

УДК (616.31+678.746.47+615.015.35):(599.323.7+591.87)

С. А. Шнайдер, д. мед. Е. К. Ткаченко, к. биол. н., В. А. ДацюкГосударственное учреждение «Институт стоматологии
Национальной академии медицинских наук Украины»**ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ
НА ЦИТОМОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ЭПИТЕЛИЯ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКОТОКСИКАНТА**

В опытах на 23 белых крысах-самцах 1,5- мес. возраста изучено влияние комбинации растительных полифенолов в виде препарата с рабочим названием ПФ4 на состояние эпителия слизистой оболочки полости рта крыс в условиях действия экотоксиканта ДДЕ. Под влиянием ДДЕ выявлены неоднородность структуры эпителиального пласта СОПР; значительный рост числа патологических митозов; проявления воспалительной реакции. Препарат ПФ4 увеличивал митотическую активность и значительно снижал степень вакуолярной дистрофии эпителиоцитов; ликвидировал воспалительные явления в собственной пластинке СОПР.

Ключевые слова: соединительная ткань, слизистая оболочка полости рта, цитоморфометрические исследования, эпителиоциты, экотоксикант, растительные полифенолы.

С. А. Шнайдер, Е. К. Ткаченко, В. А. ДацюкДержавна установа «Інститут стоматології
Національної академії медичних наук України»**ВПЛИВ КОМБІНАЦІЇ РОСЛИННИХ ПОЛІФЕНОЛІВ
НА ЦИТОМОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ СТАНУ ЕПІТЕЛІЮ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ
ПОРОЖНИНИ РОТА ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ЕКОТОКСИКАНТУ**

В дослідях на 23 білих щурах-самцях 1,5-міс. віку вивчено вплив комбінації рослинних поліфенолів у вигляді препарату з робочою назвою ПФ4 на стан епітелію слизової оболонки порожнини рота щурів в умовах дії екотоксиканту ДДЕ. Під впливом ДДЕ виявлені неоднорідність структури епітеліального пласту СОПР; значне збільшення патологічних мітозів; прояви запальної реакції. Препарат ПФ4 збільшував мітотичну активність та значно знижував ступінь вакуолярної дистрофії епітеліоцитів; ліквідував запальні явища у власній пластинці СОПР.

Ключові слова: сполучна тканина, слизова оболонка порожнини рота, цитоморфометричні дослідження, епітеліоцити, екотоксикант, рослинні поліфеноли.

S. A. Shnaider, E. K. Tkachenko, V. A. DatsyukState Establishment "The Institute of Stomatology
of the National academy of medical science of Ukraine"**THE INFLUENCE OF THE COMBINATION OF THE VEGETATIVE POLYPHENOLS
UPON THE CYTOMORPHOMETRIC CHANGES IN THE STATE OF EPITHELIUM
OF ORAL MUCOUS MEMBRANE IN RATS UNDER THE AFFECTION OF ECOTOXICANT**

The influence of the combination of vegetative polyphenols in the form of the preparation with the working title PF4 upon the state of epithelium of oral mucous membrane of rats under the affection of ecotoxicant DDE was studied in the experiments with 23 white he-rats of 1.5 months old. Under the influence of DDE the heterogeneity of the structure of the epithelial layer of OMM, the considerable growth of the number of pathologic mitoses, the displays of the inflammatory reaction were revealed. The preparation PF4 increased mitotic activity and reduced considerably the degree of vacuolar dystrophy of epithelial cells; eliminated the inflammatory phenomena in the proper plate of OMM.

Key words: conjunctive tissue, oral mucous membrane, cytomorphometric studies, epithelial cells, ecotoxicant, vegetative polyphenols.

Эпителий слизистой оболочки полости рта (СОПР) постоянно подвержен воздействию различных патологических агентов, в т.ч. и токсических. Поддержание физиологического состояния СОПР определяется обновлением активно функционирующего слоя эпителия и продукцией местных защитных антимикробных и антиоксидантных протеинов. Среди белков, участвующих в

регуляции клеточного цикла, ведущая роль принадлежит протеинтирозинкиназам (РТК) – ферментам, играющим важную роль в процессах клеточного роста, пролиферации, эмбриогенеза, апоптоза и др. При срыве клеточного цикла и синтеза защитных белков [1] развиваются процессы «второй линии защиты» – воспаления.

Таким образом, нарушения клеточного цикла и синтеза белков составляют ранние предпосылки к развитию воспалительных явлений СОПР и пародонта.

В последнее время установлена регуляторная роль алиментарных полифенолов (ПФ) в клеточном цикле для многих тканей [2] поэтому поиск лекарственных препаратов на основе ПФ растительного происхождения является своевременным и актуальным.

Цель исследования. Изучение влияния препарата растительных полифенолов на состояние эпителия слизистой оболочки щеки крыс при патогенном воздействии экотоксиканта.

Материалы и методы. Опыты проведены на 23 белых крысах-самцах 1,5- мес. возраста. Крысы содержались на стандартном рационе виария. 1-ая группа – интактная (7 крыс). Во 2-ой контрольной группе (ДДЕ) 8 крысам вводили per os раствор ДДЕ (2,2-Bis(7-chlorophenic)-2 dichloroethylene) (Acros organics USA), который является основным метаболитом ДДТ. ДДЕ вводили в дозе 3,5 мг / кг 5 раз в неделю. В 3-ей группе 8 крысам вводили per os препарат ПФ4 в дозе 0,1мл/100 г массы тела крыс в течение 35 дней (ДДЕ + ПФ4). Препарат ПФ4 – комбинация концентратов проростков злаковых (овса, пшеницы, ржи) и травы Тысячелистника обыкновенного («Виола», Запорожье, Украина) в соотношении 2:1:1:1, получен по оригинальной лабораторной технологии [3]. Суммарное содержание ПФ в препарате ПФ4 – 5,5 мг / 1 мл препарата (1 мл соответствует 1 г исходного сырья).

После забоя у животных иссекали фрагменты слизистой оболочки щеки, фиксировали в формалине и заключали в парафин. Срезы толщиной около 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также обрабатывали по Эйнарсону [4, 5]. Полученные препараты использовали для обзорных морфологических и морфометрических исследований. При малом увеличении микроскопа определяли коэффициент эрозирования эпителия (КЭЭ). Для этого с помощью окулярного микрометра измеряли протяженность участков наружного повреждения эпителиального слоя и определяли, какую долю составляет зона повреждения по отношению к протяженности всего эпителия (в усл. ед.). Это позволяло оценивать состояние эпителия в целом. Используя стереометрический метод «полей», определяли процентное соотношение зон, включающих слои эпителия и состоящие из зоны клеточных слоев (ЗКС) и зоны рогового слоя (ЗРС) [6]. Эти показатели позволяли глубже оценить изменения, происходящие внутри эпителия. В ростковой зоне эпителия подсчитывали количество клеток с

фигурами митоза в базальном и шиповатом слоях и вычисляли митотический индекс (МИ) – процентное соотношение количества делящихся клеток к общему количеству учтенных клеток ростковой зоны. Подобным способом определяли также и процентное содержание двуядерных клеток (ДК) в составе слоя шиповатых клеток эпителия.

Для оценки реакции соединительной ткани (СТ) собственной пластинки слизистой оболочки рассчитывали коэффициент стеноза сосудов (КСС). Для этого определяли, какую часть (в усл. ед.) составляла площадь стенки сосуда микроциркуляторного русла (МЦР) к площади его просвета. Этот показатель объективно характеризовал направленность сосудистой реакции и степень её выраженности.

Результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами с определением критериев достоверности различий по Стьюденту.

Результаты исследований. Слизистая оболочка щеки (СОЩ) интактных крыс имеет двухслойное строение. В многослойном плоском ороговевающем эпителии хорошо видны отдельные слои клеток. В базальном слое эпителия, состоящем из призматических клеток, часть находилась в состоянии деления. Ядра клеток базального слоя имели четко выраженный рисунок хроматина, хорошо видны ядрышки. Шиповатый слой содержал клетки, имеющие крупные и светлые ядра. Цитоплазма клеток, в основном, однородная и слабо базофильная. По мере удаления от базального слоя размер клеток шиповатого слоя уменьшался, ядра таких клеток приобретали вытянутую форму. Ближе к роговому слою цитоплазма клеток становилась зернистой: выявлялись базофильные гранулы кератогиалина. Зернистый слой имел небольшую толщину и переходил в роговой слой, в нем встречались участки небольших расслоений, однако такие проявления не являлись характерными для общей структуры эпителия.

Собственная пластинка СОЩ представлена рыхлой волокнистой СТ, содержащей большое количество капилляров. Среди клеток СТ преобладали фибробласты и фиброциты. Волокна межклеточного вещества были расположены равномерно.

У крыс контрольной группы (ДДЕ) были отмечены особенности морфологической картины СОЩ. Так, выявлялась неоднородность структуры эпителия в разных его участках. Часто встречались участки расслоения и частичного отсутствия рогового слоя. Глубина эрозий эпителия также варьировала в разных местах. Показатели КЭЭ под действием ДДЕ увеличивались в 4,5

раза ($p=0,009$): $0,27\pm 0,05$ усл.ед. по сравнению с интактной группой: $0,06\pm 0,01$ усл.ед.

Структурные компоненты клеточных ядер и цитоплазмы выглядели более полиморфными, чем в интактной группе. Часть клеток базального слоя имела набухшие ядра и признаки начальной дистрофии в цитоплазме. Встречались делящиеся клетки как в базальном слое, так и в шиповатом, в котором клетки выглядели измененными. Ядра таких клеток были увеличены, постоянно встречались клетки с двумя ядрами, а также участки, где клетки были несколько раздвинуты, вероятно, за счет пернициеллюлярного отека. Эти морфологические изменения говорят о ярких проявлениях вакуолярной дистрофии в результате повреждающего действия токсиканта ДДЕ. Морфометрические исследования показали, что ЗКС существенно не изменялась: $41,2\pm 1,6$ % по сравнению с интактной группой: $39,3\pm 1,4$ %. Показатели ЗРС уменьшались на 25 % ($p=0,02$): $13,2\pm 1,1$ % относительно интактной группы: $17,6\pm 0,8$ %.

Процентное содержание делящихся и двуядерных клеток значительно изменялось. МИ под действием токсиканта снижался на 39 % ($p<0,001$): $1,1\pm 0,02$ % по сравнению с $1,8\pm 0,03$ % в интактной группе. Процентное содержание ДК, напротив, возросло на 58 % ($p=0,003$): $22,3\pm 1,2$ % по сравнению с интактной группой: $14,1\pm 0,9$ %. Возросло количество патологических митозов, которые характеризовались асимметрией деления и отставанием хромосом.

В собственной пластинке СОЩ сосудистая реакция проявлялась следующим образом. Стенки кровеносных сосудов МЦР были утолщены, в основном, за счет набухания клеток эндотелия, пернициеллюлярных и адвентициальных клеток. Внутренний просвет сосудов выглядел относительно суженным. СТ выявлялась отеочной, коллагеновые волокна были несколько утолщены. Часто встречались мигрировавшие из кровеносного русла лейкоциты, что говорит о проявлении воспалительной реакции. На этом фоне результаты изменений показателя КСС: $3,3\pm 0,35$ усл.ед. существенно не отличались от данных интактной группы: $3,1\pm 0,32$ усл.ед. Вероятно, утолщение сосудистой стенки за счет набухания образующих ее клеток выражено сильнее, чем воспринимаемое визуальное сужение просвета сосудов.

Отмеченные особенности собственной пластинки СОЩ говорят о наличии реактивных изменений под влиянием препарата ДДЕ. Учитывая, что собственная пластинка определяет трофику лежащего на ней эпителия, предположительно, эти реактивные изменения наблюдаются и в слое эпителия.

В дальнейшем исследовались защитные эффекты препарата ПФ4 на состояние СОЩ крыс на фоне токсического влияния ДДЕ. Группе крыс, которым вводили препарат ПФ4 (ДДЕ+ПФ4), степень проявлений реактивных изменений выглядела менее выраженной. Так, КЭЭ снижался на 30%: $0,19\pm 0,04$ усл. ед. относительно контрольной группы: $0,27\pm 0,05$ усл. ед.

Показатели ЗКС под влиянием препарата существенно не изменялись: $40,8\pm 1,4$ % по сравнению с данными контрольной группы: $41,2\pm 1,6$ %. Показатели ЗРС недостоверно увеличивались $14,1\pm 1,2$ % относительно контроля: $13,2\pm 1,1$ %. При этом указанные показатели приближались к данным интактной группы: $17,6\pm 0,8$ % ($p=0,05$), не достигая, однако, её уровня.

Препарат ПФ4 вызвал достоверное ($p_1<0,001$) увеличение митотической активности клеток эпителия СОЩ на $27,3$ % ($p<0,001$): $1,4\pm 0,06$ % по сравнению с контрольной группой: $1,1\pm 0,02$ %. В то же время МИ под действием препарата был более низким ($p<0,001$), чем в интактной группе: $1,8\pm 0,03$ %. Количество ДК снижалось на $18,4$ % ($p_1=0,03$): $18,2\pm 1,1$ % относительно контрольной группы: $22,3\pm 1,2$ %, однако, количество ДК было большим чем в интактной группе: $14,1\pm 0,9$ % ($p=0,05$). Степень вакуолярной дистрофии эпителиоцитов была выражена значительно меньше, чем в контрольной группе (ДДЕ).

В собственной пластинке эпителия СОЩ под действием препарата наблюдалось уменьшение количества лейкоцитов вокруг кровеносных сосудов, отек ткани практически не наблюдался. Коллагеновые волокна были видны четко, клетки СТ распределялись в поле зрения равномерно.

Все вышеизложенное можно рассматривать как нормализацию состояния СТ под действием растительных полифенолов без признаков воспалительной реакции. Исходя из данных общей микроскопии и сопоставления морфометрических показателей установлено, что препарат ПФ4 проявил существенные защитные противовоспалительные эффекты на фоне негативных изменений, вызванных экотоксикантом.

Выводы. 1. Под влиянием ДДЕ наблюдалась неоднородность структуры эпителиального пласта СОЩ – уменьшение зоны рогового слоя на 25% за счет снижения митотической активности эпителиоцитов и незавершенности митозов. ДДЕ вызвал значительный рост числа патологических митозов, которые характеризовались асимметрией деления и отставанием хромосом.

2 Соединительная ткань выявлялась отеочной, коллагеновые волокна утолщенными, внутренний просвет сосудов – сужен. Увеличение числа

лейкоцитов характеризовало проявлення воспалительной реакції.

3. Препарат ПФ4 вызвал увеличение митотической активности эпителиоцитов на 27%; снижение количества двуядерных клеток на 18%. Степень вакуолярной дистрофии эпителиоцитов была выражена значительно меньше, чем в контрольной группе.

4. Под действием препарата ПФ4 в собственной пластинке СОЩ отек ткани не выявлялся; коллагеновые волокна были видны четко; снижалось число лейкоцитов вокруг кровеносных сосудов, что свидетельствовало об отсутствии воспалительных явлений.

Список литературы

1. **Canny G.** Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human muco-

sal epithelia / G. Canny, O. Levy, G. T. Furuta // PNAS. – 2002. – Vol. 99. – №6. – P.3902-3907.

2. **Lifen Hou** Inhibition of free radical initiated peroxidation of human erythrocyte ghosts by flavonols and their glycosides / Hou Lifen, Zhou Bo, Yang Li, Liu Zhong-Li // Org. Biomol. Chem. – 2004. – №2. – P. 1419-1423.

3. **Ткаченко Е. К.** Разработка лабораторной технологии получения и количественное определение суммарного содержания ПФ в концентрате надземной части *Achillea Millefolium L.* / Е. К. Ткаченко, С. В. Носийчук. // Вісник стоматології. – 2009. – №2. – С. 82-85.

4. **Меркулов Г. А.** Курс патологической техники / Меркулов Г. А. –Л. : 1969. – 423 с.

5. **Пирс Э.** Гистохимия / Пирс Э.– М.: ИЛ. 1962. – 962 с.

6. **Автандилов Г. Г.** Медицинская морфометрия. Руководство / Автандилов Г. Г.– М.: Медицина, 1990. – 384 с.

Поступила 18.02.15

