

© М.А. Волошин, Ю.О. Бурега

УДК 611.314.018.08.599.323.4

М.А. Волошин, Ю.О. Бурега

УНІФІКАЦІЯ СПОСОБІВ ГІСТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРОДОНТА ЩУРІВ ПІСЛЯ НАРОДЖЕННЯ

Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)

Робота є фрагментом НДР кафедри анатомії людини, оперативної хірургії і топографічної анатомії і кафедри гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету «Лектингістохімічна характеристика морфогенезу органів і тканин в ранньому постнатальному періоді в нормі і експерименті» (2008-2012, № держ. реєстрації 0109U 003986).

Вступ. У структурі запальних захворювань пародонту одне з провідних місць на сьогоднішній день належить хронічному генералізованому пародонтиту (ХГП). Це визначається високою захворюваністю генералізованим пародонтитом, його резистентністю до лікування, відсутністю високоефективної терапії, що призводить, в кінцевому рахунку, до швидкої втрати зубів [2,5]. Згідно з останніми дослідженнями ВООЗ, понад 90% населення планети старше 40 років страждають запальними захворюваннями пародонту, а в останні роки відзначається неухильне зростання захворюваності і серед осіб молодого і середнього віку. Медико-соціальне значення цієї патології зумовлене значною поширеністю захворювань пародонта: у осіб віком 15-19 років ці цифри складають 55-89%, у віці 35-44 років -65-98%, у старших вікових групах –досягає 98%.

Одним з визначальних чинників що призводять до порушення морфогенезу пародонта і як наслідок розвиток його патології є стан здоров'я вагітних, більше половини яких мають хронічні хвороби та системні функціональні розлади, що супроводжуються імунopatологічними станами, а саме антигенним впливом на плід. Подібні стани пов'язані зі значними змінами реактивності організму під постійним впливом численних неконтрольованих і практично непереборних факторів антигенної стимуляції в антенатальному періоді. Вивчення антигенного впливу на плід дозволить поглибити знання про морфогенез пародонта, що має першочергове значення для створення та вдосконалення ефективних методів лікування захворювань пародонта. Досконального вивчення реактивних змін та морфогенезу пародонта під дією антигенного впливу в антенатальному періоді можливо досягти шляхом гістологічного дослідження.

Мета роботи. Оптимізувати методику гістологічної обробки пародонту щурів для морфологічних досліджень.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводились на щелепах лабораторних щурів лінії Wistar. Щури розділені на 3 групи: 1 група – інтактні щури, 2 група – щури, яким на 18-ту добу вагітності введено 0,05 мл розчину антигену в навколишньоплідні води, 3 група – контрольна, тваринам якої на 18-ту добу вагітності виконано навколишньоплідне введення фізіологічного розчину. Для вивчення особливостей морфогенезу структур пародонта та лімфоїдної тканини, асоційованої з її слизовою ясен, на тлі дії антигенів на плід обрано модель черезматкового, черезоболонкового введення антигену в навколишньоплідні води. В якості антигену було обрано вакцину Vaxigrip 2003/2004.

Утримання тварин та експерименти проводились відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Забій тварин здійснювали з 13-00 до 14-00 на 1-шу, 3-ту, 7-му, 11-ту, 21-шу, 30-ту, 45-ту добу постнатального життя шляхом декапітації. Для дослідження брали фрагменти щелеп протягом декількох хвилин після забою. На кожен термін у всіх групах тварин були досліджені 5-6 щурів від 2-3 послідів.

Результати досліджень та їх обговорення. Фіксація препаратів здійснювалася в суміші Буена протягом 24 годин з подальшим зневодненням в батареї спиртів висхідних концентрацій 50%, 60%, 70% з експозицією 1 год. Проаналізувавши стандартні методики гістологічної обробки тканин, та беручи до уваги морфологічні особливості пародонта виникла необхідність оптимізації етапів обробки шматочків пародонту щурів для подальших досліджень.

При виборі методики декальцинації було віддано перевагу методиці безкислотної декальцинації Трилоном Б, що дало можливість зберегти всі клітинні та структурні елементи пародонту та слизової ясен. Критерії успішної декальцинації :

1. Повне видалення солей кальцію.

2. Відсутність в досліджуваних зразках ознак руйнування клітин і сполучнотканинних волокон.

3. Відсутність негативного впливу декальцинації на процес фарбування зразків кісткової тканини.

Безкислотна декальцинація рекомендується у разі необхідності проведення гістохімічних досліджень кісткових зразків. ЕДТА й її натрієві солі (версен, секвестрен, трилон Б, комплексон-III й ін) відносяться до хелатоутворюючих агентів що мають чудову властивість: їх розчини в комбінації з іонами кальцію формують легко розчинні негативно заряджені комплекси кальцію. При декальцинації в розчинах ЕДТА не утворюються бульбашки газу, внаслідок чого не пошкоджуються тканини. Використання ЕДТА й її солей запобігає порушенню фарбування зрізів декальцинованих кісткових зразків.

ЕДТА й її солі рекомендують використовувати для декальцинації зубів і кісток. Вони з успіхом можуть бути застосовані для вивчення лужної фосфатази й інших ферментів (які руйнуються в кислому середовищі при декальцинації), так, як ЕДТА можна використовувати при нейтральному рН. Для декальцинації зразків кісткової тканини щелеп піддослідних тварин (декальцинації піддавалися зразки тканин пародонта щурів 21,30,45 доби життя, зразки тканин 1, 3, 7, 11,14 діб життя не піддавалися декальцинації так, як була можливість отримати якісні зрізи без додаткової обробки кісткового матеріалу), було використано розчин що складається з 250г трилону Б, 50 мл 40% розчину гідроксиду натрію і 1000мл дистильованої води. рН розчину доведена до 7,4. за схемою: проведення в батареї спиртів низхідних концентрацій -60% -50% 40% з експозицією 2 години. Експозицію промивання в проточній воді було скорочено з 24годин [4,8] до 5 годин тому що тривале промивання в воді призводило до набрякання колагенових волокон та мацерації тканин. Декальцинація проводилася при температурі 370 С протягом 3 годин. Проведення декальцинації при підвищеній температурі, а також фіксація шматочків кісткової тканини в суміші Буена, яка містить пікринову та оцтову кислоти, що мають слабо виражені декальцинуючі властивості, дозволило зменшити

експозицію з 12-24 годин [4] до 3 годин щоб уникнути руйнівної дії декальцинуючого розчину на клітинні та структурні компоненти пародонта. Завершеність декальцинації оцінювалась за допомогою голкового тесту. Після завершення декальцинації зразки протягом 5 годин промивалися в проточній воді. Було змінено експозицію зневоднення в батареї спиртів висхідних концентрацій 40%- 50% -60% -70% - 80% -90% -96% -100% -100% з 12 [4,6,7] годин до 2 годин, що дозволило уникнути змінення об'єму клітинного ядра при надмірному зневодненні тканин. Це має суттєво важливе значення при кількісному та якісному вивченні популяції лімфоцитів, та зводить до мінімуму похибку дослідження.

Для запобігання пересушування тканин час подальшого зневоднення було змінено з 2 годин до 1години: спирт-хлороформ 2:1, спирт-хлороформ 1:1, спирт-хлороформ 1:2 з експозицією 1 годину, хлороформ з експозицією 45 хвилин, хлороформ-парафін 1:1, парафін 1, парафін 2 - 15 хвилин, з наступним заливанням парафіном.

Висновки. Проаналізувавши стандартні методики гістологічної обробки тканин, враховуючи морфологічні особливості пародонта, необхідність додаткової обробки матеріалу, а також збереження всіх клітинних та структурних елементів тканин призвело до необхідності оптимізації етапів обробки шматочків пародонту щурів для подальших досліджень. Було відкориговано експозиції декальцинації, промивання та зневоднення зразків, що дозволило значно скоротити час витрачений на приготування препаратів, зберегти, практично, без змін клітинний та структурний склад пародонта та отримати якісні зрізи тканин для подальших досліджень.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дають змогу вдосконалити та спростити методики підготовки матеріалу для гістологічних досліджень, скоротити час підготовки матеріалу та зберегти клітинні та структурні елементи пародонту щурів у незмінному вигляді для подальшого вивчення кількісного та якісного клітинного і структурного складу пародонта.

Список літератури

1. Волошин, Н.А. Лимфоцит фактор морфогенеза / Н.А. Волошин // Запорожский медицинский журнал. - 2005. - № 5. - С. 123.
2. Иванов В.С. Заболевания пародонта (3-е изд., перераб. и доп.) / В.С. Иванов. - М.: Мед. информ. агенство, 1998. - 295 с.
3. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. - Л.: Мир, 1969. - 645 с.
4. Мащенко И.С. Значение иммунологических и нейрогуморальных расстройств в патогенезе пародонтита / И.С. Мащенко // Заболевания пародонта и иммунная система : Матер.симп. - Казань, 1990. - С. 11-12.
5. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники / Меркулов Г.А. // Ленинградское отделение : Медицина, 1969. - 423 с.
6. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника (руководство для врачей и лаборантов) / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 544 с.
7. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. - М., Иностранная литература, 1954. - 718 с.

УДК 611.314.018.08.599.323.4

УНІФІКАЦІЯ СПОСОБІВ ГІСТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРОДОНТА ЩУРІВ ПІСЛЯ НАРОДЖЕННЯ Волошин М.А. Бурега Ю.О

Резюме. Морфофункціональні особливості та реактивні зміни у пародонті та слизові ясен характеризуються змінами кількісного та якісного клітинного і структурного складу. Традиційні методи гістологічної обробки тканин пародонта та слизової ясен не завжди дозволяють зберегти клітинні та структурні елементи у незмінному вигляді. У зв'язку з цим виникла обґрунтована доцільність оптимізувати методи гістологічної обробки зразків пародонта та слизової ясен щурів. Дієвість та ефективність запропонованої уніфікації підтверджена подальшим забарвленням та вивченням зразків пародонта щурів.

Ключові слова: щури, пародонт, гістологічне дослідження, декальцинація.

УДК 611.314.018.08.599.323.4

УНИФИКАЦИЯ СПОСОБОВ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРОДОНТА КРЫС ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ

Волошин Н.А. Бурега Ю.А

Резюме. Морфофункциональные особенности и реактивные изменения в пародонте и слизистой десен характеризуются изменениями количественного и качественного клеточного и структурного состава. Традиционные методы гистологической обработки тканей пародонта и слизистой десен не всегда позволяют сохранить клеточные и структурные элементы в неизменном виде. В связи с этим возникла обоснованная целесообразность оптимизировать методы гистологической обработки образцов пародонта и слизистой десен крыс. Действенность и эффективность предложенной унификации подтверждена последующей окраской и изучением образцов пародонта крыс.

Ключевые слова: крысы, пародонт, гистологическое исследование, декальцинация.

UDC 611.314.018.08.599.323.4

Unification Of Methods Of Histological Study In Rats After Periodontal Birth Voloshin N.A. Burega Y.A.

Summary. Morphological characteristics and reactive changes in periodontal and gingival mucosa are characterized by qualitative and quantitative changes of cellular and structural composition. Traditional methods of histological processing of periodontal tissue and gingival mucosa is not always possible to maintain the cellular and structural elements intact. In this connection there was a reasonable expediency optimize methods of histological processing of samples and periodontal gingival mucosa of rats. Efficiency and effectiveness of the proposed unification of color and confirmed by subsequent studies of samples of periodontal rats.

Key words: rat, periodontium, histology, decalcification.

Стаття надійшла 29.07.2011 р.