

Х.П. Івасівка
Є.В. Пальтов
З.З. Масна
І.В. Челпанова

Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького, Львів,
Україна

Надійшла: 23.04.2021
Прийнята: 03.06.2021

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.2.25-30>

УДК:611.327.4.018.3+611.327.4.018.73):615.214.24.035.8

МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТА ХРЯЩОВОГО КОМПОНЕНТУ ГОРТАНІ В НОРМІ НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПОЇДНОГО ВПЛИВУ ТА ПРИ ВІДМІНІ

Ivasivka K.P.  ✉, Paltov Ye.V. , Masna Z.Z. , Chelpanova I.V.  Morphometric characteristics of the mucous membrane and the cartilaginous component of the larynx are normal at different times during the experimental opioid effect and during withdrawal.

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. The problem of uncontrolled use of opioid drugs is extremely relevant based on the data of domestic and world statistics which are covered in the scientific literature. That is why the study of indicators of morphometric characteristics of the laryngeal mucosa under opioid exposure under experimental opioid exposure will be of interest to both morphologists and practical otorhinolaryngologists. **Objective:** To study the morphometric parameters of the laryngeal mucosa in normal at different times of the experimental opioid effect and its cancellation. **Methods.** The material of the study were sexually mature, outbred rats - males in the amount of 61 animals, weighing 80 - 135 g, aged 4.5 - 7.5 months. Histological specimens were prepared according to conventional methods. All morphometric studies were performed using primary (unedited) photographs taken on a Meiji MT4300 LE microscope, Canon EOS 550D x100 lens. All statistical calculations were performed using RStudio v. 1.2.5042. **Results.** Throughout the experiment, the change of morphometric parameters of the laryngeal mucosa with signs of wavy growth and decline was clearly observed at all times. More positive was the dynamics of morphometric parameters after the abolition of the opioid analgesic, which hypothetically suggests the process of recovery of the mucosa, even after prolonged administration of the opioid.

Key words: larynx, morphometric parameters, norm, opioid effect, withdrawal, rat.

Citation:

Ivasivka KP, Paltov YeV, Masna ZZ, Chelpanova IV. [Morphometric characteristics of the mucous membrane and the cartilaginous component of the larynx are normal at different times during the experimental opioid effect and during withdrawal]. Morphologia. 2021;15(2):25-30. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.2.25-30>

 Ivasivka K.P. 0000-0003-4372-225X;  Paltov E.V. 0000-0002-2622-4753

 Masna Z.Z. 0000-0003-2057-7061;  Chelpanova I.V. 0000-0001-5215-814X

✉ Kristina2015652@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Описовий характер процесів розвитку патоморфологічних змін слизової оболонки та хрящового компоненту гортані при експериментальному опіоїдному впливі не завжди є достатнім для глибокого аналізу сутності явищ, термінів появи та темпів наростання патоморфологічних змін на різних термінах протікання експериментальної патології. Саме тому, залишаючи базовими традиційні методи реєстрації морфологічних змін, нами використано методи

математичної обробки отриманих даних. Такий підхід до вивчення описуваних явищ, значно полегшує розуміння процесів та логіку доказів [1-5].

Вищезазначене окреслює мету нашої роботи, що полягала у вивченні особливостей зміни морфометричних показників хрящового компоненту гортані на різних термінах перебігу експериментального опіоїдного впливу.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження слугували статево

зрілі, безпородні щури – самці в кількості 61 - а тварина, масою 80 – 135 г, віком 4,5 – 7,5 місяців. Тваринам проводили ін'єкції препарату налбуфін внутрішньо м'язово, щоденно 1 раз на добу в одному проміжку часу (10-11 година ранку) впродовж 42 діб. Початкова доза налбуфіну становила 8 мг/кг впродовж першого тижня, 15 мг/кг впродовж другого тижня, 20 мг/кг впродовж третього тижня, 25 мг/кг впродовж четвертого тижня, 30 мг/кг впродовж п'ятого тижня та 35 мг/кг впродовж шостого тижня. Таким чином створювали умови хронічного опіоїдного впливу [6]. Тварини поділені на 3 групи. 1- а група тварин отримувала налбуфін протягом 42 діб в одному проміжку часу (10 - 11 годин ранку) з наступним забором матеріалу дослідження. 2 – а група відміна, яка в проміжку з 42 доби до кінця 56 доби перебувала без впливу опіоїдного анальгетика. 3 – я група контрольна, яка протягом 56 діб отримувала ін'єкції фізіологічного розчину внутрішньо м'язово в одному проміжку часу (10 - 11 годин ранку) з подальшим забором матеріалу. Усі тварини знаходились в умовах віварію і робота, що стосувалася питань утримання, догляду, маркування та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” [Стразбург, 1985], “ Загальних етичних принципів експериментів на тваринах ”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики [Київ, 2001]. Комісією з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького встановлено, що проведені наукові дослідження відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01. 11. 2000 року (протокол № 10 від 26.12. 2011 року). Перед проведенням забору біопсійного матеріалу тварини присипляли дибутиловим ефіром. Як матеріал для морфометричного дослідження використали гортань щурів на гістологічних зрізах. Гістологічні препарати готували за загальноприйнятою методикою [7, 8].

Всі морфометричні дослідження було проведено із використанням первинних (нередагованих) фотографій, зроблених на мікроскопі Meiji MT4300 LE, камера Canon EOS 550D об'єktiv x100. Роздільна здатність отриманих знімків становила 2560x1920 пікселів. Для замірів лінійних показників було використано програмне забезпечення ImageJ ver. 1.51 [9–11] із використанням інструменту «straight» для лінійних замірів. Калібровочний коефіцієнт для обраного збільшення становив 1,84 пікселя на мікромметр. Забір товщини слизової проводився від основи надгортанника до його верхівки та у зворотньому напрямку із кроком 50-70 мкм. Всі результати зберігалися у вигляді електронних протоколів.

Результати замірів проходили перевірку на нормальність розподілу за допомогою критерію Шапіро - Уїлка та із використанням графічних методів – аналізу боксплотів (ящиків з вусами), та К-К графіків (квартиль - квартиль графіки). Так як отримані дані за характером розподілу не відрізнялися від нормального, було використано представлення центральної тенденції через $M \pm SD$, де M – середнє арифметичне, SD стандартне відхилення. Додатково в таблицях було вказано SE – стандартна похибка середнього, Min - мінімальне та Max – максимальне значення. Для графічного представлення отриманих результатів було обрано лінійний графік із планкою стандартного відхилення. Для перевірки рівності дисперсій між групами було використано тест Левена. Оскільки за результатами тесту Левена було встановлено відмінність дисперсії між групами, для перевірки значущості різниці показників між групами було використано H -критерій Краскела - Уолліса для трьох та більше незалежних груп із подальшим пост-хок (апостеріорним) аналізом із використанням тесту Дана (Dunn's test) для попарного порівняння. Рівень достовірності для морфометричних досліджень встановили на рівні $\alpha=95$. Різниця між групами вважалась достовірною при $p < 0,05$.

Для оформлення таблиць та графіків було використано електронні таблиці MS Excel 2010. Всі статистичні обрахунки проводилися із використанням програмного забезпечення RStudio v. 1.2.5042 [12].

Результати та їх обговорення

В результаті проведення морфометричного дослідження слизової оболонки та хрящового корсету гортані в **нормі** нами було встановлено, що на сагітальному розрізі надгортанник у щура має товщину 244.32 ± 40.26 мкм, рівномірну в центральній частині та біля верхівки, а біля основи товщина збільшується до 487.83 ± 59.32 мкм (Табл.1).

Слизова надгортанника у щурів контрольної групи має товщину 28.18 ± 5.93 мкм і коливається в межах від 16.05 мкм до 42.81 мкм (табл. 1). При проведенні морфометричного дослідження слизової оболонки та хрящового корсету гортані щура на різних термінах опіоїдного впливу було встановлено, що наприкінці **7-ої доби** опіоїдного впливу товщина слизової надгортанника збільшилась до значення 32.83 ± 7.27 мкм, що було достовірно більше показника контрольної групи (контрольна група 28.18 ± 5.93 мкм, $p < 0,05$).

Наприкінці 14-ої доби експерименту товщина слизової надгортанника становила 31.62 ± 4.74 мкм, що було в межах значення цього показника на попередньому терміні та залишалось достовірно більше показника контрольної групи (контрольна група 28.18 ± 5.93 мкм, $p < 0,05$).

Статистичні показники морфометрії надгортанника у щурів контрольної групи

Частина	M±SD	SE	Min	Max	N
Верхівка	244.32±40.26	7.89	162.61	314.82	26
Основа	487.83±59.32	20.97	401.45	570.53	8
Слизова	28.18±5.93	0.57	16.05	42.81	110

M – середнє значення, SD – стандартне відхилення, SE – стандартна похибка середнього, Min – мінімальне значення, Max – максимальне значення, N – об'єм вибірки.

Наприкінці 21-ої доби після початку введення опію товщина слизової надгортанника залишалася в межах значення попередніх термінів і її середнє значення становило 32.32±8.88 мкм (контрольна група 28.18±5.93 мкм, $p = 0,09$).

Наприкінці 28-ої доби від початку експерименту товщина слизової надгортанника тварин, яким вводили налбуфін, становила 31.81±7.29 мкм, що залишалася в межах показника попередніх термінів (контрольна група 28.18±5.93 мкм, $p = 0,28$).

Наприкінці 35-ої доби опію впливу спостерігалась динаміка зменшення товщини слизової надгортанника до показника 28.07±7.71 мкм (Рис. 1), що за значенням наблизилось до показника контрольної групи (контрольна група 28.18±5.93 мкм, $p = 1.0$).

Наприкінці 42-ої доби опію впливу показник товщини слизової продовжив тенденцію попереднього терміну дослідження та зменшився до значення 27.27±8.87 мкм (контрольна група 28.18±5.93 мкм, $p = 0.93$) (Табл. 2) (Рис. 1).

Таблиця 2

Статистичні показники морфометрії надгортанника у щурів протягом експерименту

Групи	M±SD	Min	Max	N	p
Контроль	28.18±5.93	16.05	42.81	110	
Тиждень 1	32.83±7.27	23.43	52.44	30	0.0499
Тиждень 2	31.62±4.74	20.16	43.67	82	0.0021
Тиждень 3	32.32±8.88	18.55	56.61	66	0.0904
Тиждень 4	31.81±7.29	22.82	54.24	33	0.2818
Тиждень 5	28.07±7.71	16.16	46.89	40	1.0000
Тиждень 6	27.27±8.87	16.43	55.49	50	0.9348
Тиждень 6 В	32.29±7.03	20.40	59.28	69	0.0047

M – середнє значення, SD – стандартне відхилення, SE – стандартна похибка середнього, Min – мінімальне значення, Max – максимальне значення, N – об'єм вибірки, В – відміна, p – точне значення p за результатами застосування апостеріорного тесту Дана.

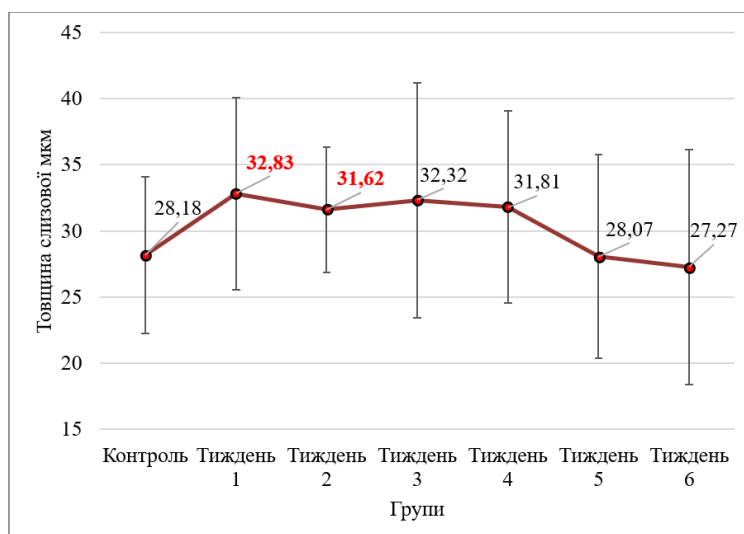


Рис. 1. Зміна значення товщини слизової протягом експерименту.

Нами було проведено дослідження зміни динаміки товщини слизової гортані при двохтижневій відміні опію в результаті якої було з'ясовано, що у групі відміни спостерігалось потовщення слизової надгортанника до показника 32.29 ± 7.03 мкм, що було достовірно як і при порівнянні із контрольною групою (контрольна група 28.18 ± 5.93 мкм, $p < 0,05$), так і при порівнянні із загальною групою 6 тижня (6 тиждень 27.27 ± 8.87 мкм, $p < 0,05$) (Рис. 2).

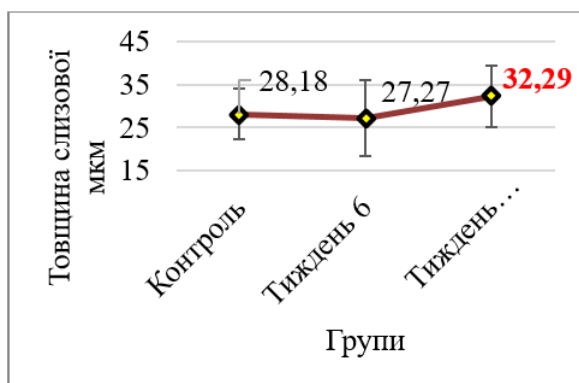


Рис.2. Динаміка зміни товщини слизової надгортанника при двохтижневій відміні опію.

Висновки

1. Таким чином, на перших тижнях опію впливу спостерігається збільшення товщини слизової надгортанника із максимальним значенням вже на 1-му тижні - 32.83 ± 7.27 мкм, що пов'язане із розвитком альтеративних змін епітелію які були найбільш виражені на гортанній поверхні з наявністю ділянок невеликих периваскулярних набряків. Таке потовщення спостерігається до 4 тижня включно.

2. На наступних термінах дослідження товщина слизової надгортанника зменшується,

фактично, до значення контрольної групи із тенденцією до подальшого зменшення на заключному терміні експерименту. Однак це зменшення до рівня контрольної групи, скоріше, можна трактувати як прояв декомпенсації та розвиток дистрофічних змін слизової. Це припущення корелює із потовщенням слизової надгортанника у підгрупі відміни на 6 тижні до значення 32.29 ± 7.03 мкм, що вказує на можливість відновлення слизової навіть після тривалого введення опію.

Перспективи подальших досліджень

Проведені нами морфометричні дослідження динаміки зміни товщини слизової оболонки гортані та його хрящового корсету на різних термінах експериментального опію впливу дадуть можливість виявити початок змін та їх глибину. На підставі цієї інформації знаючи етапи появи початкових проявів ми зможемо зорієнтуватися у термінах проведення корекції з подальшим співставленням даних морфометричного дослідження між собою.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідних тем «Структурна організація, ангіоархітектоніки та антропометричні особливості органів у внутрішньо та позаутробному періодах розвитку, за умов екзо- та ендопатогенних факторів» (номер державної реєстрації 0115U000041) та «Морфофункціональні особливості органів у пре- та постнатальному періодах онтогенезу, при впливі опію, харчових добавок, реконструктивних операціях та ожирінні» (номер державної реєстрації 0120U002129).

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Ulrich Vlrch Vinther M. [et al.] J. Am. Acad. Articular cartilage biology. Orthop Surg. 2003; 2: 421 – 430.

2. Eckstein F, Hudelmaier M, Puts R. The effects of exercise on human articular cartilage. Journal of Anatomy. 2006; 208(4): 491 – 512.

3. Paltov EV, Kryvko YuYa, Zhukovskiy VS, Fik VB, Vilkhova IV, Pankiv MV. Pathomorphologic changes in the retina layers at the end of the fourth week of effect. Deutscher Wissenschaftsherold. German Science Herald. 2018; 4: 36 – 39.

4. Ivasivka HP, Paltov EV, Masna ZZ. [Characteristics of the structural components of the mucosa and cartilage of the larynx of rats are normal]. World Science. 2021;3 (64): 4 – 13. Ukrainian.

5. Ivasivka HP, Paltov EV, Masna ZZ. [Pathomorphological characteristics of changes in the structural components of the mucosa and cartilage of the larynx of rats at the end of the seventh day of the experimental opioid effect]. Science review. 2021;2(37). DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_sr/30042021/7516 Ukrainian.

6. Onysko RM, Paltov EV, Fik VB, Vilkhova IV, Kryvko YuYa, Yakimiv NYa, Fitkalo OS, inventors; Danylo Halytskyi Lviv National Medical University. Method of modeling chronic opioid influence. Ukrainian patent. UA76564. 2013 Jan 10. G09B 23/28. Ukrainian.

7. Romeys B. [Microscopic technique]. Mos-

cow. Medicine. 1953: 71 – 72. Russian.

8. Goralsky LP, Khomych VT, Kononsky OI. [Fundamentals of histological technique and morphofunctional research methods in normal and pathology]. Tutorial. Kind. III, corrected and supplemented. Zhytomyr: Polissya, 2015. 286 p. Ukrainian.

9. Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. Biophotonics Int. 2004;11(7):36–42.

10. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, others. NIH Image to ImageJ: 25 years of image

analysis. Nat Methods. 2012;9(7):671–5.

11. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676–82.

12. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>

Івасівка Х.П., Пальтов Є.В., Масна З.З., Челпанова І.В. Морфометрична характеристика слизової оболонки та хрящового компоненту гортані в нормі на різних термінах перебігу експериментального опіоїдного впливу та при відміні.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Проблема неконтрольованого вживання препаратів опіоїдної групи є надзвичайно актуальною виходячи з даних вітчизняної та світової статистики яка висвітлюється у науковій літературі. Саме тому вивчення показників морфометричної характеристики слизової оболонки гортані при експериментальному опіоїдному впливі буде цікава як морфологам так і практичним оториноларингологам. **Мета.** Вивчити морфометричні показники слизової оболонки гортані в нормі на різних термінах експериментального опіоїдного впливу та при його відміні. **Методи.** Матеріалом дослідження слугували статево зрілі, безпородні шури – самці в кількості 61 - а тварина, масою 80 – 135 г, віком 4,5 – 7,5 місяців. Гістологічні препарати готували за загальноприйнятою методикою. Всі морфометричні дослідження було проведено із використанням первинних (нередагованих) фотографій, зроблених на мікроскопі Meiji MT4300 LE, камера Canon EOS 550D об'єктивів x100. Для оформлення таблиць та графіків було використано електронні таблиці MS Excel 2010. Всі статистичні обрахунки проводилися із використанням програмного забезпечення RStudio v. 1.2.5042. **Результати.** Таким чином, на перших тижнях опіоїдного впливу спостерігається збільшення товщини слизової надгортанника із максимальним значенням вже на 1-му тижні - 32.83 ± 7.27 мкм, що пов'язане із розвитком альтеративних змін епітелію які були найбільш виражені на гортанній поверхні з наявністю ділянок невеликих периваскулярних набряків. Таке потовщення спостерігається до 4 тижня включно. На наступних термінах дослідження товщина слизової надгортанника зменшується, фактично, до значення контрольної групи із тенденцією до подальшого зменшення на заключному терміні експерименту. Однак це зменшення до рівня контрольної групи, скоріше, можна трактувати як прояв декомпенсації та розвиток дистрофічних змін слизової. Це припущення корелює із потовщенням слизової надгортанника у підгрупі відміни на 6 тижні до значення 32.29 ± 7.03 мкм, що вказує на можливість відновлення слизової навіть після тривалого введення опіоїду. **Підсумок.** Впродовж всього експерименту на всіх термінах чітко прослідковувалася зміна морфометричних показників слизової оболонки гортані з ознаками хвилеподібного наростання та спаду. Більш позитивною була динаміка морфометричних показників після відміни опіоїдного анальгетика, що гіпотетично дає можливість припустити на процеси відновлення слизової навіть після тривалого введення опіоїду.

Ключові слова: гортань, морфометричні показники, норма, опіоїдний вплив, відміна, щур.

Ивасивка Х.П., Пальтов Е.В., Масна З.З., Челпанова И.В. Морфометрическая характеристика слизистой оболочки и хрящевого компонента гортани в норме на разных сроках течения экспериментального опиоидного воздействия и при отмене.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Проблема неконтролируемого употребления препаратов опиоидной группы является чрезвычайно актуальной исходя из данных отечественной и мировой статистики которая освещается в научной литературе. Именно поэтому изучение показателей морфометрических характеристики слизистой оболочки гортани при экспериментальном опиоидном воздействии будет интересна как морфологам так и практическим оториноларингологам. **Цель.** Изучить морфометрические показатели слизистой оболочки гортани в норме на разных сроках экспериментального опиоидного воздействия и при его отмене. **Методы.** Материалом исследования послужили зрелые, беспородные крысы - самцы в количестве 61 животное, массой 80 - 135 г, в возрасте 4,5 - 7,5 месяцев. Все морфометрические исследования были проведены с использованием первичных (Нередактируемая) фотографий, сделанных на микроскопе Meiji MT4300 LE, камера Canon EOS 550D объектив x100. Все статистические расчеты проводи-

лись с использованием программного обеспечения RStudio v. 1.2.5042. **Результаты.** Таким образом, на первых неделях опиоидного воздействия наблюдается увеличение толщины слизистой надгортанника с максимальным значением уже на 1-й неделе - 32.83 ± 7.27 мкм, что связано с развитием альтернативных изменений эпителия которые были наиболее выражены на гортанной поверхности с наличием участков небольших периваскулярных отеков. Такое утолщение наблюдается до 4 недели включительно. На следующих терминах исследования толщина слизистой надгортанника уменьшается фактически до значения контрольной группы с тенденцией к дальнейшему уменьшению на заключительном сроке эксперимента. Однако это уменьшение до уровня контрольной группы, скорее, можно трактовать как проявление декомпенсации и развитие дистрофических изменений слизистой. Это предположение коррелирует с утолщением слизистой надгортанника в подгруппе отмены на 6 неделе до значения 32.29 ± 7.03 мкм, что указывает на возможность восстановления слизистой даже после длительного введения опиоидов. **Заключение.** В течение всего эксперимента на всех сроках четко прослеживалась изменение морфометрических показателей слизистой оболочки гортани с признаками волнообразного нарастания и спада. Более позитивной была динамика морфометрических показателей после отмены опиоидного анальгетика, что гипотетически дает возможность предположить на процессы восстановления слизистой даже после длительного введения опиоидов.

Ключевые слова: гортань, морфометрические показатели, норма, опиоидный влияние, отмена, крыса.