

ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
«ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ»

КАЗАКОВА КАТЕРИНА СТАНІСЛАВІВНА

УДК 616.315-018.73:616.31-009.613

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЯСЕН ЩУРІВ В
НОРМІ ТА ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ЕТАНОЛОМ**

14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Дніпро – 2019

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вживання алкоголю не лише порушує антиоксидантну систему і метаболічні процеси в печінці, а й спричиняє тяжкі імунomodulatory ефекти. Зловживання алкоголем часто зумовлює розвиток соматичних ушкоджень і нерідко призводить до інвалідності та смерті хворих (Rehm J. et al., 2009; Zaridze D. et al., 2009; Грінченко О. А. та ін., 2013; Калинина Е. Ю. та ін., 2011). Тому вивчення морфологічних змін внутрішніх органів при хронічній інтоксикації етанолом є актуальною проблемою сучасної медицини (Мировая статистика здравоохранения: доклад. Женева: ВОЗ; 2009; Казаков О. А., 2017; Скрипніков А.М. та ін., 2018). Багато досліджень присвячено вивченню впливу хронічної інтоксикації етанолу на морфофункціональний стан печінки, підшлункової залози, нервової системи, серця, але питання змін структури слизової оболонки порожнини рота вивчено недостатньо (Neafsey E. J., Collins M. A., 2011; Yanagawa Y. et al., 2008; Prat G. et al., 2009; Плюснин С. В. та ін., 2016; Токмакова С. И. та ін., 2014).

Зміни, які відбуваються в імунній системі під впливом алкогольної інтоксикації, залежать від тривалості дії алкоголю на організм (Забродский П. Ф. та ін., 2010; Шаликиани Н. В. та ін., 2015). І за гострого, і за хронічного його застосування виявлено ослаблення імунної відповіді, зміни продукування цитокінів та імуноглобулінів, ушкодження функцій ефекторних клітин імунітету, порушення процесів антигенної презентації тощо. Серед клітин імунної системи одними з найчутливіших до дії алкоголю визнано клітини Купфера, які належать до резидентних макрофагів печінки (Шевченко О. О. та ін., 2013).

Однак дослідники зазначають також про вплив алкогольної інтоксикації на функціонування нейтрофілів, фагоцитарних моноцитів і макрофагів. За хронічної дії алкоголю посилюється продукування цитокінів прозапального профілю, таких як ФНП_α, ІЛ₁ та ІЛ₆, що синтезуються активованими ефекторними клітинами. Цей процес пов'язують, насамперед, із деструктивними ураженнями печінки (Van den Wildenberg et al., 2007; Яковлева Л. М. та ін., 2013). Водночас гостра інтоксикація алкоголем асоційована зі зниженням рівня цих цитокінів запалення. Однак синтез активних радикалів кисню, продуктів так званого "кисневого вибуху", відіграє ключову роль у протимікробній і протипухлинній функціях клітин моноцитарно-макрофагального ряду (Marmillot P. et al., 2007; Рикало Н. А., Яровенко Л. О., 2015; Кнышова Л. П. та ін., 2016).

Етанол викликає клітинну дегенерацію і внутрішньоклітинні порушення обмінних процесів. У порожнині рота він пригнічує секрецію і підвищує в'язкість слини. Визначення стоматологічного статусу хворих із алкогольною залежністю має діагностичне та профілактичне значення, а вивчення його особливостей актуальним у стоматологічній практиці (Токмакова С. И., Луницына Ю. В. та ін., 2014; Сілкіна Ю. В., та ін., 2018; Yeroshenko G. A. et al., 2018).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи Української медичної стоматологічної академії МОЗ України: "Експериментально-морфологічне вивчення дії трансплантатів кріоконсервованої плаценти та інших екзогенних чинників на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів", номер державної реєстрації 0113U006185. Автор є співвиконавцем даної роботи.

Мета дослідження. Визначити структурну організацію слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів у нормі та при хронічній інтоксикації етанолом.

Завдання дослідження:

1. Визначити структурні особливості слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів у нормі.
2. Установити особливості перебудови слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом.
3. Дослідити морфофункціональні особливості судин гемомікроциркуляторного русла власної пластинки слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів у нормі та при хронічній інтоксикації етанолом.
4. Вивчити кількісні зміни лейкоцитів у слизовій оболонці прикріпленої частини ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом.
5. Визначити специфічну панель лектинів та дослідити особливості зв'язування лектинів із вуглеводними детермінантами структурних компонентів слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів у нормі та при хронічній інтоксикації етанолом.

Об'єкт дослідження – слизова оболонка прикріпленої частини ясен щурів.

Предмет дослідження – структурні особливості епітеліальної та власної пластинок слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів у нормі та при хронічній інтоксикації етанолом.

Методи дослідження:

- гістологічний – для виявлення структурних змін у компонентах слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів;
- метод серійних напівтонких зрізів – для отримання цілісної інформації про слизову оболонку прикріпленої частини ясен;
- морфометричний – для встановлення кількісних параметрів компонентів слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів;
- лектинохімічний – для визначення динаміки експресії глікопротеїнових рецепторів компонентів клітин слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів до панелі визначених лектинових маркерів у нормі та при хронічній інтоксикації етанолом;
- методи варіаційної статистики – для встановлення об'єктивності отриманих результатів і визначення розвитку основних тенденцій реактивних змін у епітеліальному і сполучнотканинному компонентах слизової оболонки прикріпленої частини ясен.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше, на підставі отриманих даних доведено, що вплив етанолу призводить до порушення процесів диференціювання епітелію слизової оболонки прикріпленої частини ясен у вигляді гіперкератозу на ранніх стадіях, на пізніх термінах спостереження – явищами акантозу. У власній пластинці на ранніх термінах експерименту розвивається гіпергідратація периваскулярної сполучної тканини, яка зберігається до 30-ої доби. Розлади гемомікроциркуляції проявляються звуженням артеріол і дилатацією венул на п'яту добу експерименту. Відновлення перфузії крові в обмінній і ємнісній ланках гемомікроциркуляторного русла не визначалося на 12-ту і 30-ту доби експерименту.

Вперше, за допомогою комплексної морфологічної оцінки сформульовані метричні критерії епітеліальної та власної пластинок, ланок гемомікроциркуляторного русла і мігрантних клітин сполучної тканини прикріпленої частини слизової оболонки ясен щурів у нормі та під впливом хронічної інтоксикації етанолом.

Теоретично обґрунтовано положення про наявність у прикріпленій частині слизової оболонки ясен щурів місцевого захисного бар'єра, який представлений макрофагами, лімфоцитами, плазмоцитами і мастоцитами. При інтоксикації етанолом зміни свідчать про активізацію неспецифічної ланки імунної відповіді, що проявляється стійким збільшенням середньої кількості макрофагів протягом експерименту. На 12-ту добу спостереження встановлено зменшення середньої кількості лімфоцитів, плазмоцитів і мастоцитів, що свідчить про ослаблення захисного бар'єра. До 30-ої доби спостереження кількість плазмоцитів і мастоцитів збільшилася більш ніж удвічі, що є морфологічним підтвердженням напруженості місцевого захисного бар'єра.

За результатами власних лектинохімічних досліджень вперше визначені специфічні лектини до структурних компонентів прикріпленої частини слизової оболонки ясен щурів (сіалоспецифічні лектини зародків пшениці і бузини чорної), які проявляли сильну реакцію. Протягом експерименту встановлено зниження інтенсивності маркування, відновлення до 12-ої доби не відбулося.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані є теоретичною передумовою для розробки методів профілактики і лікування патологічних змін слизової оболонки порожнини рота при хронічному впливі етанолу. Отримані результати визначають важливість вивчення структурного ремоделювання слизових оболонок під впливом несприятливих екзогенних чинників. Викладені в дисертації теоретичні дані впроваджені в навчальний процес і науково-дослідну роботу кафедр гістології, цитології та ембріології та можуть бути використані на морфологічних кафедрах закладів вищої освіти медико-біологічного профілю.

Впровадження результатів дослідження. Матеріали дисертації впроваджені у навчальний процес і наукову роботу кафедр гістології та ембріології ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (затв. 24 червня 2016 р.), Одеського

національного медичного університету (затв. 28 червня 2016 р.), Запорізького державного медичного університету (затв. 29 січня 2016 р.), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (затв. 15 листопада 2018 р.), ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет» (затв. 5 червня 2018 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною науковою працею здобувача. Автором особисто проаналізовано наукову літературу з вивченням проблеми дослідження і проведено патентно-інформаційний пошук; сформульовані мета і завдання, а також засоби їх вирішення. Експериментальна частина роботи за безпосередньої участі автора виконана на базі експериментально-біологічної клініки Української медичної стоматологічної академії.

Морфологічні дослідження виконані власноруч на базі кафедри гістології, цитології та ембріології Української медичної стоматологічної академії, лектинохімічні – на базі лабораторії «Лектинотест» Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Аналіз отриманих результатів та їх математична обробка, практичні рекомендації розроблені автором самостійно, підготовлені до друку основні матеріали за результатами дисертаційної роботи. Обговорення результатів досліджень і формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником. У наукових працях, надрукованих у співавторстві, реалізовані наукові ідеї здобувача.

Дисертантом особисто написані, проілюстровані й підготовлені до друку всі розділи дисертації. Автору належить фактичний матеріал, отриманий під час проведення дослідження.

Апробація результатів дисертації. На етапах виконання дисертаційної роботи її основні положення доповідалися на: міжнародному науково-практичному конгресі «Scientific resources management of countries and regions» (Копенгаген, 2014); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 2016); VI Міжнародному академічному конгресі “Fundamental and Applied Studies in EU and CIS Countries” (Кембридж, 2016); XV Міжнародному академічному конгресі «Fundamental and Applied Studies in the Modern World, United Kingdom, Oxford (2016); науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології» (Вінниця, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 наукових праць, із них 5 статей у фахових журналах, затверджених ДАК України, які включені до переліку міжнародних наукометричних баз (із них 1 – одноосібна), 1 – у зарубіжному виданні, які повністю відповідають змісту проведених досліджень; 6 праць – у матеріалах наукових конгресів і конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Матеріали дисертації викладено українською мовою на **185** сторінках комп’ютерного тексту, з них **134** сторінки основного тексту. Дисертація складається з анотації, вступу, основної частини (складається з 6 розділів: огляд літератури, матеріали і методи, 3 розділи

власних досліджень, аналіз та обговорення результатів дослідження), висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури (202 найменування – 109 кирилицею і 93 латиницею), додатків. Робота ілюстрована 67 мікрофотографіями, 13 рисунками та містить 14 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведене на 61 безпородніх щурах-самцях (125 ± 20) г, які утримувались в звичайних умовах експериментально-біологічної клініки Української медичної стоматологічної академії.

Було сформовано дві групи тварин: контрольна – 15 щурів, і експериментальна – 46 тварин, яким, для відтворення експериментальної моделі хронічної інтоксикації етанолом дошлунково 4 рази за добу вводили по 12 мг/кг 40^0 етанолу (у перерахунку на чистий алкоголь). Тварин з експерименту виводили на п'яту, дев'яту, дванадцятую і тридцятую доби шляхом передозування тіопенталового наркозу (25 мг/кг) згідно з етапами формування алкогольної залежності (Іваночко В. М., 2003).

Перед виведенням тварин з експерименту контроль формування алкогольної залежності й оцінку змін поведінкових реакцій проводили за допомогою тесту «відкрите поле» (Воронина Т. А. та ін., 2012).

Комісія з етичних питань та біоетики Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава) у складі, затвердженому ректором (наказ № 234 від 02.09.2015 р.) на своєму засіданні (протокол № 139 від 14.06.2016 р.) розглянула матеріали по виконанню роботи і визначила, що експерименти на тваринах проведені відповідно до положення Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/ЄЕС (1986) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15 грудня 2009 року та наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Для проведення гістологічного і морфометричного досліджень після евтаназії у експериментальних тварин видаляли фрагменти слизової оболонки прикріпленої частини ясен. Після фіксації в 2,5 % розчині глютарового альдегіду матеріал заключали в суміш епоксидних смол за загальноприйнятою методикою (Багрій М. М. та співав., 2016). Напівтонкі зрізи товщиною (1-2) мкм виготовляли на ультрамікротомі Сумського ВО «Selmi» УМТП-7 (серійний номер 8–31.4, ТУ 25–7401 0063-91). Напівтонкі зрізи забарвлювали толуїдиновим синім і поліхромним барвником.

При проведенні морфометричного аналізу визначали загальну товщину епітеліальної та власної пластинок; середню кількість шарів клітин у роговому, зернистому, остистому і базальному шарах епітелію, середню кількість у полі зору клітин-мігрантів сполучної тканини власної пластинки – макрофагів, лімфоцитів, плазмоцитів, мастоцитів; діаметри просвіту судин гемомікроциркуляторного русла – артеріол, капілярів і венул за допомогою мікроскопа «Biogex - 3 ВМ - 500Т» із цифровою мікрофотонасадкою «DCM 900» при збільшенні $\times 400$ мікроскопа (серійний номер 49394).

Для проведення лектинохімічного дослідження фрагменти прикріпленої частини ясен після вилучення фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну, ущільнювали в парафін, за загальноприйнятою методикою. З отриманих парафінових блоків виготовляли серійні зрізи на санному мікротомі товщиною 5-7 мкм. Обробку зрізів лектинами здійснювали за стандартною схемою (Луцик О.Д. та ін., 1989). Визначали ступінь експресії вуглеводних детермінант для маннозоспецифічних (конканаваліну А), сіалоспецифічних (бузини чорної та зародків пшениці), галактозоспецифічних (арахісу, виноградного равлика, насіння сої) та фукозоспецифічних (кора золотого дощу звичайного) лектинів напівкількісним методом.

Кількісний аналіз результатів морфометричного дослідження і статистичну обробку морфометричних даних проводили за загально прийнятими статистичними методами за допомогою програми Excel. Достовірність різниці значень між незалежними мікрометричними величинами визначали за двовибірковим критерієм Ст'юдента, Mann-Whitney та Wilcoxon.

Результати дослідження та їх обговорення. Ясна, як слизова оболонка жувального типу, завдяки анатомо-гістологічним особливостям первинно підлягають впливу екзогенних факторів, оскільки стають «органом-мішенню» під час розвитку патології пародонта. Епітелій ясен зазнає механічного, хіміко-токсичного, сенсibilізаційного, термоізолюючого впливу під дією екзогенних чинників, які ініціюють комбіноване подразнення (Шевченко Е.А., 2015).

Комплексне дослідження структурної перебудови слизової оболонки ясен щурів за хронічного впливу етанолу встановило порушення процесу диференціації епітелію вже на ранніх термінах спостереження. На п'яту добу експерименту визначено зменшення середньої товщини епітеліальної пластинки на 26,45 % (рис. 1), зумовлене гальмуванням метаболізму кератиноцитів шипуватого і зернистого шарів, та збільшення кількості шарів рогових лусочок унаслідок безпосередньої дії екзогенного чинника.

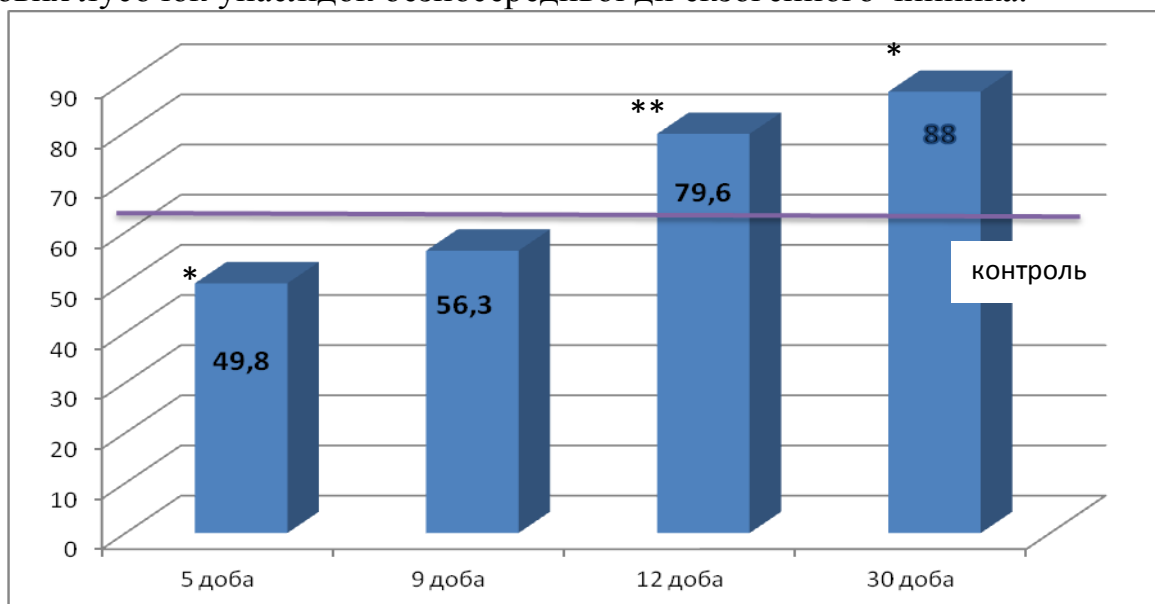


Рис. 1. Динаміка змін середньої товщини епітеліальної пластинки слизової оболонки ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом

На дев'яту добу спостереження середні значення товщини епітелію збільшилися на 13,3 % у порівнянні з попереднім терміном і достовірно від показників у контрольній групі не відрізнялися. Гістологічно на цей термін експерименту в епітелії розвинулись явища гіперкератозу і виявлено активізацію диференціювання клітин у остистому та зернистому шарах як компенсаторно-приспосувальний процес.

На 12-у добу експерименту визначено прогресивне достовірне збільшення середньої товщини епітеліальної пластинки на 17,4 % проти значень у контрольній групі щурів (див. рис. 1), що супроводжувалося збільшенням висоти епітеліальних гребінців, їх розгалуженням у підлеглу власну пластинку, що є морфологічним проявом акантозу, який розвинувся внаслідок тривалої дії етанолу на слизову оболонку ясен.

До 30-ї доби спостереження явища акантозу в епітелії прогресували, висота сосочків і гребінців збільшилася. Загальна середня товщина епітеліальної пластинки на 29,8 % перевищувала значення в контрольній групі тварин і від показника попереднього терміну спостереження не відрізнялася (див. рис. 1).

Таким чином, за результатами аналізу морфологічних і морфометричних змін епітеліальної пластинки слизової оболонки ясен щурів встановлено порушення диференціювання кератиноцитів, які до 30-ї доби спостереження проявляли компенсаторну реакцію у вигляді загального потовщення епітелію і формування акантозу, що підвищувало стійкість слизової оболонки й епітеліальної пластинки до тривалої дії подразнюючого чинника.

При вивченні динаміки змін шарів епітелію встановлено зменшення кількості шарів клітин у базальному шарі до п'ятої доби експерименту, що було зумовлено порушеннями злущення рогових лусочок із поверхні епітеліального пласта та пригніченням мітотичної активності в базальному шарі. Відповідно, у цей термін спостереження встановлено достовірне зменшення шарів клітин у остистому та зернистому шарах, що підтверджує гальмування диференціювання кератиноцитів.

На дев'яту добу експерименту виявлено збільшення шарів клітин у остистому та зернистому шарах, що можна розцінити як формування компенсаторних механізмів для подальшої адаптації епітелію до впливу подразнювального чинника.

На 12-у добу спостереження на стадії стійкого звикання до алкоголю встановлено достовірне збільшення кількості шарів у зернистому та роговому шарах на тлі зменшення кількості шарів клітин у остистому. Таким чином, у цей термін спостереження формується компенсація захисної функції за рахунок збільшення товщини поверхневих шарів епітеліальної пластинки, що, у свою чергу, прискорює процеси дозрівання клітин епітелію. Установлені дані узгоджуються з напрацюваннями інших дослідників (Тимошенко Ю.В., Єрошенко Г.А., 2018; Семенова А.К., 2018).

До 30-ї доби експерименту процеси потовщення епітеліальної пластинки посилювалися за рахунок збільшення на 86,9 % кількості шарів клітин у остистому шарі, на 9,9 % – у зернистому і на 11,1 % – у роговому.

Вплив етанолу на морфофункціональний стан власної пластинки слизової оболонки ясен щурів проявлявся гіпергідратацією периваскулярного аморфного компоненту міжклітинної речовини пухкої сполучної тканини максимально на п'яту добу спостереження. За допомогою морфометричного методу визначено достовірне збільшення показника середньої товщини власної пластинки на 26,7 %. Далі впродовж експерименту значення середньої товщини власної пластинки поступово зменшувалися, достовірно від попереднього терміну спостереження не відрізняючись, але навіть на 30-у добу експерименту перевищували показник у контрольній групі тварин достовірно на 34,9 %.

Важливу роль у підтриманні гомеостазу слизових оболонок відіграють судини гемомікроциркуляторного русла, які забезпечують трофічні й обмінні процеси в тканинах, а також евакуацію продуктів обміну і токсичних речовин, що можуть накопичуватися внаслідок дії різних патогенних чинників. Оцінюючи стан ланок гемомікроциркуляторного русла, ми встановили, що на ранніх термінах спостереження (п'ята доба) відбувалося достовірне зменшення середнього діаметра просвіту артеріол на 35,6 %, що, на нашу думку, зумовлено безпосередньою подразнювальною дією етанолу на слизову оболонку ясен щурів. Внутрішні еластичні мембрани артеріол мали чітко виражений хвилястий хід, ядра ендотеліальних клітин вибухали в просвіті.

На дев'яту добу експерименту показник середнього діаметра просвіту артеріол збільшився достовірно на 59,5 % у порівнянні з попереднім терміном експерименту і достовірно від значень у контрольній групі тварин не відрізнявся (рис. 2а).

Надалі впродовж експерименту значення діаметра просвіту артеріол змінювалися недостовірно.

Таким чином, із дев'ятої доби експерименту відновлювалося надходження крові до тканин слизової оболонки ясен щурів, що могло бути забезпечено потовщенням епітеліальної пластинки та посиленням захисної функції епітелію.

При дослідженні стану гемокапілярів встановлено, що на п'яту добу експерименту значення середнього діаметра просвіту обмінної ланки гемомікроциркуляторного русла достовірно зменшилися на 35,7 % (див. рис. 2б) проти значень у контрольній групі тварин, що викликано, з одного боку, зменшенням припливу крові зі звужених артеріол, а з іншого – гіпергідратацією аморфного компоненту міжклітинної речовини сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки.

З дев'ятої доби експерименту середній діаметр просвіту капілярів мав тенденцію до відновлення, у просвітах визначалися формені елементи крові. Однак повного відновлення показників не встановлено до кінця терміну спостереження.

На дев'яту добу значення діаметра просвіту капілярів на 29,5 % були меншими за показник у контрольній групі щурів, на 12-у добу – на 20,4 %, на 30-у добу – на 19,1 % (див. рис. 2б).

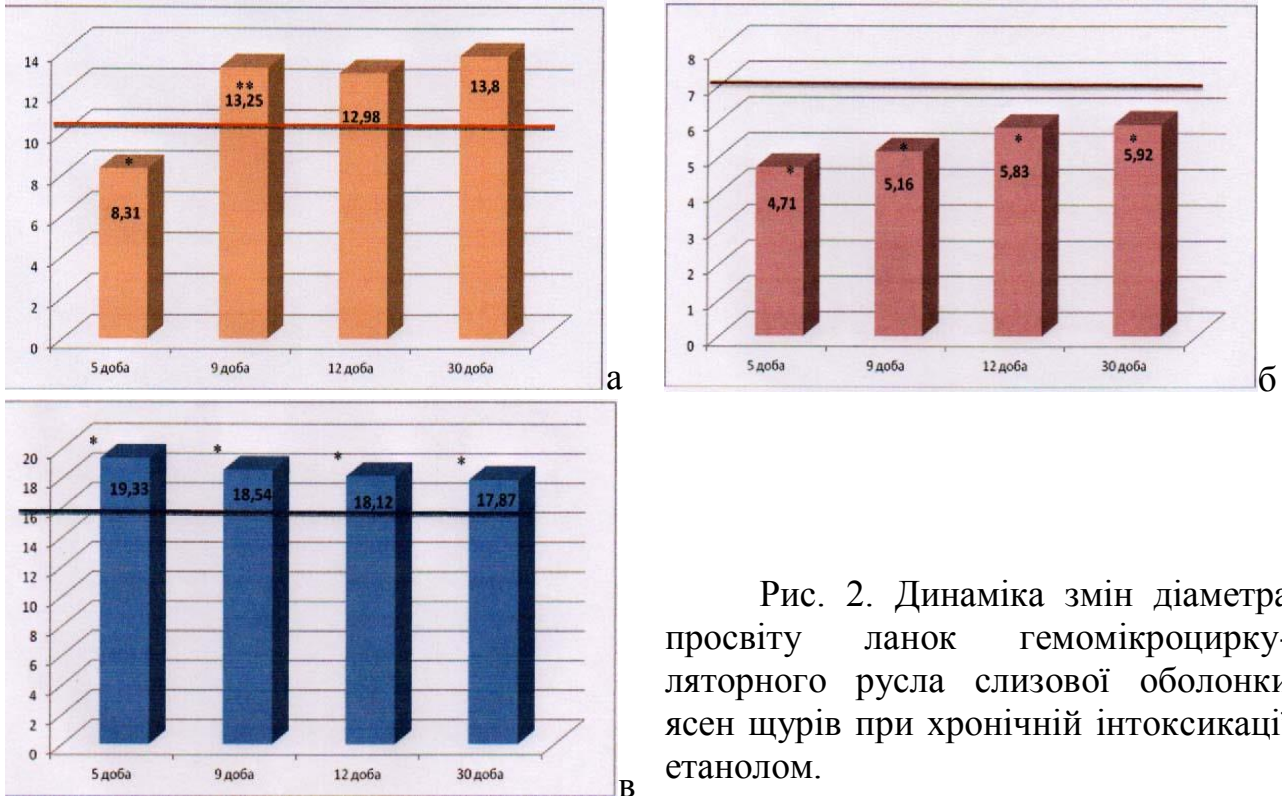


Рис. 2. Динаміка змін діаметра просвіту ланок гемомікроциркуляторного русла слизової оболонки ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом.

Ємнісна ланка гемомікроциркуляторного русла у власній пластинці слизової оболонки ясен щурів представлена венулами і забезпечує евакуацію крові. Венули мали стінку з підвищеною гідравлічною провідністю і є місцем переміщення рідини з навколосудинного простору в кровообіг. Хронічний вплив етанолу проявлявся збільшенням середнього діаметра просвіту венул у п'яту добу експерименту на 20,74 % (див. рис. 2в), що зумовлено звуженням просвіту артеріол на цей термін спостереження і скиданням крові через артеріоло-венулярні анастомози в ємнісну ланку.

Далі, на тлі відновлення перфузії крові через артеріоли, встановлено поступове відновлення показників середнього діаметра просвіту венул, але повної нормалізації значень не встановлено до кінця спостереження: на 30-у добу експерименту значення діаметра просвіту на 11,6 % достовірно перевищували показник у контрольній групі тварин (рис. 2в).

Клітини-мігранти сполучної тканини відіграють важливу роль у забезпеченні захисної функції слизових оболонок і формуванні місцевого імунного захисту на шляху чужорідних агентів. У слизовій оболонці ясен вони представлені інтраепітеліальними лімфоцитами і макрофагами (клітинами Лангерганса), у власній пластинці – макрофагами, лімфоцитами, плазмоцитами і мастоцитами.

При аналізі присутніх макрофагів у власній пластинці ясен щурів контрольної групи середня кількість їх становила $2,24 \pm 0,03$ у полі зору. Дія

етанолу на п'яту добу спостереження призводила до достовірного зменшення середньої кількості даних клітин на 10,7 %. До дев'ятої доби експерименту показник збільшився на 28,5 % у порівнянні зі значеннями на п'яту добу і на 14,7 % достовірно перевищував показник контрольної групи щурів. До 12-ї доби кількість макрофагів була сталою, а на 30-у добу значення знову достовірно збільшилися на 6,4 % і на 19,6 % були більшими за значення в контрольній групі тварин.

Кількість лімфоцитів у тканині свідчить про напруженість захисного бар'єра в цій анатомічній ділянці. Їх середня кількість у щурів контрольної групи становила $2,36 \pm 0,08$. Дія етанолу призводила на п'яту добу до достовірного збільшення середньої кількості лімфоцитів у полі зору на 25 %, що є морфологічним проявом збільшення кількості антигенів у власній пластинці й міграції клітин із крові для забезпечення імунної відповіді. На дев'яту добу спостереження кількість лімфоцитів від попереднього терміну експерименту не відрізнялась, а на 12-у встановлено різке зменшення їх середньої кількості на 43,2%.

Поряд із цим різко збільшилася середня кількість плазмоцитів, які є активованими В-лімфоцитами. До 30-ї доби кількість лімфоцитів збільшилася на 138,9 % у порівнянні зі значеннями на 12-у добу і на 69,1 % перевищувала показник у контрольній групі тварин.

Таким чином, хронічна дія етанолу викликає посилення антигенної стимуляції та підвищення напруженості гуморального імунітету, що супроводжується збільшенням кількості клітин-ініціаторів імунної відповіді.

Середня кількість плазмоцитів у власній пластинці слизової оболонки ясен щурів контрольної групи становить $2,37 \pm 0,09$ у полі зору і достовірно не відрізняється від показника лімфоцитів.

Отже, співвідношення клітин становить 1: 1. Протягом спостереження встановлено прогресивне збільшення плазмоцитів за винятком плато на 9-12-у доби експерименту. На 30-у добу збільшення кількості плазмоцитів становило 55,3 % у порівнянні з попереднім терміном спостереження і більш, ніж у три рази перевищувало показник у контрольній групі тварин.

Співвідношення лімфоцити : плазмоцити протягом спостереження становило на п'яту добу 3 : 4; на дев'яту добу – 3 : 5; на 12-у добу – 1,7 : 5; на 30-у добу – 4 : 7,5, що було морфологічним підтвердженням посилення антигенної стимуляції при хронічній інтоксикації етанолом і формуванні пула клітин, які були джерелом антитіл для формування адекватного захисного бар'єра на шляху антигенів.

У контрольній групі тварин середня кількість мастоцитів становила $2,41 \pm 0,03$. На п'яту добу експерименту показник середньої кількості мастоцитів збільшився на 120,9 %.

При хронічній алкогольній інтоксикації в експерименті змінюється стан мастоцитів як регулятора тканинного гомеостазу і клітини активно реагують дегрануляцією. Дані гістологічного дослідження підтверджені морфометрично. На дев'яту добу експерименту кількість мастоцитів зменшилася на 167,5 % у

порівнянні з попереднім терміном експерименту, можливо, за рахунок масованої екструзії секреторних гранул і утруднене визначення локалізації ядер.

Подібна картина визначена і на 12-у добу спостереження: середня кількість мастоцитів у полі зору дещо збільшилася, але недостовірно.

Різке збільшення показника спостерігалось на 30-у добу експерименту: на 143,4 % і на 114,1 % він перевищував значення в контрольній групі тварин.

Таким чином, мастоцити як регулятори проникності судинної стінки й аморфного компоненту міжклітинної речовини сполучної тканини беруть активну участь у компенсаторних процесах у власній пластинці слизової оболонки ясен щурів під дією етанолу.

У тварин контрольної групи за допомогою лектинохімічного дослідження встановлено, що специфічними до рогових лусочок є лектин конканаваліну А і сіалоспецифічні лектини; до кератиноцитів і базальної мембрани – сіалоспецифічні. До резидентних структурних компонентів власної пластинки – лектини арахісу, конканаваліну А, бузини чорної та пшениці; до клітин-мігрантів – лектини арахісу, кори золотого дощу звичайного, зародків пшениці (мастоцити) і лектин бузини чорної (макрофаги).

При дії етанолу на п'яту добу встановлено зниження інтенсивності маркування на кератиноцитах, що морфологічно проявлялось явищами гіперкератозу; до 12-ї доби визначено неповне відновлення експресії до лектину зародків пшениці та бузини чорної. Експресія рецепторів на фібробластах і колагенових волокнах зменшилася у всіх термінах спостереження внаслідок як прямої пошкоджуючої дії етанолу на слизову оболонку, так і гіпергідратації аморфного компоненту міжклітинної речовини через розлади мікроциркуляції. Мастоцити і макрофаги на 12-у добу експерименту характеризувалися зниженням ступеня кон'югації з рецепторами до лектинів арахісу, кори золотого дощу звичайного, зародків пшениці та бузини чорної, що відображало процеси активної екструзії секреторних гранул і зменшення кількості субстрату для фіксації лектинів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання, яке полягає у встановленні структурної перебудови слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом.

1. Слизова оболонка прикріпленої частини ясен щурів за загальними принципами структурної організації відповідає такій у людини і складається з епітеліальної та власної пластинок. У контрольній групі тварин середня товщина епітелію становила $67,79 \pm 6,17$ мкм, власної пластинки – $117,78 \pm 10,14$ мкм. Гемомікроциркуляторне русло представлене артеріолами, капілярами і венулами. Середні значення просвітів становили $12,91 \pm 0,96$ мкм, $7,32 \pm 0,14$ мкм і $16,01 \pm 1,29$ мкм відповідно. У складі епітеліальної пластинки

виявляються лімфоцити, у пухкій сполучній тканині власної пластинки – лімфоцити, макрофаги, плазмоцити і мастоцити.

2. Під дією етанолу в епітелії слизової оболонки прикріпленої частини ясен порушуються процеси диференціації, що на ранніх термінах експерименту проявляється гіперкератозом, на пізніх – явищами акантозу. У власній пластинці на 5-ту добу встановлені морфологічні ознаки гіпергідратації периваскулярної сполучної тканини, які зберігалися до 30-ї доби. Контакт слизової оболонки з етанолом призводить до змін метричних показників, що проявляється, зокрема, зменшенням загальної товщини епітеліальної пластинки з подальшим стійким потовщенням до 30-ї доби експерименту та збільшенням загальної товщини власної пластинки на 26,7 %, що не відновлюється до кінця спостереження. Найменший вплив етанолу на середню кількість шарів клітин у встановлений у базальному шарі епітеліальної пластинки. Визначено, що на ранніх термінах спостереження зменшується показник для остистого та зернистого шарів, на пізніх – значно збільшується кількість шарів клітин у зернистому та роговому шарах, що є морфологічним проявом захисної реакції епітелію на дію етанолу.

3. Введення етанолу викликає розлади гемомікроциркуляції, які проявляються нерівномірним кровонаповненням ємнісної ланки гемомікроциркуляторного русла, запусінням просвітів капілярів на 12-у і 30-у доби експерименту. Метричні зміни проявлялись достовірним зменшенням на п'яту добу спостереження діаметрів просвітів артеріол і капілярів на 35,7 % і 35,5 % відповідно. Значення середнього діаметра просвіту ємнісної ланки достовірно збільшилися на 20,6 %. Відновлення показників визначено лише з боку діаметра просвіту артеріол на дев'яту добу експерименту. Обмінна ланка не відновила метричні показники до 30-ї доби спостереження, вони залишалися меншими за значення в контрольній групі тварин на 19,2 %. Збільшення середніх значень діаметра венул на 30-у добу експерименту на 11,6 % свідчить про порушення перфузії крові під дією хронічної інтоксикації етанолом.

4. Хронічна інтоксикація етанолом викликає збільшення середньої кількості макрофагів на 19,6 % і плазмоцитів майже в 3 рази протягом експерименту. Після збільшення на п'яту добу середньої кількості лімфоцитів і мастоцитів на 25 % і 121 % відповідно відбувалося достовірне зменшення показників на 12-у добу спостереження, що свідчить про ослаблення захисного бар'єра. До 30-ї доби спостереження кількість плазмоцитів і мастоцитів збільшилася більш ніж удвічі, що є морфологічним підтвердженням напруженості місцевого захисного бар'єра.

5. Специфічними до рогових лусочок є лектин конканаваліну А і сіалоспецифічні лектини; до кератиноцитів і базальної мембрани – сіалоспецифічні. До резидентних структурних компонентів власної пластинки – лектини арахісу, конканаваліну А, бузини чорної та пшениці; до мігрантних клітин – лектини арахісу, кори золотого дощу звичайного, зародків пшениці (мастоцити) і лектин бузини чорної (макрофаги). При дії етанолу на п'яту добу

встановлено зниження інтенсивності маркування на кератиноцитах, що морфологічно проявлялось явищами гіперкератозу, до 12-ї доби визначено неповне відновлення експресії до лектину зародків пшениці та бузини чорної. Експресія рецепторів на фібробластах і колагенових волокнах зменшилася на всіх термінах спостереження. Мастоцити і макрофаги характеризувалися зниженням ступеня кон'югації з рецепторами до лектинів арахісу, кори золотого дощу звичайного, зародків пшениці та бузини чорної.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Структурні особливості ремоделювання слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів доцільно використовувати в навчальному та науково-дослідному процесах кафедр морфологічного, стоматологічного терапевтичного, хірургічного та ортопедичного профілів.

2. Дані про особливості морфологічних змін слизової оболонки прикріпленої частини ясен при хронічній інтоксикації етанолом можуть бути використані в якості наукового та методологічного підґрунтя для подальшої розробки методів профілактики, діагностики та комплексного лікування стоматологічних хворих на терапевтичному прийомі.

СПИСОК ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Казакова К. С. Гистологическая характеристика микроциркуляторного русла собственной пластинки десневой борозды в норме / С. Ю. Масловский, К. С. Казакова, С. Б. Герасименко // Світ біології та медицини – 2015. – № 3 (51). – С. 97-99. *(Здобувачем проведене гістологічне дослідження, узагальнення результатів. Співавтор Масловський С. Ю. надавав консультативну допомогу, Герасименко С. Б. приймав участь в оформленні статті).*

2. Казакова К. С. Зміни представництва мігрантних клітин слизової оболонки ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом / Г. А. Єрошенко, К. С. Казакова, А. І. Єрошенко, О. Д. Лисаченко // Світ медицини та біології.- 2015. – № 3 (52). – С. 103-105. *(Здобувачем проведене гістологічне дослідження, узагальнення результатів. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу, Єрошенко А. І. приймала участь у проведенні морфометричного дослідження, Лисаченко О. Д. приймала участь в оформленні статті).*

3. Казакова К. С. Морфометрична характеристика ланок гемомікроциркуляторного русла слизової оболонки ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом / К. С. Казакова // Вісник проблем біології і медицини.- 2016. – Вип. 2, Т. 2 (129). – С. 131-133. *(Здобувачем проведене морфометричне дослідження, узагальнення результатів).*

4. Comparative analysis of metric changes in the sections of hemo microcirculatory stream of rat mucous membrane of gums and hard palate after exposure to ethanol and methacrylate / Г. А. Єрошенко, Ю. В. Сенчакович, К. С. Казакова [та ін.] // The VI International Academic Congress «Fundamental and Applied Studies in EU and CIS Countries». – 2016. – Vol. VI. – P. 600-605. *(Здобувачем проведене гістологічне дослідження, узагальнення результатів).*

Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу, Сенчакович Ю. В. провела забір та ущільнення матеріалу).

5. Єрошенко Г. А. Lectinochemical characteristics of rat normal masticatory oral mucosa / Г. А. Єрошенко, Ю. В. Тимошенко, К. С. Казакова [та ін.] // The XV International Academic Congress «Fundamental and Applied Studies in the Modern World». – United Kingdom, Oxford, 2016. – Vol. XV. – P. 207-211. *(Особисто здобувачем проведений аналіз літературних джерел, узагальнення результатів. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу, Тимошенко Ю.В. приймала участь в оформленні статті).*

6. Казакова К. С. Morphometric characteristics of rat gingival mucosa in chronic ethanol intoxication / Г. А. Єрошенко, К. С. Казакова // European Journal of Scientific Research, 2016, № 1 (13), (January-June). Volume II. “Paris University Press”, 2016. – P. 528-533. *(Здобувачем проведено морфометричне дослідження, узагальнення результатів. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу).*

7. Казакова К. С. Токсичний вплив етанолу на слизові оболонки. // Г. А. Єрошенко, К. В. Шевченко, К. С. Казакова // Світ медицини та біології. – 2017. – № 3(61). – С.169-173.*(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу, Шевченко К. В. приймав участь в оформленні статті).*

8. Казакова К. С. Динаміка експресії вуглеводних детермінант структурних компонентів слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів за умов хронічної інтоксикації етанолом / К. С. Казакова, Г. А. Єрошенко // Вісник проблем біології і медицини. – 2018. – Вип. 3, (145). – С. 294-297. *(Здобувачем проведено морфометричне дослідження, узагальнення результатів. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу).*

9. Казакова К. С. Динаміка изменений представительства лейкоцитов в слизистой оболочке десны крыс при хронической интоксикации этанолом / Г. А. Єрошенко, Н. Ф.Єрсьоміна, К. С. Казакова // Матеріали I міжнародної науково-практичної конференції з міжнародною участю «Scientific resources management of countries and regions». – Копенгаген, 2014, Vol. 1. – P. 167-169. *(Здобувачем проведено узагальнення отриманих даних. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу, Єрсьоміна Н. Ф. приймала участь в оформленні статті).*

10. Морфометрична характеристика змін гемомікроциркуляторного русла слизової оболонки ясен та твердого піднебіння щурів після впливу етанолу та метакрилату / Ю. В. Тимошенко, Г. А. Єрошенко, К. С. Казакова [та інш.] // Мат-ли наук.-практ. конф. з між нар. участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 5-7 жовтня 2016 року). – Дніпро, 2016. – С.54-55 *(Здобувачем проведено виготовлення зрізів, аналіз та узагальнення отриманих морфометричних даних. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу; Тимошенко Ю. В. приймала участь у заборі та ущільненні матеріалу).*

11. Казакова К. С. Особливості експресії вуглеводних детермінант в структурних компонентах слизової оболонки порожнини рота / Ю. В.

Тимошенко, Г. А. Єрошенко, К. С. Казакова // Мат-ли наук.-практ. конф. «Прикладні аспекти морфології» (Тернопіль, 21- 22 жовтня 2016 року). – Тернопіль, 2016. – С. 58-59. (Здобувачем проведено виготовлення зрізів, аналіз та узагальнення отриманих морфометричних даних. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу; Тимошенко Ю. В. приймала участь у заборі та ущільненні матеріалу).

12. Казакова К. С. Вплив етанолу на морфо функціональний стан епітелію в експерименті // Г. А. Єрошенко, К. С. Казакова, С. Б. Герасименко // Мат-ли наук.-практ. конф. Актуальні проблеми функціональної морфології та інтерактивної антропології. « Прикладні аспекти морфології» (Вінниця, 21-22 вересня 2017року). – Вінниця: друкарня «Тези», 2017. – С.80-82. (Здобувачем проведено виготовлення зрізів, аналіз та узагальнення отриманих морфометричних даних. Співавтор Єрошенко Г. А. надавала консультативну допомогу; Герасименко С. Б. приймав участь у заборі та ущільненні матеріалу).

АНОТАЦІЯ

Казакова К.С. Морфофункціональна характеристика ясен щурів в нормі та за умов хронічної інтоксикації етанолом. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.09 - гістологія, цитологія, ембріологія. – ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро, 2019.

Дисертація присвячена визначенню структурної перебудови слизової оболонки прикріпленої частини ясен щурів при хронічній інтоксикації етанолом.

За допомогою комплексного гістологічного, морфометричного та лектинохімічного методів встановлено, що під дією етанолу в епітелії слизової оболонки прикріпленої частини ясен порушуються процеси диференціації, що на ранніх термінах експерименту проявляється гіперкератозом, на пізніх – явищами акантозу. У власній пластинці на ранніх термінах експерименту (п'ята доба) установлені морфологічні ознаки гіпергідратації периваскулярної сполучної тканини, які зберігалися до 30 - ї доби. Дія етанолу викликає розлади мікроциркуляції, які проявляються нерівномірним кровонаповненням емнісної ланки гемомікроциркуляторного русла, запустінням просвітів капілярів на 12 - у і 30 - у доби експерименту. Хронічна інтоксикація етанолом викликає збільшення середньої кількості клітин-мігрантів сполучної тканини, що є морфологічним підтвердженням напруженості місцевого захисного бар'єра.

Ключові слова: слизова оболонка ясен, морфологічна характеристика, хронічна інтоксикація етанолом.

АННОТАЦІЯ

Казакова Л.С. Морфофункціональна характеристика десни крыс в норме и при хронической интоксикации этанолом. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – гистология, цитология, эмбриология. – ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», Днепро, 2019.

Диссертация посвящена изучению структурной перестройки слизистой оболочки прикрепленной части десны крыс при хронической интоксикации этанолом.

С помощью комплекса гистологического, морфометрического и лектинохимического методов установлено, что под действием этанола в эпителии слизистой оболочки прикрепленной части десны нарушаются процессы дифференцировки, что на ранних сроках эксперимента проявляется гиперкератозом, на поздних – явлениями акантоза. В собственной пластинке на ранних сроках эксперимента (пятые сутки) установлены морфологические признаки гипергидратации периваскулярной соединительной ткани, которые сохранялись до 30-х суток. Действие этанола вызывает расстройства микроциркуляции, которые проявляются неравномерным кровенаполнением емкостного звена гемомикроциркуляторного русла, запуском просветов капилляров на двенадцатые и тридцатые сутки эксперимента. Хроническая интоксикация этанолом вызывает увеличение среднего количества клеток-мигрантов соединительной ткани, что является морфологическим подтверждением напряженности местного защитного барьера.

Ключевые слова: слизистая оболочка десны, морфологическая характеристика, хроническая интоксикация этанолом.

ANNOTATION

Kazakova K.S. Morphofunctional characteristic of rats gums mucosa in normal and under conditions of chronic ethanol intoxication. – Manuscript.

PhD thesis in Medicine on the Specialty 14.03.09 – histology, cytology, embryology. – SE “Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine”, Dnipro, 2019.

In the dissertation the theoretical generalization and a new solution of a scientific problem, which consists in the establishment of a structural transformation of the mucous membrane of an attached part of the gums of rats during chronic intoxication with ethanol, is given.

The mucous membrane of the fastened part of the gums of rats according to the general principles of structural organization corresponds to such a person and consists of epithelial and own plates. In the control group of animals, the average thickness of the epithelium was $67,79 \pm 6,17 \mu\text{m}$, its own plate – $117,78 \pm 10,14 \mu\text{m}$. Hemomycocirculatory bed is represented by arterioles, capillaries and venules. The mean values of the lumens are $12,91 \pm 0,96 \mu\text{m}$, $7,32 \pm 0,14 \mu\text{m}$ and $16,01 \pm 1,29 \mu\text{m}$, respectively. In the epithelial plate, lymphocytes are found, in the loose connective tissue of their own plate - lymphocytes, macrophages, plasma cells and mastocytes.

Under the influence of ethanol in the epithelium of the mucous membrane of the attached gingiva, processes of differentiation, which in the early stages of the experiment manifests hyperkeratosis, are violated in the late stages of observation -

the phenomena of acanthosis. In his own plate, in the early stages of the experiment (5th day), morphological signs of hyperhydration of perivascular connective tissue were established, which remained until the 30th day. The contact of the mucous membrane with ethanol leads to changes in metric parameters, which manifests itself in the early stages of the experiment by decreasing the overall thickness of the epithelial plate, followed by persistent thickening until the 30th day of the experiment. The total thickness of its own plate increases by 26,7% already by 5th day by increasing the content of amorphous substance, and until the end of the observation is not restored. The smallest influence of ethanol on the average number of cell layers is found in the basal layer of the epithelial plate. It has been determined that in the early stages of observation, the index for spiked and granular layers decreases, and at later stages the number of layers of cells in the granular and horny layers is significantly increased, which is a morphological manifestation of the protective reaction of the epithelium with the influence of ethanol.

Introduction of ethanol causes microcirculation disorders, which manifest themselves uneven blood filling of the capacitive link of the hemomyocirculatory bed, deficiency of the lumen of the capillaries in the 12th and 30th days of the experiment. Metric changes in the hemomyocirculatory channels showed a significant reduction on the 5th day of observation of the diameter of the lumen of arterioles and capillaries by 35,7% and 35,5% respectively. The mean diameter of the lumen of the capacitive unit has increased significantly by 20,6%. Restoration of indicators is determined only by the diameter of the arteriol lumen on the 9th day of the experiment. The exchange did not restore metric data until the 30th day of observation, which remained below the value in the control group of animals by 19,2%. The average values of the diameter of venules for the 30th day of the experiment were higher than those in the control group of rats by 11,6%, indicating a violation of perfusion of blood under the influence of chronic intoxication with ethanol.

Chronic intoxication with ethanol causes an increase in the average number of macrophages by 19,6 % and plasma cells by 318 % during the experiment. After an increase in the average number of lymphocytes and mast cells by 5th day by 25 % and 121 %, respectively, there was a significant decrease in the indicators for 12 days of observation, indicating a weakening of the protective barrier. By 30 days of observation, the number of plasmocytes and mast cells has more than doubled, which is a morphological confirmation of the tension of the local protective barrier.

In animals of the control group, with the help of lectinochemical research, it was found that specific to the horny scales are lectin of concanavalin a and sialospecific lectins, to keratinocytes and basal membranes - sialospecific. To the resident structural components of its own plate - lectins of peanut, konkanavalin a, elderberry and wheat, to migrant cells - peanut lectins, common golden rain, wheat germs (mastocytes) and lectins of elderberry (macrophages).

At the action of ethanol at 5 days, a decrease in the intensity of marking on

keratinocytes, morphologically manifested by hyperkeratosis phenomena, was determined, until 12 days, incomplete recovery of the expression of lectin of wheat germ and elderberry black was determined. Expression of the receptors on fibroblasts and collagen fibers has decreased in all terms of observation. Mastocytes and macrophages were characterized by a decrease in the degree of conjugation with receptors to peanut lectins, common golden crust, wheat germ and elderly black elder.

Key words: gums mucosa, morphological characteristics, chronic ethanol intoxication.

Віддруковано в ТОВ НВП «Укрпромторгсервіс»
36039, м. Полтава, вул. Пушкіна, 103, к. 102

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
суб'єкта видавничої справи ПЛ№9 від 20.06.2001
Підписано до друку 30.01.2019 р.

Формат 60X90/16. Папір офсетний. Друк офсетний.
Ум. друк. арк. 1,22. Наклад 100 прим.
Зам. №