



УДК 616.314.18-002-018-073

## УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ МОРФОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ПУЛЬПИ ЗУБА

Українська  
медична  
стоматологічна  
академія,  
м. Полтава

Павленко С.А.

Жодне дослідження не може вважатися достовірним, якщо воно не підтверджене практичними результатами, для досягнення яких використовуються різні методики.

Морфологічні особливості будови органів порожнини рота докладно вивчаються протягом багатьох років, але ще багато питань, які стосуються механізмів диференціації, транспорту, регенерації, міжклітинних та міжтканинних співвідношень у пульпі зуба, особливо при патології, лишаються недостатньо вивченими [1].

Питання морфофункціональних співвідношень у пульпі зуба в нормі, єдність та взаємозумовленість структурних змін і функцій окремого органа при запаленні з цієї точки зору виходять на перший план.

Метод виготовлення постійного гістологічного препарату пульпи зуба достатньо складний, та саме постійний гістологічний препарат використовується в наукових дослідженнях [2].

Тому метою стало проведення докладного опису методики, що застосовується для морфологічного дослідження пульпи зуба у плані підготовки її до ретрової та трансмісійної електронної мікроскопії.

Для виготовлення препарату для морфологічних досліджень необхідно одержати матеріал для досліджень. У нашому випадку - зуби, що видаляються з тієї чи іншої причини, якнайкраще підходять для такої мети.

Видалені зуби необхідно розколоти у струбціні та відразу ж помістити в 4% холодний розчин формальдегіду, ( рН 7,4 ), з додаванням 1% розчину хлористого кальцію, на 60 хвилин. Занурення досліджуваного матеріалу у фіксатор здійснюється з метою закріплення всіх гістологічних структур пульпи зуба у тому ж місці та стані, як і в живому зубі. Фіксація у свіжоприготованому формальдегіді забезпечує надійне збереження структури пульпи зуба, адже під час видалення зуба відбувається розрив судин, що проникають до його порожнини крізь верхівковий отвір кореневого каналу та крізь його бокові відгалуження. У цей момент різко знижується внутрішньосудинний та інтерстиційний тиск, утворюються інтерстиційні розриви, які нагадують осередки вакуольної атрофії [3]. Тому для повного збереження всіх структурних компонентів пульпи зуба, з метою подальшого їх дослідження, необхідно після видалення зуба якомога швидше помістити його в розчин фіксатора.

Як було зазначено вище, у ролі фіксатора використовують 4% розчин формальдегіду, що готується за формулою:

— 2 г параформальдегіду розчинити у 50 г 0,1 М фосфатного буфера ( рН 7,4 ), нагріти до 70°C постійно перемішуючи, охолодити та відфільтрувати. Приготований таким чином фіксатор має властивість стабілізувати тканину не денатуруючи білкові структури [4].

Після 60-хвилинної попередньої фіксації та повного розколу зуба в струбціні видалену пульпу необхідно розрізати гострим лезом на окремі блоки розміром 0,5 - 1 мм <sup>2</sup>, причому пульпа повинна знаходитися під свіжим розчином фіксатора ( формальдегіду ). Далі тканинні блоки пульпи зуба на 12 год. розташовують у холодильнику у флаконах, заповнених свіжоприготованою сумішшю 2% розчину глютарового альдегіду на фосфатному буфері ( рН 7,4 ) з додаванням 1% розчину хлористого кальцію. Після закінчення цього терміну фіксації необхідно провести відмивку тканинних блоків пульпи зуба від залишків альдегіду. Відмивку проводять у 0,1 М фосфатному буфері ( рН 7,4 ) із додаванням хлористого кальцію ( 0,5 мл CaCl<sub>2</sub> на 100 мл буфера ) у 4-6 свіжих порціях зазначеного розчину у проміжку часу від 2 до 24 год.

Для подальшого морфологічного дослідження необхідна додаткова фіксація тканинних блоків пульпи зуба, яка проводиться в осмієвому фіксаторі за методикою, запропонованою Millonig G. [5].

До складу фіксатора входить:

Розчин «А» 6,71%	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14 мл
Розчин «В» 2,52%	NaOH	8,5 мл
Розчин «С» 5,4%	р-н глюкози	5,5 мл
Розчин «Д» 2%	р-н OsO <sub>4</sub>	27,5 мл
Розчин «Е» 1%	р-н CaCl <sub>2</sub>	0,3 мл

Тканинні блоки пульпи протягом 2 год. повинні знаходитися у вищевказаному фіксаторі при t - 4° C.

Чотириокис осмію діє не лише як фіксатор, але й як контрастуюча речовина за рахунок того, що частина відновленого осмію після подальшої відмивки лишається у тканині пульпи. Ця властивість осмієвого фіксатора надає можливість його використання у процесі підготовки тканинних блоків до електронно-мікроскопічних досліджень. Осмієвий фіксатор рівномірно проникає на всю глибину тканинних блоків пульпи зуба, забезпечуючи надійне та повне збереження клітинних та неклітинних ультраструктур [6,7].

Після 2-годинної фіксації в осмії тканинні блоки пульпи зуба слід відмити від осмієвого фіксатора в 0,1 М фосфатному буфері ( рН 7,4 ) протягом 1 год. в 4-х свіжих порціях по 15 хв. у кожній.

Для проведення подальших досліджень тканинних блоків пульпи зуба їх необхідно зневоднити у спиртах зі зростаючою міцністю і переходом до ацетону за наведеного нижче схемою:

- 50° спирт - три свіжі порції по 10 хв.
- 70° спирт - три свіжі порції по 10 хв.
- 80° спирт - три свіжі порції по 10 хв.
- 95° спирт - три свіжі порції по 10 хв.
- 100° ацетон + 95° спирт 1 : 1 протягом 15 хв.
- 100° ацетон - три свіжі порції по 15 хв.

Це необхідно для того, щоб ретельно видалити воду з тканини пульпи зуба, ушільнити її, а потім просочити епоксидними смолами.

Насичення тканинних блоків пульпи зуба проводиться в епоксидній смолі і при цьому концентрація робо-



чої суміші с моли та ацетону змінюється поетапно:

- 100° ацетон + повна суміш смоли 3:1 - 30 хв.
- 100° ацетон + повна суміш смоли 1:1 - 30 хв.
- 100° ацетон + повна суміш смоли 1:3 - 30 хв.

Але цей спосіб має суттєвий недолік, який полягає в тому, що внаслідок насичення тканинних блоків пульпи зуба в три етапи вони мають малий ступінь щільності та недостатній ступінь збереження тканинних структур [8].

Щоб досягти більшого ступеня щільності тканинних блоків пульпи зуба, а також зберегти їхні структурні елементи, необхідно провести заливку цих блоків в епоксидну смолу ЕПОН - 812 за методикою, запропонованою нами ( заявка на винахід № 2001031761 від 16.03.2001 року).

Насичення тканинних блоків пульпи зуба проводиться за такою схемою:

- 100° ацетон + повна суміш смоли 3:1 — 30 хв.
- 100° ацетон + повна суміш смоли 2:1 — 30 хв.
- 100° ацетон + повна суміш смоли 1:1 — 30 хв.
- 100° ацетон + повна суміш смоли 1:2 — 30 хв.
- 100° ацетон + повна суміш смоли 1:3 — 30 хв.

Увівши два додаткові етапи насичення із проміжною концентрацією робочої суміші смоли, тим самим пом'якшивши вплив фіксуєчого розчину на клітинні структури, ми досягли кращого проникнення в них фіксуєчого розчину та забезпечили плавний перехід від етапу до етапу насичення і більш глибоке проникнення епоксидної смоли у тканинні структури пульпи зуба.

Цей спосіб заливки дозволяє досягти більшого ступеня щільності тканинних блоків пульпи зуба та разом з тим зберегти цілісність їхніх тканинних структур, запобігти деформаціям та появі артефактів у тканинних структурах [9, 10];

Після заливки насичені тканинні блоки пульпи зуба необхідно розмістити у повній суміші смоли ЕПОН - 812 у термостаті на 1 год. при  $t = +35^{\circ}\text{C}$ . Після цього насичені шматочки пульпи перенесли в желатинові капсули, розміщували їх у термостаті та проводили подальшу полімеризацію за схемою:

- При  $t = 35^{\circ}\text{C}$  — 24 год.
- При  $t = 45^{\circ}\text{C}$  — 24 год.
- При  $t = 60^{\circ}\text{C}$  — 24 год.

Після закінчення процесу полімеризації проводили ультратомування отриманих тканинних блоків, ув'язнених в епоксидній смолі, на ультратомах УМТП - 1 та ЛКБ ( 3 модель) за допомогою скляних ножів.

Таким чином, підготовлені за такою схемою тканинні блоки пульпи зуба надають змогу виготовити високої якості напівтонкі зрізи 0,2-4 мкм та 2-4 нм товщини і, як результат, можливість проведення якісної міжнародного рівня трансмісійної електронної мікроскопії, отримання достовірної внутрішньоклітинної та позаклітинної інформації під час дослідження ультраструктурної будови пульпи зуба в нормі та при патології.

#### Література

1. Ten. Cate A.R. Oral hystology. Development, structure and function. - Toronto: c.v. Mosby Company, 1989.- 466 p.
2. Луцик О.Д., Іванова А.Й., Кабак К.С. Гістологія людини . - Львів: Мир, 1992. - С. 5-11.
3. Ковальов Є.В. Структурний аналіз шляхів мікроциркуляції пульпи зубів людини в нормі та при пародонтози.: Автореф. дис. к. мед. н. - Полтава - Москва, 1978. - 20с.
4. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. - 488 с.
5. Millonig G. Further observation a phosphates buffer for osmium solutions in fixations. // V. International Congress EM, New York. - 1962.- P. 1-8.
6. Bahr G.F. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biological important substances. // Exp. Cell Res. - 1954. - №7. - P.457-479.
7. Bahr G.F. Continued studies about the fixation with osmium tetroxide. // Exp. Cell Res. - 1995. - №9. - P.277-285.
8. Карупу В.Я. Електронна мікроскопія. - К.: Вища школа, 1984.
9. Peters T., Ashley Ch. A. An frtifact in autoradiography due to binding of free amino acids to tissues by fixatives. // J. Cell Biol. - 1967. - №33. - P.53-60.
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH electron opaque strain in electron microscopy. // J. Cell Biol. - 1963. - 17. - P208-212.

Стаття надійшла  
6.06.2001 р.

#### Резюме

В настоящей статье дано докладное описание методики, применяемой в исследовательской практике для подготовки пульпы зуба к морфологическому рastroвому электронно-микроскопическому исследованию.

#### Summary

In present clause the report description of procedure used in explolatory practice for preparation of a pulp of dens to morphological raster-type microscopic examination is given.

