

Исследование белков воспаленной пульпы временных зубов в начальной стадии резорбции корней

И.Г. ОСТРОВСКАЯ*, к.м.н., ст. преподаватель
Т.П. ВАВИЛОВА*, д.м.н., проф., зав. кафедрой
А.В. МИТРОНИН**, д.м.н., проф., зав. кафедрой
Е.А. САВИНОВА***, к.м.н., доц. кафедры

*Кафедра биохимии

**Кафедра терапевтической стоматологии и эндодонтии ФПДО

***Кафедра терапевтической стоматологии детского возраста

ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет»

Research of proteins of the inflamed pulp of the deciduous teeth in initial stage resorbtive of roots

I.G. OSTROVSKAYA, T.P. VAVILOVA, A.V. MITRONIN, E.A. SAVINOVA

Резюме

Клетки воспаленной пульпы временных зубов в начальной стадии резорбции корней принимают активное участие в запрограммированном разрушении зуба и гораздо меньше реагируют на развитие воспаления, которое характеризуется необратимым повреждением эндотелия сосудов, подавлением процессов восстановления клеточных структур на фоне активации белков, участвующих в апоптозе клеток и разрушении костных структур пародонта.

Ключевые слова: пульпа зуба, временные зубы, воспаление, резорбция корня, основной фактор роста фибробластов- β (FGF- β), гомоцистеин (Hcy), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), аннексин V, остеопротегерин (OPG), растворимый рецептор активации фактора нуклеации каппа В лиганд (sRANKL).

Abstract

Cages of the inflamed pulp of a deciduous teeth in an initial stage resorbtive of root take active part in the programmed destruction of a tooth and much less react to development of an inflammation which is characterised by irreversible damage endothelium vessels, suppression of processes of restoration of cellular structures against activation of the proteins participating in apoptosis of cages and destruction of bone structures periodontis.

Key words: tooth pulp, deciduous teeth, inflammation, resorbtive of root, major fibroblast growth factor- β (FGF- β), homocysteine (Hcy), tumour necrosis factor- α (TNF- α), annexin V, osteoprotegerin (OPG), soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (sRANKL).

В физиологическом процессе резорбции корней временных зубов принимают участие локализованные в пульпе многоядерные одонтокласты, фибробласты и макрофаги [17]. Морфологические исследования показали, что резорбция начинается в зоне апикального отверстия и наиболее активно протекает на язычной или небной поверхности корня зуба [14]. Начало резорбции корней совпадает с активацией ферментов окислительной части пентозофосфатного пути превращения глюкозы, а именно с повышением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Исследователи считают, что это связано с усиленным образованием восстановленного НАДФ, который необходим для защиты

тканей от активных форм кислорода. В период резорбции корней зубов также растет активность кислой фосфатазы и активируется перекисное окисление липидов мембран [7, 9]. Процесс резорбции корней временных зубов регулирует с целью предотвращения гибели клеток пародонта, окружающих временный зуб, для сохранения зачатков постоянных зубов.

На стадии резорбции корней временных зубов нередко развивается воспаление пульпы. Воспаление – это сосудисто-мезенхимальная реакция тканей на повреждение, которая направлена не только на ликвидацию повреждающего агента, но и на восстановление поврежденного участка [3], которое характерно для тканей

мезенхимного происхождения. Однако воспалительная реакция пульпы зуба имеет свою специфичность, которая обусловлена образованием в зоне повреждения заместительного дентина [7]. Поэтому исследование характера изменений, происходящих в воспаленной пульпе временных зубов в момент резорбции корней, является актуальным не только для теоретической, но и для практической стоматологии.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение в воспаленной пульпе временных зубов, находящихся в начальной стадии резорбции корня, количества белков, участвующих в микроциркуляции сосудистого русла, и состояния собственных клеток пульпы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для настоящего исследования были взяты образцы пульпы в стадии хронического пульпита (ХП) у 20 детей в возрасте от двух до четырех лет в стадии физиологического покоя корня (СФП), у 26 детей в возрасте от пяти до семи лет в стадии резорбции корня зуба (СРК). В исследование не входили дети с отягощенным соматическим статусом. Воспаленная пульпа была получена путем экстирпации по строго медицинским показаниям под анестезией с применением 4% раствора Убистезина. Хронический фиброзный пульпит был диагностирован согласно Международной статистической классификации болезней и сопутствующих проблем Десятого пересмотра (1998) [4] по данным анамнеза и электроодонтометрии. Также исследовались образцы воспаленной пульпы, резорбтивные процессы корня которой находились только в пределах апикального отверстия и устанавливались по данным рентгенографии. В качестве контроля была использована пульпа ($n = 6$), извлеченная из временных зубов со сформированным апикальным отверстием, удаленных по ортодонтическим показаниям. Образцы пульпы гомогенизировали в фарфоровой ступке на холоду с добавлением 0,9% раствора NaCl, центрифугировали и в полученной надосадочной жидкости методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли содержание основного фактора роста фибробластов- β (oFGF- β) в нг/мг ткани, гомоцистеина (Hcy) в мкмоль/г ткани, а также фактора некроза опухоли- α (TNF- α), аннексина V, остеопротегерина (OPG) и растворимого рецептора активации фактора нуклеации каппа В лиганд (sRANKL) в пг/мг ткани. Результаты исследования были статистически обработаны с использованием пакета программ Statistica 6.0. Значимость различий для количественных переменных оценивались по критериям Манна-Уитни и Вилкоксона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что в пульпе интактных ВЗ определяется содержание oFGF- β , что подтверждается исследованиями Klagsbrun M. и Moses M. A. (1999), которые методами иммуногистохимии и гибридизации обнаружили наличие этого фактора роста в нервных и эндотелиальных

клетках, кератиноцитах и макрофагах, а также в межклеточном матриксе [12]. Также показано, что oFGF- β стимулирует ангиогенез, обеспечивая пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [5].

При развитии воспаления в пульпе ВЗ с СФП отмечается тенденция к повышению данного фактора роста ($p > 0,05$). В воспаленной пульпе на стадии резорбции корня содержание oFGF- β не отличается от значений интактной пульпы и достоверно ниже значений хронического пульпита в СФП ($p < 0,05$).

Показателем состояния сосудистого эндотелия является аминокислота гомоцистеин [10], количество которой резко возрастает на фоне поражения периферических сосудов [15]. По нашим данным, количество Hcy в пульпе ВЗ на фоне воспаления резко увеличивается: в пульпе в СФП в пять раз, а в пульпе в СРК почти в девять раз. Выявленные изменения в количестве Hcy свидетельствуют о повреждении эндотелия сосудов пульпы, которые наиболее выражены в том случае, когда начинается резорбция корня. На наш взгляд, в пульпе временного зуба в процессе резорбции корня происходит физиологическое подавление ангиогенеза, а воспалительный процесс еще более усиливает лизис клеток и структурных белков сосудов.

Изучение содержания аннексина V показало, что наши данные совпадают с исследованиями Goldberg M. и Smith A. J. (2004), которые также обнаружили аннексин V в пульпе зуба и показали, что данный белок локализуется только в одонтобластах [7]. Считается, что аннексины участвуют в формировании кальциевых каналов в просвете везикул для обеспечения притока ионов кальция в зону минерализации [11]. Поэтому от количества аннексина V будет зависеть обеспечение ионами кальция зоны преддентина.

В пульпе в СФП при воспалении количество аннексина V имеет тенденцию к снижению, но эти значения практически не отличаются от его содержания в интактной пульпе. Напротив, в воспаленной пульпе в СРК содержание исследуемого маркера достоверно возрастает ($p < 0,005$) как по сравнению с данными интактной пульпы, так и в пульпе в СФП при хроническом пульпите.

Выявленные изменения, возможно, отражают регуляцию количества апоптотических клеток в разные периоды состояния корня зуба. Считается, что апоптоз клеток пульпы зуба

необходим для обновления их популяций, что очень важно для обеспечения жизнедеятельности пульпы зуба [16]. Уменьшение количества свободного аннексина V при хроническом воспалении пульпы, вероятно, связано с защитой клеток, в частности – одонтобластов, так как аннексин V, связываясь с фосфолипидами клеточных мембран, обеспечивает защиту клеток от апоптоза. Увеличение содержания этого белка в пульпе временных белков в СРК, по всей видимости, отражает сам процесс запрограммированной гибели клеток в момент резорбции корня, а развившееся воспаление способствует ускорению этих необратимых изменений.

О начале гибели клеток тканей пародонта временных зубов в стадии резорбции свидетельствуют полученные нами данные о содержании маркеров резорбции костной ткани sRANKL и OPG. В интактной пульпе ВЗ и в воспаленной пульпе с завершающимся апоптозом sRANKL не выявляется. Одновременно процессы резорбции корня зуба и воспаления характеризуются наличием в пульпе sRANKL и увеличением содержания OPG.

При прорезывании постоянных зубов происходит дифференцировка мононуклеарных клеток пульпы зуба в преодонтокласты, а тех, в свою очередь, – в одонтокласты. Одонтокласты – клетки, подобные остеокластам, располагающиеся на лакунарной поверхности корня зуба, которые участвуют в деградации неорганических и органических компонентов твердых тканей зуба и являются основными участниками в процессе физиологической резорбции корневой части временных зубов [1, 6]. Предшественники одонтокластов имеют мембранные рецепторы активатора нуклеации каппа В (RANK), свойственные остеокластам – клеткам костной ткани [2, 13]. При связывании RANK с RANK-лигандами (RANKL) происходит слияние предшественников в одну крупную структуру с формированием зрелых многоядерных одонтокластов. Стадия дифференцировки одонтокластов из предшественников может блокироваться OPG, который, свободно перемещаясь, способен связывать RANKL и таким образом предотвращает взаимодействие RANKL с RANK-рецепторами [8].

В регуляции слияния мононуклеарных клеток участвует фактор некроза опухоли- α . В интактной пульпе ВЗ содержание TNF- α крайне низкое, но оно достоверно возрастает при развитии хронического воспаления, наиболь-

шее его количество определяется в воспаленной пульпе в СРК. Показано, что сильно повышенная концентрация TNF- α при воспалении может ограничивать возможности сосудов пульпы к расширению, что, вполне вероятно, приведет к развитию стаза и необратимым изменениям [1].

Таким образом, клетки пульпы временных зубов, находящихся в начальной стадии физиологической резорбции корня, принимают активное участие в запрограммированном разрушении зуба и гораздо меньше реагируют на развитие воспаления. На фоне воспаления пульпы происходит повреждение эндотелия сосудов, о чем свидетельствует накопление большого количества Нсу и снижение содержания oFGF- β ; подавляются процессы восстановления клеточных структур на фоне активации белков, участвующих в апоптозе и разрушении костных структур пародонта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Вавилова Т. П., Островская И. Г. Биохимия и физиология пульпы зуба. – М., 2008. – 136 с.
2. Вавилова Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие. 2-е изд., испр. и доп. – М., 2008. – 250 с.
3. Маянский Д. Н., Урсов И. Г. Лекции по клинической патологии. – Новосибирск: Ин-т теплофизики, 1997. – 249 с.
4. Международная статистическая

классификация болезней и сопутствующих проблем: Десятый пересмотр / Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 1998. – 385 с.

5. Пальцев М. А., Иванов А. А. Межклеточные взаимодействия. – М.: Медицина, 1995. – С. 56.
6. Brudvik P., Rygh P. Multi-nucleated cells remove the hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces // Eur J Orthodont. 1994. Vol. 16. P. 265-273.
7. Goldberg M., Smith A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp a biological basis for repair and tissue engineering // Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2004. Vol. 15. P. 13-27.
8. Hasegawa T., Yoshimura Y., Kikuri T. et al. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells // J Periodont Res. 2002. Vol. 37. P. 405-411.
9. Foster E., Robinson P. A study of branched pulpal axons in ferrets with supplemental teeth // Arch Oral Biol. 1994. №39. P. 1003-1005.
10. Folsom A. R. et al. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence // Ann.Intern. Med. 1999. №131. P. 363-375.
11. Kirsch T., Nah H.-D., Demuth D. R., Harrison G., Golub E. E., Adams S. L., Pacifici M. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition. Implications for cartilage mineralization // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 3359-3367.
12. Klagsbrun M., Moses M. A.

Molecular angiogenesis // Chem Biol. 1999. №6. P. 217-224.

13. Lossderfer S., Getz W., Jeger A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth // Calcified Tissue International. 2002. Vol. 71. P. 45-52.
14. Liao S. C., Chang H. P. The study of root resorption of human deciduous. Histological observation by light microscope // Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi. 1990. Vol. 6 (2). P. 88-99.
15. Nehler M. R., Taylor L. M., Porter J. M. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: a review // Cardiovascular Pathology. 1997. №6. P. 1-9.
16. Vermelin L., Lecolle S., Septier D., Lasfargues J. J., Goldberg M. Apoptosis in human and rat dental pulp // Eur. J. Oral Sci. 1996. Vol. 104 (5-6). P. 547-553.
17. Vildirim S., Yapar M., Sermet U., Sener K., Kubar A. The role of dental pulp in resorption of deciduous teeth // Oral Surg Oral Med Oral Patol Oral Radiol Endod. 2008. Vol. 105 (1). P. 113-120.

Поступила 20.12.2010

Координаты для связи
с авторами:
ostvavir@rambler.ru

Таблица 1. Содержание белков и пептидов в воспаленной пульпе временных зубов в норме и при воспалении ($M \pm m$)

Белки и пептиды	Состояние пульпы ВЗ		
	Интakтная пульпа n = 6	Хронический пульпит в СФП n = 20	Хронический пульпит в СРК n = 26
oFGF- β (нг/мг ткани)	94,3 $\pm$ 18,5	127,0 $\pm$ 10,2 p = 0,002	71,40 $\pm$ 12,50 p = 0,38; p ¹ = 0,003
Нсу (мкмоль/мг ткани)	0,11 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01 p = 0,003	0,94 $\pm$ 0,03 p = 0,003; p ¹ = 0,002
TNF- α (пг/мг ткани)	4,93 $\pm$ 1,34	13,60 $\pm$ 1,87 p = 0,002	19,80 $\pm$ 2,78 p = 0,002; p ¹ = 0,02
Аннексин V (пг/мг ткани)	5,50 $\pm$ 0,09	4,76 $\pm$ 0,42 p = 0,07	15,00 $\pm$ 1,33 p = 0,004; p ¹ = 0,004
OPG (пг/мг ткани)	0,0060 $\pm$ 0,0004	0,020 $\pm$ 0,004 p = 0,003	0,060 $\pm$ 0,003 p = 0,003; p ¹ = 0,002
sRANKL (пг/мг ткани)	0	0	2,50 $\pm$ 0,45 p = 0,001; p ¹ = 0,001

p — достоверность различий при по отношению к показателям интактной пульпы;
p¹ — по отношению к показателям воспаленной пульпы в СФП.