

В.В.Кутель

Моделирование врожденных аномалий развития нижней челюсти с использованием циклофосфана

Белорусский государственный медицинский университет

Изучены механизмы формирования аномалий нижней челюсти, индуцированные действием тератогенных факторов химической природы. Материалом для исследования послужили 18-ти, 20-ти суточные плоды беспородных самок белой крысы, которым на 12 сутки эмбриогенеза вводили циклофосфан в дозе 20 мг/кг. При изучении просветленных препаратов и серийных гистологических срезов выявлено, что однократное введение беременным самкам циклофосфана приводит к гипоплазии тела и ветви нижней челюсти. Репаративная регенерация, проявляющаяся в усилении процессов хондро-и остеогенеза, не обеспечивает полного восстановления структуры кости как органа. Образующиеся отростки недоразвиты, что впоследствии приводит к задержке формирования височно-нижнечелюстного сустава и нарушению сбалансированного развития всей зубо-челюстной системы.

Ключевые слова: эмбриогенез, нижняя челюсть, циклофосфан, белая крыса.

Циклофосфан (циклофосфамид) – алкилирующий цитостатический препарат, который оказывает цитостатическое, противоопухолевое, иммунодепрессивное действие, обладает избирательной противоопухолевой активностью и в связи с этим широко используется для лечения злокачественных новообразований [1].

В периферической крови препарат находится в неактивном состоянии, но при проникновении в опухолевые клетки быстро разлагается под влиянием содержащихся в них фосфатаз с освобождением бис-(b-хлорэтил)-амина. Бис (бета-хлорэтил)-амин нарушает синтез ДНК, замедляет митотическое деление клеток, вызывая их гибель. Таким образом, препарат может рассматриваться как пролекарство с «транспортной» функцией, доставляющее активное цитостатическое вещество в клетки [1].

Кроме того, циклофосфан обладает доказанным тератогенным действием на эмбрионы экспериментальных животных и человека [Sherard, 1984; С.Л.Кабак, 1991;].

Врожденная патология нижней челюсти и височно-нижнечелюстного сустава редко встречается изолированно. Обычно поражение сустава является одним из симптомов сложного врожденного синдрома. Нередко ведущим клиническим признаком врожденной патологии является недоразвитие продольных размеров нижней челюсти, изолированная гипоплазия мышечкового отростка. Например, при синдроме Франческетти деформация нижней челюсти обусловлена преимущественно недоразвитием её подбородочного отдела. У всех детей выявляется также недоразвитие обоих мышечковых отростков [2].

В настоящее время число больных с патологией височно-нижнечелюстного сустава неуклонно увеличивается [3], также как, и обращаемость за лечебной помощью детей с врожденными и приобретенными деформациями нижней челюсти [В.А.Козлов, 1985; В.А.Маргунская, 1985; А.С.Иванов, 1992; Д.Ю.Комелягин, 2002; W.Kirk, D. Salabrese, 1989].

Цель исследования: выявить патогенетические механизмы формирования аномалий нижней челюсти и других структур лицевого черепа, индуцированные действием тератогенных факторов химической природы.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили 18-ти, 20-ти суточные плоды беспородных самок белой крысы весом 170 – 210 гр.

Для получения плодов с датированным сроком беременности использовался метод вагинальных мазков. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считался нулевым днем беременности. Классификация эмбрионального материала осуществлялась по суткам внутриутробного развития.

Морфометрическое изучение нижней челюсти производилось на просветленных препаратах. Для этого плоды фиксировались в 960 спирте, тотально окрашивались альциановым синим и ализариновым красным [9], избирательно выявляющим скелетные ткани (костную и хрящевую), просветлялись в растворе щелочи. Нижняя челюсть выделялась под бинокулярной лупой, производилась ее съемка цифровым фотоаппаратом с применением масштабной шкалы. В связи с тем, что нижняя челюсть имеет небольшие размеры, для удобства и точности измерений в основу изучения тотальных препаратов был положен метод «проекционной остеометрии», погрешность которого по сравнению с другими методами (непосредственной и рентгенологической проекционной остеометрией) не превышает 0,1 мм [4,10]. Измерение линейных размеров между общепринятыми краниометрическими точками [5] производилось с использованием компьютерной программы «Биоскан», разработанной в лаборатории ЦНИЛ БГМУ. Статистическая обработка материала осуществлялась с помощью программы Excel. Всего было изучено 17 линейных параметров нижней челюсти, а также измерялись площадь и объем нижней челюсти.

Изучение гистогенеза хрящевой и костной тканей у зародышей проведено на сериях парафиновых срезов.

Выбор дозы воздействия определялся необходимостью вызвать максимальный тератогенный эффект и получить наибольшее разнообразие аномалий нижней челюсти. Основываясь на данных литературы и собственных поисковых экспериментах, таковой для циклофосфана является доза 20 мг/кг [С.Л.Кабак, 1985; Greenaway et al., 1982]. Более высокие дозы тератогенов оказывают уже эмбриотоксический эффект, вызывая раннюю гибель и резорбцию эмбрионов. Снижение дозы воздействия уменьшает число зародышей с врожденными аномалиями развития.

Введение циклофосфана осуществлялось в хвостовую вену. Контрольной группе самок вводилась дистиллированная вода – растворитель

циклофосфана. Животные содержались в одинаковых условиях и получали идентичный рацион питания. Выведение животных экспериментальной и контрольной групп из опыта осуществлялось путем их декапитации под эфирным наркозом на 18 и 20 сутки беременности. Часть зародышей фиксировалась в спирте и использовалась для приготовления просветленных препаратов, другие фиксировались в жидкости Буэна и 12% нейтральном формалине, затем заливались в парафин для приготовления гистологических препаратов.

Результаты и обсуждение

На 18 сутки эмбриогенеза нижняя челюсть плодов белой крысы имеет характерную подковообразную форму, образована костной тканью, в толще которой расположен меккелев хрящ. Тело нижней челюсти постепенно переходит в сильно наклоненную назад ветвь. Ветвь несет два отростка: венечный и суставной (мышцелковый). От тела нижней челюсти вниз и дорсально отходит хорошо развитый у крыс угловой отросток (рис.1). Венечный отросток у всех изученных животных образован был только костной тканью. Мыщелковый и угловой отростки содержат в своем составе кроме костной ткани хрящевую ткань, а их дистальные отделы были образованы исключительно хрящевой тканью (рис.1,3). Мыщелковый отросток является самым длинным. С возрастом наблюдается увеличение его длины и проекционной высоты.

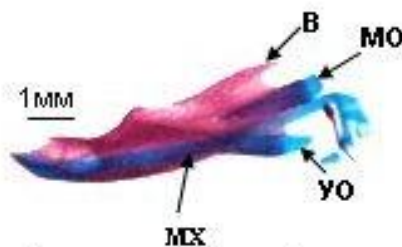


Рис. 1. Просветленный препарат ½ нижней челюсти 18-ти суточного плода. ВО - венечный отросток, МО - мышцелковый отросток, УО - угловой отросток, МХ - меккелев хрящ.

Тератогенное действие циклофосфана проявляется в плодном периоде. При визуальном осмотре у изученных плодов отмечено уменьшение, по сравнению с контролем, общих размеров тела. Выявляются мозговые грыжи, деформации и недоразвитие верхних и нижних конечностей.

При однократном введении самкам циклофосфана у плодов на 18 и 20 сутки эмбриогенеза наблюдается задержка роста нижней челюсти в среднем на двое суток. Площадь и объем челюсти 20 суточных крысят по размерам соответствует 18-ти суточному интактному плоду. Однако, несмотря на явное отставание в росте нижней челюсти по сравнению с контрольной группой животных к 20 суткам развития у плодов, подверженных действию цитостатика, наблюдается увеличение объема и площади нижней челюсти в среднем в 2 раза по сравнению с 18-суточными плодами.

После введения цитостатика угнетается рост, не только тела, но и ветви нижней челюсти, что проявляется задержкой роста формирующих ее отростков. Изученные параметры венечного, мышелкового и углового отростков значительно ниже ($P < 0,05$), чем в контрольной группе животных. Площадь венечного отростка у крысят опытной группы в 3 раза меньше, чем в контроле. Однако прирост площади этого отростка во всех исследуемых группах с 18-х по 20-е сутки – одинаков (этот показатель увеличивается более чем в 2 раза) (рис.2).

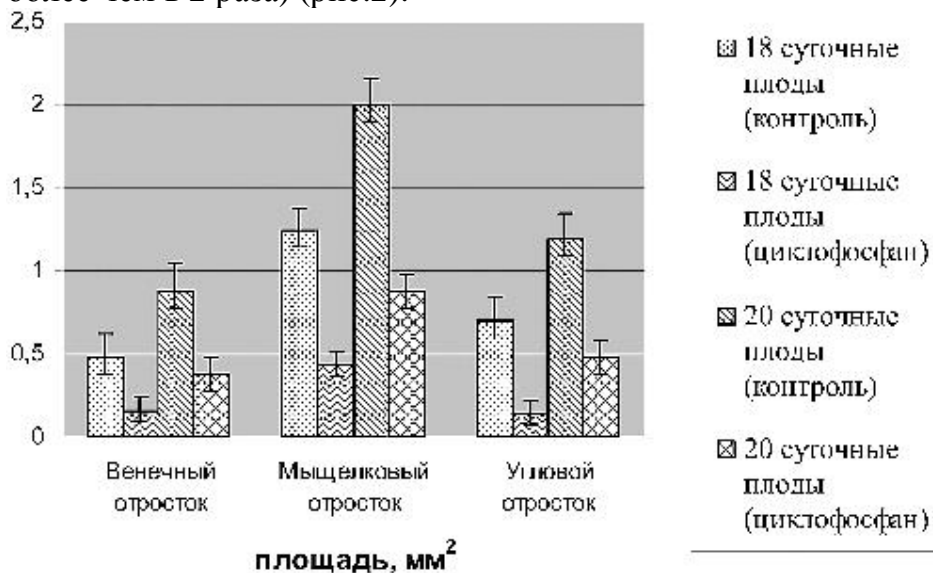


Рис. 2. Площадь отростков нижней челюсти плодов белой крысы

Проекционная площадь хряща в составе головки нижней челюсти в опытной группе 18 суточных плодов ниже на 47% и на 65% у плодов 20-ти суток эмбриогенеза ($P < 0,05$). Между тем в течение двух суток объем хрящевой ткани в составе мышелкового отростка нижней челюсти в группе животных подверженных действию цитостатика, увеличивается на 41%, а его площадь на 54% ($P < 0,05$).

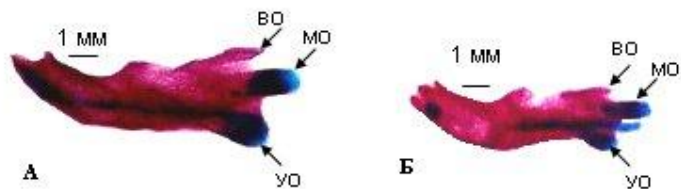


Рис. 3. Просветленные препараты 1/2 нижней челюсти. 20 сутки эмбриогенеза.

А - контроль, Б - после введения циклофосфана. ВО - венечный отросток,

МО - мышелковый отросток, УО - угловой отросток.

Изучение гистологических срезов плодов экспериментальной группы позволило выявить отклонения от нормального морфогенеза на клеточно-тканевом уровнях. Так образующиеся костные балки нижней челюсти, под воздействием цитостатика, тонкие, их значительно меньше, чем у интактных животных. На поверхности костных балок располагается небольшое

количество остеобластов и остеокластов (рис.4). Остеокласты часто лежат группами и имеют крупные размеры (рис.4).

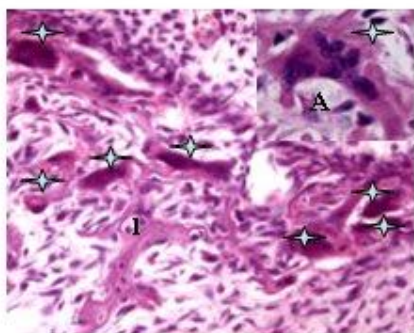


Рис.4. Костные балки нижней челюсти плодов белой крысы, подверженные действию циклофосфана. 18 сутки эмбриогенеза. Окраска гематоксилин - эозином. Ув.х 40. 1-костные балки. ★ - остеокласты. А - остеокласт. Ув.х100.

Циклофосфан угнетает пролиферативную активность эпителия ротовой полости, что приводит к нарушению гисто-и органогенеза тканей зубов. Образующиеся зачатки зубов, особенно производные эпителия, отстают по степени дифференцировки от контроля, часто деформированы (рис.4а).

У 18 суточных плодов белой крысы после действия цитостатика была выявлена частичная расщелина неба (рис.5). В процессе эмбриогенеза нижняя челюсть играет важную роль в формировании вторичного неба. Ее гипоплазия препятствует смещению закладки языка вниз и, на наш взгляд, является одной из причин образования врожденного дефекта неба.



Рис.5. Частичная расщелина вторичного неба (♦) у 18-ти суточных плодов белой крысы (действие циклофосфана на 12 сутки эмбриогенеза). Окраска гематоксилин - эозином. Сагиттальный срез. Увеличение х 5. 1-полость носа, 2-ротовая полость, 3-язык, 4-меккелев хрящ, 5- костные балки нижней челюсти. I- зачатки резцов. II- зачатки моляров на верхней и нижней челюсти. А- зачаток моляра. Ув.х 40. 6-эмалевый орган, 7-зубной сосочек, 8-зубной мешочек.

Недоразвитие отростков ветви нижней челюсти впоследствии может привести к нарушению формирования височно-нижнечелюстного сустава и всей зубо-челюстной системы.

Сходные нарушения морфогенеза нижней челюсти наблюдались нами после действия на зародыш крысы рентгеновского облучения [7,8]. Следовательно, все выше сказанное свидетельствует о том, что схожие по морфологическим признакам врожденные аномалии имеют сходные патогенетические механизмы формирования.

Выводы

1. Однократное введение циклофосфана беременным самкам на 12 день эмбриогенеза в дозе 20 мг/кг приводит к гипоплазии тела и ветви нижней челюсти.

2. Репаративная регенерация, проявляющаяся в усилении процессов хондро-и остеогенеза, не обеспечивает полного восстановления структуры кости как органа. Отростки нижней челюсти остаются недоразвитыми, что впоследствии приводит к задержке формирования височно-нижнечелюстного сустава и нарушению сбалансированного развития всей зубо-челюстной системы, одним из следствий такого нарушения является формирование расщелины твердого неба.

Литература

1. Машковский, Д.М. Лекарственные средства. / М.Д. Машковский.-15 изд.-Москва: Новая волна, 2005.-С.969.
2. Каспарова, Н.Н. Врожденные пороки развития височно-нижнечелюстного сустава./Н.Н.Каспарова [и др.] // Стоматология.-1982.-№5.-С.65-66.
3. Безруков, В.М. Заболевания височно-нижнечелюстного сустава./ В.М. Безруков [и др.]; Российская медицинская академия постдипломного образования. – М.:ГЭОТАР-МЕД,2002.-48с.
4. Окушко, В.Р. Особенности развития нижней челюсти крыс при спонтанном и экспериментальном пародонтозе. // В кн.: Морфология органов и тканей лица, полости рта в норме и патологии.-Труды Смоленского медицинского института. – 1975.-Том 46. – С. 18-21.
5. Сперанский, В.С. Основы медицинской краниологии. / В.С. Сперанский.-Москва: Медицина, 1988. – С.268.
6. Кабак, С.Л. Врожденные аномалии скелета и суставов конечностей белой крысы, индуцированные циклофосфаном. / С.Л.Кабак, Л.Н.Бойцов, Е.П.Аниськова. //-Доклады АН БССР.-1985.-Т.29.-№6. – С.565-567.
7. Китель, В.В. Влияние рентгеновского облучения на развитие нижней челюсти плодов белой крысы / В.В.Китель // Сб. научных трудов к 80-летию профессора П.Ф. Степанова. – Смоленск, 2004. – С.82-87.
8. Китель, В.В. Пролиферативная и синтетическая активность хрящевых клеток в головке нижней челюсти// Морфология.-2004.-№ 4.-С. 59.
9. Peters P. // Method in prenatal toxicology. G. Tr. Publ.-Stuttgart.-1977.-P.-153.
10. Barrentt M.I., Brown T., Mcnylty E. // Austr.dent.J.-1968.-13.-3.-P.-207.