

Особливості морфофункціонального стану привушних слинних залоз шестимісячних щурів при експериментально модельованій внутрішньоутробній макросомії

О. В. Гармаш^{*1,A-D,F}, Г. І. Губіна-Вакулік^{1,C,E}, Давід Вондрашек^{2,B}

¹Харківський національний медичний університет, Україна, ²Інститут фізіології, Академія Наук Чеської Республіки, м. Прага

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

макросомія плода, експериментальні тварини, привушні слинні залози.

Патологія. – 2019. – Т. 16, № 1(45). – С. 106–115

DOI: 10.14739/2310-1237.2019.1.166469

*E-mail: o.v.garmash@gmail.com

Стаття присвячена вивченню особливостей морфофункціонального стану тканини привушної слинної залози шестимісячних щурів, які народилися з експериментально модельованою макросомією в різних варіаціях. Відомо, що кількість та якість слини є важливими факторами стану здоров'я/патології зубів та ясен.

Мета роботи – на моделях макросомії плода в шестимісячних лабораторних тварин оцінити морфофункціональний стан привушних слинних залоз і порівняти його з таким у тримісячних щурів.

Матеріали та методи. Застосували 4 моделі макросомії з використанням гіперкалорійної їжі та гіпокінезії для вагітних самок щурів Wistar Albino Glaxo. Після народження щурів-нащадків зважили та поділили на групи за масо-ростовими параметрами. Сформували групу контролю та 4 основні групи тварин-макросомів: із великою довжиною тіла та відносно зниженою масою тіла; з гармонійним внутрішньоутробним розвитком; зі стандартною довжиною тіла та внутрішньоутробним ожирінням; зі стандартною довжиною тіла та внутрішньоутробним ожирінням, у формуванні якого одним із факторів була гіпокінезія вагітної самки. У віці 6 місяців щурів-нащадків вивели з експерименту. Оцінювали абсолютні та відносні значення маси слинних залоз.

Після парафінової заливки слинних залоз виконали гістологічний аналіз із виявленням ДНК і РНК (забарвлення галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном); для виявлення глікопротеїдів поставили PAS-реакцію. Використовуючи комп'ютерні зображення, виконали вимірювання площі ядер сероцитів, оцінили вміст ДНК в ядрі, РНК у цитоплазмі. На зображеннях, що одержали за допомогою конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії, обчислили площу поперечного перерізу та периметр ацинусу привушної слинної залози, а також площу поперечного перерізу сероцита. Поставили імуногістохімічну реакцію на Caspase 3.

Результати. У тварин, які народилися макросомами із гармонійним внутрішньоутробним розвитком та внутрішньоутробним ожирінням, у віці 6 місяців в привушних слинних залозах виявили ознаки апоптозу сероцитів, розширення і склерозу строми та макрофагально-лімфоцитарного інфільтрату строми. Максимальні ці явища у тварин, формування макросомії яких відбувалося шляхом гіперкалорійної дієти та гіпокінетичних умов утримання вагітної самки. Також у тварин цих груп спостерігали збільшення ядер сероцитів, еухромність ядер, тобто підвищення морфофункціональної активності окремого сероцита. У макросомів, які народилися з ознаками дефіциту маси тіла, спостерігали «острівці» неактивних, запасних сероцитів, морфофункціональне навантаження функціонуючих сероцитів невисоке, а ознаки пошкодження, компенсаторні процеси відсутні.

Порівняння морфофункціонального стану слинної залози у три- і шестимісячних щурів показало, що вікове збільшення слинної залози було менш вираженим у тварин, які народилися макросомами із дефіцитом маси тіла та з надлишком маси тіла, порівняно з групою контролю. У макросомів, які народилися із ознаками дефіциту маси тіла, виявили ознаки функціонування, котре можна вважати економним, а у тварин, які народилися з внутрішньоутробним ожирінням, розвиваються ознаки атрофізації слинної залози з компенсаторною морфофункціональною активацією функціонуючих сероцитів.

Висновки. Соматометричні особливості макросомії при народженні «впливають» на морфофункціональні особливості слинної залози тварин-нащадків віком 6 місяців (зрілий вік).

Ключевые слова:

макросомия плода, экспериментальные животные, околоушные слюнные железы.

Патология. – 2019. – Т. 16, № 1(45). – С. 106–115

Особенности морфофункционального состояния околоушных слюнных желез шестимесячных крыс при экспериментально моделированной внутриутробной макросомии

О. В. Гармаш, Г. И. Губина-Вакулік, Давид Вондрашек

Статья посвящена изучению особенностей морфофункционального состояния ткани околоушной слюнной железы шестимесячных крыс, родившихся с экспериментально моделированной в различных вариациях макросомией. Известно, что количество и качество слюны – важные факторы состояния здоровья / патологии зубов и десен.

Цель работы – на моделях макросомии плода у шестимесячных лабораторных животных оценить морфофункциональное состояние околоушных слюнных желез и сравнить его с таковым у трехмесячных животных.

Материалы и методы. Использовали 4 модели макросомии с применением гиперкалорийной пищи и гипокинезии беременных самок крыс Wistar Albino Glaxo. После рождения крыс-потомков взвесили и поделили на группы с учетом

вычисленных массо-ростовых параметров. Сформировали группу контроля и 4 основные группы животных-макросомов: с большой длиной тела и относительно пониженной массой тела; с гармоничным внутриутробным развитием; со стандартной длиной тела и внутриутробным ожирением; со стандартной длиной тела и внутриутробным ожирением, в формировании которого одним из факторов была гипокинезия беременной самки. В возрасте 6 месяцев крыс-потомков вывели из эксперимента. Оценивали абсолютные и относительные значения массы слюнных желез.

После парафиновой заливки слюнных желез проведен гистологический анализ с установлением ДНК и РНК (окраска галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону), для выявления гликопротеидов поставлена PAS-реакция. С использованием компьютерных изображений измерили площадь ядер сероцитов, оценили содержание ДНК в ядре, РНК в цитоплазме. На изображениях, полученных с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, вычислили площадь поперечного сечения и периметр ацинуса околоушной слюнной железы, а также площадь поперечного сечения сероцита. Поставили иммуногистохимическую реакцию на Caspase 3.

Результаты. У животных, родившихся макросомами с гармоничным внутриутробным развитием и внутриутробным ожирением, в возрасте 6 месяцев в околоушных слюнных железах обнаружены признаки апоптоза сероцитов, расширения и склероза стромы, а также макрофагально-лимфоцитарного инфильтрата стромы. Максимально эти явления представлены у животных, формирование макросомии которых происходило за счет гиперкалорийной диеты и гипокинезии беременной самки. Также у животных этих групп отмечено увеличение ядер сероцитов, зухромность ядер, то есть повышение морфофункциональной активности отдельного сероцита. У макросомов, которые родились с признаками дефицита массы тела, обнаружены «островки» неактивных запасных сероцитов, морфофункциональная нагрузка функционирующих сероцитов невысокая, а признаки повреждения и компенсаторные процессы отсутствуют.

Сравнение морфофункционального состояния слюнной железы у трех- и шестимесячных животных показало, что возрастное увеличение слюнной железы менее выражено у животных, родившихся макросомами с дефицитом массы тела и с избытком массы тела, по сравнению с группой контроля. У макросомов, которые родились с дефицитом массы тела, установлены признаки функционирования, которое можно считать экономным, а у животных, родившихся с внутриутробным ожирением, развиваются признаки атрофизации слюнной железы с компенсаторной морфофункциональной активацией функционирующих сероцитов.

Выводы. Соматометрические особенности макросомии при рождении «влияют» на морфофункциональные особенности околоушной слюнной железы животных-потомков в возрасте 6 месяцев (зрелый возраст).

Features of the morphofunctional state of parotid salivary glands in six-month-old rats with experimentally induced fetal macrosomia

O. V. Garmash, H. I. Gubina-Vakulik, David Vondrášek

The paper aims at studying the features of the morphofunctional state of parotid gland tissue in six-month-old rats born with induced macrosomia in its different variations. It has been known that the amount and quality of saliva are important indicators of teeth and gums health condition.

The aim of the study is to examine experimentally the features of postnatal morphogenesis of parotid salivary glands in six-month-old rats with fetal macrosomia and compare the morphofunctional condition of parotid glands between two groups of 6-month-old and 3-month-old rats with induced macrosomia.

Materials and methods. Four macrosomia models have been used by applying a high-calorie diet and hypokinesia to pregnant Wistar rats. After birth, the descendant rats have been weighed and divided into groups taking into account their calculated weight-length parameters. Four main groups and a comparison group have been created. The main (macrosomic) groups consist of species with the following parameters: (1) long body length and relatively decreased body weight; (2) balanced intrauterine development; (3) standard body length and intrauterine obesity; (4) standard body weight and intrauterine obesity induced by hypokinesia of a pregnant female rat. At the age of 6 months, the rats have been sacrificed. The absolute and relative weights of parotid glands have been evaluated.

A histopathologic analysis revealing DNA and RNA (Gallocyanin-chrome alum technique) has been carried out after coating the parotid glands with paraffin; the PAS-reaction has been used to reveal glycoproteins. The serocytes nuclei cross section, the content of DNA in the cell nucleus, and the content of RNA in cytoplasm have been measured using computer images. Using the images obtained with confocal laser scanning microscopy, the gland acini cross section and the acini cross section perimeter of the parotid gland have been measured. The same technique has been used to measure the serocyte cross section. Caspase-3 immunohistochemical staining has been performed.

Results. The macrosomic animals born with balanced intrauterine development and intrauterine obesity have shown signs of serocyte apoptosis, stroma widening and sclerosis, and the macrophage-lymphocyte infiltration of parotid gland stroma at the age of six months. Such manifestations attain their maximum in the animals whose macrosomia is induced by the hyper-calorie diet and the hypokinetic conditions in the pregnant rat females. Also, the enlargement and euchromatization of serocytes nuclei is observed in the animals in these groups, which indicate an increase in the morphofunctional activity of an individual serocyte. In the macrosomic rats born with signs of body mass deficiency, the islets of inactive serocytes are observed, the morphofunctional load of serocytes is relatively low, and in addition, there are no signs of serocytes failure or active compensatory processes.

Comparison of the morphofunctional condition of the parotid gland at the age of 3 and 6 months has revealed that the age-specific enlargement of the parotid gland is less in the rats born with macrosomia and with both body mass deficiency and obesity, than that in the comparison group. The rats born with signs of body mass deficiency show an economic type of

Key words:

fetal macrosomia, experimental animal models, parotid gland.

Pathologia

2019; 16 (1), 106–115

gland functioning, whereas the animals born with intrauterine obesity show signs of parotid gland atrophy with compensatory morphofunctional activation of functioning serocytes.

Conclusion. The somatometric features of fetal macrosomia affect the morphofunctional features of the parotid gland of descendant animals at the age of 6 months (mature age).

Вітчизняні та іноземні вчені протягом останніх 50 років вивчають низку безпосередніх і віддалених наслідків народження з великою масою тіла [1–3]. Останнім часом з'явилася чимала кількість публікацій, що присвячені патологічному стану органів ротової порожнини осіб, які народилися макросомами [4–6]. Є тісний зв'язок між станом слинних залоз і формуванням стоматологічних порушень.

Ця робота є продовженням попереднього дослідження з вивчення особливостей гістологічної будови слинних залоз у тварин, чия маса при народженні була понад 90 центиль графіка фізичного розвитку, тобто які народилися з макросомією. Раніше встановлено: в щурів лінії Wistar, які народилися макросомами, у тримісячному віці відбувається зміна морфофункціонального стану паренхіми привушних слинних залоз [7]. У цій статті зробили спробу дослідити стан слинних залоз в експериментальних тварин старшого віку (6 місяців) із макросомією при народженні та порівняти його зі станом привушних слинних залоз у 3-місячних тварин, що описаний раніше [7].

Співвідношення людського віку з віком експериментальних тварин має низку особливостей і трактується різними авторами по-різному залежно від факторів, які вивчають [8,9]. Безумовно, відмінності в анатомії, фізіології та швидкості дорослішання не дають змогу точно екстраполювати вік експериментальних тварин на людський [10]. Але експериментальні моделі дуже важливі для з'ясування особливостей морфогенезу різних органів і тканин, розроблення моделей профілактики патологічних змін і перевірки життєздатності нових схем лікування низки захворювань. У попередній роботі [7] розглянули морфофункціональні особливості слинних залоз тримісячних тварин; вважали, що такий вік щурів приблизно відповідає людському віку 7,0–7,5 року, але, можливо, та старше, оскільки 3-місячні щури вже статевозрілі. У цій роботі також орієнтувалися на запропонований авторами алгоритм перерахунку днів життя щурів у роки людського життя. Прийшли до висновку: 6-мі-

сячний вік щурів приблизно відповідає 15–17 рокам людського життя, тобто пубертатному періоду [11,12].

Мета роботи

На моделях макросомії плода в шестимісячних лабораторних тварин оцінити морфофункціональний стан привушних слинних залоз і порівняти його з таким у тримісячних щурів.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на лінійних щурах Wistar Albino Glaxo. Для моделювання макросомії плода використали 4 різні моделі, що детально викладені в роботі [7].

Макросомію в новонароджених щурів діагностували, спираючись на стандартний клінічний критерій – маса тіла понад 90-центильний рівень. Після аналізу великої кількості архівних даних про новонароджених щурів ($n = 500$) та обчислення їхніх масо-ростових параметрів при народженні (50-центильний рівень) становить $5,28 \times 10^{-3}$ кг. Тому щурят, що народилися з масою тіла m , яка була більшою чи дорівнювала $6,3 \times 10^{-3}$ кг, вважали макросомами.

Тварини при народженні мали різну довжину тіла l та індекс маси тіла m/l^2 . Безпосередньо після народження щурів зважили та поділили на групи відповідно до масо-ростових параметрів. Повторне соматометричне обстеження виконали під час виведення тварин з експерименту. Результати соматометричного обстеження в кожній із груп наведені в таблиці 1.

Група контролю – новонароджені тварини ($n = 6$) із середніми масо-ростовими параметрами (маса тіла – в межах одного стандартного відхилення від медіанної маси тіла), вагітність матерів яких перебігала у звичайних умовах і на стандартному харчовому раціоні.

Група 1 – новонароджені щури-макросоми ($n = 5$) із внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів і найменшим серед усіх тварин індексом маси тіла. У

Таблиця 1. Медіанні значення Me ($Q3;Q1$) маси та довжини тіла, а також масо-ростового показника експериментальних тварин у різних групах при народженні та під час виведення з експерименту

Група дослідження	Маса тіла m (кг $\times 10^{-3}$)	Довжина тіла l (м $\times 10^{-2}$)	Значення масо-ростового показника m/l^2	Маса тіла m (кг $\times 10^{-3}$)	Довжина тіла l (м $\times 10^{-2}$)	Значення масо-ростового показника m/l^2
	При народженні			Під час виведення з експерименту (180–182 доба)		
Контроль	5,6 (5,8; 5,5)	5,00 (5,0; 4,9)	0,226 (0,233; 0,216)	165 (200; 150)	17,3 (19,0; 16,5)	0,562 (0,588; 0,551)
Група 1	6,9* (7,5; 6,8) $p = 0,004$	6,15* (6,2; 6,0) $p = 0,004$	0,186* (0,195; 0,180) $p = 0,007$	215 (240; 200)	19,0 (19; 18)	0,617 (0,665; 0,579)
Група 2	7,1* (7,4; 6,6) $p = 0,004$	5,65* (6,0; 5,3) $p = 0,012$	0,225 (0,238; 0,208)	189 (250; 158)	17,3 (19,5; 16,5)	0,618 (0,657; 0,580)
Група 3	6,5* (7,0; 6,3) $p = 0,004$	5,05 (5,2; 4,9)	0,263* (0,280; 0,46) $p = 0,010$	193 (220; 160)	18,0 (19,0; 17,0)	0,590 (0,614; 0,554)
Група 4	6,8* (6,9; 6,6) $p = 0,006$	5,10 (5,1; 5,0)	0,265* (0,272; 0,264) $p = 0,006$	158 (165; 150)	17,5 (17,5; 17,0)	0,539 (0,547; 0,502)

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки $p < 0,05$.

цю групу переважно відбирали потомство тварин, які перед спарюванням і під час вагітності перебували на стандартному раціоні віварію, але народилися з великою довжиною тіла та відносно зниженою масою тіла.

Група 2 – новонароджені щури-макросоми ($n = 6$) із гармонійним внутрішньоутробним розвитком – з індексом маси тіла, що аналогічний контролю. У цю групу переважно увійшло потомство тварин у зрілому віці (8–9 місяців), які перед спарюванням і під час вагітності перебували на висококалорійній дієті.

Група 3 – щури-макросоми ($n = 6$) зі стандартною довжиною тіла та великими значеннями маси тіла й індексу маси тіла. У цій групі переважало потомство молодих тварин віком 3–5 місяців, які перед спарюванням і під час вагітності перебували на висококалорійній дієті.

Група 4 – щури-макросоми ($n = 6$) із середніми значеннями довжини тіла при народженні та внутрішньоутробним ожирінням (як і у тварин групи 2). Але вагітність матерів цих тварин перебігала в гіпокінетичних умовах, тому вирішили виділити їх в окрему групу.

Для формування всіх груп відібрали новонароджених щурів із різних послідів. Усі групи репрезентативні за наявністю щурят чоловічої та жіночої статі.

Потомство щурів виводили з експерименту на 180–182 добу після народження (6 місяців). Зміст і маніпуляції з експериментальними тваринами відповідали національним «Спільним етичним принципам досліджень на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Тварин виводили з експерименту шляхом передозування тіопенталу натрію з наступною декапітацією.

Для морфологічного аналізу використовували тканини привушних слинних залоз. Взятий матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні й заливали парафіном за загальноприйнятою методикою. Для вивчення світлооптичним методом зрізи завтовшки 5–6 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозинном (Н&Е), галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсонном на сумарні нуклеїнові кислоти [13,14]; поставили PAS-реакцію на глікопротеїди [15]. Для виявлення інтенсивності апоптозу у гландулоцитах поставили імуногістохімічну реакцію з Caspase 3 із дозбарвленням гематоксиліном Майєра (ThermoScientific, США) [16]. Для ідентифікації реакції використовували систему візуалізації Quanto (ThermoScientific, США) з нанесенням як хромогена 3-діамінобензидин тетрахлориду.

Мікропрепарати вивчали на мікроскопі Axiostar-plus (Zeiss AG, ФРН), використовуючи фотокамеру. Морфометрію здійснювали на цифрових зображеннях за допомогою комп'ютерного забезпечення «BioTest» (РФ). Визначали площу ядер гландулоцитів, оцінювали вміст ДНК у ядрі, РНК у цитоплазмі (забарвлення за Ейнарсонном), глікопротеїдів у слині, яка виявлена у протоках і просвітах ацинусів (PAS-реакція).

Усі результати конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії одержали за допомогою лазерного сканувального конфокального мікроскопа Leica SP8 AOBS на інвертованому стенді мікроскопа Leica DMI8 у лабораторії «Біоматематика» Інституту фізіології

Чеської академії наук (м. Прага, Чеська Республіка). У режимі однофотонного збудження використовували аргонний лазер (488 нм). Налаштування та перевірку потужності лазера виконували при 100 % інтенсивності зображення. Потужність лазера у фокусній площині зразка з ACS APON 40x1.15 Oil and Water CS об'єктивом становила 1,14 мВт для 100 % потужності лазера та 0,27 мВт для потужності лазера 9,52 %. Для уникнення фотоочищення зразка під час збирання даних потужність лазера Leica встановлена на 9,52 %. Для уникнення надмірного насичення зображення для всіх зразків значення інтенсивності встановлено на 2,5 %.

Для отримання оптимального сигналу від тканин, що забарвлені Н&Е, використали довжину хвилі однофотонного збудження 488 нм і діапазон детектування від 500 нм до 600 нм [17].

Для вимірювання точного розміру поперечного перерізу ацинусів привушних слинних залоз у досліджуваних тварин використовували зрізи завтовшки 15–80 мкм, забарвлені Н&Е, які дослідили за допомогою конфокальної мікроскопії. Отримали тривимірні зображення, у кожному зі зразків виміряли такі параметри: площа поперечного перерізу ацинуса слинної залози в найширшій його частині, площа просвіту ацинуса, площа поперечного перерізу кожного гландулоцита в ацинусі, периметр кожного ацинуса в найширшій його частині. Вимірювання зроблені за допомогою відкритого програмного пакета Fiji з використанням плагіна Measure [18].

Середні значення параметрів оцінювали, застосовуючи програму MS Excel 2016. Гіпотези про відмінність середніх значень параметрів у малих групах перевіряли методами непараметричної статистики (за критерієм Манна–Уїтні), використовуючи пакет Statistica 6.0.

Результати

Медіани відношення маси слинних залоз до маси тіла тварин в основних групах були невірогідно менші порівняно з контрольними щурами (табл. 2). Цікавими є порівняння цього параметра з даними для тримісячних тварин, що одержані в попередній роботі [7]. У тварин контрольної групи з віком (від 3 до 6 місяців) відбувається збільшення відносної маси слинних залоз приблизно у 2,5 раза. У тварин, які народилися макросомами, також відбувається збільшення цього показника, але набагато меншою мірою – в середньому на 38 %. Виявилось, що з віком відносна маса слинних залоз тварин-макросомів при народженні стає меншою, ніж у тварин групи контролю, а у тримісячних тварин-макросомів при народженні цей показник був більший, ніж у тварин групи контролю.

У щурів контрольної групи паренхіма добре збережена, інтерстицій тонкий, без лейкоцитарних інфільтратів. Однак перидуктально виявили незначний склероз. При забарвленні галоціанін-хромовими галунами (за Ейнарсонном) спостерігали велику кількість інтенсивно забарвлених ядер, що є свідченням домінування спіралізованого неактивного хроматину. Частина сероцитів має еухромне ядро, в якому добре проглядається ядерце. В таблицях 2 і 3 наведені ре-

Таблиця 2. Медіанні значення Me (Q3;Q1) маси привушних слинних залоз, відношення маси слинних залоз до маси тіла, а також кількості glanduloцитів на площі зрізу 750 мкм² у шестимісячних експериментальних тварин

Група дослідження	Медіанні значення маси слинних залоз (кг ×10 ⁻⁵)	Медіанні значення відношення маси слинних залоз до маси тіла (%)	Медіанна кількість сероцитів на площі зрізу 750 мкм ² (екземпляри)
Контроль ₁₈₀	5,30 (6,0; 4,9)	0,034 (0,036; 0,033)	115 (130; 111)
Група 1 ₁₈₀	6,45 (7,7; 4,6)	0,029 (0,032; 0,022)	104* (105; 102) p = 0,015
Група 2 ₁₈₀	5,45 (7,9; 4,7)	0,032 (0,033; 0,030)	142* (156;133) p = 0,042
Група 3 ₁₈₀	4,75 (6,1; 4,1)	0,025 (0,028; 0,024)	137 (150; 122)
Група 4 ₁₈₀	4,30 (4,7; 4,1)	0,028 (0,029; 0,026)	138* (170; 134) p = 0,025

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки p < 0,05.

Таблиця 3. Медіанні значення Me (Q3;Q1) розмірів ядер, оптичної густини цитоплазми, ядер сероцитів і рідини у просвітах привушних слинних залоз 6-місячних експериментальних тварин

Група дослідження	Медіанні значення площі ядер сероцитів, мкм ²	Оптична густина ядер сероцитів (забарвлення за Ейнарсоном, ум. од. опт. густини)	Оптична густина цитоплазми сероцитів (забарвлення за Ейнарсоном, ум. од. опт. густини)
Контроль ₁₈₀	22,2 (32,1; 21,4)	0,388 (0,395; 0,294)	0,113 (0,114; 0,112)
Група 1 ₁₈₀	20,7 (24,6; 18,4)	0,745* (0,815; 0,674) p = 0,032	0,077* (0,089; 0,073) p = 0,047
Група 2 ₁₈₀	26,5 (32,0; 23,5)	0,326 (0,364; 0,303)	0,125 (0,148; 0,123)
Група 3 ₁₈₀	23,5 (27,5; 22,1)	0,401 (0,454; 0,362)	0,218* (0,242; 0,143) p = 0,047
Група 4 ₁₈₀	30,2* (33,1; 26,6) p = 0,047	0,574 (0,756; 0,545)	0,349* (0,362; 0,338) p = 0,009

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки p < 0,05.

зультати морфометрії: медіанна кількість сероцитів на площі зрізу 750 мкм², медіанне значення площі ядер, оптична густина ядер та оптична густина цитоплазми при забарвленні за Ейнарсоном.

Порівнюючи морфометричні дані шестимісячних контрольних тварин із такими в три місяці [7], виявили: середня кількість glanduloцитів на фіксованій площі зрізу зменшилась на 23 %, площа ядер glanduloцитів збільшилась на 60 %. Оптична густина ядер glanduloцитів зменшилась на 30 %, а оптична густина цитоплазми зменшилась на 59 %. Отже, в онтогенезі від 3 до 6 місяців ядра сероцитів стали більшими та еухромнішими, що свідчить про підвищення морфофункціональної активності. Зменшення вмісту РНК у цитоплазмі можна пояснити накопиченням у ній білків слини. Таке пояснення підтверджується вивченням мікропрепаратів із проведенням PAS-реакції – в багатьох glanduloцитах цитоплазма фуксинофільна.

У тварин групи 1 порівняно з групою контролю абсолютна медіанна маса слинних залоз невірогідно збільшена, а відносна маса зменшена (табл. 2). Мікроскопічно інтерстицій тонкий, не склерозований, кінцеві відділи ацинусів широкі. Привертає увагу, що тільки у тварин цієї основної групи немає фокусів загибелі ацинусів, але місцями візуалізуються ділянки з так званими «спокійними» сероцитами, які ще не функціонують і не утворюють ацинус. Середня кількість сероцитів на фіксованій площі зрізу вірогідно знижена порівняно з групою контролю (табл. 2). Ядра здебільшого дрібніші, ніж у контролі, а оптична густина ядер при пофарбуванні за Ейнарсоном вірогідно збільшена. Визначили також вірогідне зменшення оптичної густини цитоплазми (табл. 3). Отже, залози морфофункціонально високоактивні, але навантаження на окремі сероцити відносно невелике.

Порівнюючи стан залоз у тварин цієї групи (макросоми з дефіцитом маси тіла при народженні) в шести- і тримісячному віці [7] можна відзначити зменшення на 9 % кількості сероцитів на фіксованій площі зрізу, що пов'язано зі збільшенням кінцевих відділів ацинусів. При розвитку тварин від 3 до 6 місяців також спостерігали незначне (на 17 %) зменшення площі ядер glanduloцитів і на 29 % збільшення оптичної густини ядер, а оптична густина цитоплазми знижується на 78 %. Можна припустити, що в віковій динаміці в макросомів цієї групи відбувається збільшення залоз, однак їхня морфофункціональна активність стимульована менше, ніж у контрольній групі. Крім того, як уже відзначено, виявили недиференційовані сероцити, неорганізовані в ацинуси, тобто такі, що перебувають у «запасі».

У групі 2 макросоми представлені тваринами, які народилися гармонійно розвиненими – з високими значеннями маси та довжини тіла. У віці 6 місяців і абсолютна, і відносна маса привушних слинних залоз вірогідно не відрізнялася від групи контролю (табл. 2). Мікроскопічно визначили розширення інтерстицію, наявність слабо вираженого макрофагально-лімфоцитарного інфільтрату, місцями спостерігали істотну домішку поліморфонуклеарів. Сероцити мають ядра різного розміру, є дуже великі (поліплоїдні), їхня кількість на фіксованій площі зрізу вірогідно більше, ніж у контролі. Площа ядер невірогідно збільшена (табл. 2). Оптична густина ядер знижена внаслідок збільшення кількості еухромних ядер, а оптична густина цитоплазми сероцитів при забарвленні за Ейнарсоном на рівні групи контролю (табл. 3). Тобто можна припустити, що морфофункціональний стан привушних слинних залоз у щурів цієї групи на тому ж рівні, що і в контрольних тварин. Хоча у тримісячному віці [7] були наявні ознаки

пошкодження слинних залоз, компенсаторної гіперплазії та гіпертрофії.

Порівнюючи стан привушних слинних залоз у шестимісячних тварин цієї основної групи з тримісячними тваринами аналогічної групи [7], виявили: у тварин віком 6 місяців відбувається зменшення на 28 % кількості сероцитів на фіксованій площі зрізу; площа ядер гландулоцитів суттєво (на 63 %) збільшилась, як і під час порівняння цих вікових категорій контрольних тварин. Оптична густина ядер при забарвленні за Ейнарсоном зменшилась на 42 %; оптична густина цитоплазми також зменшилась на 63 % – до рівня контролю. Отже, у віковій динаміці в макросомів групи 2 спостерігали втрату частини паренхіматозних елементів і підвищення морфофункціональної активності окремого сероцита.

У шестимісячних тварин групи 3, які народилися макросомами з ожирінням, абсолютна й відносна маси слинних залоз виявились зменшеними відносно контрольних тварин (табл. 2).

Під час мікроскопії виявили розвиток інтерстиціального склерозу – вираженого перидуктального склерозу (рис. 1).

Розширення строми спостерігали не тільки внаслідок склерозу, але й через виражений набряк і наявність марофагально-лімфоцитарної інфільтрації. Виявили дрібні ділянки руйнування паренхіми. Сероцити, які спостерігали навколо фокусів руйнування, мають феномен маргінації хроматину ядер. Ядра сероцитів різного розміру, деякі ядра дуже великі, гіперхромні, вочевидь, поліплоїдні (рис. 2).

Візуалізується чимала кількість сероцитів із двома ядрами. Під час морфометрії визначили, що у тварин групи 3 середня кількість сероцитів на фіксованій площі зрізу невірогідно збільшена порівняно з контролем (табл. 2). Середня площа ядер сероцитів, як і оптична густина ядер сероцитів, на рівні контролю, а оптична густина цитоплазми вірогідно збільшена щодо контролю (табл. 3). Тобто порівняно з контролем наявні ознаки склерозу, що розвивається, а також атрофізації залози з компенсаторною, більш інтенсивною продукцією білків одним сероцитом.

Аналізуючи зміни привушних слинних залоз цієї основної групи у віковому аспекті [7], виявили: кількість сероцитів на фіксованій площі зрізу в щурів цієї групи з віком зменшилась на 30 %; площа ядра сероцита збільшилась на 15 %. Оптична густина ядер і цитоплазми дещо знизилась (на 12 і 30 % відповідно), що пояснюється накопиченням у цитоплазмі великої кількості глікопротеїдів і протеїдів (PAS-реакція).

Макросоми групи 4, в яку включили тварин із великою масою тіла та високим індексом маси тіла при народженні (тобто з соматометричною картиною, що схожа на макросомів групи 3, але при моделюванні макросомії яких додатково до гіперкалорійної дієти використали фактор гіпокінезії), у віці 6 місяців мали таку саму абсолютну і відносну масу привушних слинних залоз, як і тварини групи 3, тобто знижену щодо контролю (табл. 2). Мікроскопічно місцями візуалізується ще більше розширення строми, перидуктальний склероз, наявність макрофагально-лімфоцитарного інфільтрату зі збільшеною кількістю

активних фібробластів і еозинофілів. Здебільшого сероцити невисокі, ядра різного розміру, багато дуже великих ядер. Місцями спостерігали дрібні ділянки з ознаками загибелі сероцитів. Під час морфометрії виявили вірогідне суттєве збільшення кількості сероцитів на фіксованій площі зрізу порівняно з групою контролю (табл. 2). Середня площа ядер сероцитів також виявилася збільшеною щодо контролю, але вірогідність не виявили – як уже зазначено, розмір ядер дуже різниться. Оптична густина ядер і цитоплазми при забарвленні за Ейнарсоном також збільшена щодо контролю (табл. 3). Вочевидь процес атрофізації та склеротизації в цій групі посилюється порівняно з групою 3. Виявили фокуси загибелі сероцитів, а ті гландулоцити, що залишилися, функціонують із більшим навантаженням.

Порівнюючи морфофункціональний стан шестимісячних тварин цієї основної групи із тримісячними [7], встановили: кількість гландулоцитів на фіксованій площі зрізу збільшилась на 16 %; площа ядер гландулоцитів – на 25 %; густина ядер і цитоплазми при забарвленні за Ейнарсоном збільшилась на 52 % та 18 % відповідно. Тобто слинна залоза щурів цієї основної групи протягом онтогенезу ще більш інтенсивно «втрачає» паренхіму, а функціонуючі сероцити зазнають поліплоїдизації з підвищенням морфофункціонального навантаження.

Крім гістологічного та морфометричного вивчення слинних залоз поставили імуногістохімічну реакцію, використовуючи антитіла до Caspase 3, яка є маркером апоптозу. Якщо у тварин контрольної групи мічені гландулоцити є одиничними, їх спостерігають не в кожному полі зору, то при збільшенні ступеня ожиріння в макросомів, особливо при гіпокінетичному способі життя вагітних самоць (рис. 3), мічені клітини трапляються у великій кількості ацинусів.

Отже, припущення про більш інтенсивний морфофункціональний стан гландулоцитів у макросомів з ожирінням має об'єктивне підтвердження. Порівнюючи інтенсивність імуногістохімічної реакції на Caspase 3 загалом у всіх групах, можна отримати таке співвідношення: $K < гр. 1 < гр. 2 < гр. 3 < гр. 4$.

Матеріал експерименту також дослідили з використанням конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії. Серії оптичних зрізів (рис. 4), що одержали за допомогою цього методу, дали змогу визначити в кожному ацинусі площу поперечного перерізу в найширшій його частині, а також інші параметри (табл. 4).

Досліджуючи препарати привушних слинних залоз шестимісячних тварин за допомогою конфокальної мікроскопії (табл. 4), доповнили дані, що отримали за допомогою звичайної світлової мікроскопії. В усіх тварин, які народилися макросомами, поперечний переріз ацинуса, його периметр, кількість сероцитів в ацинусі та площа окремого сероцита виявились більшими, ніж у контролі. Особливо цікавою є ситуація з тваринами групи 1. У них показники поперечного перерізу ацинуса, периметра ацинуса та площі окремого сероцита мають максимальні значення. У макросомів, які народилися з ожирінням, особливо на тлі гіпокінезії матері, спостерігали збільшену кількість сероцитів у

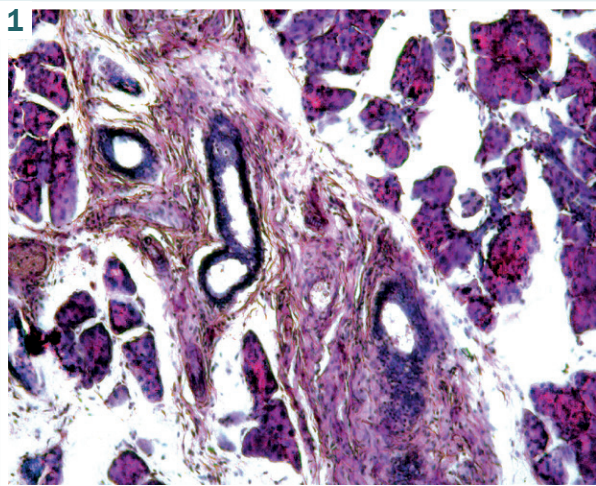


Рис. 1. Ділянка слинної залози 180-денного щура основної групи 3. Виражений перидуктальний склероз. Забарвлення Н&Е. Збільшення $\times 100$.

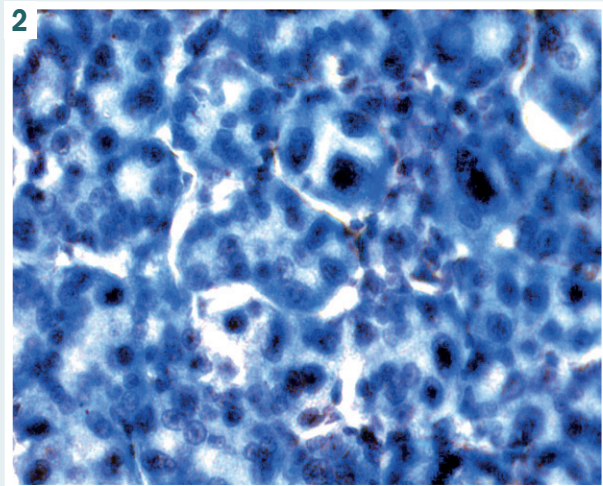


Рис. 2. Ділянка слинної залози 180-денного щура основної групи 3. Велика кількість сероцитів із дуже великими (поліплоїдними) ядрами ∇ , а також з еухромними ядрами Δ . Забарвлення за Ейнарсоном. Збільшення $\times 400$.

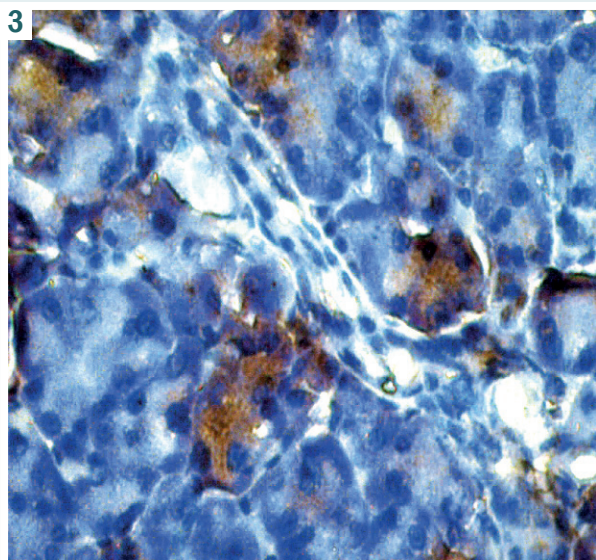


Рис. 3. Ділянка слинної залози 180-денного щура основної групи 4. Імуногістохімічна реакція з Caspase 3, дозабарвлення гематоксилином Майєра. Збільшення $\times 400$. Візуалізуються кінцеві відділи, в яких усі гландулоцити мічені антитілами до Caspase 3.

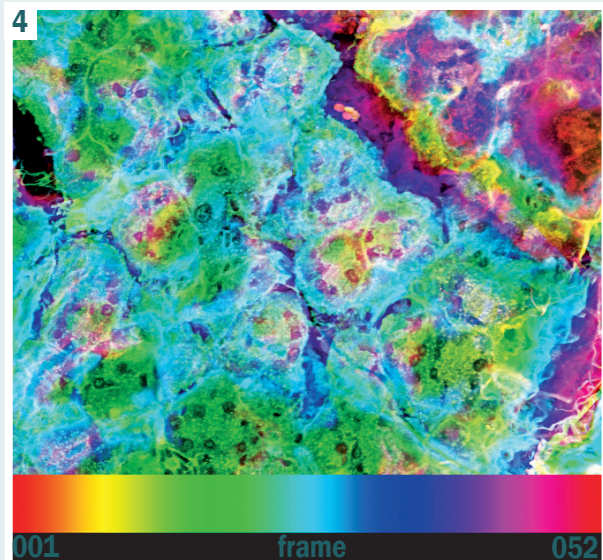


Рис. 4. Ділянка привушної слинної залози 180-денного щура основної групи 3, кольорове кодування глибини (максимальна проекція стеку конфокальних мікрофотографій) (52 оптичні зрізи, фізичний розмір видимої площі $277,24 \times 277,24 \times 36\text{mm}$) Н & Е. Об'єктив ACS APO 40 \times NA1.15 Oil and Water CS $^{\infty}$.

Таблиця 4. Медіанні значення Me ($Q3;Q1$) морфометричних параметрів привушних слинних залоз 6-місячних експериментальних тварин

Група дослідження	Медіанна площа поперечного перерізу ацинуса привушної слинної залози, μm^2	Медіанний периметр ацинуса привушної слинної залози, μm	Медіанна площа поперечного перерізу сіроцита привушної слинної залози, μm^2	Медіанна кількість сіроцитів у поперечному перерізі ацинуса
Контроль ₁₈₀	631,9 (796,5; 485,0)	96,2 (107,7; 84,0)	106,5 (133,2; 67,4)	6,2 (7,1; 5,8)
Група 1 ₁₈₀	1122,8* (1136,6; 819,8) $p = 0,006$	133,9* (134,9; 116,9) $p = 0,006$	160,4* (162,4; 123,1) $p = 0,045$	7,0 (7,0; 6,8)
Група 2 ₁₈₀	889,2* (933,8; 876,6) $p = 0,011$	113,5* (117,2; 113,4) $p = 0,006$	118,2 (138,9; 115,7)	7,0 (7,7; 6,4)
Група 3 ₁₈₀	881,4* (892,4; 732,2) $p = 0,045$	113,1 (113,4; 102,9)	117,9 (124,1; 96,7)	7,3* (7,9; 7,1) $p = 0,035$
Група 4 ₁₈₀	814,3* (914,6; 772,0) $p = 0,032$	109,2* (116,1; 106,3) $p = 0,032$	110,0 (114,7; 105,5)	7,3* (8,8; 7,0) $p = 0,020$

*: відмінність від групи контролю вірогідна з імовірністю похибки $p \leq 0,05$.

поперечному перерізі ацинуса, хоча розміри сероцитів не відрізняються від контролю.

Морфометрія на зображеннях, що отримані за допомогою конфокальної мікроскопії, відповідає даним, котрі одержали за допомогою світлової мікроскопії, точніше доповнює їх: у щурів групи 1 збільшена площа цитоплазми сероцитів. Тобто, аналізуючи отримані раніше дані, з'ясували, що в сероцитах утворюються запаси секрету в більшій кількості, ніж у контролі. У щурів групи 2 відбувається такий самий процес, але він є менш вираженим. У щурів групи 3 запаси секрету зменшені, а у щурів групи 4 зафіксували максимальне зменшення.

Отже, збільшення відносної маси привушної слинної залози у макросомів, які народилися пропорційно розвиненими, в онтогенезі від 3 до 6 місяців виявилось аналогічним контролю. У макросомів із дефіцитом або з надлишком маси тіла, як-от ожирінням при народженні, відносна маса залози за цей період збільшилась меншою мірою.

Привертає увагу, що в макросомів із дефіцитом маси тіла при народженні з віком кількість сероцитів зменшується мінімально, менше, ніж у контролі, але ацинуси великі. Результати каріометрії та цитофотографії свідчать, що морфологічна активність окремого сероцита з віком знижується, запаси секрету збільшуються.

У макросомів із надлишком маси тіла при народженні, особливо у тварин, моделювання макросомії яких передбачало гіпокінезію вагітної самиці, з віком спостерігали ознаки збільшення морфологічної активності залози, але це збільшення лімітоване. Тому в них зафіксований більш виражений апоптоз, запаси секрету в сероцитах зменшуються.

Обговорення

Результати дослідження є новими, оскільки у відомій авторам науковій літературі інформація про подібні дослідження відсутня. Однак є багато досліджень впливу кількості та якості слини на формування стоматологічних порушень. Є відомості про вплив швидкості виділення, кислотності та буферної ємності слини на формування каріозних уражень [19]. Також відомо, що нестача у змішаній слині імуноглобулінів (А, М, G) може суттєво зменшити місцеві захисні сили організму та провокувати розвиток каріозного процесу [20,21]. Мікроелементний склад слини також має значення у формуванні карієсогенної ситуації ротової порожнини [22]. Отже, слинні залози, які нормально функціонують, підтримують якісний стан твердих тканин зубів. Непрямо ризиковий стан слинних залоз у людей, які народилися макросомами, підтверджують дані про високу інтенсивність карієсу в дітей і підлітків, чия маса тіла при народженні була понад 90-центильний рівень [4–6].

Порушення морфогенезу слинних залоз за умови народження з макросомією, що реалізується в руйнуванні механізмів захисту порожнини рота, пояснює підвищену схильність осіб, які народжені макросомами, до запальних процесів слизової оболонки ротової порожнини [23].

Висновки

1. У щурів, які народилися макросомами, незалежно від соматотипу при народженні в шестимісячному віці наявна тенденція до зниження значення відносної маси привушної слинної залози порівняно з групою контролю.

2. У слинних залозах тварин, які народилися макросомами (крім тварин із внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів і відносним дефіцитом маси тіла), у віці 6 місяців мікроскопічно, з використанням конфокальної мікроскопії виявлені результати пошкодження, зокрема апоптозу сероцитів, «зникнення» паренхіми, склерозу строми та макрофагально-лімфоцитарного інфільтрату строми. Найбільш виражені ці явища у тварин з ознаками внутрішньоутробного ожиріння, формування макросомії яких відбувалося шляхом гіперкалорійної дієти та гіпокінетичних умов утримання вагітної самиці.

3. Водночас активуються компенсаторні механізми: спостерігали збільшення ядер сероцитів, еухромність ядер, тобто підвищення морфологічної активності окремого сероциту. У тварин із внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів і відносним дефіцитом маси тіла пошкодження та компенсаторні явища відсутні, – виявили «острівці» неактивних, запасних сероцитів, морфологічне навантаження функціонуючих сероцитів невисоке.

4. У віковій динаміці, тобто порівнюючи морфологічний стан слинної залози щурів у віці 3 і 6 місяців, виявили: щодо групи контролю вікове збільшення слинної залози менш виражене у тварин, які народилися макросомами з внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів і відносним дефіцитом маси тіла, та у тварин із надлишком маси тіла. У тварин із внутрішньоутробною стимуляцією ростових процесів встановлені ознаки економного функціонування, є наявність клітинних «запасів», натомість у тварин із внутрішньоутробним ожирінням розвиваються ознаки атрофізації слинної залози з компенсаторною морфологічною активацією функціонуючих сероцитів.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні стану твердих тканин зубів в експериментальних тварин, які народились із макросомією, для підтвердження прямого впливу поганого стану їхніх слинних залоз на карієсогенну ситуацію ротової порожнини.

Подяка

Робота виконана засобами біологічної візуалізації Інституту фізіології за підтримки проекту Czech-Biolmaging large RI project (LM2015062 що фінансується MEYS CR) і проекту «Модернізація та підтримка дослідницької діяльності національної інфраструктури для біологічної та медичної обробки зображень Czech-Biolmaging (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775, що фінансується OP RDE). Автори висловлюють подяку Dr. Lucie Kubínová та Dr. Jiří Janáček за корисні поради з різних технічних питань і Dr. Daniel Hadraba за його поради та коментарі.

Відомості про авторів:

Гармаш О. В., канд. мед. наук, доцент, каф. терапевтичної стоматології, Харківський національний медичний університет, Україна.

Губіна-Вакулик Г. І., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії, Харківський національний медичний університет, Україна.

Вондрашек Давід, магістр, PhD-аспірант, відділення біоматематики, Інститут фізіології, Академія наук Чеської Республіки, м. Прага.

Сведения об авторах:

Гармаш О. В., канд. мед. наук, доцент, каф. терапевтической стоматологии, Харьковский национальный медицинский университет, Украина.

Губина-Вакулик Г. И., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, Украина.

Вондрашек Давид, магистр, PhD-аспирант, отделение биоматематики, Институт физиологии, Академия наук Чешской Республики, г. Прага.

Information about authors:

Garmash O. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Therapeutic Dentistry, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Gubina-Vakulyk H. I., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy, Kharkiv National Medical University, Ukraine.

Vondrášek David, Master of Science, PhD student, Department of Biomathematics, Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague.

Надійшла до редакції / Received: 27.07.2018

Після доопрацювання / Revised: 09.11.2018

Прийнято до друку / Accepted: 21.11.2018

Список літератури

- Sorokina A.V. Крупный плод: мифы и реальность / А.В. Сорокина // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2013. – Т. 13. – №4. – С. 86–88.
- Хурасева А.Б. Репродуктивное здоровье женщин, родившихся с полярными значениями массы тела / А.Б. Хурасева // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2010. – №8. – С. 106–115.
- Godfrey K.M. The long-term effects of prenatal development on growth and metabolism / K.M. Godfrey, H.M. Inskip, M.A. Hanson // Semin. Reprod. Med. – 2011. – Vol. 29. – Issue 3. – P. 257–265.
- High birthweight is associated with increased prevalence of dental caries in Japanese children / K. Hisano, K. Tanaka, C. Nagata, et al. // Int J Dent Hyg. – 2018. – Vol. 16. – Issue 3. – P. 404–410.
- Macrosomic neonates carry increased risk of dental caries in early childhood: findings from a cohort study, the Okinawa child health study, Japan / H. Yokomichi, T. Tanaka, K. Suzuki, et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – Issue 7. – e0133872.
- High birth weight is a risk factor of dental caries increment during adolescence in Sweden / A. Julihn, U. Molund, E. Drevsäter, T. Modéer // Dent. J. – 2014. – Vol. 2. – Issue 3. – P. 118–133.
- Гармаш О. В. Морфофункціональний стан привушних слинних залоз тримісячних щурів при експериментально модельованій внутрішньоутробній макросомії / О.В. Гармаш, Г.І. Губіна-Вакулик // Патологія. – 2018. – Т. 15. – №1(42). – С. 81–87.
- Иванова Л.П. К вопросу экстраполяции возрастных периодов развития репродуктивной системы экспериментальных животных на человека / Л.П. Иванова, Н.Р. Шепельская // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – №7. – С. 169–170.
- Исследование энтеросорбирующих свойств пищевых биосистем в условиях in vivo / Л.Э. Глаголева, Н.С. Родионова, О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева // Вестник ГУИТ. – 2012. – №3. – С. 163–164.
- Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? Nutrition / R. Quinn // Nutrition. – 2005. – Vol. 21. – Issue 6. – P. 775–7.
- Rat's age versus human's age: what is the relationship? / N.A. Andreollo, E.F. Santos, M.R. Araújo, L.R. Lopes // Arq Bras Cir Dig. – 2012. – Vol. 25. – Issue 1. – P. 49–51.
- End-to-end esophagogastric anastomosis comparative study, between a single layer and submucosa-mucosa invagination technics: in rats / D.I. Júnior, A.J.T. Nigro, A. Sementilli, et al. // Acta Cir Bras. – 2000. – Vol. 15. – Issue 1. – P. 14–22.
- Pearse A.G.E. Histochemistry: Theoretical and Applied / A.G.E. Pearse. – 4th edition. – Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980–1991. – 1055 p.
- Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, 1969. – 425 с.
- Саркисов Д.С. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
- Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 96 с.
- Garmash O. Three-dimensional image analysis of minor salivary glands in 180-day rat born with macrosomia / O. Garmash, G. Gubina-Vakulyk, D. Vondrášek // Med Čas (Krag) / Med J (Krag). – 2018. – Vol. 52. – Issue 1. – P. 7–14.
- Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, et al. // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9. – Issue 7. – P. 676–682.
- Shetty Ch.M. Correlation between dental caries with salivary flow, pH, and buffering capacity in adult south Indian population: An in-vivo study / Ch.M. Shetty, M.N. Hegde, D. Devadiga // International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. – 2013. – Vol. 4. – Issue 2. – P. 219–223.
- The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children / E. Ranadheer, U.A. Nayak, N.V. Reddy, V.A. Rao. // J Indian Soc Pedod Prev Dent. – 2011. – Vol. 29. – Issue 2. – P. 106–112.
- Comparison of the salivary immunoglobulin concentration levels between children with early childhood caries and caries-free children / A. Bagherian, A. Jafarzadeh, M. Rezaeian, et al. // Iran J Immunol. – 2008. – Vol. 5. – Issue 4. – P. 217–221.
- Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in Shah Alam, Malaysia / A.S. Hussein, H.F. Ghasheer, N.M. Ramli, et al. // European Journal of Paediatric Dentistry vol. – 2013. – Vol. 14. – Issue 2. – P. 113–118.
- Яковцова А.Ф. Иммунная система плода людини у великих і IUGR плодах / А.Ф. Яковцова, І.В. Сорокіна, І.Е. Алешенко. – Х.: Антика, 2004. – 218 с.

References

- Sorokina, A. V. (2013). Krupnyj plod: mify i real'nost' [A large fetus: myths and realities]. *Rossijskij vestnik akushera-ginekologa*, 13(4), 86–88. [in Russian].
- Khuraseva, A. B. (2010). Reproductivnoe zdorov'e zhenschin, rodivshixsya s pol'nyymi znacheniyami massy tela [Reproductive health of women born with polar body weight]. *Mizhnarodnyi endokrynolohichnyi zhurnal*, 8, 106–115. [in Russian].
- Godfrey, K. M., Inskip, H. M., & Hanson, M. A. (2011). The long term effects of prenatal development on growth and metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*, 29(3), 257–265. doi: 10.1055/s-0031-1275518
- Hisano, K., Tanaka, K., Nagata, C., Arakawa, M., & Miyake, Y. (2018). High birthweight is associated with increased prevalence of dental caries in Japanese children. *International Journal of Dental Hygiene*, 16(3), 404–410. doi: 10.1111/ijdh.12337
- Yokomichi, H., Tanaka, T., Suzuki, K., Akiyama, T., & Yamagata, Z. (2015). Macrosomic neonates carry increased risk of dental caries in early childhood: findings from a cohort study, the Okinawa child health study, Japan. *PLoS One*, 10(7), e0133872. doi: 10.1371/journal.pone.0133872.
- Julihn, A., Molund, U., Drevsäter, E., & Modéer, T. (2014). High birth weight is a risk factor of dental caries increment during adolescence in Sweden. *Dent. J.*, 2(3), 118–133. doi: 10.3390/dj2040118
- Garmash, O. V., & Gubina-Vakulyk, G. I. (2018). Morfofunktsionalnyi stan pryvushnykh slynnykh zaloz trymsyachnykh shchuriv pry eksperymentalno modelovanii vnutrishnoutrobnoi makrosomii [Morphofunctional status of parotid salivary glands in three-month-old rats with experimentally induced fetal macrosomia]. *Pathologia*, 15(1), 81–87. doi: 10.14739/2310-1237. 2018.1.129324 [in Ukrainian].
- Ivanova, L. P., & Shepel'skaya, N. R. (2012). K voprosu e'kstrapolyacii vozrastnykh periodov razvitiya reproductivnoy sistemy e'kspyemantal'nykh zhivotnykh na cheloveka [To the subject of extrapolation of the reproductive system age periods development of experimental animals on humans]. *Mezhduarodnyj zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovanij*, 7, 169–170. [in Russian].
- Glagoleva, L. E., Rodionova, N. S., Korneeva, O. S., & Shuvaeva, G. P. (2012). Issledovanie e'ntrosorbiruyuschikh svoystv pischevykh biosistem v usloviyakh in vivo [Investigation of the enterosorbing properties of food biosystems in vivo]. *Vestnik GUIIT*, 3, 163–164. [in Russian].
- Quinn R. (2005). Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*, 21(6), 775–7. doi: 10.1016/j.nut.2005.04.002
- Andreollo, N. A., Santos, E. F., Araújo, M. R., & Lopes, L. R. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig.*, 25(1), 49–51. doi: 10.1590/S0102-67202012000100011
- Júnior, D. I., Nigro, A. J. T., Sementilli, A., Juliano, Y., & Novo, N. F. (2000). End-to-end esophagogastric anastomosis comparative study, between a single layer and submucosa-mucosa invagination technics: in rats. *Acta Cir Bras*, 15(1), 14–22. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502000000100003

- [13] Pearse, A. G. E. (1980–1991). *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- [14] Merkulov, G. A. (1969). *Kurs patogistologicheskoy tekhniki [Course of patogistologicheskoy techniques]*. Moscow. [in Russian].
- [15] Sarkisov, D. S., & Perov, Yu. L. (1996). *Mikroskopicheskaya tekhnika: rukovodstvo dlya vrachej i laborantov [Microscopic Technique (manual for physicians and laboratory technicians)]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
- [16] Korzhevskij, D. E., & Gilyarov, A. V. (2010). *Osnovy gistologicheskoy tekhniki [Basics of histologic techniques]*. Saint Petersburg: SpecLit. [in Russian].
- [17] Garmash, O., Gubina-Vakulik, G., & Vondrášek, D. (2018). Three dimensional image analysis of minor salivary glands in 180-day rats born with macrosomia *Med Čas (Krag) / Med J (Krag)*, 52(1), 7–14.
- [18] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–82. doi: 10.1038/nmeth.2019
- [19] Shetty, Ch. M., Hegde, M. N., & Devadiga, D. (2013). Correlation between dental caries with salivary flow, pH, and buffering capacity in adult south Indian population: An in-vivo study April 2013 *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 4(2), 219–223. doi: 10.7897/2277-4343.04226
- [20] Ranadheer, E., Nayak, U. A., Reddy, N. V., & Rao, V. A. (2011) The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 29(2), 106–112. doi: 10.4103/0970-4388.84681
- [21] Bagherian, A., Jafarzadeh, A., Rezaeian, M., et al. (2008) Comparison of the salivary immunoglobulin concentration levels between children with early childhood caries and caries-free children. *Iran J Immunol*, 5(4), 217–221.
- [22] Hussein, A. S., Ghasheer, H. F., Ramli, N. M., Schroth, R. J., & Abu-Hasan, M. I. (2013). Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in Sūhah Alam, Malaysia. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 14(2), 113–18.
- [23] Yakovtsova, A. F., Sorokina, I. V., Aleshchenko, I. Ye. (2004) *Imunna sistema ploda liudyny u velykykh i IUGR plodakh [Immune system of the human fetus in large and IUGR fetuses]*. Kharkiv: Antykva. [in Ukrainian].