

В.А. Кузьміна, І.І. Якубова

Експериментальне вивчення впливу гіперхолестеринової дієти на зачатки зубів нижньої щелепи в ембріонів мишей

Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет», Україна

Резюме. Одним з чинників, що призводить до порушення фізіологічного розвитку всіх органів і систем плода, є нераціональне харчування вагітних у кількісному та якісному співвідношенні. Порушення одонтогенезу в антенатальний період можливе як у фазі утворення білкового матрикса, так і у фазі первинної мінералізації.

Метою роботи було вивчення впливу харчової речовини (2 %) Cholesterol на морфологічну будову зачатків зубів ембріонів мишей на етапі гістогенезу.

Матеріал і методи дослідження. Для дослідження були використані білі безпородні миші масою 25–28 г (40 тварин). Самки контрольної групи отримували раціон віварію, а самки дослідної групи – корм з підвищеним вмістом Cholesterol. Матеріалом для дослідження слугували нижні щелепи 17–18-денних ембріонів мишей.

Результати та їх обговорення. У результаті морфологічного дослідження зачатків зубів 17–18-денних ембріонів мишей дослідної групи встановлено такі морфологічні зміни: одонтобласти різної форми, їх відростки слабо сформовані або взагалі відсутні, стоншення шару дентину, його неоднорідність, відсутність чіткої межі на рівні плащового та навколопульпарного дентину, що формуються у вигляді хвилястої чи ламаної лінії; відсутність вакуольних включень у цитоплазмі ена멜остоматобластів.

Висновки. Таким чином, отримано підтвердження негативного впливу надмірної кількості жирів у раціоні вагітної на закладку та первинну мінералізацію твердих тканин зубів у плода.

Ключові слова: нижня щелепа ембріона миші, одонтобласти, енамеლობласти, зачаток зуба.

Негативний вплив чинників ризику, що можуть впливати на повноцінне формування твердих тканин зубів, можливий як у фазі утворення білкового матрикса, так і у фазі первинної мінералізації [6]. Порушення процесів закладки та розвитку зачатків зубів, зміни структурно-функціонального стану емалі, сповільнення її дозрівання, а також дефіцит мінеральних компонентів у її складі можуть стати передумовою виникнення низькокарієсрезистентних твердих тканин зубів у дітей раннього віку [8].

Нераціональне харчування майбутніх матерів як у кількісному (недостатність або надлишок калорійності), так і в якісному співвідношенні (за основними харчовими компонентами) призводить до порушення розвитку плода й має вплив на виникнення хвороб у дитини [5, 10, 11]. При неповноцінному харчуванні вагітної відбувається затримка дозрівання твердих тканин зуба, натомість раціональне та збалансоване харчування є важливою складовою профілактики карієсу зубів [1, 4].

Частота проявів стоматологічної патології обумовлена порушеннями фетального органогенезу та гістогенезу [13]. У процесі ембріогенезу емалі, а саме первинної мінералізації, вирішальне значення мають білки емалі – амелобластин, амелогенін, енамелін і тафтелін [3]. Проблема диференціювання тканин зуба у фізіологічних і патологічних умовах є важливим теоретичним і практичним завданням сучасної стоматології [9].

Метою дослідження було вивчення впливу надлишкового вмісту жирів у харчуванні вагітних тварин на морфологічну будову зачатків зубів (17–18-денних) ембріонів мишей на етапі первинної мінералізації.

Матеріал і методи дослідження

При проведенні експерименту дотримувалися «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», а також Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», № 3446 ГУ від 12.02.2006 року [2].

Для вирішення поставлених завдань проведено експериментальне дослідження впливу гіперхолестеринової дієти як негативного чинника під час вагітності [7]. Для дослідів були використані білі безпородні миші. Експериментальну гіперліпідемію моделювали шляхом додавання в харчовий раціон двох грамів «Cholesterol extra pure» (виробництва фірми «Merck», Німеччина) на 100 грамів корму. Тварини були розділені на дві групи – дослідну та контрольну. За 30 днів до вагітності та в період вагітності самки контрольної групи отримували раціон віварію; самки дослідної групи – корм з підвищеним (2 %) вмістом Cholesterol.

Інтерпретація одержаних результатів відносно людини можлива, оскільки послідовність генів, що містять інформацію про біологічно активні білки, у них подібна [12].

Експериментальні дослідження проводили у відділі загальної та молекулярної патофізіології, в експериментально-біологічній клініці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України під керівництвом д-ра мед. наук, професора Досенко В.Є. (договір від 23.10.2014 р.).

Для дослідів були використані 40 білих безпородних мишей-самок і 10 білих безпородних мишей-самців кожна масою 25–28 г. Тварини були статевозрілими, утримувалися в однакових умовах. Мишей-самок було розділено на дві групи (по 20 тварин у кожній) – контрольну й дослідну. Самки контрольної групи отримували раціон віварію; самки дослідної групи – корм з підвищеним (2 %) вмістом Cholesterol. Експериментальне дослідження було розпочато 24.11.2014 р. Через 30 днів (24.12.2014 р.) самкам, що перебували у стадії проеструса (передтічки) й еструса (тічки), увечері підсаджували самців у співвідношенні 4:1. Ранком наступного дня проводили мікроскопічне дослідження вагінальних мазків. Виявлення сперми у вагінальному мазку самок підтверджувало факт запліднення – перший день вагітності. Протягом вагітності самки контрольної групи отримували звичайний раціон

віварію, а самки дослідної групи – дієту з підвищеним вмістом Cholesterol. На 18-й день вагітності вагітних мишей, по шість тварин з кожної групи, виводили з дослідної інгальційним передозуванням вуглекислого газу.

Матеріалом для молекулярно-генетичних досліджень слугували нижні щелепи 17–18-денних ембріонів (Е 17–18) мишей у зв'язку з тим, що визначальними чинниками кальцифікації зачатків зубів на всіх стадіях одонтогенезу є білкові продукти генів, і вони є впливовими на стадії «дзвоника» (the bell stage) із 16,5 до 18,5 дня вагітності мишей (Е 16,5–18,5).

Нижні щелепи фіксували у 2 % глютаральдегіді на какодилатному буфері з подальшою декальцинацією та наступною постфіксацією у 1 % оксиді осмію та заливкою в епоксидні смоли. Морфологічні зрізи виготовляли товщиною 1,0–1,5 мкм, фарбування проводили метиленовим синім та основним фуksiном, що дало можливість розмежувати мезенхімальні та епітеліальні тканини. Дослідження проводили під мікроскопом «Nicon Eclipse E 200» (виробництво Fryer Co., Huntley, IL, США), фотографування здійснювали за допомогою цифрової камери «Nicon DS-F11» для опису мікрофотографій при збільшенні 10, 20, 40, 100.

Результати дослідження та їх обговорення

Були проведені дослідження морфологічної будови зачатків зубів нижньої щелепи 17–18-денних ембріонів мишей для порівняння патоморфологічних змін під впливом дієти з підвищеним вмістом Cholesterol з метою встановлення функціонального значення експресії генів ключових регуляторів остеогенезу – Ameloblastin, OPG та RANKL на етапі закладки та первинної мінералізації зубів.

На мікропрепараті (рис. 1) виявляється зубний зачаток на етапі гістогенезу, у центрі якого розташована ретикулярна тканина, представлена клітинами зірчастої форми. В її товщі присутні окремі судинні ходи із включенням еритроцитів. Навколо прошарок клітин грушоподібної форми – одонтобласти, що згодом відіграватимуть роль у постачанні в дентин поживних речовин (глікополімерів і мінеральних солей). Далі – прошарок дентину, який формується, край якого чіткий і відмежований від ще не сформованого прошарку емалі та енамелобластів. Оточений зубний зачаток щільною мезенхімальною тканиною із фрагментами кісткової пластинки по периферії. Відмічається досі збережений тяж багат шарового епітелію, який указує на ділянку, з якої відбувалось формування зубного зачатку.

При огляді мікропрепарату (рис. 2) з тварин контрольної групи відмічається чітка межа між мезенхімальним шаром і шаром енамелобластів, які представлені рядом клітин витягнутої циліндричної форми з контурами ядер. Одонтобласти – зі світлою цитоплазмою та довгастим ядром з чіткими контурами.

На ідентично збільшеному мікропрепараті (рис. 3) тварин з дослідної групи відмічається посилена вакуолізація одонтобластів, межа із прилеглим прошарком дентину хвиляста чи зубчаста. Масив енамелобластів з нерівномірним зафарбуванням, що вказує на неоднорідність клітин.

При перегляді наступного мікропрепарату (рис. 4) тварин з контрольної групи відмічається рівномірний розвиток одонтобластів, чіткий контур їх ядер. Прошарок дентину разом із біляпульпарною та плащовою зонами широкий, помірно й рівномірно забарвлений. Енамелобласти розташовані рівномірно, в апікальній частині – їх збільшена щільність. Ділянками відмічаються їх відростки – відростки Томса, що в подальшому збережуть у кутикулі емалі, формуючи її щільність.

Однак на мікропрепараті (рис. 5) тварин з дослідної групи звертає на себе увагу значне зменшення розмірів прошарку дентину. Межа між шарами плащового дентину та біляпульпарного дентину, що формується у вигляді хвилястої розмитої, нерівномірно зафарбованої смуги. Енамелобласти витягнутої округлої форми, без ділянок ущільнення. Ядра окремих клітин відсутні, відростки Томса не візуалізуються.

На двох наступних мікропрепаратах (рис. 6) тварин з контрольної групи присутні ознаки рівномірного формування шару одонтобластів, відростки яких по дентинних трубочках занурені в товщу дентину. Плащовий дентин на межі з енамелобластами формує практично рівну межу. Енамелобласти містять добре виражені ядра, у товщі цитоплазми визначаються вакуольні включення, що виділяються через відростки Томса в кутикулу емалі, що формується.

При порівнянні мікропрепаратів (рис. 7), відібраних з дослідної групи тварин, відмічається, що одонтобласти різних розмірів, округлої форми, їх відростки не контуруються. Шар дентину з його пульпарною та плащовою зонами тонкий, нерівномірно забарвлений, що свідчить про неоднорідність тканини. Лінія дентинного прошарку має вигляд ламаної за рахунок нерівномірного розвитку одонтобластів. Вакуольні включення в цитоплазмі енамелобластів відсутні, що в подальшому впливатиме на формування емалі зуба.

Висновок

Після морфологічного дослідження зачатків зубів 17–18-денних ембріонів мишей, самки яких до й у період вагітності перебували на гіперхолестериновій дієті, у порівнянні з морфологічним дослідженням тканин ембріонів мишей, самки яких утримувались на раціоні віварію, встановлено такі морфологічні зміни: одонтобласти різної форми, їх відростки слабо сформовані або взагалі не сформовані; стоншення прошарку дентину, його неоднорідність, відсутність чіткої межі на рівні плащового та навколопульпарного дентину, що формуються у вигляді хвилястої чи ламаної лінії; відсутність вакуольних включень у цитоплазмі амелобластів.

Такий стан ембріональних структур свідчить про порушення на рівні клітин при формуванні твердих тканин зуба, що в подальшому може супроводжуватися швидкою втратою їх функціональної здатності з подальшим незворотним руйнуванням через незначний проміжок часу після прорізування.

Таким чином, маємо підстави обґрунтовано стверджувати, що на закладку та первинну мінералізацію твердих тканин зубів у плода негативно впливає надмірна кількість жирів у раціоні вагітної. Саме тому, одним із пріоритетних напрямків диспансерного спостереження вагітних повинні бути раннє виявлення порушень харчування та нормалізація раціону харчування як метод антенатальної профілактики загалом і стоматологічної зокрема.

Перспективи майбутніх досліджень

Отримані дані морфологічних досліджень використані для планування клінічних досліджень і розробки лікувально-профілактичної схеми для вагітних з конституційно-аліментарною формою ожиріння та їхніх дітей до 24-х місяців.

Автори висловлюють подяку представництву торгової марки «R.O.C.S.» в Україні ТОВ «ВДС Фарма» за забезпечення засобами та предметами гігієни порожнини рота при проведенні клінічних досліджень.

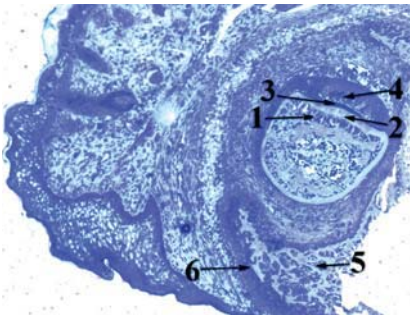


Рис. 1. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші на етапі гістогенезу, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 10$:
1 – одонтобласти;
2 – дентин, що формується;
3 – емаль, що формується;
4 – емалобласти;
5 – фрагмент кісткової пластинки;
6 – емалевий тяж (багат шаровий епітелій).

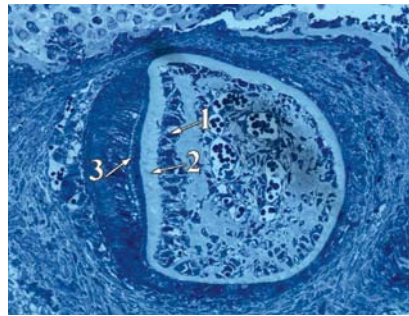


Рис. 2. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші на етапі гістогенезу (зразок 3, самка № 2), контрольна група тварин, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 20$:
1 – одонтобласти;
2 – дентин;
3 – емалобласти.

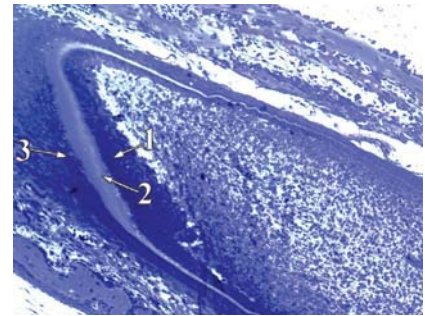


Рис. 3. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші (зразок 6, самка № 1), дослідна група тварин, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 20$:
1 – одонтобласти; 2 – дентин;
3 – емалобласти.

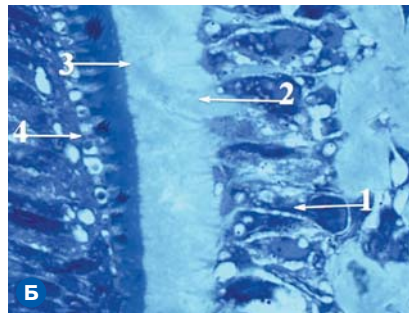
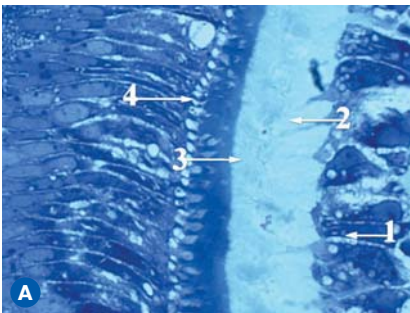


Рис. 6. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші (зразок 3, самка № 2), контрольна група тварин, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 100$:
1 – одонтобласти;
2 – навколопульпарний дентин, що формується;
3 – плащовий дентин, що формується;
4 – емалобласти.

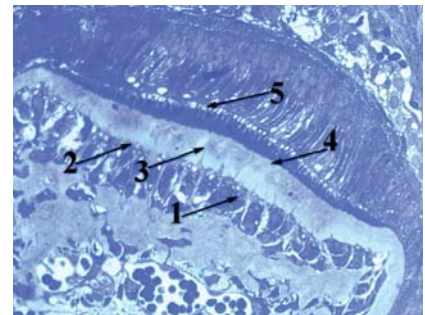


Рис. 4. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші (зразок 3, самка № 2), контрольна група тварин, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 40$:
1 – одонтобласти;
2 – навколопульпарний дентин, що формується, 3 – дентин;
4 – плащовий дентин, що формується;
5 – емалобласти.

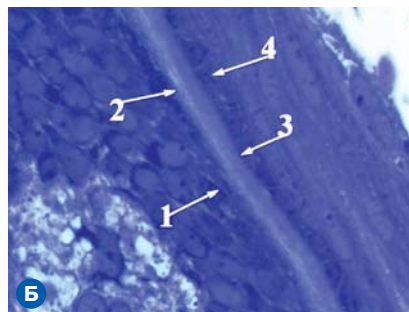
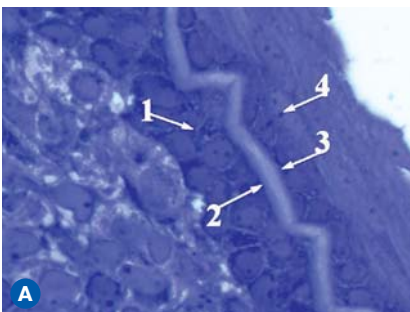


Рис. 7. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші, дослідна група тварин, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 100$:
1 – одонтобласти;
2 – навколопульпарний дентин, що формується;
3 – плащовий дентин, що формується;
4 – емалобласти.



Рис. 5. Мікрофотографія структури зачатка зуба нижньої щелепи 17–18-денного ембріона миші, дослідна група тварин, забарвлення метиленовим синім, збільшення $\times 40$:
1 – одонтобласти;
2 – навколопульпарний дентин, що формується; 3 – дентин;
4 – плащовий дентин, що формується;
5 – емалобласти.

ЛІТЕРАТУРА

1. Александров Е.И., Овсянкин В.И., Александров И.Н., Овсянкина Е.В. Стоматологические аспекты питания беременных и детей // Медико-социальные проблемы сім'ї. – 2012. – Т. 17. – № 1. – С. 111–113.
2. Анисимов А.П., Копылов Д.Э., Мохов А.А. Правовой режим животных как объекта гражданских и иных правоотношений // Современное право. – 2007. – № 4. – С. 93–98.
3. Гасюк П.А., Ройко Н.В. Морфология первинної мінералізації емалі на етапі амелогенезу // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16. – № 2 (62). – С. 47–49.
4. Гігієна харчування з основами нутріціології / Підручник: у 2 кн. / Під ред. В.І. Ципріяна. – К.: Здоров'я, 2007. – 544 с.
5. Хахиани М.И. Нарушения питания у беременных – состояние проблемы // Журнал акушерства и женских болезней. – 2008. – Том LVII, вып. 2. – С. 121–124.
6. Ковач І.В., Дичко Є.Н., Біндюгін О.Ю., Бунятян Х. А. Потенційні фактори ризику при системній гіпоплазії та карієсі зубів на етапі одонтогенезу // Клінічна медицина. – 2013. – Т. XVIII. – № 1. – С. 33–37.
7. Демидова М.А., Волкова О.В., Егорова Е.Н., Савчук И.А. Моделирование атерогенной гиперлипидемии у кроликов // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 3. – URL: <http://www.scienceeducation.ru/974689>.
8. Морозов С.А. Морфологічна характеристика зачатків зубів новонародженого щура при експериментальній затримці внутрішньоутробного розвитку / Експериментальна і клінічна медицина. – 2013. – № 1 (58). – С. 91–96.
9. Морозов С.А. Морфологічна характеристика зачатків зубів новонародженого щура при фізіологічному перебігу вагітності // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 169–172.
10. Намазова А.Ф., Красникова М.Б., Трубина Т.Б., Трубин В.Б. Оценка влияния фактического питания на особенности течения беременности, родов и лактационную функцию // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90. – № 3. – С. 429–431.
11. Хорошилов И.Е. Правильное питание беременных и кормящих женщин // Гинекология. – 2006. – № 5. – С. 35–38.
12. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas / by P.M. Treuting, S.M. Dintzis. Ac. demic Pr. ss, 2012. – 474 p.
13. Warner M.J., Ozanne S.E. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease // Biochem. J. – 2010. – Apr. № 427 (3). – P. 333–347.

Експериментальное изучение влияния гиперхолестериновой диеты на зачатки зубов нижней челюсти у эмбрионов мышей

В.А. Кузьмина, И.И. Якубова

Резюме. Одним из факторов, приводящих к нарушению физиологического развития всех органов и систем плода, является нерациональное питание беременных в количественном и качественном соотношении. Нарушение одонтогенеза в антенатальный период возможны как в фазе образования белкового матрикса, так и в фазе первичной минерализации.

Целью было изучение влияния пищевого продукта (2 %) Cholesterol на морфологическое строение зачатков зубов эмбрионов мышей на этапе гистогенеза.

Материал и методы исследования. Для исследования были использованы белые беспородные мыши массой 25–28 г (40 животных). Самки контрольной группы получали рацион вивария, а самки подопытной группы – корм с повышенным содержанием Cholesterol. Материалом для исследования послужили нижние челюсти 17–18-дневных эмбрионов мышей.

Результаты и их обсуждение. В результате морфологического исследования зачатков зубов 17–18-дневных эмбрионов мышей исследовательской группы установлены следующие морфологические изменения: одонтобласты различной формы, их отростки сформированы слабо или вообще отсутствуют, истончение слоя дентина, его неоднородность, отсутствие четкой границы на уровне плащевого и околопульпарного дентина в виде волнистой или ломаной линии; отсутствие вакуольных включений в цитоплазме энамелобластов.

Выводы. Таким образом, получено подтверждение негативного влияния чрезмерного количества жиров в рационе беременной на закладку и первичную минерализацию твердых тканей зубов у плода.

Ключевые слова: нижняя челюсть эмбриона мыши, одонтобласты, энамелобласты, зачаток зуба.

Experimental study of the influence of hypercholesterin diet on the lower jaw follicles in mice embryos

V. Kuz'mina, I. Yakubova

Resume. One of the factors that leads to a violation of the physiological development of all organs and systems of the fetus is the inappropriate nutrition of pregnant women in a quantitative and qualitative ratio. Violation of odontogenesis in the antenatal period is possible both in the phase of formation of the protein matrix and in the phase of primary mineralization.

The Aim of this Work was to study the influence of nutrients (2 %) Cholesterol on the morphological structure of the dental follicles in mice embryos at the stage of histogenesis.

Materials and methods of research. For the study were used white, unborn mice weighing 25–28 g (40 animals). The females of the control group received a diet of vivarias, and females of the experimental group – a feed with high Cholesterol content. The material for the study was the lower jaw of the 17–18 day embryos of mice.

Results and discussion. As a result of the morphological study of the dental follicles of the 17–18 day embryos of mice of the experimental group there were identified the following morphological changes: odontoblasts with different forms, their processes are poorly formed or absolutely absent, thinning of the dentin layer and its in homogeneity, the absence of a clear boundary on the level between the mantle dentin and circumpulpal dentin, forming in the form of a wavy or «broken» line; absence of vacuolar inclusions in the enameleoblastic cytoplasm.

Conclusions. Thus, we have received confirmation of the negative influence of excessive amount of fats in the diet of the pregnant woman on the initiation and primary mineralization of hard tissues of the teeth in fetus.

Key words: lower jaw of the mouse embryo, odontoblasts, enameloblasts, dental follicle.

В.А. Кузьміна – магістр, асистент кафедри дитячої терапевтичної стоматології приватного вищого навчального закладу «Київський медичний університет».
І.І. Якубова – д-р мед. наук, професор приватного вищого навчального закладу «Київський медичний університет», завідувач кафедри дитячої терапевтичної стоматології.

SMART ORAL CARE

Новинка!



Подтверждено клиническими исследованиями и тестами

УНИКАЛЬНАЯ ЗУБНАЯ ПАСТА

С РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПЕПТИДАМИ

BIOSOMPLEX

АКТИВНАЯ ЗАЩИТА

НА ОСНОВЕ НАТУРАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ **98%**

- ЗАЩИЩАЕТ ОТ КАРИЕСА
- УМЕНЬШАЕТ ВОСПАЛЕНИЕ И КРОВОТОЧИВОСТЬ ДЕСЕН
- НАСЫЩАЕТ ЭМАЛЬ МИНЕРАЛАМИ

Активная натуральная защита на каждый день. Содержит запатентованный комплекс на основе растительных пептидов, ксилита и минералов. Защищает от кариеса, воспаления десен*. Надолго освежает дыхание. Не имеет возрастных ограничений. Подходит для длительного ежедневного применения.

БЕЗ ФТОРА, БЕЗ ПАРАБЕНОВ, БЕЗ ЛАУРИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ.

