

Сведения об авторах:

Виленский Игорь Леонидович, аспирант кафедры гигиены; тел.: (8655)350069, 89624408373; e-mail: shpak.crb.epid@mail.ru
Минаев Борис Дмитриевич, кандидат медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой;
тел.: (8652)351907, 89624978999; e-mail: shpak.crb.epid@mail.ru

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.716.8
DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12022>
ISSN – 2073-8137

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАСТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ОДОНТОБЛАСТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПАРОТИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ

С. В. Сирак¹, Е. В. Щетинин¹, Т. Л. Кобылкина¹, М. Ю. Вафиади¹, Н. И. Быкова²

¹ Ставропольский государственный медицинский университет, Россия

² Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

HISTOCHEMICAL STUDY OF PLASTIC FUNCTION OF ODONTOBLASTS UNDER THE INFLUENCE OF PAROTINE IN ANIMAL EXPERIMENTS

Sirak S. V.¹, Shchetinin E. V.¹, Kobylkina T. L.¹, Vafiadi M. Yu.¹, Bykova N. I.²

¹ Stavropol State Medical University, Russia

² Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Рассматриваются вопросы влияния паротина на содержание нуклеиновых кислот и функциональных групп белков в одонтоблестах пульпы нижних резцов барана. В эксперименте изучена гистохимическая ультраструктура коронковой и корневого пульпы 96 постоянных нижних резцов 12 годовалых баранов, у которых в этом возрасте зубы с полностью сформированными корнями относятся к молочному прикусу. Установлено, что паротин в дозе 2 мг/кг вызывает повышение концентрации функциональных групп белков и нуклеиновых кислот в одонтоблестах, а при большей дозе (10 мг/кг) их содержание снижается. Результаты исследования дополняют существующие представления о патофизиологических механизмах стимуляции репаративной функции пульпы зуба и ускорения дентиногенеза под влиянием малых доз паротина.

Ключевые слова: пульпа, одонтобласты, паротин, нуклеиновые кислоты

The article considers the issues of assessing the impact of parotine on the contents of nucleic acids and functional groups of proteins in odontoblasts of the pulp of the lower incisors of sheep. The experiment studied histochemical ultrastructure of the crown and root pulp of 96 permanent lower incisors of 12 yearling sheep, which have teeth with fully formed roots at this age, belonging to the milk dentition. It is established that parotine in a dose of 2 mg/kg causes an increase in the concentration of functional groups of proteins and nucleic acids in odontoblasts, but at a higher dose (10 mg/kg) their content is reduced. The results of the study complement the existing ideas about the pathophysiological mechanisms of stimulation of the reparative function of the tooth pulp and accelerate dentinogenesis under the influence of small doses of parotine.

Keywords: pulp, odontoblast, parotine, nucleic acids

Известно, что гормон слюнных желез белковой природы – паротин, с молекулярной массой около 100 кДа, вырабатывается в околушных слюнных железах, обладает выраженным влиянием на рост и развитие зубов и скелета, снижает уровень Ca₂₊ крови, усиливая его поступление в ткани, что способствует минерализации зубов и костной ткани, а также повышает интенсивность обмена кальция и фосфора [2, 7]. Усиление минерализации зубов под влиянием паротина обосновывает его клиническое применение при пародонтите и заболеваниях опорно-двигательного аппарата [4, 8, 9]. Паротин повышает функциональную активность одонтобластов

пульпы зубов, о чем свидетельствует накопление в них белка и нуклеиновых кислот [5, 11]. Важным физиологическим эффектом паротина является стимуляция макрофагальной системы. Влияние паротина на развитие и обызвествление дентина – один из наиболее чувствительных тестов для определения его активности, однако механизм данного влияния мало изучен. В литературе имеется лишь несколько упоминаний о влиянии паротина на одонтобласты пульпы, продуцирующие дентин [1, 3, 10].

Цель исследования – гистохимическое исследование пластической функции одонтобластов под влиянием паротина.

Материал и методы. Экспериментальное исследование проведено на 12 годовалых баранах. Изучена гистохимическая ультраструктура коронковой и корневой пульпы 96 постоянных нижних резцов (зацепов) годовалых баранов, у которых в этом возрасте зубы с полностью сформированными корнями относятся к молочному прикусу. После однократного внутримышечного введения паротина (в 0,5 % растворе NaCl) в дозах 2 и 10 мг на 1 кг веса в соответствующие сроки наблюдения (6 и 24 часа) резцы удаляли, из них извлекали пульпу и фиксировали ее в жидкости Карнуа. Контролем служила пульпа соответствующих зубов интактных животных.

При гистохимическом выявлении аминокрупп белков использовали известные методы для морфологического анализа: реакцию с тетразоном по Даниелли (Danielli, 1947), Пирсу (Pearse, 1960) и Лизону (Lison, 1960), а также реакцию с нитробензоилхлоридом по Берстону (Burstone, 1955). Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) выявляли по методу Браше (РНК) и методу Фельгена (ДНК). Содержание функциональных групп белков и нуклеиновых кислот одонтобластов пульпы зуба оценивали в ходе флуоресцентно-микроскопического исследования с помощью сульфавлавина по Леманну и Руху (Leemann, Ruch, 1972). Результаты реакции подвергали количественной оценке при помощи флуоресцентной цитометрии. Данные фотометрии подвергали статистической обработке. О морфологических изменениях судили по препаратам, окрашенным гематоксилин-эозином и по Массону.

Микроскопию срезов проводили на цифровом микроскопе со встроенным фотоаппаратом Olympus VX45. Морфометрические исследования проводили с использованием программы Видео-Тест Морфология 5.1 для Windows. Полученные цифровые данные были анализированы с применением статистического метода t-критерия Стьюдента в программе Primer of Biostatistics 4.03 для Windows. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Эксперимент на животных проведен в соответствии с общими принципами (Национальный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики») и положительным заключением этического комитета Ставропольского медицинского университета. Исследование осуществлено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации по осуществлению научных исследований и разработок по теме «Стволовые клетки пульпы зуба в регенерации и иммуномодуляции» совместно с Всероссийским НИИ овцеводства и козоводства и Ставропольским государственным аграрным университетом.

Результаты исследования. Установлено, что для клеток периферического слоя одонтобластов пульпы характерна высокая интенсивность реакции на аминокруппы белков. В ядрах этих клеток оболочка, хроматин, а также ядрышко обнаруживают более высокую, а кариоплазма несколько меньшую, чем цитоплазма, концентрацию NH_2 -групп. В дентине коронковой части зуба белковые вещества распределены в виде диффузно расположенных мелких зерен, сливающихся в пятна при окрашивании по Массону при реакции с ни-

тробензоилхлоридом по Берстону (рис. 1, а), в дентине корневой части зуба белковые субстраты также сливаются в пятна, но имеют неровные, рваные края (рис. 1, б). Соединительная ткань промежуточного и центрального слоев пульпы давала среднюю интенсивность реакции на белковые NH_2 -группы. В пределах отдельных слоев пульпы распределение аминокрупп довольно монотонно (исключая центральный слой, для которого характерно наличие белков с более высоким содержанием NH_2 -групп). Клеточные элементы этих слоев (адвентициальные клетки, макрофаги, фибробласты) в сравнении с одонтобластами содержат значительно меньшее количество аминокрупп. Однако их концентрация в клетках превышает таковую в соединительной ткани, вследствие чего клеточные границы хорошо контурируются (рис. 2, а).

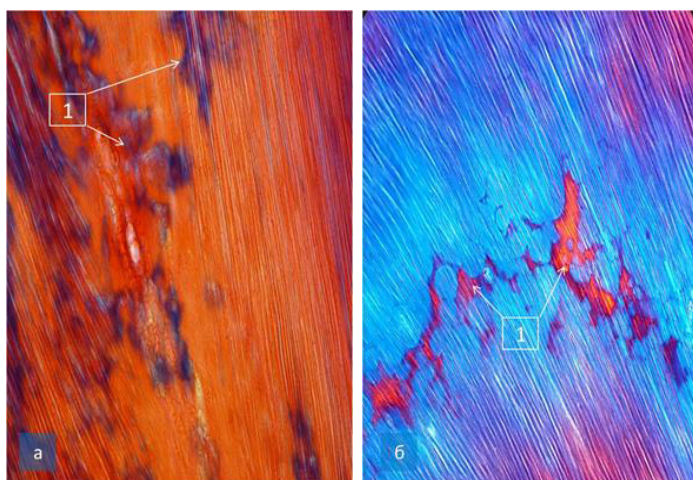


Рис. 1. Микропрепараты – гистологические срезы зубов основной группы после проведения реакции с нитробензоилхлоридом по Берстону через 6 (а) и 24 часа (б) после начала эксперимента: а – диффузное распределение белкового вещества (1) в дентине коронковой части зуба в виде пятен правильной формы. Окраска по Массону. Ок. 20, об. 40; б – белковые субстраты в виде слившихся пятен с неровными, рваными краями (1) в дентине корневой части зуба. Окраска по Массону. Ок. 20, об. 40

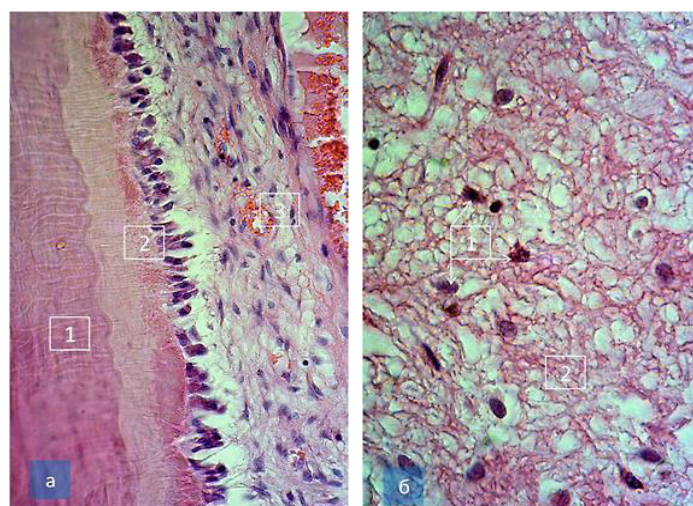


Рис. 2. Микропрепараты – гистологические срезы пульпы зубов основной группы после проведения реакции с помощью сульфавлавина по Леманну и Руху через 6 (а) и 24 часа (б) после начала эксперимента: а – клеточные элементы периферического слоя пульпы на границе с дентином (1): адвентициальные клетки (2), макрофаги и фибробласты (3). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 20, об. 40; б – мелкие, диффузно расположенные зерна РНК (1) в цитоплазме одонтобластов центрального слоя пульпы (2). Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 40, об. 40

Распределение карбоксильных групп белков совпадает с распределением NH₂-групп, но первые обнаруживаются в более низкой концентрации; соотношение содержания белков в отдельных слоях, а также в клеточных элементах, характерное для аминокислот, сохраняется и для COOH-групп.

При анализе распределения нуклеиновых кислот обнаружено, что суммарное содержание обеих нуклеиновых кислот, определяемых с помощью сульфавлафина, особенно высоко в одонтобластиках. В ядрах одонтобластов ДНК выявляется в высокой концентрации в виде мелкой зернистости, равномерно лежащей по всему ядру. Иногда в отдельных клетках видны единичные более крупные глыбки, расположенные в основном около ядрышка. Цитоплазма содержит большое число мелких, диффузно расположенных зерен РНК (рис. 2, б). Большое количество РНК обнаруживается и в ядрышках, которые, однако, часто маскируются зернами ДНК (в связи с высоким ее содержанием).

Через 6 часов после введения паротина в дозе 10 мг/кг веса в одонтобластиках обнаружено статистически достоверное (во всех случаях $p < 0,01$) снижение концентрации нуклеиновых кислот и белков. Как показали данные фотометрии, к этому сроку содержание ДНК в одонтобластиках понизилось в среднем на 15 %, РНК – на 20 %, а функциональных групп белков (NH₂ и COOH) – на 10 % ниже уровня контроля. Через 24 часа при той же дозе паротина снижение становится более выраженным и для нуклеиновых кислот составляет в среднем 30 %, для аминокислот – 18 %, а для COOH-групп – 25 %. При суточном сроке наблюдения отмечается также снижение интенсивности реакции на изученные белковые группировки в промежуточном и центральном слоях пульпы. При этом концентрация амино- и карбоксильных групп белков

в центральном слое приближалась к уровню, типичному для промежуточного слоя.

Через 24 часа после введения паротина в меньшей дозе (2 мг/кг) отмечены обратные изменения – повышение содержания как нуклеиновых кислот, так и белковых веществ. Наиболее выраженные изменения наблюдались со стороны аминокислотных групп белков (повышение в среднем на 35 % по сравнению с контролем). Содержание РНК повышалось в среднем на 25 %. Минимальные сдвиги (повышение на 15–20 %) отмечены для ДНК и COOH-групп белков. Все названные изменения статистически достоверны ($p < 0,01$). При дозе паротина 2 мг/кг содержание и распределение белковых веществ в промежуточном и центральном слоях пульпы заметно не отличались от таковых у контрольных животных.

Таким образом, как при минимальной (2 мг/кг), так и при максимальной (10 мг/кг) дозах паротина не обнаружено существенных морфологических изменений со стороны центральных и периферических слоев пульпы. Обращает на себя внимание тот факт, что паротин в дозе 2 мг/кг вызывает повышение концентрации функциональных групп белков и нуклеиновых кислот в одонтобластиках, а при большей дозе (10 мг/кг) их содержание снижается.

Заключение. Полученные данные о повышении концентрации нуклеиновых кислот и белковых веществ в одонтобластиках под влиянием малых доз паротина (2 мг/кг) следует рассматривать как показатель функциональной активности этих клеток: данная интерпретация полученных результатов экспериментального исследования дополняет существующие представления о патофизиологических механизмах стимуляции репаративной функции пульпы зуба и ускорения дентиногенеза под влиянием малых доз паротина.

Литература

1. Арутюнов, А. В. Морфологическая оценка влияния разработанной комбинированной лекарственной композиции на репаративные процессы при экспериментальном пульпите / А. В. Арутюнов, С. В. Сирак // *Эндодонтия Today*. – 2015. – № 3. – С. 31–34.
2. Сукманский, О. И. Влияние паротина на содержание амино- и карбоксильных групп белков и нуклеиновых кислот в пульпе зубов кролика / О. И. Сукманский, В. П. Плевинский // *Стоматология*. – 1968. – № 5. – С. 47–40.
3. Bignozzi, I. Root caries: A periodontal perspective / I. Bignozzi, A. Crea, D. Capri [et al.] // *J. Periodontol Res.* – 2014. – Vol. 49, № 2. – P. 143–163. doi: 10.1111/jre.12094
4. Bruno, K. F. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis / K. F. Bruno, J. A. Silva, T. A. Silva [et al.] // *Intern. Endodontic J.* – 2010. – Vol. 43, № 11. – P. 1013–1021. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01757.x
5. Featherstone, J. D. B. The science and practice of caries prevention / J. D. B. Featherstone // *J. Am. Dental Association*. – 2000. – Vol. 131, № 7. – P. 887–899.
6. Grimm, W. D. Clinical, radiographic, and histological analyses after transplantation of crest-related palatal-derived ectomesenchymal stem cells (paldscs) for improving ver-

- tical alveolar bone augmentation in critical size alveolar defects / W. D. Grimm, W. A. Arnold, S. W. Sirak [et al.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2015. – Vol. 42, № S17. – P. 366b–366.
7. Leonora, J. Parotid gland function and dentin apposition in rat molars / J. Leonora, L. Tjäderhane, J.-M. Tietche // *J. Dental Res.* – 2002. – Vol. 81, № 4. – P. 259–264.
8. Melvin, J. E. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells / J. E. Melvin, D. Yule, T. Shuttleworth, T. Begenisich // *Ann. Rev. Physiol.* – 2005. – Vol. 67. – P. 445–469. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745
9. Samuni, Y. Gene delivery in salivary glands: From the bench to the clinic / Y. Samuni, B. J. Baum // *Biochim. Biophys. Acta – Molec. Basis. Dis.* – 2011. – Vol. 1812, № 11. – P. 1515–1521. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.06.014
10. Shchetinin, E. V. Pathogenetic aspects of dental pulp pathology / E. V. Shchetinin, S. V. Sirak, A. B. Khodzhanan [et al.] // *Medical News of North Caucasus*. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 187–191. doi: 10.14300/mnnc.2015.10044
11. Firsova, I. V. Clinical and experimental study of the regenerative features of oral mucosa under autohemotherapy / I. V. Firsova, Iu. A. Makedonova, D. V. Mikhalchenko [et al.] // *Res. J. Pharmac., Biol. Chem. Sci.* – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 1711–1716.

References

1. Arutyunov A. V., Sirak S. V. *Endodontiya Today*. – *Endodontics Today*. 2015;3:31-34.
2. Sukmansky O. I., Plevinskis V. P. *Stomatologija*. – *Stomatology*. 1968;5:47-40.
3. Bignozzi I., Crea A., Capri D., Littarru C., Lajolo C. *J. Periodontol Res.* 2014;49(2):143-163. doi: 10.1111/jre.12094
4. Bruno K. F., Silva J. A., Silva T. A. *Intern. Endodontic J.* 2010;43(11):1013-1021. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01757.x
5. Featherstone J. D. B. *J. Am. Dental Association*. 2000;131(7):887-899.
6. Grimm W. D., Arnold W. A., Sirak S. W. *J. Clin. Periodontol.* 2015;42(S17):366b-366.

7. Leonora J., Tjäderhane L., Tietche J.-M. *J. Dental Res.* 2002;81(4):259-264.
8. Melvin J. E., Yule D., Shuttleworth T., Begenisich T. *Ann. Rev. of Physiol.* 2005;67:445-469. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745
9. Samuni Y., Baum B. J. *Biochim. Biophys. Acta – Molec. Basis. Dis.* 2011;1812(11):1515-1521. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.06.014
10. Shchetinin E. V., Sirak S. V., Khodzhanan A. B. *Medical News of North Caucasus*. 2015;10(2):187-191. doi: 10.14300/mnnc.2015.10044
11. Firsova I. V., Makedonova Iu. A., Mikhalchenko D. V. *Research J. Pharmac. Biol. Chem. Sci.* 2015;6(6):1711-1716.

Сведения об авторах:

Сирак Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии;
тел.: (8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Щетинин Евгений Вячеславович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической физиологии;
тел.: (8652)352684; e-mail: ev.cliph@rambler.ru

Кобылкина Татьяна Леонидовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии;
тел.: (8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Вафиади Марина Юрьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии;
тел.: (8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru

Быкова Наталья Ильинична, кандидат медицинских наук, доцент кафедры детской стоматологии,
ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии; тел.: 88612683684; e-mail: kafedradetstom@ksma.ru

© Коллектив авторов, 2017

УДК 576.54.085.23:611.085

DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2017.12023>

ISSN – 2073-8137

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК МАКАК-РЕЗУСОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Е. А. Губарева¹, Е. В. Куевда¹, А. С. Сотниченко¹, И. В. Гилевич¹,
И. С. Гуменюк¹, Р. З. Накохов¹, Д. Д. Карал-оглы², С. В. Орлов²

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

² Научно-исследовательский институт медицинской приматологии,
Сочи-Адлер, Россия

PROSPECTS OF MACACAMULATTA'S MESENCHYMAL MULTIPOTENT STROMAL CELLS USAGE FOR TISSUE-ENGINEERED SCAFFOLDS CREATION

Gubareva E. A.¹, Kuevda E. V.¹, Sotnichenko A. S.¹, Gilevich I. V.¹,
Gumenyuk I. S.¹, Nakohov R. Z.¹, Karal-ogly D. D.², Orlov S. V.²

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

² Research Institute of Medical Primatology, Sochi-Adler, Russia

Тканевая инженерия может стать альтернативным способом лечения и фокусируется на восстановлении, замене и регенерации клеток, тканей и органов с нарушенными функциями. Одной из задач регенеративной медицины является выбор клеточной линии для рецеллюляризации биологических или синтетических каркасов. Для статической рецеллюляризации или даже рецеллюляризации целого органа можно использовать мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) с последующей оценкой их метаболической активности и жизнеспособности. Популяция ММСК, полученная из костного мозга приматов *Macaca mulatta*, дифференцируется в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлении и характеризуется иммунофенотипом CD73+/CD90+/CD105+/CD45-/CD34-, что очень важно для определения клеточной принадлежности и дальнейшего использования клеток для рецеллюляризации. Рецеллюляризация легких, диафрагмы и пищевода приматов выполнена статическим способом для последующей оценки цитотоксических свойств полученных каркасов, что является важнейшим критерием их качества.

Ключевые слова: тканевая инженерия, легкие, диафрагма, пищевод, рецеллюляризация, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Tissue engineering may become an alternative way of treatment being focused on restoration, replacement and regeneration of damaged cells, tissues and organs. One of the problems of regenerative medicine is the choice of the cellular line for a recellularization of biological or synthetic scaffolds. For a static recellularization or even a recellularization of a whole organ it is possible to use the mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) with the subsequent evaluation of their metabolic activity and viability. The population of MMSCs obtained from bone marrow of *Macaca mulatta* primates is differentiated in adipogenic, chondrogenic and osteogenetic directions and is characterized by CD73+/CD90+/CD105+/CD45-/CD34- immunophenotype that is very important for cells specificity identification and further use of cells for recellularization. Recellularization of primate's lungs, diaphragm and oesophagus is executed in the static way with the subsequent evaluation of cytotoxic properties of the obtained scaffolds.

Keywords: tissue engineering, lungs, diaphragm, oesophagus, recellularization, mesenchymal stem cells