

УДК: 616.314.17–008.1–02:615.462.03

Зв'язок між модифікацією глікополімерів ясен людини та порушенням мікроциркуляції на тлі запалення

The Connection Between the Modification of Human Gum Glycopolymers and Microcirculation Disorders During Inflammation

**Зубачик В.М., д.мед.н., проф.,
Яричківська Н.В., ас., Паска М.І.,
лікар, Заставний І.І., ас.**

Львівський національний медичний
університет ім. Данила Галицького
Zubachyk V.M., Yarychkivska N.V., Paska M.I.,
Zastavnyy I.I.
Danylo Halytskyi Lviv National Medical
University

Адреса для кореспонденції:
Зубачик Володимир Михайлович
e-mail: zubachyk_volodymyr@meduniv.lviv.ua

Мета: Дослідити зв'язок між модифікацією глікополімерів ясен людини та порушеннями мікроциркуляції на тлі запалення за допомогою загальногістологічних методик та із застосуванням лектинопероксидазної техніки. **Методи:** Проводили гістохімічне вивчення біопатитів ясен у пацієнтів з пародонтитом та клінічно здорових осіб. Вуглеводні залишки оцінювали за допомогою лектинів різної вуглеводної специфічності — WGA та SNA. **Результати:** При запаленні ясен сполучнотканинні сосочки високі, інтенсивно проліферує епітелій у власну пластинку, яка набрякає і відшаровується. Кількість мікросудин збільшується, їхня стінка потовщена та гіалінізована, просвіт звужений, є скупчення еритроцитів, адгезованих до клітин ендотелію. У хворих на пародонтит в яснах інтенсивно накопичується лектин WGA в колагенових волокнах і фібробластах власної пластинки, поверхневому та базальному шарах епітелію, а також акумулюється в ендотелії судин мікроциркуляторного русла. Високий рівень вуглеводних детермінант в ендотелії спричиняє прокоагулянтні зміни у крові. Лектин SNA не виявив реактивності в жодній із досліджуваних груп. **Висновки:** При запаленні змінюється гістологічна будова ясен, збільшується кількість судин мікроциркуляторного русла, потовщуються та гіалінізуються їхні стінки. Зміна вуглеводного складу ендотелію судин мікроциркуляторного русла порушує гемостаз тканин пародонта, погіршує в ньому перебіг запального процесу. При цьому лектин WGA може бути маркером стану як клінічно інтактних ясен, так і запального процесу при хворобах пародонта.

Ключові слова: ясна, запалення, глікополімери, мікроциркуляторне русло.

Purpose: To investigate the connection between the modification of human gum glycopolymers and microcirculation disorders during inflammation using histological methods and lactoperoxidase. **Methods:** Histochemical examination of gums in patients with periodontitis and with clinically healthy periodontium was performed. The carbohydrate residues were evaluated using lectins of different carbohydrate specificity WGA and SNA. **Results:** In the inflammatory process, the connective tissue papillae are high, the epithelium intensively proliferates into lamina propria, which can swell and dissect. The number of microvessels increases, their walls become thickened and hyalinized, the lumen is narrowed, aggregation of erythrocytes adhered to endothelial cells is observed. In patients with periodontitis lectin WGA intensively accumulates in collagen fibers and fibroblasts of lamina propria, superior and basal layers of the epithelium, and also accumulates in the endothelium of vessels of the microcirculatory bed. A high level of carbohydrate determinants in the endothelium causes procoagulant changes in the blood. Lectin SNA did not show reactivity either in the control group or in the study group. **Conclusions:** In inflammation, the histological structure of the gums changes, the number of vessels in the microcirculatory bed increases, the walls of the cells become thickened and hyalinized. Changes in the hydrocarbon composition of the blood vessels endothelium of the microcirculatory bed disturbs the hemostasis of periodontal tissues, worsening the course of inflammatory process. Lectin WGA can serve as a marker for clinically intact gums and inflammation process in periodontal disease.

Key words: gums, inflammation, glycopolymers, microcirculatory bed.

ВСТУП

Судинні порушення мікроциркуляторного руслу тканин пародонта суттєво впливають на формування і перебіг хронічного генералізованого пародонтиту (ХГП). Дисфункція ключової ланки мікросудин – ендотелію спричиняє порушення гемостазу, призводить до патологічних змін у навколосудинних тканинах [3, 5].

Поверхня ендотеліальних клітин, що спрямована у просвіт судини, в нормі має антикоагулянтні властивості, які забезпечуються наявністю глікокаліксу, – від'ємно зарядженої вуглеводної сітки на поверхні ендотелію, яка представлена глікопротеїнами та протеогліканами [10]. З іншого боку фібриноген, як центральний білок системи згортання крові, маючи «біоантенну» структуру вуглеводних компонентів, що складається із залишків N-ацетилглюкозаміну, маннози, галактози та сілової кислоти і подібний до структури вуглеводних компонентів плазміногену, трансферину, може прямо зв'язуватися з рецепторами мембран ендотеліальних клітин [7]. Це призводить до активування сигнальних механізмів і, як наслідок, до порушення цілісності ендотеліальних клітин, значного зростання проникності кровоносних судин [4]. Запальні процеси послаблюють антикоагулянтні властивості ендотелію і можуть перетворювати їх у прокоагулянтні [11]. Водночас знижується антитромботичний і фібринолітичний потенціал ендотелію, однією із причин чого є порушення структури глікокаліксу [12].

Одними із найпростіших і найінформативніших гістологічних методів

розпізнавання окремих вуглеводних детермінант і їхніх модифікацій є застосування лектинопероксидазної реакції [1, 9]. Аналіз динаміки активності цих реакцій у цитоплазмі та на поверхні клітинних мембран дозволяє отримати відповідь щодо рівня функціональної активності клітин, наявності запального процесу в тканині та порушення рецепторних і антикоагулянтних властивостей ендотелію судин [2, 6]. Мета роботи – дослідити зв'язок між модифікацією глікополімерів ясен людини та порушеннями мікроциркуляції на тлі запалення за допомогою загальногістологічних методик та із застосуванням лектинопероксидазної техніки із лектинами різної вуглеводної специфічності.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Дослідження проводили згідно з основними стандартами GCP (1996), Європейської конвенції із прав людини та біомедицини від 04.04.1997, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження» (1964–2008), Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 та за інформованою згодою пацієнтів.

Проводили гістохімічні дослідження 12 біоптатів ясен пацієнтів із хронічним генералізованим пародонтитом (ХГП) (досліджувані зразки) та 8 біоптатів ясен клінічно здорових людей (контрольні зразки). Забирали біопсійний матеріал під провідниковим знечуленням в осіб із клінічно здоровим пародонтом під час видалення зубів, а у хворих на ХГП – у процесі хірур-

гічного втручання на пародонті. Біологічний матеріал тричі промивали у забуференому фізіологічному розчині, фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну та заливали у парафін за стандартною схемою [8]. Для вивчення загальної морфології зрізи товщиною 6 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином. Вуглеводні залишки оцінювали за допомогою набору із 2-х лектинів (WGA та SNA) методиками, рекомендованими виробником (лабораторія «Лектинотест», Львів, Україна). У табл. 1 охарактеризовано вуглеводну специфічність лектинів.

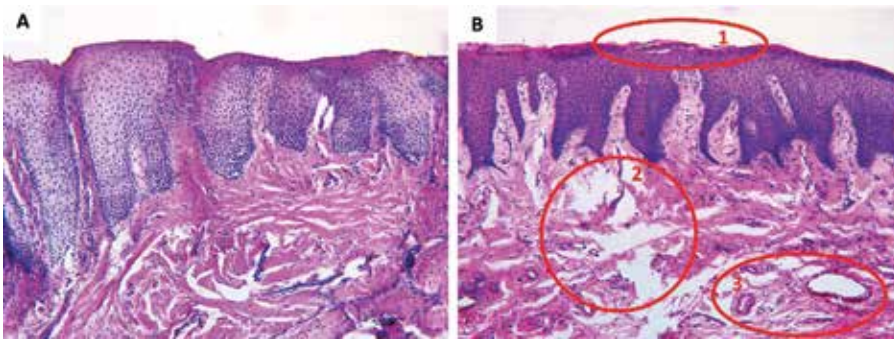
Лектинопероксидазна техніка. Депарафіновані зрізи інкубували упродовж 45 хв за кімнатної температури в лектинопероксидазі (25 µg/ml) (лабораторія «Лектинотест») у забуференому фізіологічному розчині, pH 7,4. Візуалізували рецептори лектинів за допомогою 0,05% розчину діамінобензидину тетрагідрохлориду («Sigma, St. Louis, MO», США) із додаванням 0,015% H₂O₂. Контроль реакції проводили виключенням лектину із протоколу та виключенням реакції інгібування ендогенної пероксидази метанолом [1]. Активність реакції оцінювали за 4-бальною шкалою, де 0 – негативна реакція, 1 – слабка реакція, 2 – помірна реакція, 3 – сильна реакція.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

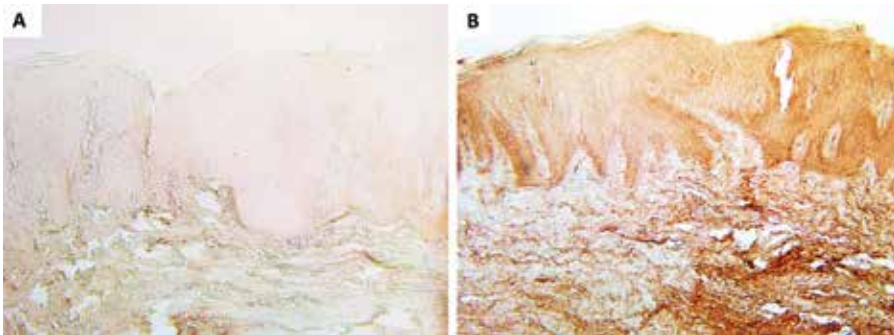
Оглядом, забарвленим гематоксиліном та еозином, препарати зразків контрольної групи показали, що ясна людини мають основні гістологічні складові: багат шаровий плаский незроговілий епітелій (базальний, остистий шари та

Таблиця 1. Назва та вуглеводна специфічність лектинів

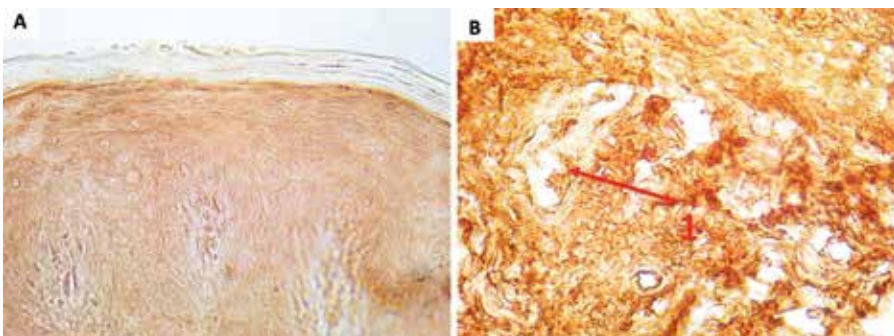
Скорочена назва лектину і джерело отримання	Вуглеводна специфічність
SNA, Sambucus nigra agglutinin (бузина чорна)	NeuNAc(α2-6)DGal (сіалова кислота і D-галактоза)
WGA, Triticum PNA vulgare (зародки пшениці)	NAcDGlс (N-Ac-D-глюкозамін)



Мал. 1. Препарати ясен людини, забарвлені гематоксилином і еозином: А — контрольні зразки клінічно здорових осіб ($\times 100$); В — досліджувані зразки хворих на ХГП ($\times 100$). 1 — відшарування частково зроговілого епітелію, набряк власної пластинки, 3 — гіалінізація та потовщення стінки судин мікроциркуляторного русла



Мал. 2. Препарати ясен людини, мічені лектином WGA: А — контрольні зразки тканин ясен ($\times 100$); В — досліджувані зразки ($\times 100$)



Мал. 3. Препарати ясен людини, мічені лектином WGA: А — контрольні зразки здорових осіб ($\times 400$); В — досліджувані зразки тканин хворих на ХГП ($\times 400$). 1 — адгезія еритроцитів до судинної стінки

шар плоских клітин), частково зроговілий епітелій на його поверхні, поверхневі та глибокі шари власної пластинки, до складу якої входять колагенові волокна, фібробласти, фіброцити, лейкоцити та, переважно, незаповнені елементами крові порожні судини мікроциркуляторного русла (мал. 1 А). У дослідних зразках тканин ясен, забарвлених гематоксилином та еозином, усі гістологічні структури у пацієнтів із ХГП були збережені, однак спостерігали відшарування, набрякання власної пластинки слизової оболонки та частково зроговілого епітелію, сполучнотканинні сосочки високі, у деяких пацієнтів встановили інтенсивну проліферацію епітелію у власну пластинку. Колагенові волокна розшаровані і

спрямовані в різних напрямках. Спостерігали більшу кількість судин мікроциркуляторного русла, при цьому їхня стінка була потовщена та гіалінізована, просвіт судин мікроциркуляторного русла звужений, відзначали скупчення еритроцитів, адгезованих до клітин ендотелію (мал. 1 В). Ці зміни можуть вказувати на розвиток запального процесу в досліджуваній тканині, зокрема на її набрякання та гіперемію. Для дослідження вуглеводних детермінант ясен людини за допомогою лектинопероксидазної реакції використовували панель із 2-х лектинів (WGA та SNA). Результати підтвердили, що при використанні NAcDGlс-специфічного лектину зародків пшениці (WGA) відзначалася більша кількість рецепторів

до цього лектину в гістологічних структурах досліджуваних зразків хворих на ХГП, порівняно із контрольними (мал. 2). В останніх спостерігали окремі ділянки накопичення у волокнах власної пластинки. При запаленні ясен у тканинах простежувалося інтенсивніше накопичення лектину WGA в колагенових волокнах і фібробластах власної пластинки, поверхневому та базальному шарах епітелію, зокрема збільшився вміст N-Ас-D-глюкозаміну, що є переважно компонентом глікокаліксу клітин остистого шару епітеліальної пластинки, які беруть участь у формуванні десмосомних міжклітинних контактів, а також перинуклеарному просторі. Окрім цього, за допомогою лектину

WGA, який у досліджуваних зразках акумулювався в ендотелії судин мікроциркуляторного русла, місцями спостерігали адгезію еритроцитів до їхніх стінок (мал. 3 В). Також слід відзначити, що псевдозроговілий епітелій не має рецепторів до цього лектину (мал. 3 А).

Лектин бузини чорної (SNA) не виявив реактивності ні в контрольній, ні в досліджуваній групах. Відсутність рецепторів SNA специфічного до сіалової кислоти у пацієнтів з пародонтитом викликає зміну рН на

поверхні слизової оболонки ясен, що також може спричиняти виникнення патологічного процесу. NAcDGlс-специфічний лектин WGA підтвердив накопичення глікополімерів із цими залишками в колагенових волокнах власної пластинки та епітелії ясен при запальному процесі. Високий рівень експресії рецепторів до цього лектину в ендотелії судин мікроциркуляторного русла та адгезія еритроцитів до нього можуть вказувати на те, що зміна вуглеводних детермінант веде до прокоагулянтних змін під час за-

пального процесу ясен. Що стосується псевдокератинізованого епітелію, то WGA показав відсутність рецепторів на його поверхні, що підтверджує його функціональну неактивність та виконання власне механічної, захисної функції. Підсумовані результати дослідження наведено в табл. 2.

ВИСНОВКИ

Під час запального процесу змінюється гістологічна будова ясен, зростає кількість судин мікроциркуляторного русла, потовщуються та гіалінізуються їхні стінки. Після використання лектиногістохімічної техніки лише NAcDGlс-специфічний лектин WGA показав реактивність у тканині ясен до судин мікроциркуляторного русла. Отримані результати дозволили припустити, що зміна відповідного вуглеводного складу ендотелію судин призводить до розвитку його прокоагулянтної активності, порушує мікроциркуляцію та погіршує перебіг запального процесу. Відповідно, лектин WGA може бути селективним маркером стану клінічно інтактних ясен і запального процесу при хворобах пародонта.

Таблиця 2. Рівень експресії рецепторів лектинів ясен у контрольних зразках клінічно здорових осіб та досліджуваних зразках хворих на ХГП

	Структурні компоненти	Контрольна група	Досліджувана група
WGA	Частково зроговілий епітелій	0	0
	Багатошаровий плаский незроговілий епітелій	1	2
	Власна пластинка	1	2
	Судини мікроциркуляторного русла	1	3
SNA	Частково зроговілий епітелій	0	0
	Багатошаровий плаский незроговілий епітелій	0	0
	Власна пластинка	0	0
	Судини мікроциркуляторного русла	0	0

Примітки: 0 — негативна реакція, 1 — слабка реакція, 2 — помірна реакція, 3 — сильна реакція

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. — Л.: Кварт, 2005.— 551 с.
2. Зубачик В.М. Дослідження глікокон'югатів структурних компонентів клітин слизової оболонки ясен у хворих на пародонти / В.М. Зубачик, І.Р. Федун // Сучасні технології профілактики та лікування в стоматології: Мат. II (IX) з'їзду Асоціації стоматологів України (м. Київ, 22 лютого-24 лютого 2005 р.). — К., 2005. — С. 223.
3. Зубачик В.М. Патогенетичне значення дисфункції ендотелію судин мікроциркуляторного русла пародонту у формуванні та перебігу генералізованого пародонтиту / В.М. Зубачик, Ю.В. Ризник // Современная стоматология. — 2013. — №4 (68). — С. 50–53.
4. Луговский Э.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Физико-химический и иммунохимический анализ / Э.В. Луговский, Е.М. Макогоненко, С.В. Комисаренко. — К.: Наукова думка, 2013. — 230 с.
5. Ризник Ю.Б. Ультраструктура гемомікроциркуляторного русла пародонта у пацієнтів с генералізованим пародонтитом / Ю.Б. Ризник, В.И. Ковалишин // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2014. — №2 (10). — С. 9–13.
6. Селективність зв'язування лектинів із структурними компонентами слизової оболонки ясен у хворих на пародонтит / В.М. Зубачик, А.М. Яценко, О.В. Смолькова, І.Р. Федун, О.Д. Луцик // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Збірник наук. статей, вип. XI / Роль імунної, ендокринної та нервової систем в процесах морфогенезу та регенерації. — 2003. — С. 56–60.
7. Blomback B. Fibrinogen and fibrin — proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis / B. Blomback // Thromb. Res. — 1996. — Vol. 83, №1. — P. 1–75.
8. Maynard R. Histological Techniques: an introduction for beginners in toxicology / R. Maynard, N. Downes, B. Finney. — London: Royal Society of Chemistry, 2014. — 334 p.
9. Morphological and lectin histochemical features of white nonlinear rats myocardium during experimental hypothyroidism / I. Zastavnyy, A. Yashchenko, O. Smolkova, Kh. Strus, L. Pankevych. — Journal of Advances in Biology. — 2016. — Vol. 9, № 2. — P. 1866–1871.
10. Nieuwenhuizen W. A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen subcommittee of the scientific and standardization committee of the international society of thrombosis and haemostasis / W. Nieuwenhuizen // Thromb. Haemost. — 1997. — Vol. 77, № 5. — P. 1031–1033.

11. Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis / S. Strukova // *Front Biosci.* – 2006. – 11. – P. 59–80.
12. Van Hinsbergh V.W. Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation / V.W. Van Hinsbergh // *Semin. Immunopathol.* – 2012. – Vol. 34, № 1. – P. 93–106.

REFERENCES

1. Antoniuk, V.O. (2005). *Lektyny ta yikh syrovynni dzhherela.* L.: Kvart, 551 s. (in Ukrainian).
2. Zubachyk, V.M., & Fedun, I.R. (2005). Doslidzhennia hlikokoniuhativ strukturnykh komponentiv klityn slyzovoi obolonky yasen u khvorykh na parodonty // Suchasni tekhnologii profilaktyky ta likuvannia v stomatologii: *Mat. II (IX) zizdu Asotsiatsii stomatolohiv Ukrainy* (m. Kyiv, 22 liutoho-24 liutoho 2005 p.). K., s. 223 (in Ukrainian).
3. Zubachyk, V.M., Riznyk, & Yu.V. (2013). Patohenetychne znachennia dysfunktsii endoteliiu sudyn mikrotsyrukulatornogo rusla parodontu u formuvanni ta perebihu heneralizovanoho parodontytu. *Sovremennaiia stomatolohyia*, no. 4 (68), s. 50–53 (in Ukrainian).
4. Lugovskij, Je.V., Makogonenko, E.M., & Komisarenko, S.V. (2013). *Molekuljarny mehanizmy obrazovaniia i razrusheniia fibrina.* Fiziko-himicheskij i immunohimicheskij analiz. K.: Naukova dumka, 230 s. (in Russian).
5. Riznyk, Ju.B., & Kovalishin, V.I. (2014). Ul'trastruktura gemomikrocirkuljatornogo rusla parodonta u pacientov s generalizovannym parodontitom. *Klinicheskaja i jeksperimental'naja morfologija*, no. №2 (10), s. 9–13 (in Russian).
6. Zubachyk, V.M., Yashchenko, A.M., Smolkova, O.V., Fedun, I.R. Lutsyk, O.D. (2003). Selektivnist zviazuvannia lektyniv iz strukturnymy komponentamy slyzovoi obolonky yasen u khvorykh na parodontyt. *Aktualni pytannia farmatsevtichnoi ta medychnoi nauky ta praktyky: Zbirnyk nauk. statei, vyp. XI. Rol imunnoi, endokrynnoi ta nervovoi system v protsesakh morfohenezu ta reheneratsii*, s. 56–60 (in Ukrainian).
7. Blomback, B. (1996). Fibrinogen and fibrin – proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis. *Thromb. Res.*, vol. 83, no. 1, p. 1–75 (in English).
8. Maynard, R., Downes, N., & Finney, B. (2014). *Histological Techniques: an introduction for beginners in toxicology.* London: Royal Society of Chemistry, 334 p. (in English).
9. Zastavnyy, I., Yashchenko, A., Smolkova, Strus, Kh., & Pankevych, L. (2016). Morphological and lectin histochemical features of white nonlinear rats myocardium during experimental hypothyroidism. *Journal of Advances in Biology*, vol. 9, no. 2, p. 1866–1871 (in English).
10. Nieuwenhuizen, W. (1997). A reference material for harmonisation of D-dimer assays. Fibrinogen subcommittee of the scientific and standardization committee of the international society of thrombosis and haemostasis. *Thromb. Haemost.*, vol. 77, no. 5, p. 1031–1033 (in English).
11. Strukova, S. (2006). *Blood coagulation-dependent inflammation.* Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis. *Front Biosci.*, 11, p. 59–80 (in English).
12. Van Hinsbergh, V.W. (2012). Endothelium – role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.*, vol. 34, no. 1, p. 93–106 (in English).

Стаття надійшла в редакцію 10 травня 2018 року