

ВИВЧЕННЯ ЕМАЛІ ЗУБІВ МИШЕЙ, ЯКІ УТРИМУВАЛИСЯ НА ДІЄТІ ІЗ ПІДВИЩЕНИМ ВМІСТОМ ХОЛЕСТЕРИНУ МЕТОДОМ РАСТРОВОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет УАНМ»
(м. Київ)

Дана робота є фрагментом комплексної науково-дослідної теми кафедри терапевтичної стоматології спільно з кафедрою дитячої терапевтичної стоматології та профілактики стоматологічних захворювань Приватного вищого навчального закладу «Київського медичного університету УАНМ» «Використання біологічно-активних речовин і гомеопатичних препаратів у комплексному лікуванні карієсу та його ускладнень, захворювань пародонту та слизової оболонки порожнини рота» (державний реєстраційний номер РК № 0106УО13099).

Вступ. Надмірне споживання з їжею підвищеної кількості холестерину, призводить до збільшення його рівня в крові [7]. Джерелом харчового холестерину є продукти тваринного походження, зокрема м'ясо, молоко та продукти його переробки (у тому числі і в сирах), жовтки яєць, вершкове масло, яловичий жир, сметана, мозок тварин [1, 11].

Вплив гіперхолестеринемії на експресію генів, зокрема *BMP 2* і остеокальцину є відомим [21]. Білок *BMP 2*, який є ростовим чинником для клітин зачатку зуба [22], запускає диференціацію фолікулярних клітин в цементобласти / остеобласти [19]. Білок остеокальцин відноситься до протеїнів, що містить три залишки γ -карбоксиглутамінової кислоти, яка зв'язує вільний кальцій та запобігає утворенню апатитів. Остеокальцин є вітамін-К-залежним матриксним протеїном, який може зв'язуватися з гідроксиапатитами. Він синтезується одонтобласти дентину і є визначальним чинником мінералізації сполучної тканини зуба [23]. Досліджено в експерименті, що гіперхолестеринова дієта певною мірою змінює експресію генів *BMP 2* та остеокальцину, при чому ці зміни є різноспрямованими. Виходячи з функції *BMP 2*, як ключового чиннику диференціації одонтобластів [19], можна вважати, що збільшення його експресії буде прискорювати одонтогенез. При цьому, зниження експресії гену остеокальцину, що забезпечує мінералізацію в тканинах зачатку зуба, може призвести до недостатності насичення гідроксиапатитами твердих тканин зуба, що формується і як наслідок прорізування зубів із зниженим рівнем мінералізації. В щелепах 17-денних ембріонів мишей, які отримували холестерин (2 %) протягом вагітності рівень експресії *BMP 2* мав тенденцію до збільшення і становив $30,9 \pm 5,81$ ($P=0,53$; $P>0,05$).

При цьому рівень експресії остеокальцину, навпаки, знижувався на 22,3% і становив $23,7 \pm 5,31$ [17]. В експерименті на препаратах зачатків зубів 17-тиденних ембріонів мишей, які отримували протягом вагітності холестерин (2 %) виявлено значні морфологічні зміни, що свідчать про виражену функціональну дисфункцію амелобластів та одонтобластів [18].

За методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії було з'ясовано, що на поверхні емалі дводенних мишей під впливом дієти із підвищеним вмістом холестерину (2 %) відбулися зміни мінерального складу емалі. Зокрема, зниження вмісту елемента Ca^{2+} , вміст елементів P^{5+} , Na^+ , Cl^- мав тенденцію до зростання. Вихідний рівень мінералізації за Ca / P коефіцієнтом складав 1,26. Зважаючи, що при співвідношенні Ca / P нижче 1,33 спостерігаються незворотні зміни в структурі емалі [3], можна говорити про прорізування зубів із недосконалою структурою [16].

Метою дослідження було вивчення впливу дієти із підвищеним вмістом холестерину на структуру зубів 28-денних мишенят.

Об'єкт і методи дослідження. Експеримент проводили із дотриманням «Правил проведення робіт із використанням експериментальних тварин». Для експерименту були використані білі безпородні миші масою 25 – 28 г (40 тварин). Тварин поділили на 2 групи: контрольну і дослідну.

Експериментальну гіперхолестеринемію моделювали додаванням в харчовий раціон холестерину (2 %) протягом 60 днів [2, 12]. Миші дослідної групи отримували раціон віварію із додаванням 2 гр. холестерину (*Cholesterol* виробництва фірми *Merck, Germany*) на 100 гр. корму. Миші контрольної групи отримували раціон віварію. Через 30 днів самкам, що знаходилися в стадії проєструса (передтічка) і еструса (тічка) підсаджували самців у співвідношенні 4:1. Виявлення спермій у вагінальному мазку самки після підсадки вказувало на запліднення – перший день вагітності. Протягом усієї вагітності самки знаходилися в клітках і отримували раціон віварію (контрольна група) і раціон віварію із підвищеним вмістом холестерину (2%) (дослідна група). Вагітні миші народжували і мишенят у кількості по 6 тварин із кожної групи виводили із експерименту інгаляційним передозуванням вуглекислого газу на

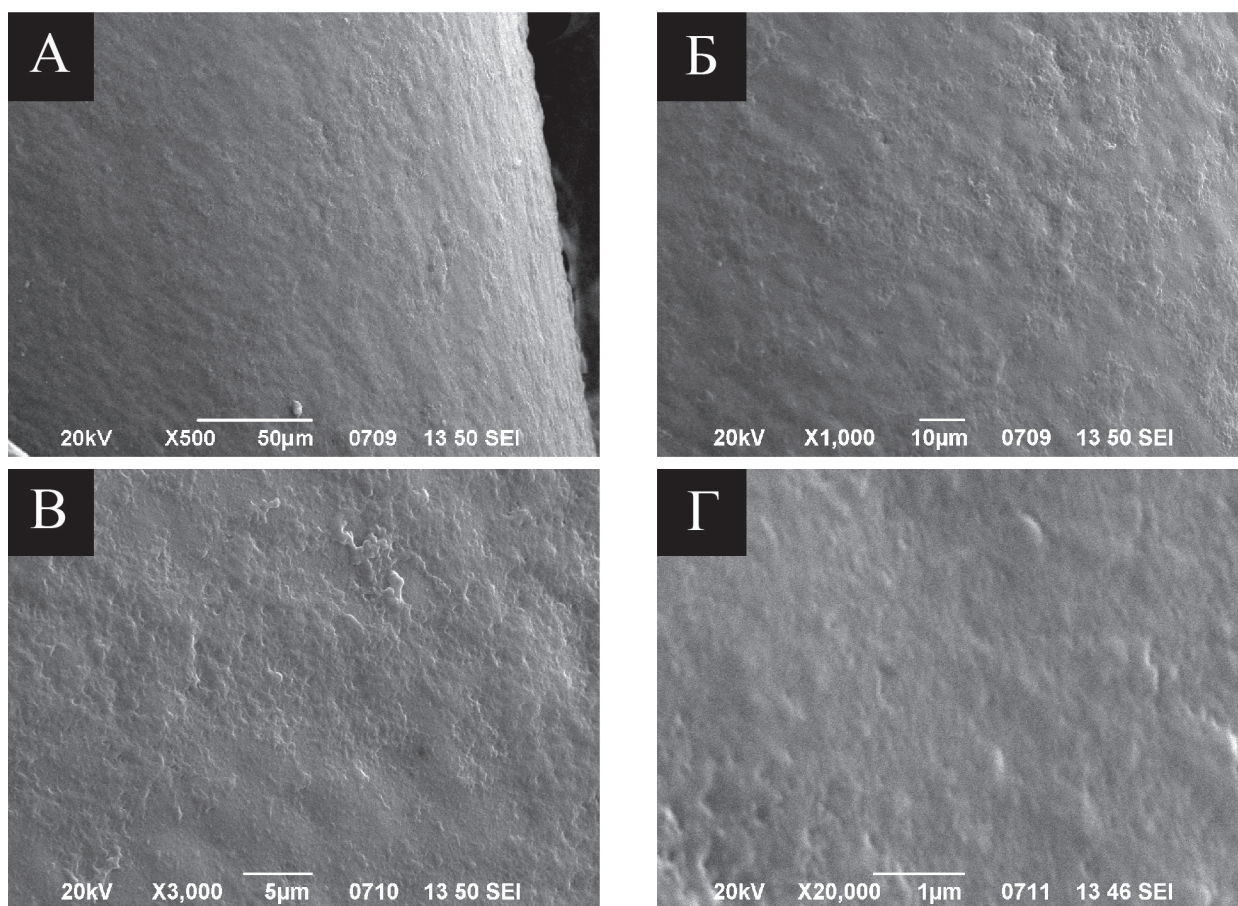


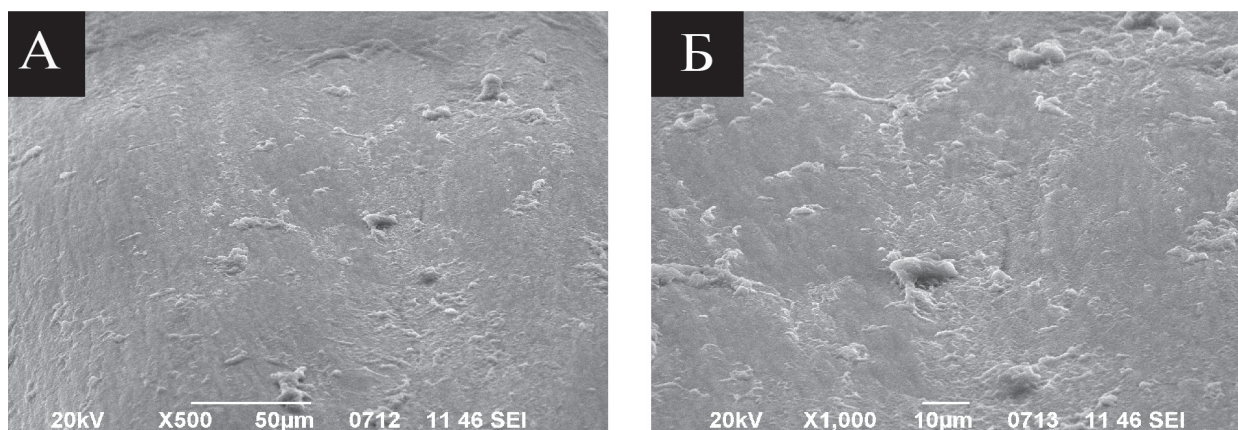
Рис. 1. Р.Е.М. поверхневого шару емалі нижніх різців 28-денних мишенят (D-28) контрольної групи (А – x500; Б – x1000; В – x3000; Г – x20000).

28-й день після народження (D-28). Для дослідження використовувались нижні щелепи мишенят. Всі зразки зберігались у пробірках (10% р-н стрептоміцину), що щільно закриваються, при температурі +2... +4°C. Перед дослідженням зразки промоили руками у гумових рукавичках дистильованою водою і пасивно висушили. Після цього зразки розміщували у вакуумний апарат (*Ion Sputter JFC-1600*, виробництва *Jeol, Japan*) до повного випаровування залишкової вологи з подальшим напыленням тонкого шару Pt (~25 nm). Поверхневу структуру та морфологію

очищеної емалі оцінювали за допомогою растрового електронного мікроскопу (*JSM-6490LV*, виробництва *Jeol, Japan*), з прискорюючою напругою 20 кВ. Було отримано растрові електронні мікрофотографії (Р.Е.М.) зі збільшенням x30, x100, x500, x1000, x3000, x5000 та x10000.

Результати досліджень та їх обговорення.

При електронній мікроскопії різців мишенят контрольної групи визначається класична поверхня емалі зуба миші [19] (рис.1). При збільшені x3000



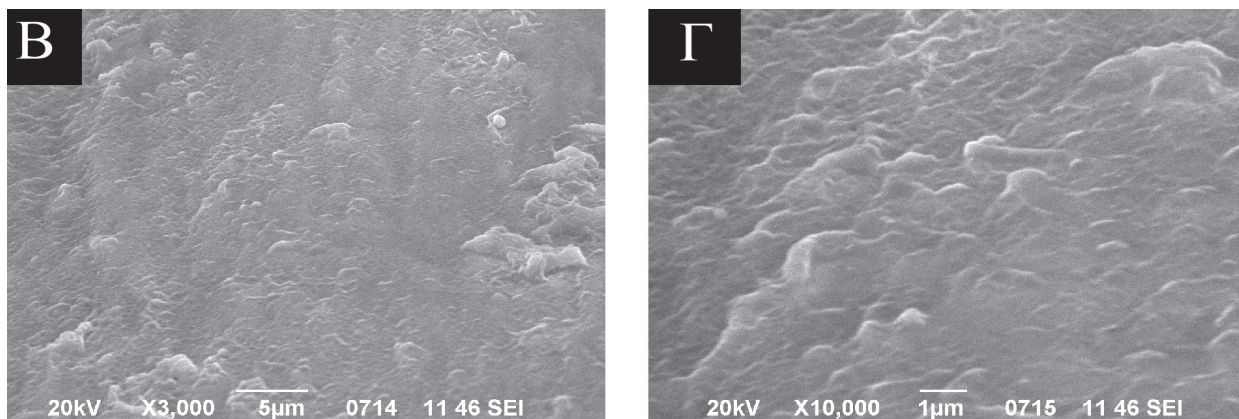


Рис. 2. Р.Е.М. зображення поверхневого шару емалі нижніх різців 28-денних мишенят (D-28) під впливом дієти із підвищеним вмістом холестерину (А – х500; Б – х1000; В – х3000; Г – х10000).

спостерігається загалом рівномірна поверхня, на котрій можна простежити незначну шорхуватість.

При електронній мікроскопії різців мишенят основної групи визначається майже гладка поверхня емалі зуба миші (**рис.2**). При збільшенні х3000 спостерігаються хвиляподібні напливи емалі, що характеризуються різною періодичністю та величиною хвиль. Збільшення х10000 дозволяє конкретизувати

деформацію поверхні емалі, а саме можна визначити, що більшість хвиляподібних напливів мають розмір близько 1 – 2 мкм, але зустрічаються й більші – до 5 мкм. Це може свідчити про порушення функції амелобластів в період амелогенезу.

При аналізі растрових електронних мікрофотографій нижніх молярів мишенят (D-28), які народилися від мишей, котрі знаходились на дієті із

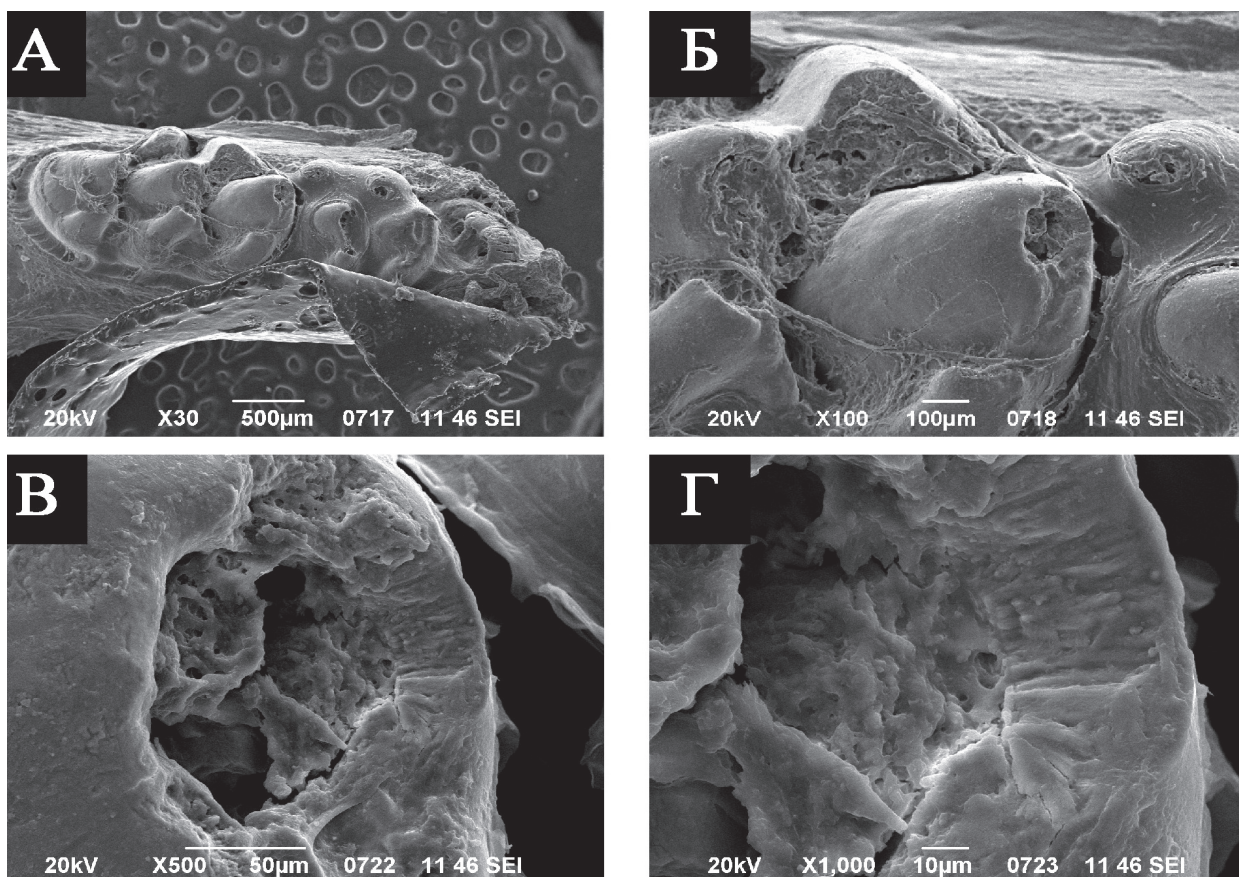


Рис. 3. Р.Е.М. зображення поверхневого шару емалі нижніх молярів 28-денних мишенят (D-28) під впливом дієти із підвищеним вмістом холестерину (А – х30; Б – х100; В – х500; Г – х1000)

підвищеним вмістом холестерину, виявились порушення в поверхневій структурі зубів (**рис. 3 А-Г**). При збільшенні $\times 30$ (**рис. 3 А**) на вершинах бугрів молярів простежуються кратероподібні отвори, що є ознакою порушення цілісності емалі. При збільшенні $\times 100$ (**рис. 3 Б**) визначились розміри дефектів, вони складають близько 100 мкм в діаметрі. Роздільна здатність $\times 500$ (**рис. 3 В**) дозволила конкретизувати нерівномірність країв дефекту, а також глибокий характер відсутності твердих тканин зуба у цій ділянці. Крім того, на деяких скатах додаткових бугрів молярів теж визначається нерівномірна пористість, котра вірогідно виникла під час формування емалі. При збільшенні $\times 1000$ (**рис. 3 Г**) створилась можливість простежити бокову ділянку дефекту, виявилась наскрізна руйнація поверхні емалі до дентину зуба, видима частина дефекту сягає глибше 160 мкм і продовжується вглиб зубу, в ділянки без можливості зовнішньої візуалізації. Це вказує на більш глибокий дефект і, вірогідно, разом із цим дефектом може простежуватись спотворення структури твердих тканин зубу не тільки зовнішнього шару, але і внутрішніх глибоких шарів.

Дані мікрофотографії дають можливість зробити висновки, що зразки нижніх молярів мишенят мають структурні зміни, які знаходять своє відображення в нерівномірному, але закономірному порушенні структури як поверхневих, так і більш глибоких шарів твердих тканин зубів.

Висновок. При аналізі растрових електронних мікрофотографій різців і нижніх молярів 28-денних

мишенят, які народилися від мишей, котрі до і під час вагітності знаходились на дієті із підвищеним вмістом холестерину (2 %), виявились порушення в поверхневій структурі зубів, зокрема мали аномальну поверхню емалі різців та дефекти бугрів нижніх молярів. Цей факт доводить важливість аліментарного чиннику, зокрема надлишкового вмісту жирів у вагітних мишей в розвитку патології твердих тканин зубів у їх потомства. Аналогічні дефекти та деформації бугрів спостерігались у нижніх молярах *NBCe1* мутантних мишей у дослідженнях американських та канадських вчених [24].

Перспективами подальшого дослідження є вивчення впливу підвищеного вмісту жирів у харчуванні вагітних жінок на емалеву резистентність зубів народжених ними дітей.

Подяка

Автор висловлює подяку

Андрію Олександровичу Рудовському,
завідувачу експериментально-біологічної клініки
Інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН Укра-

їни за підтримку лабораторних робіт;

Віталію Олександровичу Тінкову,

канд. фіз.-матем. наук, молодшому науковому
співробітникові Інституту металофізики імені Г.В.

Курдюмова НАН України (м. Київ) за допомогу у

проведенні досліджень;

компанії **TOKYO BOEKI CIS LTD** (Японія)

за надану можливість проведення робіт на мі-

кроскопі **JEOL JSM 6490LV**.

Список літератури

1. Анохина Г.А. Питание беременных, рожениц и кормящих матерей / Г.А. Анохина. — Киев, 2002. — С. 3-14.
2. Боровский Е.В. Кариес зубов: препарирование и пломбирование / Е.В. Боровский. -М.: АО Стоматология, 2001. — 144 с.
3. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие. 2-е изд., испр. и доп. — М: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 250 с.
4. Григоренко О. М. Наукові підходи до формування раціонів харчування студентів / О. М. Григоренко // зб. наук. пр. "Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі": Вип. 2 (10). — Х.: ХДУХТ, 2009. — С. 210—218.
5. Демидова М.А., Волкова О.В., Егорова Е.Н., Савчук И.А. Моделирование атерогенной гиперлипидемии у кроликов // Современные проблемы науки и образования. — 2011. — № 3.
6. Кирсанова Л.А. Сбалансированное питание: для беременных и кормящих / Л.А. Кирсанова. — М.: Центрполиграф, 2007. — 155 с.
7. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я.Кольман, К.-Г. Рем: пер. с нем.- 4-е изд.- М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011.- 469с.
8. Мальцева Н.А. Особенности первого триместра беременности у женщин с нарушением жирового обмена: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.00.01 «Акушерство и гинекология» / Н.А. Мальцева. — М., 2008. — 24 с.
9. Матасар І.Т. Гігієнічна оцінка стану харчування працездатного населення в сучасних екологічних умовах: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.02.01 — «Гігієна» / І. Т. Матасар. — К., 2001. — 40 с.
10. Справочник по детской стоматологии / Под ред. А.С. Cameron, R.P.Widmer; Перевод с англ. под ред. Т.Ф. Виноградовой, Н.В. Гинали, О.З. Топольницкого. — М.: МЕДпресс-информ, 2003. - С. 154-155.
11. Справочник по диетологии Под ред. В.А. Тутельяна, М.А. Самсонова. М.: Медицина, 2002. 544 с.
12. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.
13. Стоматология детей и подростков / Под ред. Р.Е. МакДональда, Д.Р. Эйвери / Пер. с англ. под ред. Т.Ф. Виноградовой. — М.: Медицинское информационное агентство, 2003. — 766 с.
14. Сунцов В.Г. Стоматологическая профилактика у детей. / Сунцов В.Г., Леонтьев В.К., Дистель В.А., Вагнер В.Д.— Москва: Мед.книга; Н.Новгород: Из-во НГМА, 2001. — 344 с.
15. Терапевтическая стоматология детского возраста / [Хоменко Л.А., Чайковский Ю.Б., Савичук А.В. и др.]; под ред. Л.А. Хоменко — К.: Книга плюс, 2007. — С. 7 - 29 с.

16. Якубова І.І. Визначення хімічного складу емалі зубів мишей, що утримувалися на дієті із підвищеним вмістом Cholesterol методом рентгено-дисперсійного спектрального аналізу / Якубова І.І. // Вісник проблем біології та медицини. - 2012. - Вип. 2, Т. 1 (92). - С. 186 - 190.
17. Якубова І.І. Вплив дієти із збільшеним вмістом холестерину на експресію генів, що кодують кістковий морфогенетичний протеїн та остеокальцин в тканинах нижньої щелепи ембріонів мишей / Якубова І.І., Досенко В.Є. // Современная стоматология. - 2011. - № 3. - С. 166-168.
18. Якубова І.І. Морфологічні зміни зачатків зубів у ембріонів мишей під впливом Cholesterol / Якубова І.І., Тумановська Л., Каськова Л.Ф. // Світ медицини та біології. - 2012. - № 1. - С.
19. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas by Piper M. Treuting, Suzanne M. Dintzis Ac.demic Pr.ss. - 2012. - P. 474.
20. Defining the roots of cementum formation / Popowics T., Foster B.L., Swanson E.C., et al. // Cells Tissues Organs. - 2005. - Vol. 181, № 3 - 4. - P. 248 - 257.
21. Edwards Ch. J. Statins as modulators of bone formation / Edwards Ch.J., Spector T.D. // Arthritis Res. - 2002. - № 4. - P. 151 - 153.
22. Epigenetic signals during odontoblast differentiation / Lesot H., Lisi S., Peterkova R., et al. // Adv. Dent. Res. - 2001. - № 15 (Aug). - P. 8 - 13.
23. Site-specific Expression of mRNAs for Osteonectin, Osteocalcin, and Osteopontin Revealed by In Situ Hybridization in Rat Periodontal Ligament During Physiological Tooth Movement / [Takano-Yamamoto T., Takemura T., Kitamura Y., Shintaro N.] // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. - 1994. - Vol. 42, №. 7. - P. 885-896.
24. The Sodium Bicarbonate Cotransporter (NBCe1) Is Essential for Normal Development of Mouse Dentition / Rodrigo S. L., Nanci A., Shane N. W., Xin W., et al. // Journ. of biological chemistry. - 2010. - V. 285, № 32 (august 6). - P. 24432 - 24438.

УДК 616.314.13-053.2:577.118:543.42

ВИВЧЕННЯ ЕМАЛІ ЗУБІВ МИШЕЙ, ЯКІ УТРИМУВАЛИСЯ НА ДІЄТІ ІЗ ПІДВИЩЕНИМ ВМІСТОМ ХОЛЕСТЕРИНУ МЕТОДОМ РАСТРОВОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Якубова І.І.

Резюме. При аналізі растрових електронних мікрофотографій різців і нижніх молярів 28-денних мишенят, які народилися від мишей, котрі до і під час вагітності знаходились на дієті із підвищеним вмістом холестерину (2 %), виявились порушення в поверхневій структурі зубів, зокрема мали аномальну поверхню емалі різців та дефекти бугрів нижніх молярів. Цей факт доводить важливість аліментарного чиннику, зокрема надлишкового вмісту жирів у вагітних мишей в розвитку патології твердих тканин зубів у їх потомства.

Ключові слова: растрова електронна мікроскопія, різці нижньої щелепи мишей, моляри нижньої щелепи мишей, холестерин, поверхневий шар емалі.

УДК 616.314.13-053.2:577.118:543.42

ИЗУЧЕНИЕ ЭМАЛИ ЗУБОВ МИШЕЙ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАЛИСЬ НА ДИЕТЕ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ХОЛЕСТЕРИНА МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Якубова И.И.

Резюме. При анализе растровых электронных микрофотографий резцов и нижних моляров 28-дневных мышат, которые родились от мышей, находящихся до и во время беременности на диете с повышенным содержанием холестерина (2 %), выявились нарушения в поверхностной структуре зубов, в частности имели аномальную поверхность эмали резцов и дефекты бугров нижних моляров. Этот факт доказывает важность алиментарного фактора, в частности избыточного содержания жиров в питании беременных мышей для развития патологии твердых тканей зубов у их потомства.

Ключевые слова: растровая электронная микроскопия, резцы нижней челюсти мышей, моляры нижней челюсти мышей, холестерин, поверхностный слой эмали.

UDC 616.314.13-053.2:577.118:543.42

Study Tooth Enamel Mice That Were Kept On A Diet With High Cholesterol Using Scanning Electron Microscopy

Yakubova I.I.

Summary. In the analysis of scanning electron microphotographs incisors and lower molars 28-day mice, born from mice that before and during pregnancy were on a diet of high cholesterol (2%) were in breach of the surface structure of the teeth, including enamel surface had abnormal incisor defects and tubercles of the lower molars. This fact proves the importance of nutritional factors such as excessive fat in pregnant mice in the development of diseases of hard tissues of teeth in their offspring.

Key words: scanning electron microscopy, mandibles incisors of mice mandibles molars mice, cholesterol, the surface layer of enamel.

Стаття надійшла 14.05.2012 р.
Рецензент – проф. Єрошенко Г.А.