



Генетическая модель пародонтоза и коррекция основных признаков заболевания стволовыми и прогениторными клетками костного мозга

О.И. Степанова, О.В. Баранова, Х.Х. Семенов, Н.В. Касинская,
Л.Х. Казакова, В.Н. Каркищенко

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: к.б.н. Ольга Ивановна Степанова scbmt@yandex.ru

Изучен положительный терапевтический эффект культивированных клеток костного мозга на коррекцию патогенетических нарушений пародонтоза у генетических мышей линии BRSUNT.

Ключевые слова: пародонтоз, мыши BRSUNT, стволовые и прогениторные клетки костного мозга.

Пародонтоз – одна из наиболее распространенных и сложных патологий челюстно-лицевой области. Рост заболеваемости пародонтоза свидетельствует, что современная медикаментозная терапия не способна надежно препятствовать возникновению и прогрессированию основных симптомов пародонтоза. Поэтому поиск и разработка новых подходов к лечению пародонтоза остается актуальной проблемой современной медицины.

Цель исследования – изучить возможности коррекции патогенетических нарушений пародонтоза на экспериментальной генетической модели с помощью аллогенных клеток костного мозга от здоровых доноров.

Материалы и методы

Для коррекции основных признаков пародонтоза использовали генетическую модель мышей линии BRSUNT. Эта модель характеризуется генетическим заболеванием зубов и околозубного пространства у 100% животных – опытная группа (n=20).

Контрольную группу составили мыши той же линии (n=20) без введения клеток костного мозга (ККМ).

В опытной и контрольной группах использовали мышей в возрасте 2-3 мес. и 7 мес. после рождения. Для коррекции нарушений пародонтоза у опытных мышей использовали культивированные аллогенные клетки (гемопоетической и стромальной фракций) костного мозга (КМ) от здоровых доноров мыши линии C57BL10.

Трансплантацию аллогенных ККМ проводили шестикратно, сначала вводили 3-х-кратно с интервалом в 5 дней в количестве 600-650 тыс. гемопоетические клетки костного мозга (ГПКМ), мононуклеарную фракцию, культивированные в течение 5 сут; затем 3-х-кратно (с интервалом в 7 дней) в количестве 100-150 тыс. культивированные в течение 14 сут мультипотентные мезенхимальные стромальные (фибробластоподобные) ККМ (ММСК КМ).

Введение ККМ проводили внутрибрюшинно, возраст доноров соответствовал возрасту реципиентов, срок наблюдений составил 6 мес. В динамике проводили клинические и гистологические исследования ротовой полости больных животных.

Гистологические методы были применены для исследования зубов нижней и верхней челюсти на декальцинированных парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Зубы и кости нижней и верхней челюсти мышей фиксировали в нейтральном формалине с последующей декальцинацией по Шафферу в 7,5% азотной кислоте в течение 2-3 сут. После декальцинации для подавления набухания соединительной ткани кусочки размещали в 5% р-р сернокислого натрия на 24 ч с последующей промывкой и проводкой с заключением в парафин. Резку блоков проводили на микротоме GREICHERT-JUNG толщиной в 6 микрон. Для окраски срезов использовали гематоксилин «Карац» и эозин водоростворимый, а далее заключали в сибирский бальзам. Результаты оценивали на микроскопе фирмы «NIKON» (Япония). Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат фирмы «OLYMPUS» (Япония).

Результаты и их обсуждение

После введения культивированных аллогенных ККМ у мышей BRSUNT наблюдали клиническое и функциональное состояние ротовой полости. При оценке гистологических изменений опытной и контрольной групп мы учитывали изменения тканей десны и зубов опытных животных в разные сроки после введения ККМ.

Клинически при осмотре ротовой полости контрольной группы поражения твердых тканей зуба в виде эрозии эмали и клиновидных дефектов не отмечалось, однако было выявлено у мышей, особенно в возрасте 7 мес. после рождения, выраженное пожелтение (налет) эмали зубов, которое сопровождалось также увеличением щели между резцами и расшатыванием зубов.

После внутрибрюшинного введения ККМ у мышей BRSUNT наблюдали клиническое и функциональное состояние ротовой полости. У мышей опытной группы слизистая оболочка рта розового цвета, не кровоточит, плотно прилегает к зубам. Десневые сосочки, образуя четкую фестончатость, занимают межзубные промежутки в области шеек зубов. Десна плотная, пародонтальные карманы отсутствуют, а зубы плотно прилегают друг к другу.

При гистологическом исследовании у мышей контрольной группы (без введения ККМ) слизистая оболочка десны была покрыта дистрофически измененным многослойным плоским эпителием с признаками атрофии, выраженного гиперкератоза с участками акантолитических тяжей, были выявлены выраженные дистрофические изменения, что проявлялось в уменьшении количества клеток в слоях многослойного плоского эпителия, истончении преимущественно базального

и шиповатого слоев, в расширении рогового слоя. Собственная пластинка слизистой оболочки десны была с признаками выраженного отека соединительнотканых волокон всех слоев (поверхностного сосочкового и более глубокого сетчатого слоя), определялись единичные спавшиеся сосуды капиллярного типа.

У мышей контрольной группы в области костной ткани зубной лунки отмечались дистрофические процессы в виде умеренно выраженной прогрессирующей гладкой резорбции костной ткани. Отмечалось умеренно выраженное истончение костных пластинок межальвеолярных перегородок, расширение костномозговых пространств, так называемое широкопетлистое строение костной ткани, ретракция десны с формированием патологического зубодесневого кармана с расшатыванием зубов (клинически), без макроскопических и микроскопических признаков воспаления. Выстилающий зубодесневый карман эпителий был представлен двумя слоями клеток – поверхностным сосочковым и более глубоким сетчатым, состоящим из несколько уплощенных клеток. Дно десневой борозды находилось ниже уровня эмалево-цементного соединения.

Периодонт был представлен тонким слоем отечных разрыхленных коллагеновых волокон.

На продольном шлифе зубов определялся однородный дентин, обычного строения и толщины. Пульпарная полость, находящаяся внутри зуба, была несколько сужена в области пульпарной камеры, количество пульпы было уменьшено, пульпа представлена рыхлой волокнистой, местами фрагментированной соединительной тканью с единичными сосудами прекапиллярного и капиллярного типов, большая часть

которых находилась в спавшемся состоянии, окружающие сосуды клетки – макрофаги и фибробласты – практически не определялись. Слой одонтобластов был представлен одним рядом кубических клеток, местами расположенных беспорядочно. Слой эмали был истончен, представлен однородной плотной обызвестленной тканью.

У мышей опытной группы (через 1, 3 и 6 мес. после введения ККМ) состояние слизистой оболочки десны было в пределах нормы. Покрывающий десну многослойный плоский эпителий был представлен всеми слоями клеток, с незначительными признаками гиперкератоза (норма). Собственная пластинка слизистой оболочки десны также соответствовала норме, была представлена двумя слоями – поверхностным сосочковым и более глубоким сетчатым. Сосочковый слой был образован рыхлой соединительной тканью, с многочисленными сосудами и нервами. Сетчатый слой был образован более плотной соединительной тканью. Строение десны в области десневой борозды было в пределах нормы, покрывающий ее эпителий представлен двумя слоями несколько уплощенных клеток. Десневая борозда имела вид щелевидного пространства – желобка, неразличимого макроскопически. Дно десневой борозды находилось на уровне эмалево-цементного соединения.

Изменения альвеолярной кости в опытной группе были представлены расширенными многочисленными прободящими каналами и нишами компактной кости, с формированием «лакун», заполненных кровью, однако данные участки чередовались с участками плотной компактной кости.

Периодонт был представлен плотной соединительной тканью, содержащей

многочисленные сосуды прекапиллярного и капиллярного типов, соединительнотканые волокна периодонта полностью заполняли пространство между стенками костных ячеек и веществом цемента зуба, между волокнами периодонта определялись многочисленные мелкие сосуды (артериолы, капилляры), часть из которых образовывала петлевые структуры.

Дентин был обычного строения и толщины. Пульпарная полость была несколько расширена, пульпа полностью заполняла пространство пульпарной камеры, была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с многочисленными, расположенными среди волокон клетками гематогенного и гистиоцитарного происхождения, отмечались многочисленные расширенные, полнокровные сосуды микроциркуляторного русла.

В опытной группе отмечались выраженные признаки ангиогенеза вблизи слоя одонтобластов, которые были представлены несколькими рядами (2-3) высоких призматических клеток. Анализ животных в данной группе показал, что сходные изменения тканей десны и зуба были как у более молодых животных (2-3 мес.), так и у старых (7 мес.).

Гистологические исследования показали, что более выраженные положительные клинические результаты были получены через 3 мес. после введения ККМ, что было подтверждено нами гистологически. Позитивная динамика коррекции пародонтоза также сохранялась у животных и через 6 мес. после введения донорских клеток КМ.

Выводы

1. Мыши линии BRSUNT являются адекватной экспериментальной генетиче-

ской моделью пародонтоза, т.к. воспроизводят функциональные и структурные изменения заболевания в челюстно-лицевой области.

2. Выявлено, что выраженность терапевтического эффекта клеток костного мозга у мышей с пародонтозом повышается: при использовании культивированных клеток; в зависимости от кратности введения клеток костного мозга гемопоэтических и стромальных фракций.

3. Установлено, что наиболее гистологически выраженные достоверные изменения были со стороны зубов и тканей десны в опытной группе животных после введения ККМ, обнаруженные изменения включали:

а) состояние десны у опытных мышей приближалось к норме – как со стороны многослойного плоского эпителия, так и со стороны собственной соединительной ткани – с признаками ангиогенеза в виде появления многочисленных сосудов капиллярного и прекапиллярного типов, наблюдается сужение и практическое исчезновение десневого канала;

б) выраженные изменения были выявлены со стороны периодонта у мышей опытной группы, периодонт отличался более плотным компактным строением с наибольшим количеством тонкостенных сосудов и с образованием сосудистых петлевых структур;

в) выраженные изменения мы отмечали со стороны альвеолярной кости. У мышей BRSUNT опытной группы отмечалась резорбция кости, появление участков компактного строения и появление расширенных «лакун», заполненных кровью;

г) изменения пульпы включали появление многочисленных расширенных сосудов капиллярного типа, а также большого количества клеток гематогенного

и гистиогенного происхождения (фибробластов и макрофагов), что соответствует нормальному строению пульпы;

д) мы отмечали увеличение слоев одонобластов обычного строения в данной группе и появление сосудов капиллярного типа вблизи нижнего слоя одонобластов.

4. Выраженное позитивное действие клеточной терапии у животных с пародонтозом на клинические и морфологические проявления заболевания зубов и околозубного пространства связано с длительными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности донорских клеток костного мозга в организме реципиента после трансплантации.

Genetic model of periodontosis and correction of the main symptoms of a disease by stem and progenitor cells of a marrow

O.I. Stepanova, O.V. Baranova, H.H. Semenov, N.V. Kasinskaya,
L.Kh. Kazakova, V.N. Karkishchenko

The positive therapeutic effect of the cultivated cells of a marrow on correction of pathogenetic violations of periodontosis at genetic mice of the BRSUNT line is studied.

Key words: periodontosis, mice of BRSUNT, stem and progenitor cells of a marrow.

д) мы отмечали увеличение слоев одонобластов обычного строения в данной группе и появление сосудов капиллярного типа вблизи нижнего слоя одонобластов.

4. Выраженное позитивное действие клеточной терапии у животных с пародонтозом на клинические и морфологические проявления заболевания зубов и околозубного пространства связано с длительными сроками сохранения жизнеспособности и функциональной активности донорских клеток костного мозга в организме реципиента после трансплантации.

Идентификация нейрорептиков – производных бензамида в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Р.А. Калёкин

ФГБУ Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздравсоцразвития РФ, Москва

Контактная информация: к.ф.н. Калёкин Роман Анатольевич kalyokin@yandex.ru

В настоящей публикации предложен метод идентификации нейрорептиков – производных бензамида (амисульпида, сульпирида и тиаприда) в извлечениях из крови. Предложенная методика позволяет с высокой воспроизводимостью и достоверностью проводить идентификацию исследуемых веществ с соэкстрактивными веществами.

Ключевые слова: нейрорептики, амисульпид, сульпирид, тиаприд, кровь, ВЭЖХ.

Введение

В настоящее время в медицинской практике широко используются психотропные лекарственные средства – нейрорептики, к которым также относится группа замещенных бензамида. К представителям данной группы относятся: амисульпид, сульпирид, тиаприд, которые применяются для лечения различных форм шизофрении; при психомоторном возбуждении и агрессивных состояниях, особенно при хроническом алкоголизме или в пожилом возрасте; депрессиях различной этиологии; острых маниакальных и маниакально-бредовых состояниях. Достаточно часто встречаются случаи острого и хронического отравления, передозировки этими лекарственными препаратами, а также их немедикаментозное и бесконтрольное применение [1, 2].

Целью нашего исследования явилась разработка методики идентификации в извлечениях из крови наиболее современным и достоверным методом – вы-

сокоэффективной жидкостной хроматографии, поскольку в доступной научной литературе отсутствует информация по исследованию крови и идентификации в извлечениях нейрорептиков – производных бензамида и их дифференциальное разделение от сопутствующих веществ. Принципиальным преимуществом пробы крови является возможность более надежно обеспечить ее сохранность, поскольку эта процедура проводится, как правило, опытным врачом [3]. Кроме того, концентрации тех или иных лекарственных веществ в крови легче поддаются интерпретации, чем в моче.

Материалы и методы

Использованный вариант модельной смеси для проведения исследования позволяет максимально приблизить условия эксперимента к реальным и получить биологическую жидкость со связанным лекарственным веществом с форменными элементами крови. Изолирование