

УДК (616.31+615.015.35):599.323.7

С. А. Шнайдер, д. мед. н.Государственное учреждение «Институт стоматологии
Национальной академии медицинских наук Украины»**ВЛИЯНИЕ ЭПИТЕЛИОТРОПНОГО ГЕНОТОКСИКАНТА
НА СОСТОЯНИЕ ПАРОДОНТА И СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА КРЫС**

В опытах на 15 белых крысах-самцах 1-мес. возраста изучены механизмы системного и локального воздействия токсиканта ДДЕ – основного метаболита ДДТ – на состояние тканей ротовой полости. Пероральное введение токсиканта вызвало явления воспаления и усиление резорбтивных процессов в пародонте. По результатам цитоморфологических исследований в эпителиоцитах слизистой оболочки щеки выявлены проявления вакуолярной дистрофии; структурные изменения соединительной ткани; в хромосомах – асимметрия деления и увеличение количества патологических митозов.

Ключевые слова: токсикант, перекисное окисление липидов, воспаление, резорбция костной ткани, цитоморфологические исследования слизистой оболочки щеки.

С. А. ШнайдерДержавна установа «Інститут стоматології
Національної академії медичних наук України»**ВПЛИВ ЕПІТЕЛІОТРОПНОГО ГЕНОТОКСИКАНТУ
НА СТАН ПАРОДОНТУ ТА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНИНИ РОТА ЩУРІВ**

В досліджах на 15 білих щурах-самцях 1-міс. віку вивчені механізми системного та локального впливу токсиканту ДДЕ – основного метаболіту ДДТ – на стан тканин ротової порожнини. Пероральне введення токсиканту викликало явища запалення та посилення резорбтивних процесів в пародонті. За результатами цитоморфологічних досліджень в епітеліоцитах слизової оболонки щіки виявлені прояви вакуолярної дистрофії; структурні зміни сполучної тканини; в хромосомах – асиметрія поділення та зріст кількості патологічних митозів.

Ключові слова: токсикант, перекисне окислення ліпідів, запалення, резорбція кісткової тканини, цитоморфологічні дослідження слизової оболонки щіки.

S. A. SnaiderState Establishment “The Institute of Stomatology
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”**THE INFLUENCE OF EPITHELIOTROPIC GENOTOXIC AGENT
UPON THE STATE OF PERIODONTIUM AND ORAL MUCOUS MEMBRANE IN RATS**

At the experiments with 15 white he-rats of 1 month old the mechanisms of system and local influence of toxic agent DDE (2,2-Bis (7-chlorophenyl)-2 dichloroethylene) upon the state of oral tissues were studied.

Oral introduction of DDE within relatively short terms of the experiment (35 days) has caused inflammatory phenomena in blood serum and liver of animals (system). Under the influence of toxic agent the pathologic changes in oral tissues (local) – the phenomena of inflammation in gum; the partial inactivation of some preventive regulatory albumens; the intensification of absorptive processes and the disorders in mineral metabolism in osseous structures of periodontium were observed.

The confirmation of the toxic influence of DDE upon oral mucous membrane is the result of cytomorphologic studies: the display of vacuolar dystrophy in epithelium; the structural changes in conjunctive tissue of the proper mucous plate (edema, thickening of collagenic fibers) and its cellular contents (the appearance of migrated leucocytes from blood vessel).

One of the most pathogenic influences DDE had upon genetic apparatus of epithelial cells – mitotic index lowered considerably and, at the same time, the number of pathologic mitoses grew; skewness of fission was noticed in chromosomes.

Key words: toxic agent, lipids peroxide oxidation, inflammation, absorption of osseous tissue, cytomorphologic studies of cheek mucous membrane.

В последние десятилетия в окружающей среде существенно возросло содержание экотоксикантов, оказывающих патогенное влияние на

организм человека. К ним относятся полихлорированные ароматические углеводороды (ДДТ и др.).

Эпителий слизистой оболочки полости рта испытывает воздействия различных патогенных агентов, в т.ч. и токсических. В то же время одной из причин возникновения стоматологической патологии является недостаточный уровень резистентности тканей ротовой полости к неблагоприятным факторам внешней среды.

В основе патологических процессов в организме лежат нарушения функционирования мембран клеток: образование свободных радикалов, усиления процессов ПОЛ, активация циклооксигеназ – синтез простагландинов при воспалении [1] и др.

Цель настоящего исследования. Изучение влияния эпителиотропного генотоксиканта ДДЕ (2,2-Bis (7-chlorophenic) -2 dichloroethylene) – основного метаболита ДДТ – на состояние пародонта и слизистой оболочки полости рта крыс.

Материалы и методы. Опыты проведены на 15 белых крысах-самцах 1-мес. возраста. Все животные содержались на стандартном рационе вивария: 1-ая группа – интактная (7 крыс); во 2-ой группе крыс 8-ми крысам перорально вводили раствор ДДЕ (2,2-Bis (4-chlorophenyl)-2 dichloroethylene) фирмы Acros organics, USA. Его вводили per os в дозе 3,5 мг 5 раз в неделю в продолжении 35 дней.

По завершению экспериментов крыс выводили из опытов путем тотального кровопускания из сердца, проводимого под наркозом (тиопентал натрия 40 мг/кг). Предварительно отделив десну и слизистую оболочку щеки, вычленили верхние и нижние челюсти, выделяли печень.

Объектами биохимических исследований служили сыворотка крови, надосадочная жидкость гомогенатов печени и кости альвеолярного отростка (50 мг/мл), десны и слизистой оболочки щеки (25 мг/мл). Надосадочную жидкость получали путем центрифугирования в центрифуге РС-6 в течение 15 минут при 3000 об/мин при температуре +4°C.

Для оценки состояния печени при её токсическом поражении ДДЕ определяли биохимические показатели сыворотки крови унифицированными методами, используя коммерческие наборы реактивов: активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) методом Райтмана-Френкеля (сер. 03.10.08) и активность аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) методом Райтмана-Френкеля (сер. 03.10.08). В кости альвеолярного отростка определяли содержания кальция (сер. 16/200).

Уровень процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) тиобарбитуровым методом [2]. Состояние физиологической анти-

оксидантной системы (ФАС) оценивали по активности глутатион-пероксидазы (ГПО) [3], каталазы [4], супероксиддисмутазы (СОД) [5]. Активность кислой фосфатазы (КФ) определяли методом Bessay et. al в модификации А. П. Левицкого с соавт. [6].

После выведения животных из опыта у них иссекали фрагменты слизистой оболочки щеки. Кусочки слизистой иссекали, фиксировали в формалине и заключали в парафин. Срезы толщиной около 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также обрабатывали по Эйнарсону [7, 8]. Полученные препараты использовали для обзорных морфологических и морфометрических исследований.

Полученные в ходе исследования результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами с определением t-критериев достоверности различий по Стьюденту.

Результаты исследования. Под влиянием перорального введения ДДЕ на фоне полноценного рациона вивария в сыворотке крови крыс достоверно (в 1,2 раза) увеличивалась активность АсАТ: $1,41 \pm 0,084$ мккат/л против $1,22 \pm 0,040$ мккат/л в интактной группе ($p=0,05$), что свидетельствовало о патогенном влиянии токсиканта на функциональную активность печени крыс. Активность АлАТ ($0,043 \pm 0,00022$ мккат/л) находилась на уровне данных интактной группы ($0,042 \pm 0,00063$ мккат/л).

Под действием ДДЕ в десне крыс активность кислой фосфатазы увеличивалась в 3,7 раза: $5,50 \pm 2,08$ нмоль/с*г против $1,50 \pm 0,67$ нмоль/с*г в интактной группе ($p=0,09$), что говорит об усилении воспалительных явлений в данном объекте исследования.

В кости альвеолярного отростка активность кислой фосфатазы увеличивалась в 1,7 раза ($p=0,06$): $1,50 \pm 0,28$ нмоль/с*г против $1,87 \pm 0,17$ нмоль/с*г, что свидетельствует об усилении катболических процессов в костной ткани пародонта под влиянием токсиканта. Известно, что кислая фосфатаза – маркерный фермент действия остеокластов в костной ткани, в результате активации которых усиливается остеорезорбция.

Подтверждением полученного факта являются результаты усиления резорбции костной ткани пародонта под влиянием токсиканта. Так, исследование показали, что резорбция кости альвеолярного отростка верхней челюсти крыс усилилась на 22,5 % (от 100 % в интактной группе) и составила: $25,0 \pm 1,56$ % против $20,4 \pm 0,69$ % в интактной группе ($p=0,02$). Резорбция кости альвеолярного отростка нижней челюсти составила: $32,1 \pm 0,82$ % против $29,1 \pm 0,68$ % ($p=0,016$). Таким образом, усиления резорбции на нижней челюсти

составило 10,3 %.

В кости альвеолярного отростка экспериментальных животных под влиянием ДДЕ значительно снижалось (в 1,6 раза) содержание кальция: $3,98 \pm 1,59$ мг/дл против $6,53 \pm 0,86$ мг/дл в интактной группе ($p=0,03$).

Определенный вклад в повреждение лизосом и освобождение лизосомальных ферментов вносят процессы свободнорадикального окисления, т.к. известно, что лизосомы, накапливая продукты ПОЛ, сами повреждаются, высвобождая ферменты и вызывая разрушение и гибель субклеточных структур. Так, в кости альвеолярного отростка содержание МДА увеличивалось в 1,3 раза: $7,35 \pm 0,53$ мкмоль/г против $5,65 \pm 0,85$ мкмоль/г в интактной группе ($p=0,10$). В сыворотке крови крыс под действием токсиканта содержание МДА увеличивалось в 1,2 раза (тенденция; $p=0,11$): $2,30 \pm 0,21$ мкмоль/мл против

$1,90 \pm 0,12$ мкмоль/мл. В десне и слизистой оболочке щеки этот показатель достоверно не изменялся.

Пероральное введение ДДЕ снижало активность ряда антиоксидантных ферментов (табл. 1). Так, активность глутатион-пероксидазы в слизистой оболочке щеки и кости альвеолярного отростка снижалась на 42,9 % и 12,8 %, соответственно. Значительное снижение активности каталазы под действием токсиканта выявлено в слизистой оболочке щеки (на 45,7 %; $p=0,016$). Активность СОД в кости альвеолярного отростка снижалась в 6,7 раза ($p<0,001$; табл.). Увеличение активности каталазы в кости альвеолярного отростка (табл. 1), носило, по-видимому, индуктивный характер, вследствие усиления в данном объекте исследования перекисных процессов.

Таблица

Влияние токсиканта ДДЕ на активность антиоксидантных ферментов в слизистой оболочке щеки и кости альвеолярного отростка крыс ($M \pm m$; p)

| Группы животных | Активность ферментов | | |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | каталаза, мккат/г | СОД, у.е. | ГПО, мккат/г |
| слизистая оболочка щеки | | | |
| Интактная | $42,0 \pm 5,26$ | $1,083 \pm 0,87$ | $96,0 \pm 0,87$ |
| ДДЕ | $22,8 \pm 3,99$ $p=0,016$ | $0,76 \pm 0,38$ | $54,8 \pm 6,35$ $p<0,001$ |
| кость альвеолярного отростка | | | |
| Интактная | $9,66 \pm 2,20$ | $1,88 \pm 0,18$ | $89,3 \pm 3,51$ |
| ДДЕ | $17,01 \pm 2,55$ $p=0,05$ | $0,28 \pm 0,12$ $p<0,001$ | $77,9 \pm 2,11$ $p=0,02$ |

Примечание: в табл. показатель достоверности p рассчитан по сравнению с интактной группой.

В слизистой оболочке щеки крыс, которым вводили токсикант, были выявлены цитоморфологические изменения. Так, наблюдалась неоднородность структуры эпителия в разных его участках. Чаще встречались участки расслоения и частичного отсутствия рогового слоя. Глубина эрозии эпителия варьировалась в разных местах. На этом фоне естественным выглядел рост значения коэффициента эрозии эпителия под действием токсиканта. Соотношение поврежденного эпителия к исследованному (в усл. ед.) увеличилось в 4,5 раза: $0,27 \pm 0,05$ усл.ед. против $0,06 \pm 0,01$ усл. ед. ($p=0,009$) в интактной группе.

В базальном слое структурные компоненты клеточных ядер и цитоплазмы выглядели несколько размытыми и более полиморфными, чем в интактной группе. Часть клеток базального слоя имели набухшие ядра и признаки начальной дистрофии в цитоплазме. В шиповатом слое клетки выглядели измененными. Ядра клеток были увеличены, внутренняя картина ядра выглядела размытой. Встречались участки, где

клетки были несколько раздвинуты, вероятно, за счет перицеллюлярного отека. Эти морфологические изменения позволяют констатировать появление в эпителии ярких проявлений вакуолярной дистрофии, как результат повреждающего действия препарата ДДЕ.

В эпителии зона клеточного слоя существенно не изменялась по сравнению с интактной группой: $41,2 \pm 1,6$ % против $39,3 \pm 1,4$ %. В то же время зона рогового слоя значительно уменьшалась (в 1,3 раза): $13,2 \pm 1,1$ % против $17,6 \pm 0,8$ % ($p=0,02$) в интактной группе.

Митотический индекс под действием токсиканта снизился в 1,6 раза: $1,1 \pm 0,02$ % против $1,8 \pm 0,03$ % ($p<0,001$). Возросло количество патологических митозов. Они характеризовались асимметрией деления и отставанием хромосом.

Соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки выявлялась отечной, коллагеновые волокна были утолщены. Кроме клеточных элементов самой соединительной ткани часто встречались мигрировавшие из кровенос-

ного русла лейкоциты, что можно рассматривать как проявления воспалительной реакции.

Заключение. Пероральное введение ДДЕ в относительно непродолжительные сроки эксперимента (35 дней) вызвало воспалительные явления в сыворотке крови и печени животных (системно). Под действием токсиканта наблюдались патологические изменения в тканях ротовой полости (локально) – явления воспаления в десне; частичная инактивация ряда защитных регуляторных белков; усиление резорбтивных процессов и нарушение минерального обмена в костных структурах пародонта.

Подтверждением токсического влияния ДДЕ на слизистую оболочку полости рта явились результаты цитоморфологических исследований: в эпителии – проявления вакуолярной дистрофии; структурные изменения соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки (отечность, утолщение коллагеновых волокон) и ее клеточного состава (появление из кровеносного русла мигрировавших лейкоцитов).

Одно из наиболее патогенных воздействий оказал ДДЕ на генетический аппарат эпителиоцитов – значительно снизился митотический индекс и, в то же время, возросло количество патологических митозов; в хромосомах наблюдалась асимметрия деления.

Список литературы

1. **Tzeng S. H.** Inhibitor of platelet aggregation by some flavonoids. / S.H.Tzeng, W.C. Ko, C.M.Teng // *Thromb. Res.* – 1991. – Oct. 1. – P. 91-100.
2. **Стальная И. Д.** Метод определения диеновых конъюгаций ненасыщенных высших жирных кислот / И. Стальная, Т. Гаришвили // *Современные методы биохимии* / Под ред. В. Н. Ореховича. – М. – 1977. – С.63-64.
3. **Пахомова В. А.** Способ определения активности глутатион-пероксидазы в биологических тканях / В. Пахомова, Н. Козлянина, Г. Крюкова // Патент А.С.922637 СССР. МКИ 01 33/48.– Оpubл. 25.04.82, Бюл. № 15. – 2 с.
4. **Королюк М. А.** Метод определения активности каталазы / М. Королюк., Д. Иванова, И. Майорова // *Лабораторное дело.* – 1988. – № 1. – С. 16-18.
5. **Чевари С.** Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й.Секей // *Лаб. дело.* – 1985. – №11. – С. 678-681.
6. **Левицкий А. П.** Сравнительная оценка трёх методов определения активности фосфатаз слюны человека / А. П. Левицкий, А. И. Марченко, Т. Л. Рыбак // *Лабораторное дело.* – 1972. – №10. – С. 624-625.
7. **Меркулов Г. А.** Курс патологической техники / Г.А. Меркулов. – Л., 1969. – 423 с.
8. **Пирс Э.** Гистохимия / Э. Пирс – М.: ИЛ., 1962. – 962 с.

Поступила 12.05.14

