

Schnaider S. A., Parasyuk A. V., Skiba A. V., Tkachenko E. K. Correction of the cytomorphological changes by the quercetin in the mucous membrane of the mouth cavity of rats under the action of systemic pathogenic factors. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(7):1247-1256. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1163696>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/5243>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).  
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Authors 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, 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/4.0/>) 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/4.0/>) 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: 01.07.2017. Revised: 02.07.2017. Accepted: 31.07.2017.

## **CORRECTION OF THE CYTOMORPHOLOGICAL CHANGES BY THE QUERCETIN IN THE MUCOUS MEMBRANE OF THE MOUTH CAVITY OF RATS UNDER THE ACTION OF SYSTEMIC PATHOGENIC FACTORS**

**S. A. Schnaider, A. V. Parasyuk, A. V. Skiba, E. K. Tkachenko**

**State Institution «Institute of stomatology and maxilla-facial surgery National Academy  
of Medical Sciences of Ukraine»**

### **Astract**

The purpose of this research was to study the correction by the quercetin of the structural and functional changes in the mucous membrane of the mouth cavity of rats caused by the action of the doxaglide prooxidant and chronic emotional and painful stress in conditions of nutritional deficiencies in plant components.

The research was conducted on 21 rats 1.5 months. age. The duration of the experiment was 60 days. Intact group (1) consisted of 7 rats, which were kept on a standard ration of the vivarium. In the 2nd group (7 rats), after 1 month of their non-polifenol diet were subjected to the combined effects of the delagil oral injections (5 mg / kg) and chronic emotional and pain stress. The protective effects of the quercetin have been studied with the combined effects of delagil, chronic stress and non-polifenol diet. Rats of the 3 group (7 animals), after one month from the beginning diet were orally receiving quercetin (50 mg / kg) five times per week for 30 days.

The combined effect of the epitheliotropic toxicant delagil, a chronic emotional pain syndrome with alimentary polyphenolic insufficiency, caused pronounced dystrophic changes in the epithelium and the intrinsic plate of the oral mucosa. Quercetin was the best corrector of inflammatory-destructive changes. The nature of the compensatory-regenerative processes

in the cells of the epithelial layer acquired features inherent in the intact group. Quercetin prevented the oppression of proliferative activity of the epithelium.

**Key words:** pathogenic factors, cytomorphological changes, quercetin, correction, epithelial layer, own plate of the mucous membrane of the cheek, rats.

## **КОРРЕКЦИЯ КВЕРЦЕТИНОМ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПОЛОСТИ РТА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ СИСТЕМНЫХ ПАТОГЕННЫХ ФАКТОРОВ**

**С. А. Шнайдер, д.мед.н., А. В. Парасюк**

**А. В. Скиба, д.мед.н., Е. К. Ткаченко, к.биол.н.**

**Государственное учреждение "Институт стоматологии и челюстно-лицевой  
хирургии Национальной академии медицинских наук Украины"**

### **Реферат**

**Целью** настоящего исследования явилось изучение коррекции кверцетином структурно-функциональных изменений в слизистой оболочке полости рта крыс, вызванных воздействием прооксиданта делагила и хронического эмоционально-болевого стресса в условиях алиментарной недостаточности растительных компонентов.

**Материалы и методы.** В опыт были взяты 21 крыса 1,5-мес. возраста линии Вистар. Длительность эксперимента составила 60 дней. Интактную, 1-ю группу, составили 7 крыс, которые содержались на стандартном рационе вивария. В 2-й группе (7 крыс), после 1-мес. содержания их на бесполифенольном рационе (БПР), подвергались комбинированному воздействию – пероральному введению делагила (5 мг/кг) и хронического эмоционально-болевого стресса (ЭБС). Защитные эффекты кверцетина изучали при сочетанном влиянии делагила, хронического ЭБС и БПР. Для этого крысам 3-ей группы (7 особей), спустя месяц от начала перевода их на БПР, ежедневно с помощью зонда 5 раз в неделю на протяжении 30 дней перорально вводили кверцетин (50 мг/кг).

**Результаты и заключение.** Комбинированное воздействие эпителиотропного токсиканта делагила, хронического ЭБС при алиментарной полифенольной недостаточности вызывало выраженные дистрофические изменения в эпителии и

собственной пластинке слизистой оболочки полости рта. Кверцетин явился эффективным корректором воспалительно-деструктивных изменений. Характер компенсаторно-восстановительных процессов в клетках эпителиального пласта приобретал черты, присущие интактной группе. Кверцетин предупреждал угнетение пролиферативной активности эпителия.

**Ключевые слова:** патогенные факторы, цитоморфологические изменения, кверцетин, коррекция, эпителиальный пласт, собственная пластинка слизистой оболочки щеки, крысы.

На состояние эпителиального пласта слизистой оболочки полости рта негативное влияние оказывают патогенные факторы различной природы. Сочетанное влияние этих факторов (микробы и их токсины, экотоксиканты и лекарственные ксенобиотики, ментальный стресс и др.), а также питание рафинированными продуктами моделируют реальные условия жизни современного человека.

В тканях организма существенна роль баланса процессов апоптоза и пролиферации, при дисбалансе которых происходит накопление поврежденных клеток, способствующее развитию воспаления.

В настоящее время накопилось значительное количество экспериментальных данных о структуре, биологической активности и лечебных свойствах флавоноидов, об их облигантной функции, как пищевых факторов [1]. Кверцетин – один из самых сильных флавоноидов, он имеет широкий спектр биологической активности – особенное внимание привлекают его антирадикальные и противовоспалительные свойства.

Целью настоящего исследования явилось изучение коррекции кверцетином структурно-функциональных изменений в слизистой оболочке полости рта крыс, вызванных воздействием сочетанных патогенных факторов – влияния прооксиданта делагила и хронического эмоционально-болевого стресса в условиях алиментарной недостаточности растительных компонентов.

#### **Материалы и методы**

В опыт была взята 21 крыса 1,5-мес. возраста линии Вистар стадного разведения. Длительность эксперимента составила 60 дней. Интактную, 1-ю группу, составили 7 крыс, которые содержались на стандартном рационе вивария. В 2-й группе крысы (7 особей), после 1-мес. содержания их на бесполифенольном рационе (БПР) [2] подвергались комбинированному воздействию – пероральному введению делагила

(хлороквина фосфат, производства «Алкалоида», Венгрия) в дозе 5 мг/кг массы тела крыс и хронического эмоционально-болевого стресса (ЭБС). Стресс тревожного ожидания (ЭБС) воспроизводили содержанием животных в клетках конструкции Дезидерато [3]. Случайная подача постоянного тока силой 5 – 6 мА на пол, либо на расположенную на нем платформу, воспроизводила состояние тревожного ожидания болевого воздействия. Такую ситуацию воспроизводили на протяжении 4 часов 3 раза в неделю в течении второго месяца содержания крыс на БПР.

Защитные эффекты кверцетина изучали при сочетанном влиянии БПР, делагила и хронического ЭБС. Для этого крысам 3-ей группы (7 особей), спустя месяц от начала перевода их на БПР, ежедневно с помощью зонда 5 раз в неделю на протяжении 30 дней перорально вводили кверцетин в дозе 50 мг/кг массы тела крыс.

По завершении 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 (тонкие использовали для фотометрии) окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону и толуидиновым синим [4]. Кариометрию клеток базального и шиповатого слоев осуществляли путем зарисовки ядер и ядрышек с помощью рисовального аппарата при увеличении 15×90. Полученные величины объемов ядер и ядрышек выражали в мкм<sup>3</sup>, а также в десятичных логарифмах для снятия ассиметрии распределения, что существенно для построения кариометрических кривых и статистического анализа. На зарисовках определяли средние межъядерные расстояния, а полученные величины переводили в мкм. Степень эрозирования эпителиального пласта учитывали с помощью шкалы микрометра при увеличении 8×20. Коэффициент эрозии эпителия вычисляли по соотношению протяженности эпителий поврежденный/эпителий исследованный в условных единицах (усл.ед.). Стереометрически определяли объемную долю (объемная плотность – Vv) зон эпителиального пласта, состоящего из клеточных слоев (ЗКС) и рогового слоя (ЗРС) [5]. Сумма названных величин позволяет составить представление о высоте эпителия в целом. Подсчет митозов эпителиоцитов проводили в базальном и шиповатом слоях СОЩ при увеличении 15×40. Митотический индекс (МИ) вычисляли, исходя из общего количества учтенных клеток и выражали в процентах. Двухъядерные эпителиоциты определяли в шиповатом слое на ограниченной площади среза при таком же увеличении.

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.

Результаты опытов обрабатывали с помощью t-критериев достоверности различий по Стьюденту.

### **Результаты исследований**

Слизистая оболочка щеки крыс построена из многослойного плоского ороговевающего эпителия и собственной пластинки. В эпителии четко видны базальный и шиповатый слои клеток. Базалиоциты характеризовались выраженной способностью к митотическому делению. Шиповатый слой состоял из нескольких рядов крупных клеток различной формы с крупным ядром, реже с двумя, и относительно светлой цитоплазмой. В поверхностных рядах клетки укрупнялись, в цитоплазме обнаруживались гранулы кератогиалина. Собственная пластинка СОЩ своими сосочками заполняла пространства между эпителиальными гребнями. Высота сосочков, а также эпителиальных гребешков претерпевала изменения на протяжении среза. Собственная пластинка СОЩ 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 переходит в подслизистую оболочку.

При комбинированном воздействии далагила и хронического ЭБС в условиях полифенольной недостаточности эпителий СОЩ характеризовался выраженной неоднородностью по высоте, истончаясь в одних участках и заметно утолщаясь в других. Средние показатели объемной плотности зоны клеточных слоев (ЗКС) уменьшались на 12 % ( $p=0,03$ ), в то время как зона рогового слоя (ЗРС) не претерпевала существенных изменений по сравнению с интактной группой (табл.1). Коэффициент эрозии эпителия (эрозии были поверхностными) оказался высоким -  $0,35\pm 0,06$  усл.ед. (табл.1).

Таблица 1

Влияние кверцетина на состояние эпителиального пласта слизистой оболочки  
щеки крыс ( $M \pm m, p, p_1$ )

Группы животных	Объемные доли		Коэффициент эрозии эпителия (усл.ед.)
	V <sub>v</sub> ЗКС	V <sub>v</sub> ЗРС	
Интактная	46,2±1,3	16,4±1,0	-
Контрольная (К)	40,8±1,3 p=0,03	14,1±0,9	0,35±0,06
К+кверцетин	43,7±1,3	13,8±0,9	0,21±0,04 p <sub>1</sub> =0,09

Примечание: В табл.1-4 показатель достоверности p рассчитан относительно интактной группы; p<sub>1</sub> – относительно контрольной.

Базальный слой эпителия выделялся выраженным полиморфизмом клеток, которые были дистрофически изменены, характеризовались набуханием ядер и цитоплазмы, а иногда и перицеллюлярными отеками. Шиповатый слой неоднороден по структуре клеток и количеству рядов. Клетки в нем набухшие, в отдельных случаях содержали вакуоли. Средние величины lg объема ядра и межъядерного расстояния достоверно увеличивались: на 5 % (p=0,012) и на 16% (p=0,05), соответственно (табл.2).

Таблица 2

Влияние кверцетина на результаты кариометрии и интеркариометрии  
эпителиальных клеток слизистой оболочки щеки крыс ( $M \pm m, p, p_1$ )

Группы животных	lg объема ядра, объем в мкм	Среднее межъядерное расстояние, в мкм
Интактная	2,34±0,02	23,9±1,15
Контрольная (К)	2,45±0,02 p=0,012	27,8±1,08 p=0,05
К+кверцетин	2,45±0,023 p=0,021	22,2±0,87 p <sub>1</sub> =0,01

Гидропические изменения эпителия проявлялись в виде появления крупных и гигантских эпителиоцитов, часть из которых лизировалась с образованием первичных пузырьков. Очаговые отслоения рогового слоя наблюдались вследствие межклеточного отека и нарушения сцепленности клеток. В базальном слое различались фигуры митозов, в том числе и атипичные. Результаты определения величин МИ и количества

двухъядерных эпителиоцитов показали наличие обратно пропорциональной зависимости между ними. Делагил и хронический ЭБС в принятых условиях опыта вызывали снижение МИ на 53% ( $p=0,03$ ) и увеличение численности двухъядерных клеток на 67 % ( $p=0,002$ ; табл.3).

Таблица 3

Влияние кверцетина на соотношение количества митозов и двухъядерных клеток в эпителии слизистой оболочки щеки крыс ( $M \pm m, p, p_1$ )

Группы животных	МИ (%)	Количество двухъядерных клеток (%)
Интактная	$1,5 \pm 0,22$	$15,0 \pm 1,1$
Контрольная (К)	$0,7 \pm 0,15$ $p=0,03$	$25,0 \pm 1,4$ $p=0,002$
К+кверцетин	$1,33 \pm 0,21$ $p_1=0,05$	$15,5 \pm 1,1$ $p_1=0,002$

Волокнистая соединительная ткань собственной пластинки СОЩ своими сосочками глубоко врастала в эпителиальный пласт, создавая картины многочисленных папилломатозных образований. Она характеризовалась огрубением коллагеновых волокон, выраженной отечностью межклеточного вещества, периваскулярных пространств и структур стенок кровеносных сосудов. Просвет кровеносных сосудов существенно уменьшался, вследствие набухания и округления эндотелиальных и адвентициальных клеток. Коэффициент стеноза сосудов в 2,3 раза ( $p=0,002$ ) превышал таковой в интактной группе (табл.4).

Таблица 4

Влияние кверцетина на изменения просвета сосудов МЦР слизистой оболочки щеки крыс. Коэффициент стеноза ( $M \pm m, p, p_1$ )

Группы животных	Площадь стенки сосуда/площадь просвета сосуда (усл.ед)
Интактная	$2,80 \pm 0,2$
Контрольная (К)	$6,40 \pm 0,6$ $p=0,002$
К+кверцетин	$3,37 \pm 0,3$ $p_1 < 0,001$

Поперечнополосатые мышечные волокна и эндомизий мышечного слоя были дистрофически изменены и отечны.

Токсикант делагил в сочетании с хроническим стрессом при недостаточности растительных полифенолов в пищевом рационе вызвал в СОЩ развитие локальных очагов воспалительно-деструктивных нарушений. При этом наблюдались изменения характера дифференцировки и компенсаторно-восстановительных реакций клеток. Основным способом структурного обеспечения изменений функциональной активности эпителиоцитов является гипертрофия клеток.

В третьей серии опытов было изучено влияние кверцетина на фоне комбинированного воздействия делагила и хронического ЭБС при алиментарной недостаточности ПФ. При сопоставлении с контрольной группой (БПР+делагил+ЭБС) в СОЩ было выявлено следующее. Высота эпителиального пласта, по результатам определения Vv ЗКС и ЗРС значительно не изменялась (табл.1). Неравномерность эпителия за счет изменений его высоты по протяженности сохранилась, но была менее выраженной. Коэффициент эрозии эпителия проявил тенденцию к снижению в 1,7 раза ( $p=0,09$ ; табл.1).

Базальный и шиповатый слои эпителиоцитов характеризовались меньшей степенью набухания цитоплазмы и ядер, более четким структурным рисунком и выраженной базофильной окраской цитоплазмы. Средние размеры Ig объема ядер относительно контрольной группы крыс достоверно не изменялись (табл. 2). Среднее межъядерное расстояние уменьшалось на 20% ( $p_1=0,01$ ; табл.2).

Дистрофические изменения (гидропия эпителиоцитов) имели очаговый характер и были существенно менее выражены, чем в контрольной группе. В этих очагах обнаруживались гигантские клетки, растянутые внутриклеточной жидкостью; первичные пузырьки; незначительное явление экстрацеллюлярного отека; образование щелевидных полостей в эпителии; отслойка рогового слоя, а также расщепление его на отдельные пластины. Несколько менее были выражены и папилломатозные изменения.

При введении кверцетина количество митотически делящихся клеток увеличивалось в 1,9 раза ( $p_1=0,05$ ); число двуядерных эпителиоцитов снижалось в 1,6 раза ( $p_1=0,02$ ) и приближалось к данным интактной группы (табл.3). Коэффициент стеноза сосудов МЦР снижался в 1,9 раза ( $p_1<0,001$ ), величина которого также приближалась к данным интактной группы (табл.4).

### **Заключение**

Комбинированное воздействие патогенных факторов – эпителиотропного токсиканта делагила, хронического ЭБС и алиментарной полифенольной

недостаточности вызывало выраженные дистрофические изменения в эпителии и собственной пластинке слизистой оболочки полости рта. Пусковым механизмом в цепи морфологических сдвигов явились нарушения функционирования кровеносных сосудов МЦР, связанные с появлением в крови избытка катехоламинов (в результате действия стресса) и последующей вазоконстрикцией артериол и нарушения микроциркуляции [6]. Возникали очаговые повреждения эпителиального покрова в виде гидropической дистрофии межклеточного отека, образование пузырьков и эрозий эпителиальной ткани, что характеризует очаги локального воспаления.

Кверцетин явился эффективным корректором воспалительно-деструктивных изменений в слизистой оболочке полости рта с алиментарной недостаточностью полифенолов в условиях действия токсиканта делагила и хронического стресса. Характер компенсаторно-восстановительных процессов в клетках эпителиального пласта приобретал черты, присущие интактной группе. Кверцетин предупреждал угнетение пролиферативной активности эпителия.

### **Список литературы**

1. Левицкий А.П., Воскресенский О.Н., Макаренко О.А. Молекулярные механизмы лечебно-профилактического действия биофлавоноидов. Вісник стоматології.:2006, Спецвипуск:16.
2. Прохончуков А.А., Жижина Н.К. Руководство по терапевтической стоматологии. Медицина.:1967:572
3. Desiderato O., MacKinnon J., Hissom H. Development of gastric ulcers in rats following stress termination. J Comp. Physiol. Psychol.: 1974, 87:208-214.
4. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. Л.:1969:423.
5. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина:1990:384.
6. Структурные основы адаптации и компенсаторных нарушенных функций. АМН СССР. Под ред. Д.С.Саркисова. М.: Медицина:1987: 448.

### **References**

1. Levickij A.P., Voskresenskij O.N., Makarenko O.A. Molekulyarnye mexanizmy lechebno-profilakticheskogo dejstvija bioflavonoidov. Visnik stomatologії.:2006, Specvipusk:16. (in Russian)

2. Proxonchukov A.A., Zhizhina N.K. Rukovodstvo po terapevticheskoj stomatologii. Medicina.:1967:572. (in Russian)
3. Desiderato O., MacKinnon J., Hissom H. Development of gastric ulcers in rats following stress termination. J Comp. Physiol. Psychol.: 1974, 87:208-214.
4. Merkulov G.A. Kurs patologicheskoy tekhniki. L.:1969:423. (in Russian)
5. Avtandilov G.G. Medicinskaya morfometriya. Rukovodstvo. M.: Medicina:1990:384. (in Russian)
6. Strukturnye osnovy adaptacii i kompensatornyx narushennyx funkciy. AMN SSSR. Pod red. D.S.Sarkisova. M.: Medicina:1987: 448. (in Russian)