

И. Н. Моисеев, *д-р мед. наук, проф.*,  
О. Н. Воскресенский, *д-р мед. наук, проф.*,  
Е. К. Ткаченко, *канд. биол. наук*,  
О. И. Скиба, *канд. биол. наук*,  
Ю. В. Калабин,  
Д. М. Пыхтеев\*

## ИНДУКЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ДЕЛАГИЛОМ И ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВЫМ СТРЕССОМ И ТОРМОЖЕНИЕ ИХ СОЧЕТАНИЕМ ЭЛЛАГОВОЙ И ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТ

Государственное учреждение «Институт стоматологии АМН Украины», Одесса,  
\*Одесский государственный медицинский университет

В 2005 г. нами было установлено, что введение крысам генотропного токсиканта делагила (Chloroquine, 5 мг/кг, 60 дней) вызывает умеренные воспалительные изменения во всех слоях эпителия и очаговые эрозии в роговом слое слизистой оболочки ротовой полости. Эти изменения сопровождались резким возрастанием уровня митотической активности (с  $(1,5 \pm 0,2)$  до  $(3,7 \pm 0,3)$  %,  $P < 0,001$ ) [1]. Комбинированное воздействие делагила и эмоционально-болевого стресса в условиях алиментарной недостаточности полифенолов значительно усиливало воспалительно-деструктивные изменения в тканях, заместительное введение полифенолов, в частности кверцетина, проявляло защитный эффект [1; 2].

В работе S. Weber и S. Levits установлено, что делагил тормозит экспрессию генов TNS- $\alpha$  человека, индуцируемую бактериальными липополисахаридами [3]. Эти данные позволяют предположить, что индукция делагилом умеренных воспалительных изменений в эпителии связана со снижением продукции липополисахаридов, обеспечивающих довоспалительную защиту оральных тканей при локальной микробной инвазии.

В настоящей работе поставлены задачи раскрытия механизмов индукции вызываемых делагилом воспалительных изменений в оральной эпителии и протективной роли фитоадаптогена эллаговой кислоты при комбинированном воздействии этого токсиканта и эмоционально-болевого стресса (ЭБС).

### Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 23 белых крысах линии Вистар стадного разведения 1,5-месячного возраста: 1-я группа крыс (интактные) содержалась на стандартном рационе вивария; 2-я (контрольная) получала бесполифенольную диету (БПФД) [1]. Длительность опыта составила 60 дней. Спустя 30 дней после перевода на диету крысы этой группы подвергались комбинированному воздействию делагила (Алкалоида, Венгрия) в дозе 5 мг/кг массы тела крыс *per os* и стрессу тревожного ожидания, определяемому как ЭБС. Случайная подача постоянного тока силой 5–6 мА на пол клетки конструкции Дезидерато [4] либо на находящуюся на нем платформу воспроизводила состояние тревожного ожидания болевого воздействия. Такая ситуация воссоздавалась на протяжении

4 ч 3 раза в неделю в течение второго месяца содержания крыс на БПФД. Таким образом, контрольная группа подвергалась комбинированному патогенному воздействию (БПФД + делагил + ЭБС). Защитные эффекты элаготанина (альтана) изучали в этих экспериментальных условиях — в 3-й группе. Для этого крысам спустя месяц после начала перевода их на БПФД ежедневно, на протяжении 30 дней, перорально вводили алтан (комплекс эллаговой и галловой кислот) в дозе 1 мг/кг массы тела крыс. По завершении эксперимента животных выводили из опыта под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), выделяли слизистую оболочку щеки, фиксировали по Карнуа, заключали в парафин и готовили срезы толщиной 6 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону [5].

Нуклеиновые кислоты (НК) выявляли гистохимически — окраской по Эйнарсону [6]. Количественное определение содержания НК в цитоплазме клеток многослойного эпителия слизистой оболочки проводилось с помощью фотометрической системы «Видеостат-Мастер», сопряженной с микроскопом «LEICA-DMLS». Измерения осуществляли в программ-

ном пакете «Видеотест-Морфология» с внутренним калибратором оптической плотности. Обработку полученных результатов проводили с использованием программного пакета статистического анализа «Статистика-6». Кариометрию и итеркариометрию эпителиоцитов (вычисление среднего межъядерного расстояния), учет величины эрозий эпителиального слоя и стереометрическое определение диаметров зон перикапиллярной диффузии осуществляли с помощью методов, описанных нами ранее [7].

### Результаты исследования и их обсуждение

Слизистая оболочка полости рта интактной группы крыс имела обычное строение. Многослойный плоский эпителий в ней состоял из базального, шиповатого и рогового слоев клеток. Собственная пластинка и подслизистая основа были представлены волокнистой соединительной тканью.

У крыс контрольной группы патоморфологические изменения были подробно описаны в опубликованной ранее работе [1]. В обобщенном виде они характеризовались следующим. В подэпителиальной соединительной ткани были выражены отежность волокон и основного вещества, набухание клеток и отек структур стенки кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (МЦР), утолщение стенки капилляров и артериол и сужение их просвета. В эпителии происходило набухание клеток, образование перипеллюлярных отеков, очагов гидропической дистрофии и деструкции эпителиоцитов, а также формирование пузырьков на границе с роговым слоем. В результате возникали локальные отслойки рогового слоя, расслоение последнего и образование эрозий. Наблюдалось разрастание эпителия шиповатого слоя (акантоз) и глубокое проникновение сосочков

собственной пластинки в эпителий — очаги папилломатоза. Компенсаторно-восстановительные реакции характеризовались увеличением количества двуядерных эпителиоцитов — одним из признаков компенсаторной гипертрофии.

В группе крыс, получавших альта, в собственной пластинке и в подслизистом слое слизистой оболочки полости рта (СОПР) отмечалось уменьшение воспалительно-деструктивных изменений, сопровождавшихся дегидратацией волокон и аморфного компонента соединительной ткани и признаками нормализации структуры стенки сосудов МЦР. У крыс исследуемой группы в сравнении с контрольной группой диаметр капилляров увеличился на 18 %, а объемная доля или плотность упаковки капилляров — на 31 % (табл. 1). В результате сдвига названных параметров диаметр зоны перикапиллярной диффузии (ЗПД) оказался на 13 % меньше такового у крыс контрольной группы и на 12 % больше, чем в интактной группе животных.

Теоретически зоны перикапиллярной диффузии можно представить в виде цилиндра, состоящего из соединительной ткани, осью которого является капилляр. Изменения  $D_{ЗПД}$  свидетельствуют о расширении или сужении зоны метаболического обеспечения ткани в расчете на 1 капилляр. У крыс контрольной группы как результат тканевого отека наблюдалось уменьшение плотности упаковки ка-

пилляров и увеличение диаметра зоны перикапиллярной диффузии. Действие альта за счет дегидратации ткани автоматически привело к увеличению плотности упаковки капилляров, сокращению зоны метаболического обеспечения и улучшению трофики. Важно помнить, что метод определения ЗПД не отражает сути прижизненных метаболических взаимоотношений между капиллярами и соответствующими участками тканей, но позволяет создать теоретическую модель взаимосвязи в этой системе по их объемным соотношениям [8]. Позитивное влияние альта на трофические процессы осуществлялось также за счет нормализации структурно-функциональных свойств стенок капилляров.

Многослойный эпителий СОПР характеризовался большей однородностью по высоте, которая нарушалась при комбинированном воздействии патогенных факторов. При введении альта эти нарушения существенно уменьшились. Коэффициент эрозии эпителия составил 49 % от уровня такового контрольной группы крыс (табл. 2). Гидропические и деструктивные изменения нивелировались и приобрели мелкоочаговый характер. Акантотические разрастания шиповатого слоя заметно увеличились при существенном уменьшении количества папилломатозных структур (рис. 1 и 2).

В результате карио- и итеркариометрии было установле-

Таблица 1

**Морфометрические показатели зоны перикапиллярной диффузии подэпителиальной соединительной ткани слизистой оболочки полости рта крыс**

Группа	Диаметр капилляров, мкм	Плотность упаковки капилляров, $V_{вк}$	Диаметр зоны перикапиллярной диффузии	
			мкм	в сравнении с контролем, %
Интактная	10,9	0,122	89	100
Контрольная	7,9	0,071	111	125
Альта	9,3	0,093	100	112

Таблица 2

**Морфометрические показатели эпителиоцитов  
слизистой оболочки полости рта крыс ( $M \pm m$ ;  $P$ ;  $P_1$ )**

Группа	Коэффициент эрозии эпителия, усл. ед.	Объем ядра эпителиоцитов, в логарифмах и мкм <sup>3</sup>	Коэффициент вариации ядерного объема, %	Митотический индекс, %	Количество двухъядерных клеток, %
Интактная	—	2,34±0,02 (220)	12	1,50±0,22	15,0±1,1
Контрольная	0,35±0,06	2,45±0,02 (332) P<0,01	8,6	0,70±0,17 P<0,01	25,0±1,4 P<0,01
Альтан	0,17±0,04 P<0,05	2,38±0,02 (240) P>0,05	9,7	0,90±0,17 P<0,05 P <sub>1</sub> >0,05	26,5±1,4 P<0,01 P <sub>1</sub> >0,05

*Примечание.* В табл. 2 и 3 показатель достоверности P рассчитан относительно интактной группы, P<sub>1</sub> — относительно контрольной группы.

но, что средние величины объемов ядра и размеров цитоплазмы (см. табл. 2 и 3) нормализовались и соответствовали величинам интактной группы. В то же время коэффициент вариации ( $C_V$ ) ядерного объема, который рассматривают в качестве показателя стабильности клеточной популяции [9; 10], оказался не только меньшим, чем у крыс интактной группы (см. табл. 2), но и перешел в разряд величин со слабым уровнем варьирования [11].

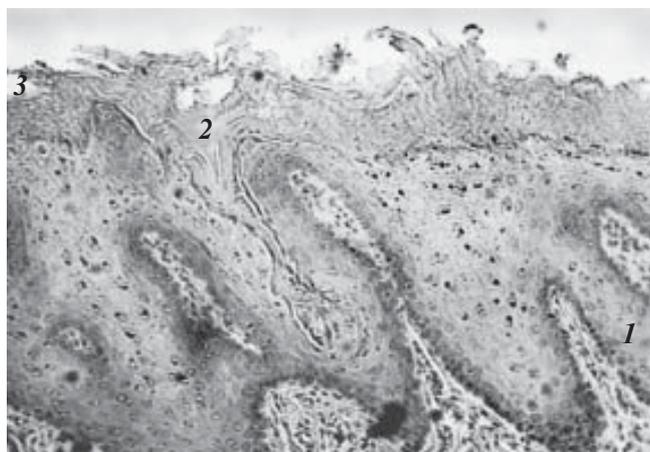
Суммируя результаты морфометрии клеток, можно заклю-

чить, что нарушения дифференцировки эпителиоцитов, обнаруженные в контрольной группе крыс, при введении альтана полностью не устраняются. К проявлениям названных нарушений относятся также акантоотические разрастания эпителия и папилломатозные структуры в нем.

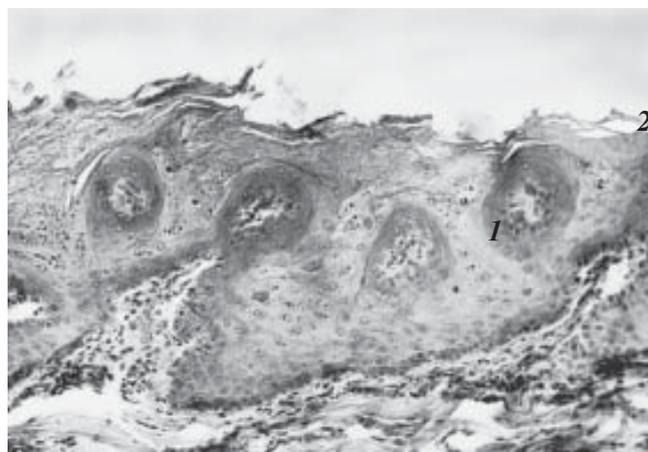
Фотометрия НК в цитоплазме эпителиоцитов у крыс, получавших альтан, показала уменьшение их содержания на 18 % относительно интактной группы, что с учетом одинаковых размеров цитоплазмы клеток

обеих групп крыс указывает на изменение их концентрации и, в первую очередь, количества РНК. Митохондриальная ДНК составляет незначительную часть суммарного количества нуклеиновых кислот. Направленность сдвигов содержания НК в цитоплазме эпителиоцитов сопоставляемых групп животных была подтверждена и результатами корреляционного анализа (выяснились связи между оптической плотностью НК и объемом клеточного ядра). У интактных крыс  $r = +0,86$ ,  $P < 0,01$ , у крыс, получавших альтан,  $r = +0,55$ ,  $P > 0,055$ , что свидетельствует об утрате значимой корреляционной связи у последних при ее наличии у животных интактной группы.

Уменьшение концентрации РНК при воспалительно-деструктивных изменениях в тканях СОПР — свидетельство первичной роли угнетения белкового синтеза в клетках эпителиального барьера. В контрольной группе крыс содержание НК в эпителиоцитах, относительно такового в интактной группе, напротив, увеличилось, но изменений концентрации последних не произошло, поскольку они сопряглись с увеличением размеров цитоплазмы клеток.



*Рис. 1.* Эпителий СОПР крыс, группа «БПФД + делагил + ЭБС + альтан»: 1 — акантоз (утолщение шиповатого слоя); 2 — образование пузырьков; 3 — расслоение рогового слоя эпителия. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×200



*Рис. 2.* Эпителий СОПР крыс, группа «БПФД + делагил + ЭБС»: 1 — папилломатоз (разрастание сосочкового слоя собственной пластинки); 2 — расслоение рогового слоя и образование эрозий. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×200

Таблица 3

Содержание нуклеиновых кислот в цитоплазме клеток и среднее межъядерное расстояние эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта крыс ( $M \pm m$ ; P;  $P_1$ )

Группа	Содержание НК, усл. ед. оптической плотности	Сравнение с контролем		Среднее межъядерное расстояние, в мкм	Сравнение с контролем	
		%	P		%	P
Интактная	6,0±0,1	100		23,90±1,15	100	
Контрольная	7,1±0,1	118	<0,001	27,83±1,08	116	<0,05
Альтан	4,94±0,10	82	<0,001	24,00±0,82	100	>0,05

Важной задачей настоящей работы было изучение особенностей действия альтана на течение компенсаторно-восстановительных реакций СОПР в условиях моделируемой патологии. Специфика восстановительных реакций СОПР крыс контрольной группы — уменьшение величины митотического индекса в 2 раза при увеличении количества гипертрофированных эпителиоцитов (двуядерных клеток) в 1,7 раза (см. табл. 2) — указывает на весомый вклад компенсаторной гипертрофии клеток в процессы репаративной регенерации многослойного эпителия СОПР [7].

В группе крыс, получавших альтан, при близких к приведенным показателям компенсаторных реакций (пролиферация — компенсаторная гипертрофия) обнаруживались выраженные позитивные сдвиги в эпителии: уменьшение количества эрозий и очагов деструкции и нормализация структуры клеток. Полученные результаты согласуются с данными литературы о действии альтана преимущественно на внутриклеточном уровне путем стабилизации мембран [12; 13] и гипертрофии внутриклеточных структур [14] — внутриклеточная регенерация по Д. С. Саркисову [15; 16].

Вместе с тем, считаем необходимым подчеркнуть, что компенсаторная гипертрофия клеток является существенным звеном в структуре репаративных изменений СОПР, возникающих при введении альтана.

В работе [1] показано, что в условиях диеты вивария делагил не вызывает существенных деструктивных изменений в СОПР. При этом наблюдается резкое повышение уровня митотического индекса — с  $1,5 \pm 0,2$  до  $3,4 \pm 2,7$ . Известно, что основной путь защиты орального эпителия представлен его симметричной и асимметричной регенерацией [17].

Установленное ведущее значение падения митозов при изученном комбинированном воздействии (см. табл. 2) и совокупность изложенных данных указывают на важнейшую роль в развитии начальных воспалительных и деструктивных изменений оральной слизистой — снижение его репаративного заместительного потенциала.

### Выводы

Обобщая изложенное, можно заключить, что альтан — эффективный корректор воспалительно-деструктивных изменений СОПР крыс с алиментарной недостаточностью полифенолов в условиях действия токсиканта делагила и стресса. Показано, что репаративная регенерация эпителия СОПР осуществляется на внутриклеточном уровне, сочетаясь с выраженной компенсаторной гипертрофией части эпителиальных клеток, восполняющих недостаточность их митотической пролиферации. Сдвиги содержания нуклеиновых кислот в эпителиальных клетках сигнализируют об ограниченных возможностях альтана поддер-

живать необходимый уровень репаративной регенерации СОПР в условиях длительного действия факторов моделируемой патологии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние хронического эмоционально-болевого стресса и прооксиданта делагила на состояние эпителия ротовой полости у крыс с недостаточностью полифенолов / О. Н. Воскресенский, Ю. В. Калабин, И. Н. Моисеев, Е. К. Ткаченко // Вісник стоматології. — 2005. — № 2. — С. 7-10.
2. Роль растительных полифенолов в формировании общей и местной резистентности к патогенным факторам у крыс / О. Н. Воскресенский, Е. К. Ткаченко, И. Н. Моисеев [и др.] // Вісник стоматології. — 2006. — С. 10-11. — (Рослинні поліфеноли та неспецифічна резистентність: матеріали симпоз., 4-5 жовтня 2006 р.).
3. Weber S. M. Chloroquine interferes with lipopolysaccharides induced TNF- $\alpha$  gene expression by a nonlysosomal mechanism / S. M. Weber, S. M. Levits // J. Immunol. — 2000. — Vol. 165. — P. 1536.
4. Desiderato O. Development of gastric ulcers in rats following stress termination / O. Desiderato, J. MacKinnon, H. Hissom // J. Comp. Physiol. Psychol. — 1974. — Vol. 87. — P. 208-214.
5. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники / Г. А. Меркулов. — Л., 1969. — 423 с.
6. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. — М.: ИЛ., 1962. — 962 с.
7. Морфологические нарушения слизистой полости рта крыс с алиментарной недостаточностью растительных полифенолов при комбинированном действии стресса и прооксиданта делагила / И. Н. Моисеев, О. Н. Воскресенский, Ю. В. Калабин [и др.] // Досягнення біології та медицини. — 2006. — № 2. — С. 52-56.
8. Автандилов Г. Г. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г. Г. Автандилов, Н. И. Яблучанский, Н. И. Губенко. — М.: Медицина, 1981. — 192 с.
9. Бородай Н. В. Содержание РНК в эпителиоцитах слизистой полости рта у больных пародонтитом / Н. В. Бородай, К. Н. Ганина, Т. Д. Центило // Цитология и генетика. — 1991. — № 4. — С. 13-16.
10. Цитологическая реактивность онкологического больного / под ред. К. П. Ганиной. — К.: Наук. думка, 1995. — 151 с.
11. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

12. Яковлева Л. В. Експериментальне вивчення кардіопротекторної активності альтану порівняно з кверцетином / Л. В. Яковлева, Е. І. Горбань, Т. С. Сахарова // Одеський медичний журнал. — 2002. — № 1. — С. 19-22.

13. Сопоставление антиоксидантных свойств новых препаратов, производных биофлавоноидов и дубильных веществ / Л. В. Яковлева, О. А. Герасимова, И. В. Карбушева [и др.] // Экс-

периментальная и клиническая фармакология. — 2001. — № 2. — С. 55-59.

14. Перспективы применения альтана в проктологии / Л. В. Яковлева, И. В. Карбушева, Н. Д. Бунятян [и др.] // Клінічна фармація. — 2000. — № 1. — С. 55-60.

15. Саркисов Д. С. Общая патология человека / Д. С. Саркисов, М. А. Пальцев, Н. К. Хитров. — М.: Медицина, 1997. — 608 с.

16. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций: руководство / под ред. Д. С. Саркисова. — М.: Медицина, 1987. — 352 с.

17. Köse O. Changes in the expression of stem cells matrix in oral lichen planus and hyperkeratosis / O. Köse, A. Lalle // J. Oral Sci. — 2007. — Vol. 49, N 2. — P. 133-139.

УДК (616.316+616-092-035.2):599.323.4

И. Н. Моисеев, О. Н. Воскресенский, Е. К. Ткаченко, О. И. Скиба, Ю. В. Калабин, Д. М. Пыхтеев

ИНДУКЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОРАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ДЕЛАГИЛОМ И ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВЫМ СТРЕССОМ И ТОРМОЖЕНИЕ ИХ СОЧЕТАНИЕМ ЭЛЛАГОВОЙ И ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТ

Исследовано корригирующее действие полифенольного препарата альтана на характер структурно-функциональных нарушений, возникающих в слизистой оболочке полости рта (СОПР) крыс при сочетанном действии прооксиданта делагила и эмоционально-болевого стресса в условиях недостаточности алиментарных растительных полифенолов. Показано защитное влияние препарата на структуры сосудов микроциркуляторного русла, подэпителиальной соединительной ткани и покровного эпителия СОПР. Установлено, что репаративные изменения, индуцированные альтаном, реализуются путем внутриклеточной регенерации в сочетании с выраженной компенсаторной гипертрофией части клеток эпителиального покрова.

**Ключевые слова:** алиментарная недостаточность полифенолов, делагил, эмоционально-болевого стресс, слизистая оболочка полости рта, пролиферация клеток, компенсаторная гипертрофия клеток, эпителиоциты.

UDC (616.316+616-092-035.2):599.323.4

I. N. Moiseyev, O. N. Voskresensky, Ye. K. Tkatchenko, O. I. Skiba, Yu. V. Kalabin, D. M. Pykhteyev

INDUCTION OF INFLAMMATORY-DESTRUCTIVE CHANGES IN THE ORAL EPITHELIUM BY DELAGIL, EMOTIONAL-PAINFUL STRESS AND THEIR INHIBITION BY COMBINATIUN OF THE ELLAGIC AND GALLIC ACIDS

It is investigated corrective action of a polyphenolic drug altan on character of the structurally functional changes arising in the tunica mucosa (TM) of rats' mouth during combined action of delagil and emotional-painful stress under conditions of insufficiency of alimentary plant polyphenols. Positive influence of drug on structures of vessels of the microcirculatory bloodstream, subepithelial connective tissue and integumentary epithelium of TM of mouth is shown. It is established, that reparative changes induced by altan are realized by endocellular regeneration in a combination with expressed compensatory hypertrophy of a part of epithelium integument cells.

**Key words:** alimentary insufficiency of polyphenols, delagil, emotional-painful stress, the tunica mucosa membrane of mouth, proliferation of cells, compensatory hypertrophy of cells, epithelial cells.

УДК 615.917:547.281.2

І. А. Кравченко, д-р біол. наук, проф.,

В. Б. Ларіонов, канд. біол. наук,

І. М. Радасва

## МЕТАБОЛІЗМ 3-ЛАУРОЇЛОКСИ-7-БРОМ-5-(О-ХЛОП)ФЕНІЛ-1,2-ДИГІДРО-3Н-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ *IN VITRO*

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Київ

### Вступ

Використання проліків у терапії різних захворювань має значні переваги, такі як зменшення розвитку побічних явищ і зміна концентраційного профілю активного метаболіту [1; 2]. Ефективним є застосування проліків у складі трансдермальних форм, тому що, володіючи оптималь-

ними фізико-хімічними властивостями, вони більш легко проникають крізь шкіру [3; 4]. Одним із перспективних підходів у створенні проліків для трансдермального застосування — це введення до структури біологічно-активних сполук залишку молекули підсилювачів трансдермального проникнення, зокрема, лауринової кислоти, що, як було показано раніше [5], є одним із найбільш