Сравнительный анализ профилей экспрессии генов ИЛ-1-бета, ЦОГ-2 и Коллагеназы II типа в тканях пульпы зубов с проявлением острого воспалительного процесса

М.А. ВОЛГИН*, к.м.н., доц.
К.В. ПЕТИНОВ**, врач-стоматолог-хирург
А.В. МИТРОНИН***, д.м.н., проф., зав. кафедрой
А.М. КИЛЬБАССА*, д.м.н., проф., зав. кафедрой
*Кафедра терапевтической стоматологии, пародонтологии и эндодонтии, Дунайский Частный Университет (DPU), Кремс-на-Дунае, Австрия
**ГБУЗ СО Самарская городская стоматологическая поликлиника №1
***Кафедра кариесологии и эндодонтии, ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России

The comparative analysis of the gene expression profiles of IL-1β, COX-2 and Collagenase type II in inflamed dental pulps

M.A. VOLGIN, K.V. PETINOV, A.V. MITRONIN, A.M. KIELBASSA

Резюме: **Целью исследования являлось выявление профилей экспрессии генов ИЛ-1-бета, ЦОГ-2 и Коллагеназы II типа в тканях пульпы. Далее необходимо было выявить различия профилей экспрессии генов ИЛ-1-бета ЦОГ-2 и Коллагеназы-2 в тканях воспаленной и невоспаленной пульпы. Используя технику количественной полимеразной цепной реакции, данное исследование показало статистически значимое увеличение экспрессии генов ИЛ-1-бета (p = 0,001) и ЦОГ-2 (p = 0,002) в тканях воспаленной пульпы зуба в сравнении с ее невоспаленным аналогом. Статистически значимые различия профилей экспрессии между образцами воспаленной и невоспаленной пульпы для маркера Коллагеназа-II типа (p = 0,757) выявлены не были.**

Ключевые слова: **медиаторы воспаления, количественная полимеразная цепная реакция, экспресс-тест, необратимый пульпит, диагностика.**

Abstract: **The aim of the present study was to detect the gene expression profiles of IL-1β, COX-2 and Collagenase Type II in dental pulps. Further, the study aimed at comparison of these profiles in healthy and inflamed dental pulps. Gene expression was assessed using Reverse Transcriptase Reaction and Real-Time-PCR. The results of the present study showed significant increase of the gene expression of IL-1β (p = 0,001), COX-2 (p = 0,002) in the inflamed samples, if compared with healthy pulps. Any statistical differences between the gene expression of Collagenase Type II (p = 0,757) in inflamed and healthy dental pulps could not be detected.**

Key words: **cytokines, real-time PCR, chairside test, irreversible pulpitis, diagnostics.**

Актуальность

В соответствии с определением, пульпитом является любое воспаление внутренних тканей зуба [1]. Данное воспаление может являться результатом воздействия на пульпу зуба стимулов различного генеза, но в подавляющем большинстве случаев основным источником воспалительного процесса являются микроорганизмы, проникающие в полость зуба в результате длительно текущего кариеса [2, 3], а также травматических, онтогенетических, ятрогенных или других процессов, связанных с механической дезинтеграцией полости зуба [3, 4]. В соответствии с принятыми классификациями стадий пульпита (ММСИ и МКБ-10) и наряду с многочисленными другими (в большинстве своем терминальными) формами данного заболевания, принято различать начальный (гиперемию пульпы) и острый пульпиты [5]. Ведя речь о физиологически здоровой пульпе, принято считать, что таковой является ткань с полным отсутствием клинических признаков заболевания [6]. Следует, однако, отметить, что отсутствие последних характерно не только для здоровой пульпы , но и для некоторых форм обратимого и даже необратимого пульпита. Такие наблюдения позволяют с уверенностью говорить о невозможности диагностирования данных форм заболевания клиническими методами [7].

В настоящее время процесс диагностики пульпита заключается в оценке совокупности объективных наблюдений и субъективных симптомов, складывающихся в общую, типичную картину заболевания. Так, например, основными субъективными признаками пульпита необратимой формы являются сильные, спонтанные, периодические, иррадиирующие и пролонгированные боли, усиливающиеся в ночное время [5]. В то время как характер боли во время обратимого пульпита носит скорее кратковременный и локализованный характер. К объективным методам исследования в обоих случаях относятся перкуссия, тест на чувствительность, доплерография и другие методы [7]. Нетрудно заметить чрезвычайную схожесть

симптомов, носящих к тому же явно субъективный характер. Принимая во внимание видимую несостоятельность современных методов диагностики стадий пульпита, а также прослеживая тенденции в международной эндодонтической периодике, следует поднять вопрос о необходимости подробного изучения молекулярно-биологических процессов, протекающий в тканях пульпы на различных стадиях пульпита с целью последующего внедрения соответствующих диагностических процедур [8–10].

С точки зрения молекулярно-биологических процессов, ткани зубной пульпы оснащены арсеналом иммунокомпетентных клеток, специфических и неспецифических защитных механизмов, представляющих собой совокупность медиаторов воспаления, которые, будучи вовлечены в регуляцию сложных межклеточных и межсистемных взаимодействий, определяют процессы ответа пульпы на поступающую извне инфекцию [11]. Кроме этого, многочисленные эксперименты, проведенные как in vitro, так и in vivo, доказали способность одонтобластов не только инициировать неспецифический иммунный ответ и миграцию иммунокомпетентных клеток, но и самостоятельно участвовать в нем, посредством собственных цитокинов и антимикробных пептидов [12, 13]. Результаты предшествующих исследований показали, в частности, значительное повышение концентрации таких цитокинов как TGF-β1, VEGF, CCL2/MCP1, CCL20/MIP3α, CXCL10, IL-8, -1β, -2, -4, -6, -10, -11, а также INF-γ, TNF-α и бета-дефензинов hBD-2, -3 и -4 в тканях или клетках воспаленной пульпы [7, 14–17]. Несмотря на многочисленные эксперименты, проводимые в этой области, современные исследователи еще далеки от окончательного понимания сложных механизмов экспрессии, синтеза и взаимодействия медиаторов воспаления в тканях и клетках пульпы [8, 32, 33, 35].

С точки зрения возможности использования молекулярно-биологических реакций в качестве диагностического инструмента, представляется важным изучение таких пептидов, уровень концентрации которых позволял бы производить экспресс-диагностику стадий пульпита в амбулаторных условиях, основанной, например, на анализе секрета или крови пульпы [18, 19, 34]. Подобные ситуации встречаются в каждодневной стоматологической практике в процессе наложения медикаментозной повязки на вскрытую пульпу с целью сохранения ее жизнеспособности (так называемое непрямое покрытие пульпы). Потенциальным субстратом для экспресс-определения стадии воспалительной реакции может являться фермент Коллагеназа II типа, успешное применение которого уже описано в пародонтологии [20]. В настоящее время экспрессия и синтез Коллагеназы II типа и других похожих субстратов в тканях зубной пульпы еще недостаточно изучены.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью данного исследования было выявление профилей экспрессии генов ИЛ-1-бета, ЦОГ-2 и Коллагеназы II типа в тканях пульпы. Далее необходимо было выявить различия профилей экспрессии генов ИЛ-1-бета ЦОГ-2 и Коллагеназы-2 в тканях воспаленной и невоспаленной пульпы. Дополнительными целями исследования являлись оценка возможности использования количественной полимеразной цепной реакции в качестве методики для лабораторного подтверждения клинического диагноза «необратимый пульпит», а также оценка возможности применения экспресс-теста для определения наличия необратимого воспаления, основанного на измерении концентрации Коллагеназы II типа. В качестве нулевой (H0) гипотезы выдвигалось отсутствие различий профилей экспрессии искомых маркеров в тканях невоспаленной (μ1) и воспаленной (μ2) пульпы зубов. Конкурирующая гипотеза (HA) была сформулирована от противного.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биопсии пульпы были взяты у взрослых пациентов, проходивших хирургическое и эндодонтическое лечение на кафедрах клиники «Шарите — университетская медицина» (Charité — Universitätsmedizin), Берлин, Германия, в период с января 2010-го по сентябрь 2011 года. Сбор биопсий происходил с письменного разрешения доноров, в строгом соответствии с положениями, регламентированными центральным комитетом по этике Федеративной Республики Германия [21]. Пациенты, находившиеся под влияниями каких-либо медикаментов в течение последних 24 часов, предшествовавших лечению, пациенты с незавершенным образованием корней, импактированными молярами, а также пациенты с признаками маргинального и/или верхушечного периодонтита были исключены из участия в сборе биопсий. Биопсии пульпы (объем выборки = 7), классифицированной как «здоровая», были получены путем извлечения последней из пульпарных камер удаленных, бессимптомных, интактных третьих моляров (рис. 1а) посредством продольного распила данных зубов охлаждаемыми алмазными борами (рис. 1б). Биопсии пульпы (объем выборки = 10), классифицированной как воспаленная, были получены путем витальной экстирпации последней из кариозных зубов с клинически диагностированным необратимым пульпитом (сильные,

Таблица 1. **Последовательность нуклеотидов в использованных праймерах**

Ген	Прямой	Обратный	Длина продукта (кб)
Колл.-II т. (длинный) Колл.-II т. (короткий)	taagccttttgtcacctca	ctgtaaaggccaagggtact	151
	atctgacttcatacatccctca	tgtttataatccttacttctaaccaaa	102
ИЛ-1-бета (длинный) ИЛ-1-бета (короткий)	ctccagggacaggatatgga	tctttcaacacgcaggacag	134
	caacaagtggtgttctccatgt	gcccaaggccacaggtat	72
ЦОГ-2 (длинный) ЦОГ-2 (короткий)	tgagcatctacggtttgctg	tgcttgtctggaacaactgc	158
	caggaggtctttggtctggt	atcaccccattcaggatgc	111
3-ФГА (длинный) 3-ФГА (короткий)	cctgacctgccgtctagaaa	tactccttggaggccatgtg	276
	tcaagaaggtggtgaagcag	ccctgttgctgtagccaaat	198

спонтанные, периодические, иррадиирующие и пролонгированные боли, усиливающиеся в ночное время, негативная реакция на перкуссию, повышенный тест на чувствительность). Все биопсии подверглись немедленной стабилизации посредством добавления РНК-стабилизатора (RNAlater; QIAGEN, Гильден, Германия) а также глубокой заморозке жидким азотом (рис. 1в).

Используя методику выделения РНК тризолом (TRIzol; Invitrogen, Карлсруэ, Германия), суммарная РНК тканей пульпы была получена путем гомогенизации тканей ручным лабораторным гомогенизатором (Sartorius, Геттинген, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. После разделения водной и органической фазы, произошедшего вследствие добавления в пробирки 200 мкл хлороформа, было произведено 15-минутное центрифугирование пробирок при скорости вращения 12 000 об./мин. и температуре 4°C. Результирующая РНК была очищена 70% раствором этилового спирта и растворена в воде, предварительно обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC). Концентрация растворенной РНК была определена при помощи фотометрического анализа. Последующий синтез комплементарной цДНК был произведен в термоциклическом режиме с использованием реакции обратной транскрипции по протоколу: 1 мкг/мкл РНК, 1 мкмоль олиго(dT)-праймера и реактива обратной транскриптазы ММЛ-В, 200 ед./мкл (Promega, Маннгейм, Германия) при температуре 42°C в течение 60 минут.

Последующая количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) была проведена по протоколу, описанному нами ранее [7, 22] с использованием амплификатора Rotor-Gene (Corbett Research, Сидней, Австралия). Для каждого изучаемого гена была проведена реакция по следующему протоколу: 160 нг цДНК, 10 мкл реактива SYBRgreen (QIAGEN), по 4 мкл прямого и обратного (короткого) праймера с конечной концентрацией 0,6 мкмоль (табл. 1) и вариабельного количества воды до общего конечного объема пробы 20 мкл. Результаты ПЦР были квантифицированы при помощи стандартных кривых, которые были выстроены в предварительном эксперименте (вложенная ПЦР), используя стандартную цДНК изучаемых генов, помеченных соответствующими парами (длинных) праймеров (табл. 1). Упомянутая стандартная цДНК была получена в предварительном эксперименте путем обратной транскрипции суммарной РНК клеток линии HaCaT (Немецкий центр изучения рака, Гейдельберг, Германия), стимулированных бактериальными липополисахаридами (ЛПС). Продукты амплификации данной реакции были очищены при помощи реактива MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN), генные копии были рассчитаны в соответствии с формулой: молекулы/мкл = ДНК (г/мл) / длина ДНК (спаренные основания × 660) × 6,022 × 1023. Стандартные кривые были генерированы путем подчинения количества копий в диапазоне от 1 × 102 до 1 × 1011 результатам ПЦР с «короткими» праймерами.

Параллельно с амплификацией цДНК каждого изучаемого гена (ЦОГ-2, Коллагеназы II типа и Эластазы-2) производилась цепная реакция генов 3-ФГА. Амплификация происходила при следующем температурном режиме: инициальная денатурация (95°C, 15 мин.), денатурация (35 циклов, 94°C, 15 сек.), отжиг (56°C, 30 сек.), элонгация (72°C, 75 сек.). Затем

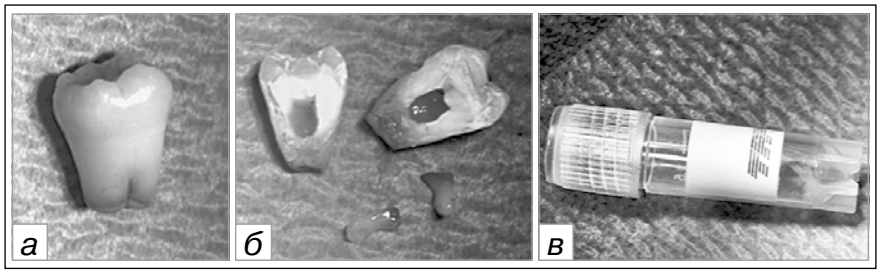

Рис. 1. **Пример получения биопсии бессимптомной пульпы: а) удаленный третий моляр (не включенный в исследование из-за незавершенного формирования корней); б) извлеченная пульпа; в) пульпа, подвергшаяся глубокой заморозке**

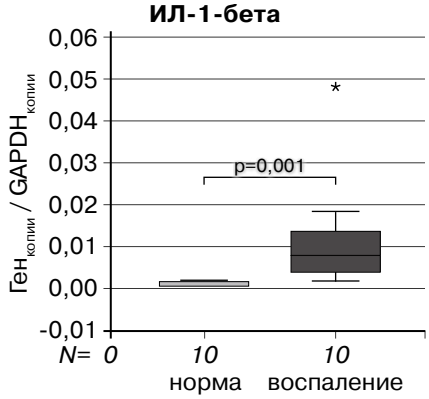

Рис. 2. **Статистический анализ выявил значимые различия профилей экспрессии гена ИЛ-1-бета (выполнял роль позитивного контроля) между пробами воспаленной и невоспаленной пульпы (p = 0,001; U-критерий Манна-Уитни)**

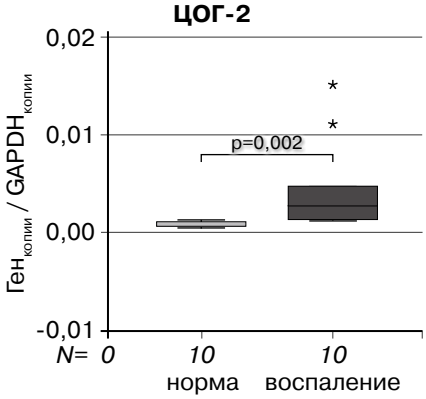

Рис. 3. **Статистический анализ выявил значимые различия профилей экспрессии гена ЦОГ-2 между пробами воспаленной и невоспаленной пульпы (p = 0,002; U-критерий Манна-Уитни)**

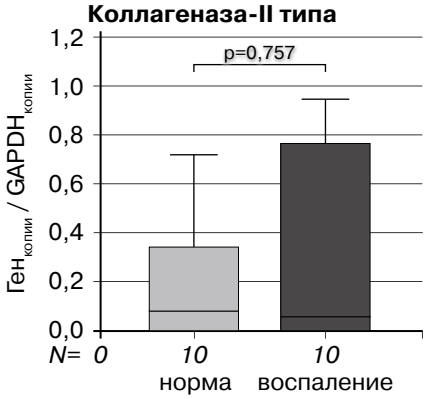

Рис. 4. **Статистический анализ не выявил значимые различия профилей экспрессии гена Коллагеназа II типа между пробами воспаленной и невоспаленной пульпы (p = 0,757; U-критерий Манна-Уитни)**

генетические копии были экстраполированы на соответствующие участки стандартных кривых и приведены в зависимость к результатам экспрессии 3-ФГА, выполнявшего роль ключевого интермедиата метаболизма. Дополнительно к функции детекции продукта в режиме реального времени была проведена сепарация продуктов ПЦР с целью их контрольного электрофореза в агарозном геле (2%). Специфичность и чистота продуктов были исследованы посредством контроля кривой плавления цДНК, а также посредством двух негативных проб.

На основании проверки нормальности распределения значений признаков критерием Шапиро-Уилка, в качестве метода статистического анализа был выбран непараметрический тест. Отличия в экспрессии исследуемых генов в тканях воспаленной и невоспаленной пульпы были статистически исследованы при помощи U-критерия Манна-Уитни. Для этого за уровень статистической значимости был взят $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя технику количественной полимеразной цепной реакции, данное исследование показало статистически значимое увеличение экспрессии генов ИЛ-1-бета (рис. 2) и ЦОГ-2 (рис. 3) в тканях воспаленной пульпы зуба в сравнении с ее невоспаленным аналогом ($p = 0,001$ и $p = 0,002$ соответственно). Статистически значимые различия профилей экспрессии между образцами воспаленной и невоспаленной пульпы для маркера Коллагеназа-II типа (рис. 4) выявлены не были ($p = 0,757$). Присутствие изучаемых генов было обнаружено в суммарной РНК всех полученных биопсий. Таким образом, для маркера Коллагеназа-II типа была подтверждена нулевая гипотеза, в то время как для маркеров ИЛ-1-бета и ЦОГ-2 получила подтверждение конкурирующая гипотеза. Увеличение экспрессии последних лабораторно подтверждает клинический диагноз «необратимый пульпит», что, также находится в соответствии с результатами подобных исследований, проведенных ранее другими авторами [23–26]. Вышеуказанные соответствия являются доказательствами правильности выбора методики, вызывают уверенность в чистоте проведенного эксперимента и не позволяют сомневаться в результате, касающемся отсутствия статистически значимых различий экспрессии гена Коллагеназа-II типа. Результаты эксперимента можно расценивать как неожиданные, поскольку экспрессия и синтез Коллагеназы-II типа находятся в непосредственной зависимости от синтеза интерлейкинов, в частности от ИЛ-1 [27]. Причины отсутствия повышения экспрессии Коллагеназы-II типа в данном контексте не ясны и могут являться темой отдельного исследования. Что касается возможности использования данного маркера в качестве субстрата для экспресс-определения необратимого воспаления в тканях пульпы, то, исходя из результатов нашего исследования, соответствующее использование Коллагеназы-II типа представляется нецелесообразным. Наиболее многообещающим в этом плане выглядят субстраты ИЛ-1-бета и ЦОГ-2. Однако следует заметить, что в настоящее время техническое оснащение лабораторной медицины не располагает возможностями проведения экспресс-тестов, основанных на данных субстратах, тем более если учесть их столь малое количество в пробах ткани. Ведя речь о примененной методике, следует заметить, что ПЦР, хотя и является высокоточным инструментом в целях определения малых доз субстрата, в то же самое время представляет собой наукоемкий и трудоемкий процесс, требующий к тому же существенных временных и финансовых затрат. Вышеперечисленные характеристики данной методики делают ее нецелесообразной в качестве потенциального метода экспресс-определения необратимого воспаления в условиях клинической практики.

Сравнивая результаты данного исследования с результатами похожих экспериментов, проведенных ранее другими авторами, следует отметить однотипность высказываний, касающихся результатов этих исследований и их интерпретации [28, 29]. Ни одна из примененных методик (ПЦР, ИФА, иммуногистохимический анализ и др.) не может отвечать требованиям экспресс-теста, поскольку подразумевают извлечение потенциально жизнеспособной ткани из пульпарной полости. В актуальной эндодонтической научной периодике прослеживаются тенденции к привлечению альтернативных источников субстрата для определения уровня экспрессии и синтеза медиаторов воспаления, таких как кровяные выделения пульпы и кревикулярной жидкости. С точки зрения локализованности воспалительного процесса в пульпарной камере зуба, пробы крови представляются наиболее правдоподобным источниками субстрата [30, 31]. Соответствующий систематический обзор литературы, проведенный нашей исследовательской группой и также готовящийся в настоящее время к публикации, имел целью обобщить данные различных исследований, проведенных в этой области. Несмотря на актуальность темы, данный систематический обзор приводит к обескураживающим выводам: на фоне кажущегося многообразия исследований лишь незначительная их часть отвечает критериям, позволяющим сохранить потенциально жизнеспособную ткань. Исследования, соответствующие вышеуказанному критерию, страдают крайне низкой гетерогенностью и высокой разнородностью полученных результатов. Основной проблемой является, например, разнородность единиц измерения, примененных в различных исследованиях, что не позволяет произвести какой-либо обобщающий статистический анализ данных. Несмотря на то что в рамках обзора литературы были приняты во внимание только те исследования, которые базировались на сборе кровяных выделений пульпы и имели потенциальную возможность сохранить жизнеспособность тканей, примененные методы определения медиаторов воспаления также не соответствовали требованиям экспресс-анализа.

В свете полученных результатов данного исследования и систематического изучения доступной литературы, необходимо подчеркнуть, что современные молекулярно-биологические методы пока не соответствуют характеристикам экспресс-теста и требуют дальнейшего развития и усовершенствования, исходя из реальных потребностей клинической эндодонтии. Кроме этого, необходимо дальнейшие изучение сложных молекулярных взаимодействий, протекающих в процессе воспалительной реакции в тканях пульпы с целью лучшего понимания особенностей данного заболевания на субклеточном уровне.

Выводы

В рамках ограниченных возможностей данного исследования были выявлены профили экспрессии генов ИЛ-1-бета, ЦОГ-2 и Коллагеназы II типа в тканях пульпы зубов. Были выявлены различия профилей экспрессии генов ИЛ-1-бета, ЦОГ-2, в тканях воспаленной и невоспаленной пульпы зубов. Различия для Коллагеназы II типа выявлены не были. Существует теоретическая возможность использования количественной полимеразной цепной реакции в качестве методики для лабораторного подтверждения клинического диагноза «необратимый пульпит». Применение эскпресс-теста для определения наличия необратимого воспаления на основании результатов данного исследования не представляется возможным.

Поступила 12.11.2016

Координаты для связи с авторами:
127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levin L. G., Law A. S., Holland G. R., Abbott P. V., Roda R. S. Identify and define all diagnostic terms for pulpal health and disease states // J. Endod. 2009. №35. P. 1645–1657.

2. Langeland K. Tissue response to dental caries // Endod. Dent. Traumatol. 1987. №3. P. 149–171.

3. Nagaoka S., Miyazaki Y., Liu H. J., Iwamoto Y., Kitano M., Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth // J. Endod. 1995. №21. P. 70–73.

4. Sadasiva K., Ramalingam S., Rajaram K., Meiyappan A. Cracked tooth syndrome: A report of three cases // J. Pharm. Bioallied. Sci. 2015. №7. P. 700–703.

5. Bramer G. R. International statistical classification of diseases and related health problems. Tenth revision // World Health Stat. Q. 1988. №41. P. 32–36.

6. Abbott P. V., Yu C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system // Aust. Dent. J. 2007. №52. P. 17–31.

7. Paris S., Wolgin M., Kielbassa A.M., Pries A., Zakrzewicz A. Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps // J. Endod. 2009. №35. P. 520–523.

8. Mejare I. A., Axelsson S., Davidson T., Frisk F., Hakeberg M., Kvist T., et al. Diagnosis of the condition of the dental pulp: a systematic review // Int. Endod. J. 2012. №45. P. 597–613.

9. Levin L. G. Pulp and periradicular testing // Pediatr. Dent. 2013. №35. P. 113–119.

10. Levin L. G. Pulp and periradicular testing // J. Endod. 2013. №39. P. 13–19.

11. Hahn C. L., Liewehr F.R. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis // J. Endod. 2007. №33. P. 213–219.

12. Veerayutthwilai O., Byers M. R., Pham T. T., Darveau R. P., Dale B. A. Differential regulation of immune responses by odontoblasts // Oral Microbiol. Immunol. 2007. №22. P. 5–13.

13. Staquet M. J., Durand S. H., Colomb E., Romeas A., Vincent C., Bleicher F., et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity // J. Dent. Res. 2008. №87. P. 256–261.

14. Piattelli A., Rubini C., Fioroni M., Tripodi D., Strocchi R. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis // Int. Endod. J. 2004. №37. P. 114–119.

15. Adachi T., Nakanishi T., Yumoto H., Hirao K., Takahashi K., Mukai K., et al. Caries-related bacteria and cytokines induce CXCL10 in dental pulp // J. Dent. Res. 2007. №86. P. 1217–1222.

16. McLachlan J. L., Smith A. J., Bujalska I. J., Cooper P. R. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries // Biochim. Biophys. Acta. 2005 №1741. P. 271–281.

17. Horst O. V., Horst J. A., Samudrala R., Dale B. A. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth // BMC Immunol. 2011. №12 P. 9.

18. Zehnder M., Rechenberg D. K., Bostanci N., Sisman F., Attin T.. Comparison of vehicles to collect dentinal fluid for molecular analysis // J. Dent. 2014. №42. P. 1027–1032.

19. Chen E., Abbott P. V. Dental pulp testing: a review // Int. J. Dent. 2009. №12. P. 365785.

20. Sorsa T., Hernandez M., Leppilahti J., Munjal S., Netuschil L., Mantyla P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods // Oral Dis. 2010. №16. P. 39–45.

21. Central German Ethics Committee Statement. The use of human body materials for purposes of medical research. — URL: http://www.zentrale-ethikkomission.de/page.asp?his=0.1.21. / 10 — 2008.

22. Bongrazio M., Da Silva-Azevedo L., Bergmann E. C., Baum O., Hinz B., Pries A. R., et al. Shear stress modulates the expression of thrombospondin-1 and CD36 in endothelial cells in vitro and during shear stress-induced angiogenesis in vivo // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2006. №19. P. 35–48.

23. Gatta V., Zizzari V. L., Dd ' Amico V., Salini L., Franchi S., et al. Microarray evaluation of gene expression profiles in inflamed and healthy human dental pulp: the role of IL1beta and CD40 in pulp inflammation // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2012. №26. P. 45–50.

24. Silva A. C., Faria M. R., Fontes A., Campos M. S., Cavalcanti B. N. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps // J. Appl. Oral. Sci. 2009. №17. P. 527–532.

25. Nakanishi T., Shimizu H., Hosokawa Y., Matsuo T. An immunohistological study on cyclooxygenase-2 in human dental pulp // J. Endod. 2001. №27. P. 385–388.

26. Holt C. I., Hutchins M. O., Pileggi R. A real time quantitative PCR analysis and correlation of COX-1 and COX-2 enzymes in inflamed dental pulps following administration of three different NSAIDs // J. Endod. 2005. №31. P. 799–804.

27. Ozeki N., Yamaguchi H., Hiyama T., Kawai R., Nakata K., Mogi M., et al. IL-1beta-induced matrix metalloproteinase-3 regulates cell proliferation in rat dental pulp cells // Oral Dis. 2015. №21. P. 97–105.

28. Pezelj-Ribaric S., Anic I., Brekalo I., Miletic I., Hasan M., Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps // Arch. Med. Res. 2002. №33. P. 482–484.

29. Kokkas A. B., Goulas A., Varsamidis K., Mirtsou V., Tziafas D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp // Int. Endod. J. 2007. №40. P. 198–203.

30. Ozdemir Y., Kutukculer N., Topaloglu-Ak A., Kose T., Eronat C. Comparative evaluation of pro-inflammatory cytokine levels in pulpotomized primary molars // J. Oral. Sci. 2015. №57. P. 145–150.

31. Nakanishi T., Matsuo T., Ebisu S.. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps // J. Endod. 1995. №21. P. 131–136.

32. Вавилова Т., Островская И., Гаверова Ю., Митронин А. В., Курбатов С. Адаптивные изменения в тканях полости рта крыс при холодовом стрессе // Cathedra. Стоматологическое образование. 2008. №2. С. 22–25.

Vavilova T., Ostrovskaya I., Gaverova Yu., Mitronin A. V., Kurbatov S. Adaptivnye izmeneniya v tkanyah polosti rta krys pri holodovom stresse // Cathedra. Stomatologicheskoe obrazovanie. 2008. №2. S. 22–25.

33. Митронин А. В., Вавилова Т.П., Островская И. Г., Гаверова Ю.Г. Влияние эмоционально-холодового стресса на сосудистый эндотелий пульпы резцов и слизистой оболочки полости рта крыс // Эндодонтия today. 2013. №3. С. 3–6.

Mitronin A. V., Vavilova T. P., Ostrovskaya I. G., Gaverova Yu. G. Vliyanie ehmocional'no-holodovogo stressa na sosudistyj ehndotelij pul'py rezcov i slizistoj obolochki polosti rta krys // Endodontiya today. 2013. №3. S. 3–6.

34. Островская И. Г., Вавилова Т. П., Митронин А. В., Савинова Е. А. Исследование содержания белков-маркеров апоптоза в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении // Эндодонтия today. 2010. №4. С. 23–25.

Ostrovskaya I. G., Vavilova T. P., Mitronin A. V., Savinova E. A. Issledovanie soderzhaniya belkov-markyorov apoptoza v pul'pe vremennyh i postoyannyh zubov pri vospalenii // Endodontiya today. 2010. №4. S. 23–25.

35. Островская И. Г., Вавилова Т. П., Ерофеева Л. М., Митронин А. В., Селезнев Д. А. Реакция пульпы резцов крыс на силовой модуль //Эндодонтия today. 2014. №2. С. 32–35

Ostrovskaya I. G., Vavilova T. P., Erofeeva L. M., Mitronin A. V., Seleznyov D. A. Reakciya pul'py rezcov krys na silovoj modul' // Endodontiya today. 2014. №2. S. 32–35.