



Исследование содержания белков-маркеров апоптоза в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении

И.Г. ОСТРОВСКАЯ*, к.м.н., старший преподаватель кафедры

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 детской терапевтической стоматологии детского возраста

ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет»

Research of the maintenance of proteins-markers apoptosis in the pulp deciduous and constant teeth at the inflammation

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

Резюме

В настоящей работе было исследовано содержание аннексина V, каспазы-9 и фактора некроза опухоли- α в гомогенатах пульпы временных и постоянных зубов в норме и при воспалении. Результаты показали, что на фоне воспаления в пульпе временных зубов увеличивается содержание аннексина V, каспазы-9 и фактора некроза опухоли- α , а в пульпе постоянных зубов имеется незначительное снижение количества аннексина V, каспазы-9 и не выявлено содержание фактора некроза опухоли- α по сравнению с интактной пульпой.

Ключевые слова: пульпа зуба, временные зубы, постоянные зубы, воспаление, фактор некроза опухоли- α , аннексин V, каспаза-9.

Abstract

In the present job the maintenance annexin V, caspase-9 and the tumour necrosis factor- α in gomogenates pulps time and second teeth in norm has been investigated and at an inflammation. Results have shown that against an inflammation in a pulp of a deciduous teeth the maintenance annexin V, caspase-9 and the tumour necrosis factor- α increases, and in a pulp of a constant teeth there is an insignificant decrease in quantity annexin V, caspase-9, and the tumour necrosis factor- α in comparison with untouched a pulp is not revealed.

Key words: tooth pulp, deciduous teeth, constant teeth, inflammation, tumour necrosis factor- α , annexin V, caspase-9.

В настоящее время известны три вида гибели клеток: апоптоз, некроз и конечное дифференцирование. Активация либо ингибирование программированной гибели клеток, как ведущего механизма ограничения пролиферации клеточных популяций, может лежать в основе развития ряда патологических состояний. При апоптозе происходит отделение клеток от межклеточного матрикса, конденсация ядра и сморщивание цитоплазматической мембраны, образование апоптотических телец [2]. Показано, что ранним признаком

апоптогенных изменений может служить изменение локализации фосфатидилсерина, а точнее – его перемещение с внутренней стороны клеточной мембраны на внешнюю, поэтому регистрация апоптозных клеток может осуществляться с помощью белка-маркера аннексина V, обладающего сродством к фосфатидилсерину. Аннексин V, связываясь с фосфолипидами на поверхности клеточной мембраны, обеспечивает защиту клеток от апоптоза [6]. В пульпе зуба белок аннексин V был обнаружен в одонтобластах, который, как оказалось впоследствии, также

принимает участие в транспорте ионов кальция в зону минерализации дентина зуба [5].

Воспаление является одним из примеров патологических процессов, характеризующихся как дисбалансом окислительного метаболизма, так и нарушениями реализации физиологического апоптоза [4]. Хроническое воспаление пульпы зуба сопровождается миграцией целого ряда иммунокомпетентных клеток в зону повреждения, которые, в свою очередь, индуцируют воспалительную реакцию с участием различных белков и пептидов [1]. Выявлено, что клетки



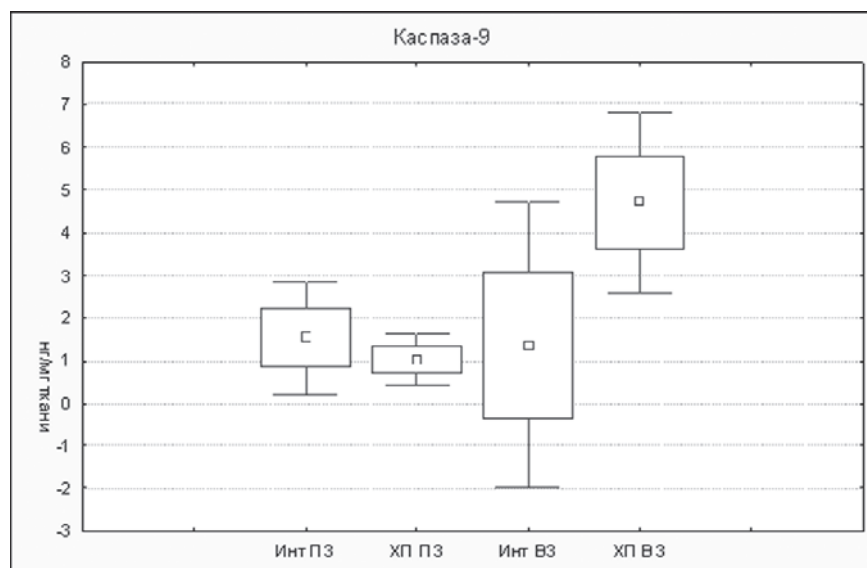


Рис. 1. Содержание каспазы-9 в пульпе временных и постоянных зубов. Инт ПЗ – интактная пульпа постоянных зубов; Инт ВЗ – интактная пульпа временных зубов; ХП ПЗ – хронический пульпит в пульпе постоянных зубов; ХП ВЗ – хронический пульпит в пульпе временных зубов

моноцит-макрофагальной линии являются основными продуцентами фактора некроза опухоли (ФНО) [3, 7]. Поскольку запуск ФНО-опосредованного апоптоза обуславливается взаимодействием данного цитокина с соответствующим лигандом, для нас представляло интерес исследование продукции клетками пульпы ФНО- α , запускающего внутриклеточный каскад активации цистеин-аспарагиновых протеиназ – каспаз, которые играют немаловажную роль в развитии апоптоза, некроза и воспаления. Каспазы присутствуют в цитоплазме клеток в виде проферментов и активируются до полностью функциональных протеиназ путем расщепления профермента на большую и малую субъединицы с дальнейшим отщеплением от них N-концевых доменов. Далее субъединицы собираются в тетрамер с двумя активными центрами [2]. В активации прокаспаз могут осуществлять различные протеиназы, в том числе и другие каспазы. По выполняемой каспазами функции их можно разделить на две основные группы: инициаторные каспазы -8, -9 и -10 и эффекторные каспазы -3, -6 и -7. После того как инициаторные каспазы активируют эффекторные каспазы, процесс, запущенный программой смерти, становится необратимым.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение содержания белковых маркеров апоптоза в пульпе временных и постоянных зубов в норме и при развитии хронического пульпита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для настоящего исследования были взяты образцы ткани пульпы у 20 детей в возрасте от одного года до семи лет и 20 взрослых людей от 17 до 30 лет. Воспаленная пульпа была получена путем экстирпации по стро-

го медицинским показаниям из временных зубов (ВЗ) ($n = 15$) и постоянных зубов (ПЗ) ($n = 10$) под анестезией с применением 4% раствора Убистезина. Хронический фиброзный пульпит был диагностирован согласно Международной статистической классификации болезней и сопутствующих проблем: Десятого пересмотра (1998) по данным анамнеза и электроодонтометрии. В качестве контроля была использована пульпа интактных ВЗ ($n = 5$) и ПЗ ($n = 10$), извлеченных по ортодонтическим показаниям. Пульпу гомогенизировали в фарфоровой ступке на холоду с добавлением 0,9% раствора NaCl, центрифугировали и в полученной надосадочной жидкости иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов определяли содержание каспазы-9 (нг/мг ткани), аннексина V (Bender MedSystems) и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в пг/мг ткани. Результаты исследования были обработаны с использованием пакета программ Statistica 6.0. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным в интактной пульпе ВЗ и ПЗ

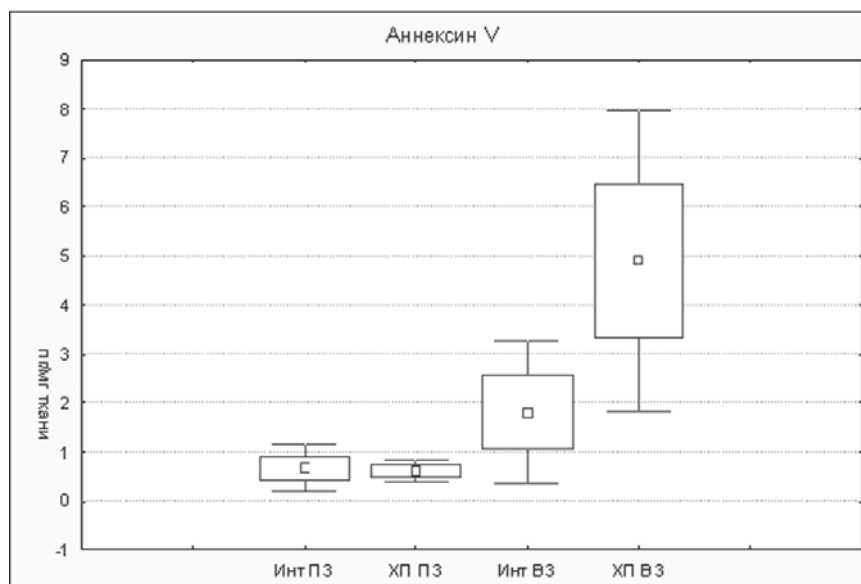


Рис. 2. Содержание аннексина V в пульпе временных и постоянных зубов. Примечание: Инт ПЗ – интактная пульпа постоянных зубов; Инт ВЗ – интактная пульпа временных зубов; ХП ПЗ – хронический пульпит в пульпе постоянных зубов; ХП ВЗ – хронический пульпит в пульпе временных зубов

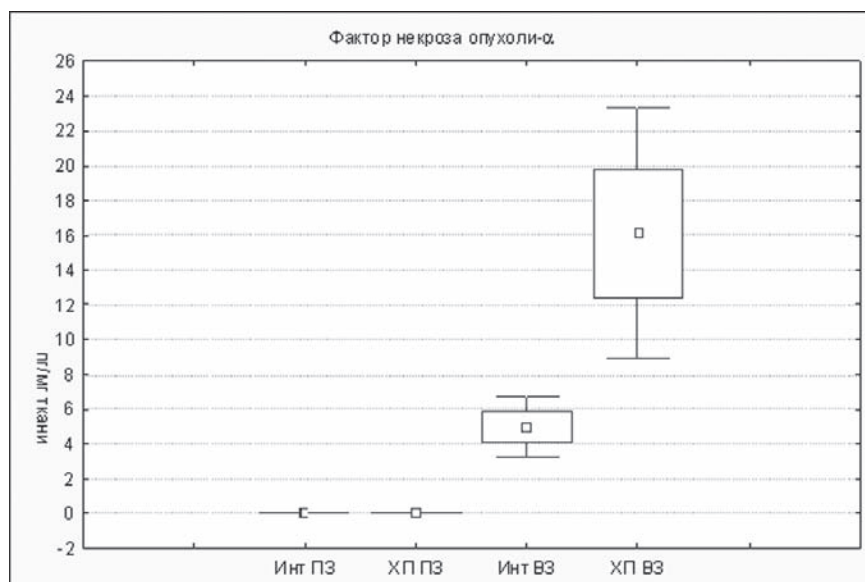


Рис. 3. Содержание ФНО-α в пульпе временных и постоянных зубов. Инт ПЗ – интактная пульпа постоянных зубов; Инт ВЗ – интактная пульпа временных зубов; ХП ПЗ – хронический пульпит в пульпе постоянных зубов; ХП ВЗ – хронический пульпит в пульпе временных зубов

выявлено незначительное содержание каспазы-9, которое равнялось $1,37 \pm 0,70$ и $1,53 \pm 0,31$ нг/мг ткани соответственно и достоверно не различалось (рис. 1), но количество аннексина V в пульпе ВЗ ($1,82 \pm 0,34$ пг/мг ткани) было достоверно выше ($p < 0,05$), чем в пульпе ПЗ ($0,67 \pm 0,11$ пг/мг ткани) (рис. 2). Содержание ФНО-α в интактной пульпе ПЗ нашими методами не определялось, а в пульпе ВЗ равнялось $4,98 \pm 0,39$ пг/мг ткани (рис. 3).

Развитие хронического воспаления в пульпе ПЗ приводило к недостоверному снижению содержания каспазы-9 ($1,02 \pm 0,10$ нг/мг ткани), аннексина V ($0,61 \pm 0,05$ пг/мг ткани) по сравнению с их содержанием в пульпе интактных зубов. Содержание ФНО-α в пульпе ПЗ при хроническом пульпите, как и в норме, не определялось. В пульпе ВЗ при развитии пульпита содержание каспазы-9 ($4,71 \pm 0,54$ нг/мг ткани), аннексина V ($4,89 \pm 0,70$ пг/мг ткани) и ФНО-α ($16,1 \pm 1,64$ пг/мг ткани) достоверно увеличивалось ($p < 0,05$) как по сравнению с показателями интактной пульпы ВЗ, так и с данными, полученными в пульпе ПЗ при воспалении.

Наши результаты показали, что процессы апоптоза при хроническом воспалении в пульпе временных зубов усиливаются,

а в пульпе постоянных зубов, наоборот, ингибируются. Исследования Часовских Н. Ю. с соавт. (2007) механизмов апоптоза на клетках крови *in vitro* показали, что излишняя активация апоптотической гибели клеток может приводить к истощению защитных систем, в то время как ее ингибирование – к хронизации воспалительного процесса [4].

Как известно, временные зубы изначально запрограммированы на небольшой срок функционирования в полости рта (7-10 лет), которые впоследствии замещаются постоянными зубами. В связи с этим физиологическое самоуничтожение тканей временных зубов закладывается еще в процессе эмбриогенеза. Постоянные зубы в постнатальном периоде обеспечивают стабильной клеточной и тканевой структурой и более мощной защитной системой, представленной большим числом иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, анализируя полученные данные, можно выдвинуть теоретическую предпосылку о повышенной готовности клеток пульпы временных зубов к преждевременной реализации запуска механизмов апоптоза, что отражается в активном синтезе белков аннексина V, каспазы-9 и ФНО-α. В пульпе же постоянных зубов при пуль-

пите незначительное снижение содержания аннексина V, каспазы-9 и отсутствие ФНО-α может свидетельствовать об усугубляющейся хронизации процесса воспаления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вавилова Т. П., Островская И. Г. Биохимия и физиология пульпы зуба. – 2008. – 136 с.
2. Гордеева А. В., Лабас Ю. А., Звягильская Р. А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция. Обзор // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 10. С. 1301-1313.
3. Козлов В. А. Некоторые аспекты проблемы цитокинов // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1. №1. С. 5-8.
4. Часовских Н. Ю., Старикова Е. Г., Кайгородова Е. В. и др. Митохондриальный, TNF- и p53 – опосредованные пути реализации апоптотической программы моноклеаров в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины». Г. Абакан, 17-19 мая 2007. – Абакан, 2007. – С. 29-30.
5. 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.
6. Kirsch T., Nah H.-D., Demuth D. R. et al. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition. Implications for cartilage mineralization // Biochemistry. 1997. Vol. 36. P. 3359-3367.
7. Nedrebo T., Berg A., Reed R. K. Effect of tumor necrosis factor-α, IL-1β and IL-6 on interstitial fluid pressure in rat skin // Am. J. Physiol. 1999. Vol. 277. P. 1857-1862.

Поступила 02.11.2010

Координаты для связи
с авторами:
ostvavir@rambler.ru