапликации. Полутонкий срез. Окраска основным фуксином и метиленовым синим. Остаточные очаги воспаления в эпителии, нарушение процессов ороговения, гиперкератоз.

При электронно-микроскопическом исследовании выявлено, что в препаратах контрольной группы ультраструктура основной массы эпителиальных клеток близка к норме, о чем свидетельствует наличие ядер с преобладанием эухроматина, крупных фибриллярно-глобулярных ядрышек в них (рис.2,а). В отличие от базального и шиповатого слоев для поверхностного эпителия характерны более плотные межклеточные контакты, с хорошо развитой системой десмосом и полудесмосом. У клеток этого слоя наблюдается типичное для нормы снижение числа органелл в цитоплазме и утолщение плазмолеммы. Однако, мы наблюдали и некоторые признаки деструктивных изменений в ультраструктуре клеток как эпителия (рис.2,б), так и компонентов подлежащей соединительной ткани, в частности набухание и гомогенизация крист митохондрий, разрыхление базальных мембран. Необходимо отметить, что самопроизвольная регенерация СОПР крыс после криодеструкции протекает медленнее в зоне прямого контакта слизистой оболочки с криоапликатором.

Данные оптического и электронно-микроскопического исследования показали, что после внутрибрюшинных инъекций «Экслина» и апи-экстракта регенерация тканей слизистой оболочки полости рта, подвергавшихся криовоздействию, полностью завершается к 14-м суткам наблюдения (рис.3). Анализ полутонких срезов свидетельствует о том, что область слизистой, находившаяся под криоапликатором, а также периферические участки восстановили характерную морфологическую структуру. Эпителий, как и в норме, имеет многослойную структуру, образуя гребешки между соединительнотканными сосочками (рис. 3). Толщина эпителиального слоя близка к нормальным значениям.

Необходимо отметить, что в образцах изучаемых тканей крыс, подвергавшихся лечению апи-экстрактом, полностью восстанавливается ороговение эпителия, что является одним из основных

защитных механизмов СОПР. Подлежащая соединительная ткань, элементы микрососудистого русла, их иннервация, а также мышечные волокна с их капиллярным и нервным окружением имеют нормальное морфологическое строение.

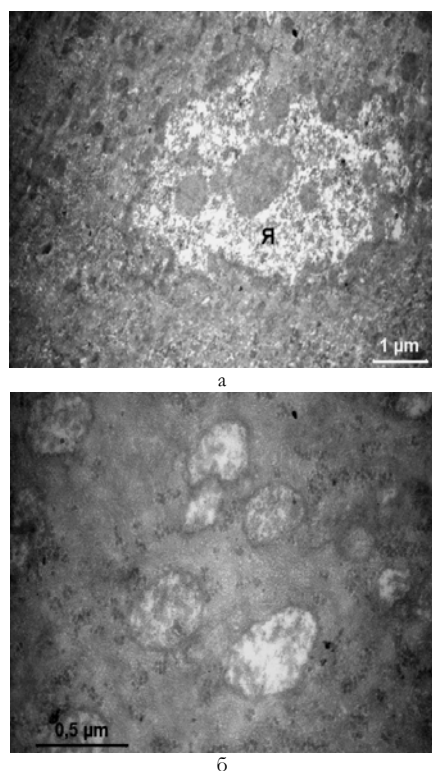


Рис. 2. Ультраструктура клеток шиповатого слоя эпителия СОПР. а – эпителиальная клетка с мелкими гранулами кератина, изрезанный контур ядра; два крупных ядрышка на фоне мелких глыбок эухроматина; б – набухание и гомогенизация крист митохондрий эпителиоцита; Я – ядро.

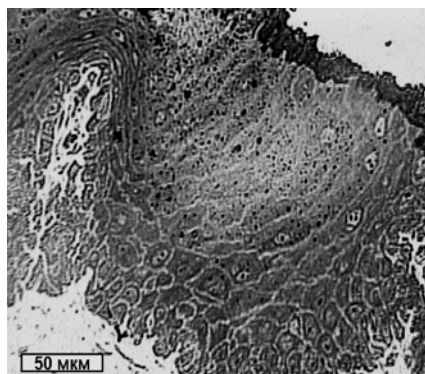


Рис. 3. Морфологическое состояние тканей СОПР крысы, находившихся под аппликатором, на 14 сутки после криоапликации и введения апи-экстракта. Полутоновый срез. Окраска основным фуксинном и метиленовым синим.

Проведенные электронно-микроскопические исследования различных групп клеток слизистой оболочки полости рта после криовоздействия и введения препарата «Экслин» и апи-экстракта позволили более детально оценить состояние клеток, их органелл, а также степень межклеточных взаимодействий. Клетки базального слоя, как и в норме, содержат крупные ядра, мелкие митохонд-

рии и характерные микроворсинки на поверхности, а также сеть нитей цитоскелета (рис. 4,а). Шиповатый, зернистый и поверхностные слои эпителия по ультраструктурным критериям не отличаются от таковых в норме. Базальная мембрана, с которой прочно связан десмосомами и полудесмосомами базальный слой эпителия, имеет фибриллярно-мелкоглобулярную структуру и обычную толщину порядка 80 нм (рис. 4,а). В отдельных периферических участках зоны криоапликации наблюдается расширение базальной мембраны (рис. 4,б).

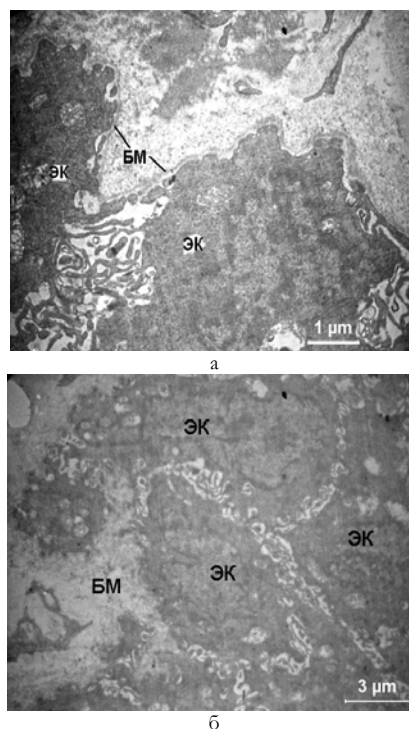
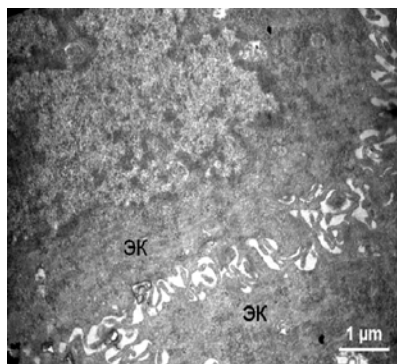


Рис. 4. Ультраструктура клеток базального слоя эпителия СОПР на 14-е сут после криовоздействия и введения АПИ-экстракта. а – зона контакта с аппликатором, б – периферический участок. ЭК – эпителиальные клетки, БМ – базальная мембрана

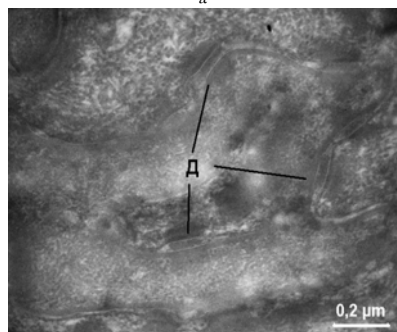
В различных слоях эпителия его физическую прочность обеспечивают соответствующие межклеточные контакты и связанные с ними строго ориентированные элементы цитоскелета. В обеих исследованных группах животных (введение апи-экстракта и препарата «Экслин») данные структуры имели типичное для нормальной ткани строение и локализацию (рис.5). Подлежащая к слизистой оболочке соединительная ткань имеет характерное для нее строение. Ее неклоточные компоненты представлены пучками коллагеновых волокон, которые распределены в аморфном веществе. Среди клеточных элементов преобладают молодые и средне дифференцированные формы фибробластов с ультраструктурными признаками активного фибрилlogenеза, о чем свидетельствует гиперплазия элементов комплекса Гольджи, расширение цистерн эндоплазматического ретикулума, большое количество рибосом на его мембранах.

Восстановление кровоснабжения тканей после криоповреждения проявляется в разрастании ка-

пилярной сети как в непосредственной близости от базальной мембраны эпителия, так и в соединительнотканых сосочках. Во всех случаях наблюдения отмечены признаки активации транспорта веществ через эндотелий микрососудов в слизистой оболочке: множественные пиноцитозные пузырьки в цитоплазме не только эндотелиоцитов, но и перикапиллярных перицитов, а также микровилли, образованные люминальной мембраной эндотелиоцитов. Видимые крупные вакуоли являются результатом либо слияния пиноцитозных везикул, либо захвата микровиллиями содержимого из просвета кровеносного сосуда (рис. 6).



а



б

Рис. 5. Ультраструктура клеток эпителия СОПР в зоне прямого контакта с аппликатором: а – межклеточные контакты эпителиоцитов шиповатого слоя (ЭК) после криоаппликации и введения апи-экстракта; б – структура десмосом (Д) у клеток поверхностных слоев после криовоздействия и введения «Экслина»

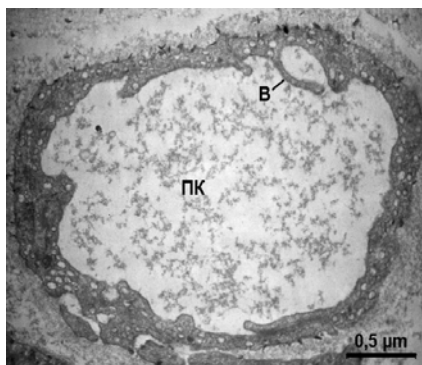


Рис. 6. Ультраструктура капилляров в зоне прямого криовоздействия на 14-е сут после введения апи-экстракта. ПК – просвет капилляра; В – микровилли.

Для образцов изучаемых тканей после применения препарата «Экслин», а особенно АПИ-экстракта было характерно разрастание нервных элементов, которое может развиваться на почве

крионекроза претерминальных участков. Регенерация нервных волокон сопровождалась появлением безмякотных волокон, объединенных одной шванновской клеткой. Вокруг такого комплекса располагалась, как правило, базальная мембрана. Субмикроскопическая организация нервных волокон в пределах нормы. Микротрубочки расположены параллельно длинной оси аксона. Быстрое восстановление иннервации и микроциркуляции в поврежденных криовоздействием тканях СОПР способствует ускоренной регенерации эпителия без формирования грануляционной ткани.

Выводы:

Сравнительное изучение восстановления структуры слизистой оболочки полости рта крыс после криовоздействия при самопроизвольной регенерации и регенерации тканей на фоне применения системного лечения препаратом «Экслин» и апи-экстрактом показало, что самопроизвольная регенерация после криовоздействия на СОПР протекает медленнее в зоне, находившейся непосредственно под аппликатором.

Регенерация тканей СОПР, которая подверглась криовоздействию, с последующим внутрибрюшинным введением препарата «Экслин» и апи-экстракта полностью завершается к 14-м суткам наблюдения в обеих исследованных зонах без образования грануляционной ткани.

Перспективы дальнейших исследований.

В дальнейших исследованиях предстоит выявить тонкие механизмы лечебного действия экстрактов селезенки и пчелиного помора в комбинации с различными режимами охлаждения на структурно-функциональное состояние патологически измененных тканей животных.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Быков В.Л. Функциональная морфология и гистогенез органов полости рта. – С.-Пб., 1995. – 285 с.
2. Бородай Н.В. Морфофункціональні особливості слизової оболонки порожнини рота та зміни в ній при різних патологічних процесах / Н.В.Бородай // Лабораторна діагностика. – 2001. – №1. – С. 49–55.
3. Грохольський А.П., Кодола М.А., Бургонський В.Г., Чайковский Ю.Б. Нетрадиційні методи лікування в стоматології. – К.: Здоров'я, – 1995. – 376 с.
4. Ермакова Н.Ю. Биологическая активность экстрактов пчел в зависимости от способа получения / Н.Ю. Ермакова, Н.Г. Кадникова, А.Д. Рощаль [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т.16, №2. – С. 192–200.
5. Сандомирський Б.П. Криобіологічні технології одержання біологічно активних екстрактів з тканин тваринного походження / Б.П.Сандомирський, С.Є. Гальченко, О.П. Синчикова [та інші.] // Ветеринарна медицина. – 2008. – С. 327–331.
6. Yermakova N.Yu., Synchykova O.P., Roshal A.D., Shnyder A.V. Antioxidant activity and chemical composition of tissue extracts // Abstracts of the 6th Parnas Conference "Molecular Mechanisms of Cellular Signaling". – 2007. – Kharkow. – P. 30–31.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.

Надійшла 14.12.2009 р.

Рецензент: проф. С.М.Смірнов