

Glazunov O. A., Glazunova S. A., Moroz V. E. Влияние токсиканта делагила на морфологические изменения в слизистой оболочке полости рта крыс при разном уровне поступления алиментарных полифенолов = The influence of the toxicant delagil on the morphological changes in the oral mucosa of rats in the different levels of receipts of alimentary polyphenols. Journal of Education, Health and Sport. 2015;5(12):326-332. ISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.35466>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%2812%29%3A326-332>
<http://pbn.nauka.gov.pl/works/682259>
Formerly Journal of Health Sciences. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011–2014
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.
Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.
Zgodnie z informacją MNiSW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.
The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).
© The Author (s) 2015;
This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 10.11.2015. Revised 15.12.2015. Accepted: 17.12.2015.

УДК: (579.23 – 036.632+615.372): 616.311:599.323.4
UDC: (579.23 – 036.632+615.372): 616.311:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ТОКСИКАНТА ДЕЛАГИЛА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПОЛОСТИ РТА КРЫС ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ ПОСТУПЛЕНИЯ АЛИМЕНТАРНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ

THE INFLUENCE OF THE TOXICANT DELAGIL ON THE MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE ORAL MUCOSA OF RATS IN THE DIFFERENT LEVELS OF RECEIPTS OF ALIMENTARY POLYPHENOLS

Глазунов О. А., Глазунова С. А., Мороз В. Е.
Glazunov O. A., Glazunova S. A., Moroz V. E.

**Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины,
Стоматологическая поликлиника № 1 г. Кривой Рог
Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine,
Stomatologic polyclinic number 1 of the Krivoy Rog**

Реферат

В опытах на 22 белых крысах линии Вистар изучено влияние токсиканта делагила на морфологические изменения слизистой оболочки полости рта крыс в условиях нормального поступления и лишения животных растительной пищи. Введение на фоне полноценного рациона вивария вызвало на поверхности эпителиального пласта появление гигантских эпителиоцитов и отека в межклеточных пространствах. Хроническое лишение крыс алиментарных растительных полифенолов усиливало чувствительность слизистой оболочки полости рта к действию делагила и вызывало более значительные изменения в эпителиальном пласте и в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки щеки крыс.

Ключевые слова: делагил, алиментарная недостаточность полифенолов, эпителиальный пласт, гигантские эпителиоциты, митотические процессы, соединительная ткань собственной пластинки, деструктивно-воспалительные изменения, белые крысы.

Summary

The Aim of study was to investigate the the influence of delagila on the morphological changes in the connective tissue of the lamina propria and the epithelium of the buccal mucosa of rats under conditions of normal receipts and deprivation of the animals plant foods.

Materials and methods. In the experiment were taken 22 white rats, distributed in the following groups. 1st group (7 rats) - intact; 2nd group (7) was obtained delagil per os at a dose of 5 mg / kg body weight of rats 5 times a week, against full vivarium ration. Rats of group 3 (8) was prepared delagil with the content on their diet, devoid of plant food. Time of the experiment was 60 days.

Results and conclusions. The introduction on the background of a full ration of vivarium caused on the surface of the epithelial layer appearance of a gigant epithelial cells and swelling in the intercellular spaces. Chronic nutritional deprivation rats of the plant polyphenols increased the sensitivity of the oral mucosa to the action delagila and caused a significant change in the epithelial layer of connective tissue in the lamina propria of the buccal mucosa of rats.

Key words: delagil, nutritional deficiency of polyphenols, epithelial layer, giant epithelial cells, mitotic process, the connective tissue of the lamina propria, destructive and inflammatory changes, white rats.

Слизистая оболочка полости рта в процессе жизнедеятельности претерпевает различные влияния, в т.ч. и действие политропных токсикантов, к которым относится лекарственный ксенобиотик прооксидант делагил (хлороквин). Делагил, наряду с геномотропным (иммуносупрессорным) действием, оказывает токсические эффекты на клетки эпителия, эндотелия, фибробласты. Накапливаясь в лизосомах, он ингибирует действие протеолитических ферментов, снижает в цитозоле содержание восстановленного глутатиона [1]. Делагил избран нами как репрезентативный токсикант для установления цитопротекторной физиологической роли алиментарных полифенолов (ПФ).

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния делагила на морфологические изменения в соединительной ткани собственной пластинки и эпителиальном покрове слизистой оболочки щеки крыс в условиях нормального поступления и лишения животных алиментарных полифенолов.

Материалы и методы. В опыт были взяты 22 белые крысы линии Вистар стадного разведения, распределенных в следующих сериях. 1-ая группа (7 крыс) – интактная; 2-ая группа (7) также содержалась на полноценном рационе вивария. Крысы этой группы получали делагил (производство «Алкалоида», Венгрия) в дозе 5 мг/ кг массы тела крыс 5 раз в неделю в утренние часы. Крысы 3-й группы (8 особей), как и крысы 2-ой, получали per os делагил при содержании их на рационе питания, лишенном растительной пищи или бесполифенольном рационе (БПР) [2]. Время проведения опыта составило 60 дней.

После завершения эксперимента крыс умерщвляли путем тотального кровопускания из сердца под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Слизистую оболочку щеки (СОЩ) иссекали, фиксировали в формалине и заключали в парафин. Срезы толщиной 6-8 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону и толуидиновым синим [3]. Подсчет митозов эпителиоцитов проводили в базальном и шиповатом слоях СОЩ при увеличении 15×40. Митотический индекс

(МИ) вычисляли, исходя из общего количества учтенных клеток (3000) и выражали в процентах. Двухъядерные эпителиоциты определяли в шиповатом слое на ограниченной площади среза при таком же увеличении. Кариометрические исследования клеток шиповатого слоя осуществляли путем зарисовки ядер на листе бумаги с помощью рисовального аппарата при увеличении микроскопа 15×90. Полученные результаты выражали в $\mu\text{м}^3$, а также в десятичных логарифмах для снятия асимметрии распределения. Степень эрозирования эпителиального пласта учитывали с помощью шкалы микрометра при увеличении 8x20. Коэффициент эрозии эпителия (КЭЭ) вычисляли по соотношению протяженности: эпителий поврежденный/эпителий исследованный в условных единицах (усл. ед.). Стереометрически определяли объемную долю (объемная плотность V_v) зон эпителиального пласта, состоящего из клеточных слоев (ЗКС) и рогового слоя (ЗРС) [3]. На зарисовках кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (МЦР), выполненных при увеличении 15x40, точечным методом определяли удельную площадь стенки кровеносного сосуда с образующими ее клетками и удельную площадь его просвета. По соотношению площадь стенки/площадь просвета рассчитывали коэффициент стеноза сосудов (КСС).

Результаты опытов обрабатывали с помощью критерия t достоверности различий по Стьюденту.

Результаты исследований

Слизистая оболочка щеки (СОЩ) крыс построена из многослойного плоского ороговевающего эпителия и собственной пластинки. В эпителии четко видны базальный и шиповатый слои клеток. У базалиоцитов наблюдалась выраженная способность к митотическому делению. Шиповатый слой состоял из нескольких слоев крупных клеток с крупным ядром и относительно светлой цитоплазмой. В цитоплазме клеток обнаруживались гранулы кератогиалина. Собственная пластинка своими сосочками заполняла пространство между эпителиальными гребнями. Высота сосочков была непостоянной, изменяясь на протяжении среза. Собственная пластинка представлена волокнистой соединительной тканью, содержащей клетки и межклеточные структуры. Среди клеток встречались фибробласты, гистиоциты, а также единичные макрофаги, тучные клетки и полиморфноядерные лейкоциты. Ткань слизистой оболочки обильно васкуляризирована и без резкой границы переходила в подслизистую оболочку.

Введение делагила крысам, содержащихся на полноценном рационе вивария (ДВ+делагил), вызвало следующие изменения. Согласно результатам стереометрических исследований эпителия V_v составляющих его зон, величины ЗКС и ЗРС претерпели значительные изменения по сравнению с данными интактных групп. Так, средние величины зоны V_v ЗКС снижались на 11 % ($p=0,05$; табл. 1); величины V_v ЗРС имели тенденцию к снижению (на 16 %; $p=0,10$; табл. 1).

Таблица 1

Морфометрия эпителиального пласта слизистой оболочки щеки крыс. Объемные доли клеточных и рогового слоев (%) ($M \pm m$; p)

Группа животных	V_v ЗКС	V_v ЗРС
Интактная (ДВ)	46,2±1,3	16,4±1,0
ДВ+делагил	41,0±1,3 $p=0,05$	13,7±0,9 $p=0,10$
БПР+ делагил	44,3±1,3	12,6±0,9 $p=0,04$

Примечание. В табл. 1-4 показатель достоверности p рассчитан относительно интактной группы; p_1 – относительно группы (ДВ+делагил).

На поверхности эпителиального пласта имели место отдельные неглубокие эрозии рогового слоя, которые не углублялись в слой подлежащих шиповатых клеток. КЭЭ составил: $0,08 \pm 0,03$ усл.ед. Об эффективности компенсаторных реакций свидетельствовало усиление митотических процессов. Так, клетки базального слоя отличались выраженным полиморфизмом ядер и активно делились митозом. Фигуры митотического деления наблюдались и в шиповатом слое. Митотический индекс в 2,5 раза ($p=0,002$) превышал таковой в интактной группе (табл. 2).

Таблица 2

Митотическая активность и количество двуядерных клеток в эпителии слизистой оболочки щеки крыс (%) ($M \pm m$; p ; p_1)

Группа животных	Митотический индекс (МИ)	Двуядерные клетки
Интактная (ДВ)	1,5±0,22	15,0±1,1
ДВ+делагил	3,7±0,27 $p=0,002$	6,5±0,8 $p=0,001$
БПР+ делагил	2,3±0,27 $p_1=0,014$	11,5±1,0 $p_1=0,012$

В отдельных случаях встречались фигуры ассиметричных митозов с мостами и отставанием хромосом. В шиповатом слое существенно, на 57 % ($p=0,001$) уменьшалось количество двуядерных клеток (табл.2). Обнаруживались очаги дистрофически измененных клеток с явлениями вакуолизации и набухания цитоплазмы и ядер клеток. В некоторых участках встречались гигантские эпителиоциты, цитоплазма которых была резко растянута. Ядра были увеличены пропорционально размерам клеток. В результате развития межклеточного отека и разрыва межклеточных связей возникали отслойки рогового слоя. Кариометрические и интеркариометрические исследования (табл.3) показали, что объемы ядер IgV и межъядерные расстояния достоверно не отличались от аналогичных данных в интактных группах. Отмечались умеренно выраженные явления акантоза – разрастание клеток шиповатого слоя и образование папилломатозных очагов.

Таблица 3

Результаты кариометрии и интеркариометрии эпителиоцитов слизистой оболочки щеки крыс под влиянием делагила (%) ($M \pm m$; p ; p_1)

Группа животных	lg объема ядра, объем, в мкм ³	Среднее межъядерное расстояние, в мкм
Интактная (ДВ)	2,34±0,02	23,9±1,15
ДВ+делагил	2,36±0,03	24,6±1,13
БПР+ делагил	2,5±0,022 $p=0,003$ $p_1=0,013$	30,5±1,26 $p=0,012$ $p_1=0,018$

Собственная пластинка характеризовалась некоторым полнокровием сосудов. Клетки сосудистой стенки иногда выглядели набухшими, но величина просвета сосудов существенно не изменялась (табл. 4). Обращало на себя внимание некоторое сближение тучных клеток с кровеносными сосудами, однако визуальных изменений в них обнаружено не было.

Таблица 4

Изменения просвета кровеносных сосудов МЦР слизистой оболочки щеки крыс под влиянием делагила ($M \pm m$; p ; p_1)

Группа животных	$\frac{\text{Площадь стенки сосуда}}{\text{Площадь просвета сосуда}}$, в усл. ед.
Интактная (ДВ)	2,80±0,18
ДВ+делагил	3,24±0,16
БПР+ делагил	5,49±0,48 $p=0,003$ $p_1=0,007$

Введение делагила крысам, содержащихся на бесполифенольном рационе (БПР+делагил) вызвало более выраженные изменения. Эпителиальный пласт слизистой в данной группе был более неоднородным по высоте в различных зонах, что объясняется выраженными процессами отслойки и расслоением рогового слоя на отдельные пластины, а также образованием многочисленных поверхностных эрозий рогового слоя на отдельных участках эпителия. В то же время глубоких эрозий, достигающих поверхности собственной пластинки обнаружено не было. При этом КЭЭ увеличился в 3,8 раза ($p_1=0,007$): 0,3±0,04 усл.ед. Средние показатели V_v ЗКС и ЗРС эпителиального пласта незначительно отличались от данных группы (ДВ+делагил), в то время как средние показатели V_v ЗРС были на 23 % ($p=0,04$) ниже, чем в интактной группе (табл.1). Отмечалось выраженное развитие акантоза эпителиоцитов шиповатого слоя, сопровождающееся увеличением высоты сосочков собственной пластинки. Существенно увеличивалось количество очагов вакуольной дистрофии, гигантских эпителиальных клеток, а также количество щелевидных полостей на границе с роговым слоем. Возросла отечность межклеточных пространств.

Делагил в условиях недостаточности полифенолов существенно на 7 % ($p = 0,003$) увеличивал среднюю величину lg объема ядра эпителиоцитов; среднее межъядерное расстояние возросло на 28 % ($p = 0,012$) по сравнению с данными интактных групп (табл.3). Подобные изменения не наблюдались в условиях полноценного рациона вивария. Повышение митотической активности было выражено в меньшей степени, чем у крыс, получавших делагил на общем рационе вивария (ДВ+делагил). Так, митотический индекс снижался на 38 % ($p_1=0,014$); количество двуядерных клеток увеличивалось в 1,8 раза ($p_1=0,012$) по сравнению с группами крыс, получавшими делагил на фоне ДВ (табл.2).

В собственной пластинке соединительной ткани наблюдалась отечность межклеточных структур и периваскулярных пространств. В кровеносных сосудах выявлено набухание и некоторое округление эндотелия и адвентициальных клеток, а также существенное сужение их просвета, чего не наблюдалось в условиях введения делагила на рационе вивария. Коэффициент стеноза сосудов МЦР слизистой оболочки щеки под влиянием делагила и содержания крыс на БПР увеличился вдвое ($p=0,003$; табл. 4) относительно интактной группы и в 1,7 раза ($p_1=0,007$) по сравнению с группой крыс, получавших делагил при полноценном рационе вивария (табл.4). В мышечном слое щеки отмечались набухание и отек волокон, отсутствие четко выраженной поперечной исчерченности в них, обусловленное уменьшением прозрачности саркоплазмы, а также неоднородностью её окрашивания. Межмышечная соединительная ткань была отечной.

Заключение

Пероральное введение крысам токсиканта делагила на фоне полноценного рациона вивария вызвало на поверхности эпителиального пласта слизистой оболочки полости рта появление гигантских эпителиоцитов с увеличенными ядрами, отеком в межклеточных пространствах. Усиление митотических процессов в базальном и шиповатом слоях клеток носило компенсаторный характер в ответ на вызываемое делагилом повреждение клеток. Хроническое лишение крыс алиментарных растительных полифенолов усиливало чувствительность слизистой оболочки полости рта к действию делагила и вызывало более значительные изменения как в эпителиальном пласте, так и в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки щеки.

Список литературы

1. Blay I., Brown K. D. Functional reseptors for epidermal growth factor in an epithelial-cell line derived from the rat small intestine / I. Blay, K. D. Brown // *Biochem. J.* – 1985. – V.225. – P.85-94.
2. Прохончуков А. А. Руководство по терапевтической стоматологии / А. А. Прохончуков, Н. К. Жижина // Под ред. А. И. Евдокимова. – М.: Медицина, 1967 – 572 с.
3. Меркулов Г.А. Курс патологической техники / Г.А. Меркулов // Л. – 1969. – 423 с.

REFERENCES:

1. Blay I., Brown K. D. Functional reseptors for epidermal growth factor in an epithelial-cell line derived from the rat small intestine / I. Blay, K. D. Brown // *Biochem. J.* – 1985. – V.225. – P.85-94.

2. Prokhonchukov A.A., Zhizhina N.K. *Rukovodstvo po terapevticheskoy stomatologii* [Manual of the therapeutic dentistry], Moscow: Meditsina, 1967, 572 p.
3. Merkulov G. A. *Kurs patologicheskoy tekhniki* [The course of the pathological technology], Leningrad: Leningrad, 1969, 423 p.