

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.311-002:612.08

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-1-71-81>

Поступила в редакцию 18.10.2022

Received 18.10.2022

Н. А. Карпук¹, С. П. Рубникович², М. Н. Медведев¹¹*Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Республика Беларусь*²*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

Аннотация. Предопухолевые заболевания слизистой оболочки ротовой полости (СОРП) являются актуальной проблемой общественного здравоохранения.

Целью исследования являлась разработка способа экспериментального моделирования предопухолевых поражений СОРП путем сочетанного местного воздействия на слизистую оболочку (СО) канцерогеном и механической травмой.

Исследования проводились на 210 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г. Животные были случайным образом разделены на 3 группы по 7 подгрупп, в каждой из которых было по 10 особей. Крысы первой группы употребляли в качестве единственного источника питьевой воды раствор 4-НХО (канцероген) в концентрации 50 мг/мл. Животным второй группы наносили аналогичный канцероген на СО нижней губы и языка 3 раза в день (в 9.00, 14.00 и 19.00) в сочетании с воздействием 3D-устройства с травмирующим элементом.

В результате выполнения работы разработан способ экспериментального моделирования предопухолевых поражений СОРП, заключающийся в сочетанном местном воздействии канцерогеном и 3D-устройством с травмирующим элементом на СО нижней губы крысы. Способ имеет следующие преимущества перед существующими моделями: развитие гиперплазии и дисплазии эпителия СО нижней губы достигается через 12 недель у 100 % животных, а в группе сравнения – у 20 % крыс ($p < 0,05$); отсутствие поражения канцерогеном других органов ЖКТ, на что указывает отсутствие снижения прироста живой массы тела до развития требуемых от экспериментальной модели изменений СОРП ($p < 0,05$); визуально доступная локализация на СО нижней губы патологических изменений эпителия (в группе сравнения – на корне языка).

Полученные результаты продемонстрировали в динамике гистопатологические изменения в слизистой оболочке – от нормального эпителия до гиперплазии, гиперкератоза и дисплазии разной степени тяжести, что характерно для предопухолевых поражений СОРП.

Ключевые слова: экспериментальная модель, предопухолевые поражения, слизистая оболочка ротовой полости, канцероген

Для цитирования: Карпук, Н. А. Экспериментальная модель предопухолевых поражений слизистой оболочки ротовой полости / Н. А. Карпук, С. П. Рубникович, М. Н. Медведев // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 1. – С. 71–81. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-1-71-81>

Natalia A. Karpuk¹, Sergey P. Rubnikovich², Mikhail N. Medvedev¹¹*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus*²*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

EXPERIMENTAL MODEL OF PRECANCEROUS LESIONS OF THE ORAL MUCOSA

Abstract. Oral mucosal cancer (OMC) is a serious public health problem. Studies were performed on 210 males of white mongrel rats weighing 180–200 g. The animals were randomly divided into 3 groups of 7 subgroups, with 10 rats in each group. The rats of the first group were included in the diet by dissolving a solution 4-NQO (carcinogen) in drinking water at a concentration of 50 mg/ml. The animals of the second group were applied by carcinogen dissolved in drinking water at a concentration of 50 mg/ml to the OMC of the lower lip and the tongue three times a day (at 9:00, 2:00, and 7:00 pm) in combination with exposure to a 3D device with a traumatic element.

The method of experimental modeling of pre-tumor lesions of the oral mucosa was developed. It included a combined local exposure to the solution 4-NQO and the 3D device with a traumatic element on the rat lower lip OMC. It has the following advantages over the existing models: the development of hyperplasia and dysplasia of lower lip OMC epithelium is achieved after 12 weeks in 100 % of animals, and in the comparison group – in 20 % of rats ($p < 0.05$); no carcinogen affection of other gastrointestinal organs, as indicated by no reduction of live body weight gain before the development of OMC changes required from the experimental model ($p < 0.05$); visually accessible localization of pathological epithelial changes on the lower lip OMC, and in the comparison group on the tongue root.

Keywords: experimental model, precancerous lesions, oral mucosa, carcinogen

For citation: Karpuk N. A., Rubnikovich S. P., Medvedev M. N. Experimental model of precancerous lesions of the oral mucosa. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 1, pp. 71–81 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-1-71-81>

Введение. Рак слизистой оболочки ротовой полости (СОРП) является значимой проблемой общественного здравоохранения, при этом уровень заболеваемости СОРП имеет выраженную тенденцию к росту. Множество сложностей и затрат, связанных с клиническими испытаниями методов лечения предопухолевых заболеваний СОРП (ПЗСОРП), подчеркивают важность доклинических исследований для обоснования использования новых методов лечения [1].

На протяжении последних десятилетий для моделирования местного воздействия канцерогена на СОРП применяют 4-нитрохинолин-1-оксид (4-НХО). Показано, что употребление мышами в качестве источника питьевой воды раствора 4-НХО приводит к развитию дисплазии эпителия и рака СОРП [2, 3]. Недостатком данной модели является то, что употребление мышами в качестве источника питьевой воды раствора 4-НХО вызывает параллельно образование опухолей в ЖКТ (малых слюнных железах, слизистой оболочке пищевода, желудка) [4, 5], что приводит к гибели животных до завершения моделирования экспериментальной патологии.

Патологические изменения эпителия наблюдаются также на дорсальной поверхности языка крыс, что затрудняет цитологическое исследование динамики развития патологии и апробацию методов лечения.

Известно, что предрак и рак СОРП у пациентов быстрее развиваются на фоне сочетания хронического травматического повреждения слизистой оболочки (прикусывание щек, губ и языка либо травма острыми краями зубов) и местного воздействия канцерогена (курение, алкоголь, насвай) [6].

Существуют различные экспериментальные модели острой травмы СОРП [7–9]. Хроническую травму моделируют путем фиксации в предварительно отпрепарированные круглым алмазным бором горизонтальные борозды нижних резцов крысы, на 5 мм ниже от режущего края, конструкции из толстой металлической проволоки длиной 10 мм, согнутой 3 раза под углами 50, 30 и 25°, на композиционный цемент с использованием лигатурной проволоки [10]. Однако данный способ имеет ряд недостатков: по причине погрешности из-за ручного изготовления конструкции из проволоки возможны различия в результатах экспериментального моделирования; изготовление и фиксация конструкции из проволоки – длительная и трудоемкая процедура, требующая выпиливания бороздок в зубах (дополнительная травма) и соответствующего навыка, что затрудняет воспроизведение экспериментальной модели другими исследователями.

В этой связи возникает необходимость разработки экспериментальной модели ПЗСОРП путем сочетанного местного воздействия на СОРП канцерогеном и механической травмой с целью последующей разработки и апробации способов лечения данной патологии.

Цель исследования – разработать метод экспериментального моделирования предопухолевых заболеваний слизистой оболочки ротовой полости путем сочетанного местного воздействия на слизистую оболочку канцерогеном и механической травмой.

Объекты и методы исследования. Исследования проводили на 210 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г (возраст 6–7 мес.), которые в течение 2 недель до начала эксперимента проходили карантин. Животные содержались в виварии НИЛ ВГМУ (по 4 крысы в клетке) в поликарбонатных клетках размером 20×30×40 см, покрытых стальными решетчатыми крышками, с углублением для корма. Манипуляции с животными осуществляли в соответствии с рекомендациями по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [11–14]. В исследование были включены подвижные, с чистым гладким шерстяным покровом здоровые крысы.

Животные были случайным образом разделены на 3 группы по 7 подгрупп, в каждой из которых было по 10 крыс. Животные первой группы употребляли в качестве единственного источника питьевой воды раствор 4-НХО (канцероген) в концентрации 50 мг/мл. Животным второй группы наносили аналогичный канцероген на слизистую оболочку (СО) нижней губы и языка

3 раза в день (в 9.00, 14.00 и 19.00) в сочетании с воздействием 3D-устройства с травмирующим элементом (табл. 1).

Индивидуальная идентификация животных проводилась путем окраски различных участков шерстяного покрова спиртовым раствором пикриновой кислоты.

Т а б л и ц а 1. Характеристика модели экспериментального исследования ($n = 210$)

Table 1. Characteristics of the experimental research model ($n = 210$)

Группа животных	Способ воздействия
1-я опытная (4-НХО, $n = 70$)	Употребление животным в качестве единственного источника питьевой воды раствора 4-НХО
2-я опытная (4-НХО + 3D, $n = 70$)	Аппликация ватным тампоном на СО языка и нижней губы раствора 4-НХО ежедневно в 9.00, 14.00 и 19.00 и постоянное воздействие 3D-устройством с травмирующим элементом на СО нижней губы и языка
Контрольная ($n = 70$)	Аппликация ватным тампоном на СО языка и нижней губы питьевой воды ежедневно в 9.00, 14.00 и 19.00

Приготовление канцерогена. Канцероген 4-НХО (Sigma Chemical) растворяли в 100 %-ном диметилсульфоксиде и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ без доступа света. Каждую неделю, перед началом выпаивания животных, готовили свежий раствор 4-НХО в питьевой воде в концентрации 50 мг/мл [2–6].

Выведение животных из эксперимента осуществлялось под эфирным наркозом путем декапитации. Сразу после вскрытия проводилось визуальное исследование ротовой полости крыс, измерение очагов патоморфологических изменений СО губ и языка, брались мазки для цитологического исследования. Затем головы грызунов погружали в 10 %-ный раствор формалина с фосфатным буфером. После фиксации изучаемые органы животных (нижнюю губу, язык) обезвоживали в автоматическом процессоре Microm STP-120 и уплотняли путем заливки в парафин при помощи аппарата ЕС-350. Далее на роторном микротоме Leica RM 2125 изготавливали срезы образцов ткани (толщиной 4–5 мкм) и окрашивали в аппарате Microm HMS-170 гематоксилин-эозином для микроскопического изучения по общепринятым методикам. Гистологические препараты органов и цитомазки исследовали на микроскопе Leica DM 2500 (окуляр с 10-кратным, объективы с 10-, 20-, 40- и 100-кратным увеличением), оснащенный цифровой камерой Leica DFC 320.

Результаты экспериментального моделирования оценивали путем определения процентного соотношения числа животных, имевших поражения СОП, к общему количеству крыс в группе.

Проводили гистологическое исследование [15–17] СОП через 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 недель от начала экспериментального воздействия.

Выраженность морфологических изменений оценивали в баллах по полуколичественной шкале: 0 – нет изменений, 1 – слабые изменения (гиперплазия, кератоз, дисплазия 1-й степени), 2 – умеренные изменения (дисплазия 2-й степени), 3 – выраженные изменения (дисплазия 3-й степени).

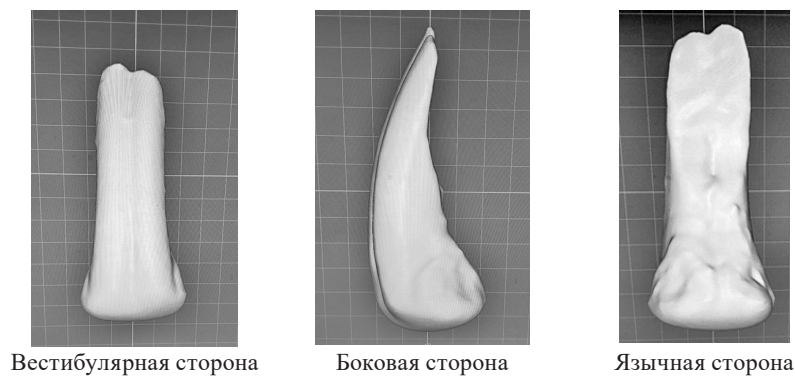
Каждую крысу классифицировали в соответствии с поражением самого высокого уровня, обнаруженным на СО языка и нижней губы.

Идентификация диспластических и опухолевых поражений контролировалась сотрудниками кафедры патологической анатомии ВГМУ.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные данные проверяли на соответствие распределению Гаусса. Для этого применяли количественный тест Shapiro–Wilk, строили квартильные графики, изучали гистограмму распределения изучаемого показателя. Данные обрабатывали с помощью критерия T -test и парного теста Wilcoxon Matched Pairs Test с указанием уровня достоверности расчета (p). Для сравнения качественных данных, которые можно представить в виде таблиц сопряженности 2×2 , применяли тест Fisher.

Процесс создания травмирующего 3D-устройства включал ряд этапов.

1. Изготовление 3D-устройства. Сканирование нижних резцов животного (крысы). Под внутривенным тиопенталовым наркозом получали 3D-изображение нижних центральных резцов крысы (рис. 1) с использованием интраорального сканера.



Вестибулярная сторона Боковая сторона Язычная сторона

Рис. 1. Скан нижних резцов крысы

Fig. 1. Scan of the rat lower incisors

Моделирование фиксирующей части 3D-устройства. С помощью специальной компьютерной программы моделировали конструкцию в виде центрального нижнего резца человека (программа не рассчитана на животных) с толщиной коронки 0,5 мм и сохраняли в виде stl-файла (рис. 2) для последующего изготовления.



Вестибулярная сторона Боковая сторона Вид изнутри

Рис. 2. Stl-файл фиксирующей части 3D-устройства

Fig. 2. Stl-file of the fixing part of the 3D device

Изготовление травмирующего элемента аддитивным методом. В нижней трети с вестибулярной стороны фиксирующей части 3D-устройства моделировали травмирующий элемент в виде 5 шипов с острыми краями длиной 1,5–2,5 мм (рис. 3) и печатали на 3D-принтере из стоматологического полимера (рис. 4).

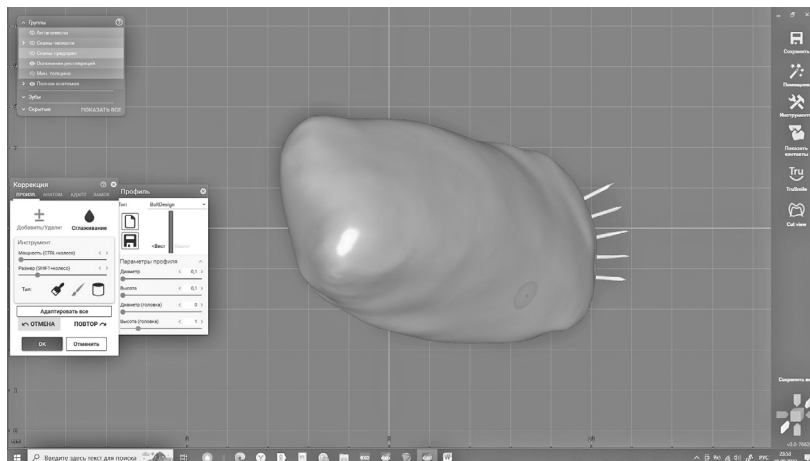
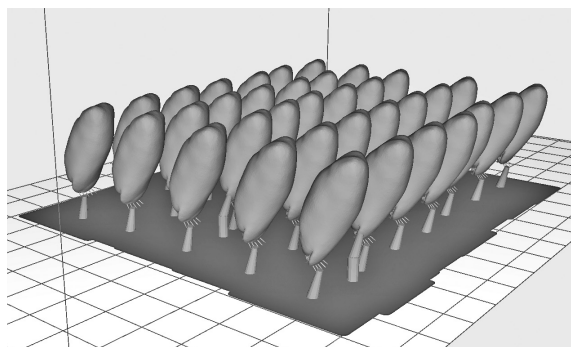


Рис. 3. Присоединение к stl-файлу удерживающего элемента объемной 3D-модели травмирующего элемента

Fig. 3. Attaching the 3D traumatic element model to the stl-file of the retaining element



3D-устройство в программе для 3D-печати



3D-устройство из полимера на резцах крысы

Рис. 4. 3D-печать устройства с травмирующим элементом

Fig. 4. 3D printing of the traumatic element device

2. Этапы экспериментального моделирования предопухолевых поражений слизистой оболочки рта с применением травмирующего 3D-устройства:

для обездвиживания грызунов (с целью создания оптимальных условий для фиксации 3D-устройства) крысам вводили внутривенно тиопенталовый наркоз;

стерильной марлевой салфеткой высушивали нижние резцы крысы;

3D-устройство фиксировали на композиционный цемент двойного отверждения, излишки композита удаляли гладилкой, после чего фотополимеризовали согласно инструкции производителя;

3D-устройство удаляли путем распиливания и заменяли на новое каждые 5 дней;

в течение 28 недель пораженный участок СОРП крысы 3 раза в день обрабатывали ватным тампоном, смоченным в водном растворе 4-НХО.

Результаты и их обсуждение. Через 12 недель от начала эксперимента у грызунов первой опытной группы, выпаиваемых 4-НХО, отмечались снижение по сравнению с контрольными животными прироста живой массы тела ($p < 0,05$), потускнение шерстяного покрова, беспокойство, агрессивное поведение с сохранением данной тенденции до 24-й недели (табл. 2). Данный факт можно объяснить постепенным развитием дисфункции органов желудочно-кишечного тракта в результате действия канцерогена, что подтверждалось результатами вскрытия.

Т а б л и ц а 2. Изменение показателей живой массы тела лабораторных животных в различные сроки исследования

Table 2. Changes in the indicators of live body weight of laboratory animals in different study periods

Время от начала экспериментального воздействия, недели	Группа животных					
	Контрольная		4-НХО		4-НХО + 3D	
	Масса тела, г	Прирост живой массы, г	Масса тела, г	Прирост живой массы, г	Масса тела, г	Прирост живой массы, г
0	183,4 ± 4,13	—	192,5 ± 7,63	—	190,8 ± 6,38	—
4	239,7 ± 6,18	37,2 ± 7,88	236,0 ± 6,20	36,8 ± 8,13	238,7 ± 6,82	37,8 ± 7,13
8	277,7 ± 6,45	44,8 ± 6,41	272,6 ± 5,64	38,0 ± 6,73	274,7 ± 7,45	43,0 ± 7,67
12	308,9 ± 5,65	34,6 ± 8,96	295,6 ± 5,43	23,2 ± 9,15*	308,4 ± 6,55	32,2 ± 8,35
16	346,4 ± 4,40	32,4 ± 4,14	317,6 ± 4,40	21,3 ± 8,12*	341,3 ± 5,40	33,1 ± 9,14
20	375,6 ± 5,04	35,7 ± 5,26	363,9 ± 3,25	17,4 ± 4,25*	368,6 ± 5,65	29,3 ± 5,12
24	392,0 ± 5,48	29,1 ± 7,54	377,7 ± 2,91	13,8 ± 1,32*	387,1 ± 6,38	25,1 ± 4,72
28	409,2 ± 5,61	33,5 ± 6,47	387,1 ± 3,90	9,4 ± 2,76*	401,3 ± 5,73	16,3 ± 3,51*

П р и м е ч а н и е. * – снижение прироста массы тела.

При осмотре ротовой полости крыс отмечалось, что слизистая оболочка на дорсальной части корня языка у 60 % животных первой опытной группы и у всех крыс второй опытной группы (местно 4-НХО и 3D-устройством) имела белый цвет и была покрыта беловато-перламутровыми

опалесцирующими пленками, иногда разделенными полосками на дольки. Почти у 40 % животных первой опытной группы и у всех крыс второй опытной группы на СО нижней губы наблюдались упругой консистенции очаги воспаления красного и белого цвета, возвышающиеся над поверхностью.

На 20–24-й неделе исследований у большинства животных, получавших раствор канцерогена системно, а также у животных, подвергнутых местной обработке 4-НХО и воздействию 3D-устройством, отмечались снижение аппетита, вялость, потускневшая и взъерошенная шерсть. При осмотре ротовой полости в области нижней губы у всех животных второй опытной группы и у 80 % крыс первой опытной группы обнаруживались различные по размеру и форме очаги белого или серого цвета с тусклой матовой шероховатой поверхностью.

К 28-й неделе у крыс второй опытной группы также отмечалось снижение прироста массы тела по сравнению с контрольными животными (табл. 2). Внешними признаками нарушения пищеварительной функции у грызунов являлись: снижение аппетита; вялость; тусклость и взъерошенность шерсти, запачканной вокруг анального отверстия фекальными массами. Аналогичная тенденция к снижению массы тела и прироста у подопытных животных, которым выпаивали раствор 4-НХО, по сравнению с контролем отмечалась и в работах других авторов [18–20].

Визуально на СОП в области нижней губы у всех животных обнаруживались различные по размеру и форме очаги белого или серого цвета с тусклой матовой шероховатой поверхностью, иногда с участками изъязвления или сосочковидными разрастаниями на эрозивной поверхности, выступающие над поверхностью слизистой. Аналогично 100 % крыс имели поражения слизистой оболочки языка: от небольших четко отграниченных плотных бело-серого цвета шероховатых участков, возвышающихся над поверхностью, до узловатых плотных разрастаний белого цвета с точечными изъязвлениями, кровоточащих при дотрагивании.

В эти же сроки у животных второй опытной группы также наблюдалось снижение прироста массы тела и нарушение пищеварительной функции. При осмотре СОП в области нижней губы у всех животных выявлялись очаги белого или серого цвета, выступающие над поверхностью слизистой.

Гистологические изменения СОП подопытных животных. В контрольной группе не наблюдалось гистопатологических изменений эпителия языка и нижней губы на протяжении всего периода наблюдений: слизистая оболочка внутренней поверхности нижней губы крыс снаружи была покрыта многослойным плоским эпителием, базальный слой которого был представлен столбчатой формы эпителиоцитами, расположенными в один ряд на непрерывной базальной мембране.

При гистологическом исследовании СОП крыс первой опытной группы, через 8 недель от начала эксперимента, изменений в эпителии нижней губы не обнаружено. Выявлены незначительные изменения клеток эпителия: у 20 % крыс отмечались гиперкератоз и гиперплазия клеток эпителия языка, имеющая достоверное отличие с исходным уровнем (табл. 3), а у одной крыс-

Т а б л и ц а 3. **Выраженность (баллы) гистопатологических изменений СОП нижней губы у крыс в зависимости от длительности экспериментального воздействия**

T a b l e 3. **Severity (scores) of histopathological changes in the rat lower lip oral mucosa depending on the experimental exposure duration**

Время от начала экспериментального воздействия, недели	4-НХО					4-НХО + 3D				
	0	1	2	3	Сумма баллов	0	1	2	3	Сумма баллов
4	10	–	–	–	–	10	–	–	–	–
8	10	–	–	–	–	8	2	–	–	1
12	8	2	–	–	2	–	9	1	–	11 ^{*,Ω}
16	7	2	1	–	4	–	7	3	–	13 ^{*,Ω}
20	4	3	2	–	7	–	5	4	1	16 ^{*,Ω}
24	3	2	2	1	9	–	3	5	2	19 ^{*,Ω}
28	–	3	2	2	13	–	1	5	4	23 ^{*,Ω}

П р и м е ч а н и е. * – тест Wilcoxon ($p < 0,05$ от исходного уровня и/или результатов предыдущего исследования); ^Ω – тест Fisher ($p < 0,05$ между исследуемыми группами).

сы – легкая дисплазия, а также незначительное расширение сосудов и инфильтрация полиморфными клетками подслизистой основы. Схожие результаты были получены S. Niwa, D. Kanojia с соавт. [21, 22].

У животных второй опытной группы через 8 недель после начала эксперимента гиперплазия эпителия нижней губы была выявлена у 20 % крыс, а также наблюдались незначительное расширение сосудов и полиморфноклеточная воспалительная инфильтрация в подслизистой (табл. 3).

На 12-й неделе выпаивания раствора 4-НХО у 50 % крыс отмечались следующие изменения эпителиального слоя слизистой оболочки языка: интенсивный гиперкератоз, акантолиз клеток шиповатого слоя, гиперплазия. Ядерный гиперхроматоз и полиморфизм клеток базального и шиповатого слоя, удлинение и расширение эпителиальных выростов в собственную пластинку (акантоз), что характерно для легкой и средней степени дисплазии, выявлены у 4 животных.

Гиперпластические изменения и гиперкератоз в эпителиальном слое слизистой оболочки нижней губы в данный период исследования наблюдались только у 20 % подопытных животных, а легкая степень дисплазии – у одного из них.

Таким образом, по сравнению с предыдущим сроком исследования не только увеличилось количество животных с поражением СОП, но и возросла тяжесть самих патологических процессов (только языка, но не нижней губы) (табл. 3).

Желаемые результаты экспериментального моделирования были достигнуты у всех животных второй опытной группы (4-НХО + 3D-устройство) через 12 недель после начала эксперимента. При гистологическом исследовании слизистой нижней губы отмечались выраженный гиперкератоз и гиперплазия, а также диспластические изменения легкой и средней степени (табл. 3, рис. 5).

На 16-й неделе у животных первой группы цитологические и архитектурные изменения в эпителии слизистой оболочки языка грызунов были более выражены и варьировались от легкой (у 2 животных) до тяжелой (у 1) гиперплазии клеток. Также наблюдались акантоз, беспорядочное расположение эпителиоцитов с потерей их полярности, наличие клеток с клеточным и ядерным полиморфизмом, увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением и ядерной гиперхромией, что указывает на усиление дисплазии (рис. 6).

По данным некоторых авторов, диспластические изменения эпителия языка у лабораторных крыс при выпаивании раствора 4-НХО наблюдались с 14–16-й недели эксперимента [4].

В то же время в слизистой оболочке нижней губы крыс вышеперечисленные процессы были менее заметны – у 4 животных наблюдалась только незначительная гиперплазия эпителия, из них у 3 – легкая и средней степени дисплазия (см. табл. 3).

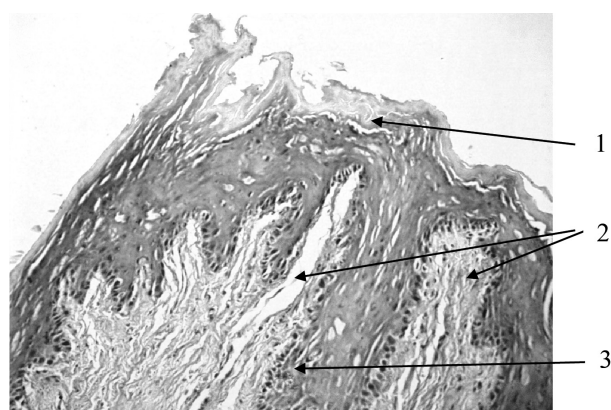


Рис. 5. Слизистая оболочка нижней губы крысы на 12-й неделе выпаивания раствора 4-НХО (1 – гиперкератоз, 2 – ядерная гиперхромия и полиморфизм эпителиоцитов, 3 – акантоз). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 5. Mucous membrane of the rat lower lip on the 12th week of soldering the solution 4-NQO (1 – hyperkeratosis, 2 – nuclear hyperchromia and epithelial cell polymorphism, 3 – acanthosis). Hematoxylin and eosin stained. $\times 200$

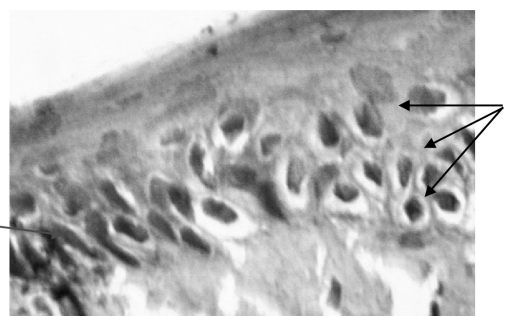


Рис. 6. Слизистая оболочка внутренней поверхности нижней губы крысы. Средняя степень дисплазии (1 – ядерный полиморфизм, 2 – гиперплазия базальных клеток). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 1000$

Fig. 6. Mucous membrane of the inner surface of the rat lower lip. Moderate degree of dysplasia (1 – nuclear polymorphism, 2 – basal cell hyperplasia). Hematoxylin and eosin stained. $\times 1000$

У крыс второй опытной группы (4-НХО + 3D-устройство) через 16 недель после начала эксперимента в слизистой оболочке нижней губы гиперпластические изменения были выражены менее значимо, а дисплазия была от легкой (у 7 крыс) до средней (у 3 крыс) степени выраженности (табл. 3).

Начиная с 20-й недели эксперимента нами обнаружено достоверное увеличение относительно предыдущего срока исследования гистопатологических изменений СОПП крыс первой опытной группы. Гиперплазия эпителия слизистой оболочки нижней губы была обнаружена у 60 % животных, языка – у 100 %. Диспластические изменения эпителиоцитов у грызунов были более выражены в слизистой оболочке языка (у 8 животных) – от легкой до тяжелой формы. В слизистой оболочке нижней губы крыс отмечалась слабая и/или умеренная дисплазия эпителия (табл. 3).

В эти же сроки у крыс второй опытной группы (4-НХО + 3D-устройство) наблюдалась выраженность гиперплазии и дисплазии эпителия слизистой оболочки нижней губы, которая продолжала нарастать.

Необходимо отметить, что к 20-й неделе в группе животных, выпаиваемых 4-НХО, погибла 1 крыса, к 24-й – 2, к 28-й – 3 крысы.

С 24-й недели у всех животных первой опытной группы определяли дисплазию эпителия языка разной степени, из них у 4 – выраженную. Эпителий слизистой оболочки нижней губы был поражен у 70 % грызунов, причем у одной крысы отмечали тяжелую дисплазию (табл. 3). Полученные нами данные согласуются с результатами исследований Choi с соавт., согласно которым уже к 22-й неделе выпаивания раствора 4-НХО у 15,6 % крыс развивается гиперпластические, у 40,6 % – диспластические изменения эпителия слизистой языка [18].

У крыс второй опытной группы с 24-й недели тяжелая дисплазия выявлена в двух случаях на слизистой нижней губы (табл. 3, рис. 7). В СО языка патологических изменений не выявлено.

В 28 недель степень тяжести дисплазии нарастала. Данные изменения характеризовались расширением базального слоя эпидермиса, хаотичностью расположения клеток с признаками атипии (гиперхромность и полиморфизм ядер, наличием кератиноцитов с аномальными фигурами митоза), потерей их полярности, наличием акантолиза, дискератоза, акантоза. В двух наблюдениях нельзя было исключить малигнизации (табл. 3).

При сравнении выраженности гистопатологических изменений у крыс за весь период воздействия на СОПП раствора 4-НХО с питьевой водой было установлено, что гиперплазия и дисплазия клеток эпителия СО языка развивались быстрее, чаще и были более выраженными, чем эпителия нижней губы. Вероятно, это обусловлено тем, что при выпаивании язык больше контактирует

с канцерогеном. В свою очередь, чаще гистопатологические изменения локализовались на корне языка, что из-за анатомического расположения затрудняет доступ к местному лечению и визуальной оценке его результатов.

Таким образом, сочетанное местное применение канцерогена и длительной механической травматизации 3D-устройством позволило снизить общетоксическое воздействие канцерогена и значительно уменьшить сроки развития у животных патологических изменений СОПП. Полученные результаты продемонстрировали в динамике гистопатологические изменения в слизистой оболочке – от нормального эпителия до гиперплазии, гиперкератоза и дисплазии разной степени тяжести, что характерно для предопухолевых поражений СОПП.

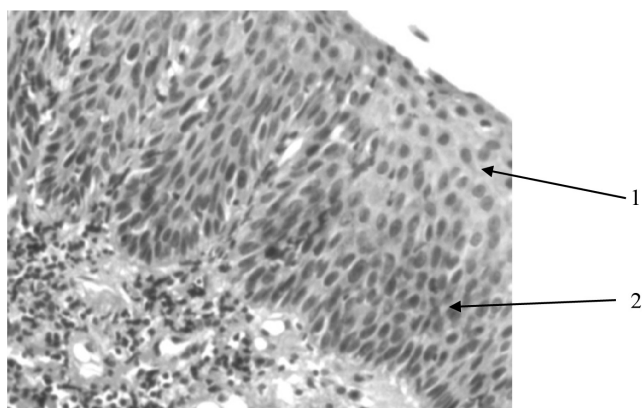


Рис. 7. Тяжелая дисплазия эпителия слизистой оболочки языка крысы на 24-й неделе применения раствора 4-НХО (1 – дискератоз, 2 – полиморфизм и гиперхромность ядер). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 7. Severe epithelium dysplasia of the mucous membrane of the rat tongue on the 24th week of application of the solution 4-HCO (1 – dyskeratosis, 2 – polymorphism and hyperchromatic nuclei). Hematoxylin and eosin stained. $\times 200$

Заклучение. Разработан способ экспериментального моделирования предопухолевых поражений СОРП, включающий сочетанное местное воздействия канцерогеном (раствор (50 мг/мл) 4-НХО) и 3D-устройством с травмирующим элементом на СО нижней губы крысы. Данный способ имеет следующие преимущества перед существующими моделями: развитие гиперплазии и дисплазии эпителия СО нижней губы достигается через 12 недель у 100 % животных, а в группе сравнения – у 20 % крыс ($p < 0,05$); отсутствие поражения канцерогеном других органов ЖКТ, на что указывает отсутствие снижения прироста живой массы тела до развития требуемых от экспериментальной модели изменений СОРП ($p < 0,05$); визуально доступная локализация на СО нижней губы патологических изменений эпителия, а в группе сравнения – на корне языка, что необходимо для доклинических исследований и обоснования использования новых методов лечения; возможность многократного воспроизведения 3D-устройства с травмирующим элементом с исходно заданными параметрами. Полученные результаты продемонстрировали в динамике гистопатологические изменения в слизистой оболочке – от нормального эпителия до гиперплазии, гиперкератоза и дисплазии разной степени тяжести, что характерно для предопухолевых поражений СОРП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Warnakulasuriya, S. Oral cancer screening: past, present, and future / S. Warnakulasuriya, A. R. Kerr // *J. Dent. Res.* – 2021. – Vol. 100, N 12. – P. 1313–1320. <https://doi.org/10.1177/00220345211014795>
2. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water / M. Ohne [et al.] // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* – 1985. – Vol. 59, N 6. – P. 600–607. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(85\)90189-6](https://doi.org/10.1016/0030-4220(85)90189-6)
3. Comparison of integrated genotoxicity endpoints in rats after acute and subchronic oral doses of 4-nitroquinoline-1-oxide / D. J. Roberts [et al.] // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2016. – Vol. 57, N 1. – P. 17–27. <https://doi.org/10.1002/em.21981>
4. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis / M. Vered [et al.] // *Oral Oncol.* – 2003. – Vol. 39, N 5. – P. 491–496. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(03\)00011-3](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(03)00011-3)
5. Иммуногистохимическая оценка изменений в тканях пародонта у экспериментальных животных с остеопорозом костного скелета / С. В. Сирак [и др.] // *Мед. вестн. Север. Кавказа.* – 2019. – Т. 14, № 4. – С. 681–685.
6. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer / M. Hahn [et al.] // *Oral Oncol.* – 2002. – Vol. 38, N 5. – P. 486–490. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(01\)00086-0](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(01)00086-0)
7. Способ моделирования экспериментального язвенного поражения слизистой оболочки рта : пат. ВУ 21020 / И. С. Кармалькова [и др.]. – Оpubл. 30.04.2017.
8. Изучение корреляционной связи между клиническими проявлениями воспалительных заболеваний пародонта и микробиомом пародонтопатогенной микрофлоры у молодых представителей смешанной популяции Европейского региона / Е. А. Тихомирова [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2021. – Т. 18, № 4. – С. 433–444.
9. Влияние местного УФ-облучения на течение экспериментального язвенного стоматита / П. Т. Максименко [и др.] // *Терапевтическая стоматология : респ. межвед. сб. / Науч. мед. о-во стоматологов УССР.* – Киев, 1982. – Вып. 17. – С. 89–94.
10. Distinct TRPV1- and TRPA1-based mechanisms underlying enhancement of oral ulcerative mucositis-induced pain by 5-fluorouracil / K. Yamaguchi [et al.] // *Pain.* – 2016. – Vol. 157, N 5. – P. 1004–1020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000498>
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes [Electronic resource] // Council of Europe: Strasbourg. – 51 p. – Mode of access: <https://rm.coe.int/168007a67b>. – Date of access: 04.09.2022.
12. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium / S. P. Rubnikovich [et al.] // *Med. News North Caucasus.* – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. 303–307. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12095>
13. Морфологические изменения в тканях пародонта лабораторных животных при применении мезенхимальных стволовых клеток / С. П. Рубникович [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 441–451.
14. Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [Электронный ресурс] : постановление от 31.10.2006 г., № 131. – Режим доступа: https://www.vsmu.by/downloads/vivary/viv_SanPin_%202.1.2.12.pdf. – Дата доступа: 03.09.2022.
15. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions / R. Mehrotra [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2006. – Vol. 5. – Art. 11. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-57>

16. Экспериментальное обоснование применения мезенхимальных стволовых клеток для восстановления тканей периодонта / Ю. Л. Денисова [и др.] // Мед. вестн. Север. Кавказа. – 2020. – Т. 15, № 3. – С. 333–337.
17. Evaluation of exfoliative cytology in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions: A cytomorphometric analysis / R. Verma [et al.] // Dent. Res. J. (Isfahan). – 2015. – Vol. 12, N 1. – P. 83–88. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.150339>
18. Chemopreventive efficacy of all-trans-retinoic acid in biodegradable microspheres against epithelial cancers: Results in a 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis model / Y. Choi [et al.] // Int. J. Pharmaceutics. – 2006. – Vol. 320, N 1–2. – P. 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.04.003>
19. Ribeiro, D. A. Gingival Changes in Wistar Rats after Oral Treatment with 4-Nitroquinoline 1-Oxide / D. A. Ribeiro, D. M. F. Salvadori // Eur. J. Dentistry. – 2007. – Vol. 1, N 3. – P. 152–157.
20. Alleviative role of rutin against 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) provoked oral squamous cell carcinoma in experimental animal model / P. Thandavamoorthy [et al.] // J. Pharm. Res. – 2014. – Vol. 8, N 7. – P. 899–906.
21. Niwa, S. Alteration of pRb expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-NQO / S. Niwa, S. Ueno, R. Shirasu // Oral Oncol. – 2001. – Vol. 37, N 7. – P. 579–585. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(00\)00141-x](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(00)00141-x)
22. Kanojia, D. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis / D. Kanojia, M. M. Vaidya // Oral Oncol. – 2006. – Vol. 42, N 7. – P. 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.10.013>

References

1. Warnakulasuriya S., Kerr A. R. Oral cancer screening: past, present, and future. *Journal of Dental Research*, 2021, vol. 100, no. 12, pp. 1313–1320. <https://doi.org/10.1177/00220345211014795>
2. Ohne M., Satoh T., Yamada S., Takai H. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1985, vol. 59, no. 6, pp. 600–607. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(85\)90189-6](https://doi.org/10.1016/0030-4220(85)90189-6)
3. Roberts D. J., McKeon M., Xu Y., Stankowski L. F. Jr. Comparison of integrated genotoxicity endpoints in rats after acute and subchronic oral doses of 4-nitroquinoline-1-oxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2016, vol. 57, no. 1, pp. 17–27. <https://doi.org/10.1002/em.21981>
4. Vered M., Daniel N., Hirshberg A., Dayan D. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *Oral Oncology*, 2003, vol. 39, no. 5, pp. 491–496. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(03\)00011-3](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(03)00011-3)
5. Sirak S. V., Rubnikovich S. P., Shchetinin E. V., Perikova M. G., Petrosyan G. G., Bykova N. I., Kobylkina T. L., Didenko M. O. Immunohistochemical evaluation of changes in periodontal tissues in experimental animals with bone skeleton osteoporosis. *Medsitsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2019, vol. 14, no. 4, pp. 681–685 (in Russian).
6. Hahn M., Hagedorn G., Kuhlisch E., Schackert H. K., Edkelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncology*, 2002, vol. 38, no. 5, pp. 486–490. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(01\)00086-0](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(01)00086-0)
7. Karmalkova I. S., Kazeko L. A., Yudina O. A., Mostovnikov A. V. *Method for modeling experimental ulcerative lesions of the oral mucosa*: patent. Publ. 30.04.2017 (in Russian).
8. Tikhomirova E. A., Zudina I. V., Slazhneva E. S., Orekhova L. Yu., Denisova Yu. L., Rubnikovich S. P., Loboda E. S., Atrushkevich V. G. Study of the correlation between the clinical manifestations of the inflammatory periodontal diseases and the microbiome of periodontal pathogenic microflora in young representatives of a mixed population of the European region. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 4, pp. 433–444 (in Russian).
9. Maksimenko P. T., Skripnikova T. P., Kindii D. E., Pavlyuchenko V. F. Influence of local UV irradiation on the course of experimental ulcerative stomatitis. *Terapevticheskaya stomatologiya: respublikanskii mezhdodomstvennyi sbornik. Vypusk 17* [Therapeutic dentistry: republican interdepartmental collection. Iss. 17]. Kiev, 1982, pp. 89–94 (in Russian).
10. Yamaguchi K., Ono K., Hitomi S., Ito M., Nodai T., Goto T. [et al.]. Distinct TRPV1- and TRPA1-based mechanisms underlying enhancement of oral ulcerative mucositis-induced pain by 5-fluorouracil. *Pain*, 2016, vol. 157, no. 5, pp. 1004–1020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000498>
11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. *Council of Europe, Strasbourg*. 51 p. Available at: <https://rm.coe.int/168007a67b> (accessed 04.09.2022).
12. Rubnikovich S. P., Maizet A. I., Denisova Yu. L., Kopylova I. A., Avanesyan R. A. The effect of magnetophototherapy on morphological changes of tissues of pathologically changed periodontium. *Medical News of North Caucasus*, 2017, vol. 12, no. 3, pp. 303–307. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12095>
13. Rubnikovich S. P., Sirak S. V., Denisova Y. L., Andreeva V. A., Kuzmenko I. S., Khomich I. S., Volotovskiy I. D. Morphological changes in periodontal tissues in laboratory animals using mesenchymal stem cells. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 17, no. 4, pp. 444–451 (in Russian).
14. *Sanitary rules and norms 2.1.2.12-18-2006 "Arrangement, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)": resolution of 10.31.2006, No 131*. Available at: https://www.vsmu.by/downloads/vivary/viv_SanPin%202.1.2.12.pdf (accessed 03.09.2022) (in Russian).
15. Mehrotra R., Gupta A., Singh M., Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molecular Cancer*, 2006, vol. 5, art. 11. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-57>

16. Denisova, Yu. L., Sirak S. V., Rubnikovich S. P., Andreeva V. A., Kuz'menko E. V., Khomich I. S., Volotovskii I. D., Vladimirskaya T. E. Experimental substantiation of mesenchymal stem cell application for the restoration of periodontal tissue. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2020, vol. 15, no. 3, pp. 333–337 (in Russian).

17. Verma R., Singh A., Badni M., Chandra A., Gupta S., Verma R. Evaluation of exfoliative cytology in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions: A cytomorphometric analysis. *Dental Research Journal (Isfahan)*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 83–88. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.150339>

18. Choi Y., Kim S.Y., Park K., Yang J., Cho K.-J., Kwon H. J., Byun Y. Chemopreventive efficacy of all-trans-retinoic acid in biodegradable microspheres against epithelial cancers: Results in a 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis model. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, vol. 320, no. 1–2, pp. 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.04.003>

19. Ribeiro D. A., Salvadori D. M. F. Gingival Changes in Wistar Rats after Oral Treatment with 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *European Journal of Dentistry*, 2007, vol. 1, no. 3, pp. 152–157.

20. Thandavamoorthy P. Alleviative role of rutin against 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) provoked oral squamous cell carcinoma in experimental animal model. *Journal of Pharmacy Research*, 2014, vol. 8, no. 7, pp. 899–906.

21. Niwa S., Ueno S., Shirasu R. Alteration of pRb expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-NQO. *Oral Oncology*, 2001, vol. 37, no. 7, pp. 579–585. [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(00\)00141-x](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(00)00141-x)

22. Kanojia D., Vaidya M. M. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*, 2006, vol. 42, no. 7, pp. 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.10.013>

Информация об авторах

Карпук Наталья Анатольевна – канд. мед. наук, доцент. Витебский государственный медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210009, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: ms.karpuk@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9991-7034>

Рубникович Сергей Петрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubnikovich@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Медведев Михаил Николаевич – канд. мед. наук, доцент. Витебский государственный медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210009, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: md_mikhail68@mail.ru. <http://orcid.org/0000-0003-3016-1967>

Information about the authors

Natalia A. Karpuk – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210009, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: ms.karpuk@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9991-7034>

Sergey P. Rubnikovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rubnikovichs@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-7450-3757>

Mikhail N. Medvedev – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210009, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: md_mikhail68@mail.ru. <http://orcid.org/0000-0003-3016-1967>