

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ

### ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА У ЛИЦ С МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ КОНСТРУКЦИЯМИ

Харьковская медицинская академия последипломного образования

(г. Харьков)

Данная работа является фрагментом НИР «Клініко-лабораторне обґрунтування застосування сучасних медичних технологій для діагностики, профілактики та лікування основних стоматологічних захворювань», № гос. регистрации 0104U000711.

**Вступление.** Интенсивное использование разных металлических сплавов в ротовой полости при восстановлении дефектов зубов поднимает вопрос о том, в какой степени организм человека может сопротивляться этим нагрузкам, какие при этом возможности организма и как следует учитывать медикаментозные способы профилактики и лечения нежелательных побочных действий этих сплавов. Врачу-стоматологу приходится сталкиваться с заболеваниями, которые возникают в результате токсичного влияния химических смесей стоматологических сплавов металлов на ткани полости рта и на организм в целом.

Основными компонентами регенераторного процесса являются клеточная пролиферация, дифференцировка, миграция клеток, а также реструктуризация стромы и ангиогенез. Проллиферативная активность является ведущим фактором в биологическом поведении поврежденных тканей. Белок Ki-67 выявляется в клетке во всех фазах митотического цикла, кроме G0, что позволяет использовать его в качестве универсального маркера пролиферирующих клеток [2].

В спектре патогенных факторов, влияющих на жизнеспособность клеток при травмирующем воздействии, апоптозу отводится решающая организующая роль. Апоптоз запускается в момент травмы как механизм отсроченного вторичного повреждения ткани и представляет собой физиологическую гибель клеток, необходимую для обновления клеточного пула, дифференцировки и развития органа. Апоптоз предохраняет ткани от возможных последствий при сублетальных повреждениях, недостаточных для прямого уничтожения клетки – некроза. При таком слабом повреждении избирательное уничтожение небольших клеточных популяций способствует оздоровлению органа [7, 12, 15].

Важнейшую роль в индукции апоптоза играет тумор-супрессорный ген p53. Механизм

p53-индуцированного апоптоза окончательно не установлен. Предполагается, что этот белок вызывает программированную клеточную гибель вследствие активации и репрессии ряда генов-мишеней [8]. Так, например, существуют сведения, что p53 осуществляет на транскрипционном уровне одновременную репрессию гена Bcl-2, повышает экспрессию генов, продукты которых вызывают оксидативный стресс и активацию киллерных рецепторов. В результате клетка задерживается в определенных точках клеточного цикла для возможной репарации повреждения или, при отсутствии таковой, подвергается апоптозу вследствие нарушения проницаемости митохондриальной и ядерной мембран. Такие агенты, как ионы кальция, факторы воспаления, свободные радикалы и оксид азота могут также «включать» гены, инициирующие апоптоз [6, 11]. Можно полагать, что недостаточность проявлений апоптоза отражается на процессе элиминации клеток с генетическими поломками, становлении аутоотолерантности и выражается в форме разного рода дефектов развития и тканевой регенерации. В условиях физиологической нормы белок p53 не выявляется [4], тогда как при хроническом воспалении его синтезируют до 70% трансформированных клеток.

В неповрежденной ткани апоптоз находится под строгим генетическим контролем. Одним из участников реализации программы гибели клетки является белок bcl-2, который блокирует митохондриальный путь запуска апоптоза. В результате его гиперэкспрессии создается благоприятный фон для пролиферации, выживания и активного функционирования слизистой оболочки, но не создается условий для опухолевой трансформации эпителия [5, 13]. С другой стороны, уменьшение концентрации bcl-2 приводит клетки к апоптозу, что может ассоциироваться с предраковыми поражениями, а возможно и с ранней стадией развития раковой опухоли в полости рта.

Поэтому **целью** данного **исследования** явилось изучение влияния конструкций стоматологических сплавов металлов на регенераторный потенциал клеток слизистой оболочки полости рта.

**Объект и методы исследования.** Исследование проводилось на стоматологических пациентах в возрасте от 35 до 54 лет, которые имели в полости рта штамповано-паяные ортопедические конструкции, покрытые нитритом титана, литые облицованные керамикой, цельно-литые (10 человек) – основная группа и пациенты хирургического профиля в возрасте от 17 до 26 лет, которым проводилось удаление интактных зубов по ортодонтическим показаниям (5 человек) – контрольная группа. Материалом для морфологического исследования послужили участки слизистой оболочки, взятые возле опорных зубов ортопедических конструкций, промывных пространств и зубов, которые подвергались удалению. Образцы слизистой оболочки фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов, затем делали парафиновую проводку общепринятым методом. Иммуногистохимическим методом выявляли в эпителиальных клетках экспрессию маркера пролиферативной активности Ki-67 MIB-1 с использованием концентрированных первичных моноклональных антител (МКАТ) фирмы Thermo scientific (Великобритания) в разведении 1:500, экспрессию маркера антиапоптотической активности bcl-2 (124) и маркера апоптоза p53 (DO-7), Rady-to- Use (фирма DAKO (Дания)). Демаскирующая термическая обработка была выполнена по методу кипячения срезов в цитратном буфере (pH 6,0). Для визуализации первичных антител применялась система детекции UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo scientific). В качестве хромогена использовался DAB (диаминобензидин).

Подсчет результатов осуществляли при помощи окулярной сетки Автандилова [1] в 3 произвольно выбранных полях зрения при увеличении 400. Оценку иммуногистохимической метки производили по двум параметрам: степень распространения и интенсивность окраски. Степень распространения окраски маркера пролиферации и маркера апоптоза определяли путем подсчета количества окрашенных ядер по отношению к общему числу ядер, маркера антиапоптоза – по процентному содержанию окрашенной цитоплазмы клеток. Для оценки степени выраженности окраски использовали полуколичественную шкалу: + – слабая, ++ – умеренная, +++ – выраженная реакция.

Пролиферативную активность многослойного плоского эпителия оценивали с помощью определения митотического индекса (МИ) на гистологических срезах продольной ориентации по формуле:

$$MI = N(Ki-67) / N \times 100\%,$$

где N(Ki-67) – число ядер, иммунопозитивных к Ki-67, N – общее число ядер на 1мм<sup>2</sup> площади среза.

Уровень запрограммированной гибели эпителиоцитов оценивали с помощью определения апоптотического индекса (АИ):

$$AI = N(p53) / N \times 100\%,$$

где N(p53) – число апоптотических ядер, иммунопозитивных к p53, N – общее число ядер.

**Результаты исследований и их обсуждение.** При иммуногистохимическом исследовании

биоптатов слизистой оболочки пациентов контрольной группы экспрессия Ki-67 была однотипной: в 4 случаях она определялась в клетках исключительно базального слоя эпителия с величиной МИ от 11 до 14%, в среднем 12%. Только у 1 из 5 больных было выявлено увеличение данного показателя до 40% в зоне акантотического разрастания эпителия на ограниченном участке, тогда как в остальных отделах слизистой его величина составила 12-13%.

Уровень экспрессии Ki-67 в клетках эпителия опытной группы значительно варьировал, что отразилось и на цифрах МИ.

Так в участках акантотических разрастаний многослойного плоского эпителия мы выявили от 40 до 70% позитивно окрашенных ядер клеток, причем в 2 из 10 случаев большее их количество обнаруживалось не в нижних отделах эпителиального пласта, а в зоне папилломатоза.

В 6 из 10 наблюдений явления акантоза носили выраженный характер с глубоким погружением сосочковых структур в собственную пластинку. В таких участках экспрессия маркера пролиферативной активности была максимальной, и значение МИ достигало 70%. Ki-67-позитивные эпителиоциты обнаруживались не только в базальном слое, но и в более высоких отделах слизистой – в парабазальном и шиповатом слое. Кроме того экспрессия Ki-67 выявлялась и в единичных клетках грануляционной ткани стромы. Морфологически такие клетки соответствовали фибробластическому ряду и лимфоидным элементам.

Два наблюдения морфологически характеризовались атрофическими процессами слизистой с истончением эпителиального пласта, однако уровень пролиферативной активности клеток был достаточно высоким (МИ 40 и 68%), при этом позитивно окрашенные клетки располагались исключительно в базальном слое слизистой.

Согласно нашим наблюдениям, длительное травмирование слизистой оболочки приводит к яркой апоптотической реакции клеток. Морфологические признаки таких клеток характеризуются сморщиванием клетки, разделением ее на отдельные части – апоптотические тельца, конденсацией ядерного хроматина. Иммуногистохимическая верификация клеток, находящихся в состоянии апоптоза, показала следующие результаты.

Как эпителиальные клетки, так и клеточные элементы собственной пластинки слизистой оболочки у пациентов контрольной группы были негативны к МКАТ к p53. Реакция в биопсийном материале опытной группы напоминала таковую при определении пролиферативной активности. В подавляющем большинстве (8 из 10 случаев) экспрессия маркера апоптоза была позитивной. Как и в наблюдениях с Ki-67, p53-позитивные клетки располагались преимущественно в базальном слое в участках акантотических разрастаний. Величина АИ колебалась от 40 до 78% и составила в среднем 61,13%.

Если базальные отделы слизистой оболочки демонстрировали наибольшие цифры АИ, то ближе к шиповатому слою реакция была неравномерной, в отдельных фрагментах величина АИ составляла лишь 26,75%. Экспрессия p53 в участках папилломатоза также была меньшей по сравнению с базальными отделами, что подтверждалось и цифрами АИ в этих зонах (от 11 до 40%, в среднем 23,25%). Изменялась и область расположения апоптотических телец – они выявлялись не только в базальных, но и в средних отделах эпителиального пласта.

В 2 случаях из 10 реакция с МКАТ к p53 была очаговой и достаточно слабой, что иллюстрировало низкий уровень апоптоза и, соответственно, низкий АИ в клетках слизистой (5 и 7%). Данные биоптаты характеризовались также скудной лимфогистиоцитарной инфильтрацией стромы и редукцией сосудистого русла.

Экспрессия маркера bcl-2 в цитоплазме эпителиальных клеток слизистой оболочки была нами отмечена только в одном наблюдении опытной группы пациентов. Данный биоптат демонстрировал также достаточно высокий митотический потенциал (68%) и умеренную апоптотическую активность (40%), а морфологически имела место атрофия эпителия с наличием участков ороговения.

В остальных 14 случаях как контрольной, так и опытной группы позитивная реакция с МКАТ к bcl-2 была обнаружена только в лимфоцитах воспалительного инфильтрата собственной пластинки слизистой и в единичных межэпителиальных лимфоцитах. В биоптатах группы исследования экспрессию bcl-2 можно было оценить как умеренную и даже выраженную (в единичных случаях), тогда как у пациентов группы сравнения ее можно охарактеризовать как слабую очаговую.

**Выводы.** К особенностям регенерации эпителия слизистой оболочки полости рта у лиц с металлическими конструкциями можно отнести: высокую пролиферативную активность базальных и парабазальных отделов пласта многослойного плоского эпителия в зонах акантоза, со снижением МИ в зонах папилломатоза почти в два раза; высокий АИ базальных отделов пласта многослойного плоского эпителия в зонах акантоза, отсутствие экспрессии bcl-2 в эпителиальных клетках всей толщи слизистой оболочки. На основании

гистологической картины и данных иммуногистохимического исследования можно заключить, что нарушение баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом может влиять на эффективность регенераторных процессов при повреждении. На нашем материале в подавляющем большинстве случаев в поврежденных участках слизистой выявлялась высокая экспрессия Ki67, p53 в сочетании со слабой реакцией к bcl-2 или отсутствием таковой. Вероятно, что низкие показатели МИ и АИ в биоптатах у пациентов контрольной группы свидетельствуют об отсутствии нарушений клеточного обновления эпителиоцитов. В тоже время высокий пролиферативный потенциал и апоптотическая активность клеток эпителия группы исследования позволяют предполагать наличие скрытых механизмов нарушения регенерации компенсаторного характера.

В основе появления и прогрессии неоплазии лежит генетическая нестабильность. Она базируется на нарушениях механизмов репарации ДНК, изменениях регуляции клеточного цикла и апоптоза. Потеря контроля над процессами пролиферации, дифференцировки и гибели клеток коррелирует с развитием дисплазии (неоплазии), увеличением степени ее тяжести и является известным фактом, описанным в эпителии многих органов [3]. По данным многочисленных исследований, у больных с хроническими травмами слизистых полости рта, носа, половых органов выявлена аномальная пролиферация, заключающаяся в «гиперэкспрессии» Ki67. Мнения о роли молекулярных маркеров p53 и bcl-2 в динамике развития пренеопластических процессов противоречивы. Ряд авторов считают, что последовательность метаплазия–дисплазия–карцинома ассоциируется с высокой пролиферативной активностью и не зависит от экспрессии p53 и bcl-2 [14]. По мнению других исследователей экспрессия p53 в «предзлокачественных поражениях» может рассматриваться как индикатор канцерогенеза [9, 10].

### **Перспективы дальнейших исследований.**

Таким образом, изучение процессов пролиферативной активности и апоптоза эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта у стоматологических больных является перспективным, поскольку они являются отражением не только регенераторной активности эпителия в зоне травм, но и могут выступать маркерами предопухолевых изменений.

## Литература

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии: [монография] / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
2. Бабиченко И. И. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста / И. И. Бабиченко, В. А. Ковязин. – М.: РУДН 2008. – 109 с.
3. Пожарисский К. М. Прогностическое и предсказательное значение иммуногистохимических маркеров при онкологических заболеваниях / К. М. Пожарисский, Е. Е. Леенман // Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. – Минск, 2004. – Ч. 1. – С. 113–116.
4. Райхлин Н. Т. Апоптоз – основные механизмы развития и роль в онкологической практике. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Н. Т. Райхлин, А. Н. Райхлин // Под ред. С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань, 2000. – С. 250–266.

5. Chae I. H. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells / I. H. Chae, K. W. Park, H. S. Kim, B. H. Oh // *Clin. Chim. Acta.* – 2004. – Vol. 341. – P. 83–91.
6. Chung E. Y. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells / E. Y. Chung, S. J. Kim, X. J. Ma // *Cell Research.* – 2006. – Vol. 16. – P. 154–161.
7. Filchenkov A. A. The caspase: regulators of apoptosis and other cellular functions / A. A. Filchenkov // *Biochemistry.* – 2003. – № 68. – P. 453–466.
8. Hengarten O. M. The biochemistry of apoptosis / O. M. Hengarten // *Nature.* – 2000. – Vol. 407. – P. 770–775.
9. Holmstrup P. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? / P. Holmstrup, P. Vedtofte, J. Reibel [et al.] // *J. Oral Pathol. Med.* – 2007. – Vol. 36. – 3. 262–266.
10. Kushner J. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth / J. Kushner, G. Bradley, R. C. K. Jordan // *J. Pathol.* – 1997. – Vol. 183. – P. 418–423.
11. Matveeva N. U. Role of nitric oxide in the apoptosis of retinal neurons human fetuses / N. U. Matveeva, S. G. Kalinichenko, I. I. Pushin, P. A. Motavkin // *Morphology.* – 2006. – Vol. 123, № 1. – P. 40–49.
12. Palcev M. A. The molecular basis of apoptosis / M. A. Palcev // *Journal of RAMS.* – 2002. – Vol. 72, № 1. – P. 13–21.
13. Van Delft M. F. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis / M. F. Van Delft, D. C. Huang // *Cell Research.* – 2006. – Vol. 16. – P. 203–213.
14. Werning J. W. Oral cancer: diagnosis, management, and rehabilitation / W. Werning J. – Thieme, 2007. – P. 8–12.
15. Yarilin A. A. The apoptosis. The nature of the phenomenon and its role in the whole organism / A. A. Yarilin // *Pathological physiology.* – 1998. – № 2. – P. 38–48.

УДК 616. 31-091. 8-003. 93

### МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА В ОСІБ З МЕТАЛЕВИМИ КОНСТРУКЦІЯМИ

Яковцова І. І., Данилюк С. В., Ніконов А. Ю., Ковальчук Ю. А., Долгая О. В.

**Резюме.** Вивчено вплив конструкцій стоматологічних сплавів металів на регенераторний потенціал клітин слизової оболонки порожнини рота. За допомогою імуногістохімічного методу вивчалися фактори, що відображають рівень проліферативної активності та що приймають участь у апоптозі (Ki67, p53, bcl-2) в різних шарах епітелію слизової оболонки порожнини рота. Показано, що порушення балансу між клітинною проліферацією та апоптозом може впливати на ефективність регенераторних процесів при пошкодженні.

**Ключові слова:** слизова оболонка порожнини рота, регенерація, проліферація, апоптоз.

УДК 616. 31-091. 8-003. 93

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА У ЛИЦ С МЕТАЛЛИЧЕСКИМИ КОНСТРУКЦИЯМИ

Яковцова И. И., Данилюк С. В., Никонов А. Ю., Ковальчук Ю. А., Долгая О. В.

**Резюме.** Изучено влияние конструкцій стоматологических сплавов металлов на регенераторный потенциал клеток слизистой оболочки полости рта. С помощью иммуногистохимического метода изучались факторы, отражающие уровень пролиферативной активности и участвующие в апоптозе (Ki67, p53, bcl-2) в разных слоях эпителия слизистой оболочки полости рта. Показано, что нарушение баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом может влиять на эффективность регенераторных процессов при повреждении.

**Ключевые слова:** слизистая оболочка полости рта, регенерация, пролиферация, апоптоз.

UDC 616. 31-091. 8-003. 93

### Morphological Features of the Regeneration of the Oral Mucosa in Patients with Metal Structures

Yakovtsova I., Danilyuk S., Nikonov A., Kovalchuk Y., Dolgaja O.

**Abstract.** Dentists have to deal with diseases that arise as a result of a toxic effect of chemical mixtures of dental metal alloys on oral tissues and the body as a whole. Leading role in the development of various methods of adapting play metabolic mechanisms that ensure the development of compensatory and pathogenic processes and increases the body's resistance to the action of toxins. Disrupt the functioning of this system leads to disruption of homeostasis and to the development of chemical pathology.

The aim of this study was to investigate the influence of structural metal dental alloys (stamped-brazed orthopedic constructions covered nitrite titanium alloy lined with ceramics, whole cast) on the regenerative capacity of the epithelial cells of the oral mucosa. Immunohistochemistry revealed the expression of a marker of proliferative activity of Ki-67, MIB-1, the expression of antiapoptotic activity marker bcl-2 (124) and apoptosis markers p53 (DO-7).

The level of expression of Ki-67 in the epithelial cells of the experimental group varied considerably, which affected the numbers of mitotic index. In areas growths of acanthosis stratified squamous epithelium, we identified 40 to 70 % positively stained nuclei of cells, and in 2 of 10 cases, more of them do not show up in the lower regions of the epithelial layer, and in the area of papillomatosis. In 6 of the 10 observations phenomenon acanthosis were pronounced with a deep dive papillary structures in the lamina propria. In such areas the expression of a marker

of proliferative activity was maximal, and the value of the mitotic index reached 70%. Ki-67-positive epithelial cells were detected not only in the basal layer, but in the higher regions of the mucosa – in parabasal and prickly layer.

Reaction of p53 in biopsies of the experimental group resembled those in the determination of proliferative activity. The vast majority (8 out of 10 cases), the expression of markers of apoptosis was positive. As observations with Ki-67, p53-positive cells were located predominantly in the basal layer at sites growths of acanthosis. The value of apoptotic index ranged from 40 to 78% and averaged 61.13%. Closer to the spiny layer response was uneven, and in some fragments of the apoptotic index value was only 26.75%. Expression of p53 in areas of papillomatosis was also lower compared to basal. Modify and area location apoptotic bodies – they are identified not only in the basal, but in the middle section of the epithelial layer.

Expression of the marker bcl-2 in the cytoplasm of epithelial cells of the mucous membrane was noted by us only one patient experienced patients. This biopsy showed quite high mitotic potential (68%) and moderate apoptotic activity (40%), and morphologically took place with the presence of epithelial atrophy sites keratinization.

Thus, based on histological and immunohistochemical study data it can be concluded that the disturbance of the balance between cell proliferation and apoptosis may affect the efficiency of regenerative processes in case of damage. In our material, in most cases in the damaged areas of the mucous detected high expression of Ki67, p53, combined with a weak reaction to the bcl-2, or lack thereof. It is likely that low rates of MI and AI in biopsy specimens of patients in the control group showed no violations of epithelial cell renewal. At the same time, a high proliferative potential and apoptotic activity of epithelial cells group studies suggest the presence of hidden mechanisms violations compensatory regeneration.

**Keywords:** oral mucosa, regeneration, proliferation, apoptosis.

*Рецензент – проф. Старченко І. І.*

*Стаття надійшла 3. 09. 2014 р.*