

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-
СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.И. ЕВДОКИМОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ОСТРОВСКАЯ ИРИНА ГЕННАДЬЕВНА

**РОЛЬ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ ТКАНЕЙ КОМПЛЕКСА ПУЛЬПА-ПЕРИОДОНТ
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ**

03.01.04 – Биохимия (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

НАУЧНЫЕ КОНСУЛЬТАНТЫ:

д.м.н., профессор **Вавилова Т.П.**
Заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор **Митронин А.В.**

МОСКВА, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Морфологическое строение пульпы зуба.....	16
1.2 Роль белковых молекул в формировании межклеточного матрикса пульпы зуба.....	18
1.3 Реакция пульпы зуба на локальное воспаление.....	22
1.4 Влияние различных химических веществ, вводимых в организм, на дентино-пульпарный комплекс.....	34
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1 Дизайн проводимых экспериментальных исследований с животными.....	46
2.2 Исследование пульпы постоянных и временных зубов человека...	54
2.2.1 Получение образцов пульпы человека и животных для исследования.....	55
2.2.2 Получение образцов пульпы зуба человека и элюатов десневой жидкости до и после лечения пульпита временных зубов.....	56
2.3 Методика оценки электровозбудимости пульпы зуба.....	57
2.4 Подготовка образцов пульпы зуба человека и животных для биохимического исследования.....	57
2.5 Получение и подготовка образцов десневой жидкости для исследования.....	58
2.6 Подготовка образцов пульпы зуба животных для гистологического исследования.....	58
2.7 Оборудование, реактивы и препараты, используемые в исследовании.....	59
2.8 Методы статистической обработки результатов исследования.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	64
3.1. Исследование белкового состава пульпы зуба человека в норме и при локальном воспалении.....	64
3.1.1 Спектры растворимых белков в пульпе временных и постоянных зубов в норме и при пульпите, выявленные методом электрофореза.....	64
3.1.2 Сравнительный анализ активности ферментов и содержания белков в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека.....	66
3.1.3 Активность ферментов в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении.....	69
3.1.4 Активность моноаминоксидаз в пульпе постоянных зубов человека при остром пульпите.....	72
3.1.5 Содержание белков неспецифического иммунитета в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении.....	74
3.1.6 Содержание белков-маркеров апоптоза в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении.....	79

3.1.7	Содержание белков, влияющих на состояние минерализованного матрикса зуба, в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении.....	83
3.1.8	Оценка регенераторной способности клеток пульпы временных и постоянных зубов при воспалении по количеству факторов роста	87
3.1.9	Содержание гомоцистеина в пульпе постоянных и временных зубов в норме и при воспалении.....	89
3.2	Содержание белков и пептидов в пульпе временных зубов в стадии резорбции корня при хроническом пульпите.....	90
3.2.1	Активность ферментов в пульпе временных зубов в стадии резорбции корня при воспалении.....	90
3.3.	Определение состояния пульпы временных зубов по показателям десневой жидкости.....	94
3.3.1	Исследование активности аспартильной и аланиновой трансаминаз в десневой жидкости временных зубов человека в норме и при пульпите.....	95
3.3.2	Исследование показателей десневой жидкости временных зубов человека после лечения пульпита с применением различных препаратов.....	97
3.4	Изучение реакции пульпы резцов крыс на травму в полости рта и иммобилизацию.....	100
3.4.1	Сравнительная характеристика активности ферментов и содержания ряда белков в интактной пульпе зубов человека и резцов крыс.....	100
3.4.2	Изучение активности щелочной фосфатазы в пульпе резцов крыс после нанесения травмы в полости рта.....	104
3.4.2.1	Исследование активности щелочной фосфатазы в пульпы резцов крыс после нанесения травмы на слизистую оболочку щеки скальпелем и эрбиевым лазером.....	104
3.4.2.2	Исследование активности щелочной фосфатазы в пульпе резцов крыс после травмы, вызванной удалением соседних моляров.....	106
3.4.3	Исследование содержания белков, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене, в пульпе резцов крыс после воздействия ортодонтического силового модуля.....	108
3.4.4	Исследование активности ферментов в пульпе резцов крыс, находящихся в условиях иммобилизации.....	111
3.5	Влияние экзогенных химических веществ на пульпу зуба.....	113
3.5.1	Влияние ингибитора синтеза карнитина на активность НАД ⁺ -зависимых дегидрогеназ и показателей антиоксидантной защиты в пульпе резцов крыс.....	114
3.5.2	Влияние мелатонина и ингибитора TLR4 на активность ферментов и цитокиновый профиль пульпы резцов крыс.....	116
3.5.3	Влияние высокого содержания сахарозы и селена на метаболические процессы в пульпе резцов молодых крыс.....	120

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	147
РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	155
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	158
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ.....	160
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	161
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	209
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	214

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Пульпа зуба представляет собой особый вид соединительной ткани, в которой расположен слой одонтобластических и других клеток. Она участвует в развитии, росте зубов и обладает способностью дать адекватный ответ на различные воздействия. Анатомическая изолированность от внешней среды и тесное пространство эволюционно наделили пульпу мощными механизмами специфической защиты - врождённым и приобретённым (Вавилова Т.П., Островская И.Г., 2008). Особенностью этой ткани является производство дентина и поддержание его биологической и физиологической жизнедеятельности, что выделяет пульпе основную роль в поддержании гомеостаза твердых тканей зуба. Развитие патологий твердых тканей зуба напрямую связаны с витальностью пульпы (Bagramian R.A. et al., 2009). Изучаются потенциальные возможности для регенерации пульпы зуба, которые с каждым днем увеличиваются благодаря достижениям современной эндодонтии (Demarco F.F., 2011). В результате этих исследований была доказана ведущая роль пульпы в защите структур твердых тканей зуба от повреждения, что в первую очередь реализуется за счет разнообразия её клеточного состава. Морфологические исследования показали идентичность структур пульпы временных и постоянных зубов (Sari S. et al., 1999; Simsek S., Duruturk L., 2005). Считается, что в отличие от пульпы временных зубов, пульпа постоянных зубов обладает возможным потенциалом для восстановления (Monteiro J., et al., 2009).

Биохимические процессы в пульпе зуба, в основном, связаны с её клетками. Они поддерживают жизнеспособность пульпы, обновление межклеточного матрикса и способствуют ответной реакции клеток пульпы на раздражение (Bender I.V., 2000). Наряду со структурными белками в пульпе зуба присутствует большое количество ферментов, участвующих в различных реакциях (Вавилова Т.П., Островская И.Г., 2008). Метаболически активное состояние пульпы является важнейшим условием здоровья и

сохранности зуба. Она обеспечивает защиту эмали и дентина от инвазии патогенов, осуществляет доставку органических и неорганических компонентов через отростки одонтобластов в минеральную зону зуба (Вавилова Т.П., Островская И.Г., 2008). Большое количество кровеносных капилляров и нервных волокон делает пульпу зуба крайне чувствительной к различным воздействиям внешней и внутренней среды (Быков В.Л., 1998). Скоординированные реакции, протекающие в пульпе зуба и периодонте, обеспечивают динамическое равновесие в период адаптации зубочелюстной системы к изменению условий внешней и внутренней среды. Пульпа зуба является источником большого числа плюрипотентных клеток, которые могут способствовать ее регенерации (Велиханова Л.К., Фирсова И.В., 2013). Однако, несмотря на имеющийся регенеративный потенциал, патологические процессы, вызываемые бактериальной микрофлорой и изменениями параметров окружающей среды, зачастую приводят к необратимым изменениям в пульпе зуба (Островская И.Г., 2008; Сирак С.В. с соавт., 2011; Паразян Л.А., 2017).

Клиническими исследованиями установлено, что стоматологические манипуляции, анестетики и лекарственные препараты, воздействие на зуб различных видов излучений и критических температур вызывают реакцию пульпы зуба (Мороз Б.Т. с соавт., 1989; Кортюков И.В., 1997; Коржукова М.В., 2001; Зюзьков Д.И., 2004; Путь В.А., 2005; Стюф Я.В. 2007; Махмудов Д.Т., 2007; Рассадина А.В., 2008; Московский А.В., 2009; Митронин А.В., Чунихин А.А., 2010; Харченко Д.А., 2013; Шамхалов Д.И., 2013). Сдвиги в метаболических процессах пульпы зуба может вызывать попадание различных химических соединений в живой организм, как с пищей, так и в виде лекарственных средств (Краснова Е.А., Деньга О.В., 2011; Лолаева А.В., 2011). Развитие кариозного процесса сопровождается образованием полости в зубе, в которую по мере её разрастания попадают различные патогены, являющиеся причиной воспалительной реакции в пульпе зуба. Сложившаяся ситуация нередко приводит к осложнениям воспалительного характера, но

уже в тканях, окружающих зуб (Максимовский Ю.М., Митронин А.В., 2011). Поэтому необходимо исследование роли белков и пептидов в реализации ответа пульпы зуба на локальные и системные воздействия для предупреждения развития патологических изменений.

Известно, что ответ организма на любое воздействие сопровождается последовательностью реакций, как на физиологическом, так и биохимическом уровне, которые обеспечивают устойчивость организма к факторам внешней и внутренней среды (Перцов С.С. с соавт., 2010). Под воздействием раздражающих факторов в клетках происходит изменение экспрессии генов, что приводит к изменению уровня синтеза определенных белков (Ferris D.K. et al., 1988), которые могут обеспечить защитную реакцию, запустить пролиферацию клеток или активировать апоптоз (Feng Q., et al., 2017). В последнее время особое место в реализации защитной реакции тканей полости рта отводится антимикробным пептидам, обладающим широким спектром протекторных свойств (Вавилова Т.П. с соавт., 2015).

Таким образом, несмотря на целый ряд исследований, единого взгляда на оценку восстановления пульпы зуба пока не существует. В связи с этим изучение роли различных белков и пептидов в реализации ответа пульпы зуба на различные стимулы представляется особенно важным для выявления механизмов адаптации этой ткани, как при воспалении, так и при воздействии ятрогенных факторов. Понимание этих механизмов может заложить основу для разработки новых подходов к терапии в стоматологии.

Степень разработанности темы

Ранее при изучении пульпы зуба чаще затрагивались вопросы, касающиеся её структурно-функциональной организации (Hillmann G., Geurtsen W., 1997; Гемонов В.В. и др., 2002). Свой вклад в решение и изучение проблемы внес А.В. Московский (2010), который, проведя морфологические исследования, установил наличие фагоцитарной инфильтрации и дегрануляцию тучных клеток пульпы зуба при глубоком

кариесе и пульпите. Однако, эта работа уделяет внимание лишь части проблемы, а именно, роли клеточного звена в иммунном ответе пульпы зуба на повреждение.

Многие исследователи занимались изучением механизмов образования репаративного дентина, поскольку этот процесс является выражением соответствующей степени жизнедеятельности пульпы и её биологической ценности (Linde A. et al., 1989; Jaber L. et al., 1992; Tziafas D., 1995; Bjrndal L., Mjör I.A., 2001; Goldberg M. et al., 2006; Iohara K. et al., 2009).

Установлено, что, не только микробный фактор, но и локальный перегрев тканей зуба вызывает активацию лизосомальных ферментов в пульпе зуба (Большаков Г.В., Трусова Н.Ф., 1988; Паразян Л.А., 2017).

Было предложено большое количество различных методик, позволяющих провести прижизненное исследование пульпы зуба, а также лекарственных комбинаций, способствующих сохранению жизнеспособности пульпы (Жилина В.В., 1985; Комнов Д.В., 1989; Котомин Б.В., 1999 и др.). Однако, несмотря все попытки, биологический метод лечения пульпы зуба, прошедший уже немалый путь с момента возникновения, всё ещё не находит достаточно широкого применения в лечебной практике. Поэтому, изучение активности ферментов и количества белков и пептидов в динамике развития воспалительного процесса под действием биологического фактора и его хронизации в пульпе зуба имеет важное биомедицинское значение. С одной стороны, оно позволит охарактеризовать спектр фармакологически значимых белков в новом биологическом объекте – пульпе человека, а с другой – даст врачам-стоматологам новый диагностический и прогностический инструмент, использование которого позволит лучше оценить механизмы, ответственные за развитие пульпита.

Цель и задачи исследования

Цель: изучить роль белков и пептидов в обеспечении резистентности тканей комплекса пульпа-периодонт при воздействии различных факторов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Сопоставить активность ряда ферментов, количество белков и пептидов, участвующих в апоптозе клеток, реакциях неспецифического иммунитета, минерального обмена и антиоксидантной защиты, а также содержание аминокислоты гомоцистеина в пульпе временных и постоянных зубов в норме и при воспалении.

2. Изучить по количеству β -трансформирующего фактора роста, инсулиноподобного фактора роста-1 и основного фактора роста фибробластов- β регенераторный потенциал клеток пульпы временных и постоянных зубов в норме и при воспалении.

3. Провести сравнительный анализ белково-пептидного спектра и активности ферментов интактной пульпы временных и постоянных зубов человека и резцов крыс.

4. По активности щелочной фосфатазы и количеству кальций-связывающих белков и пептидов выявить реакцию одонтобластов пульпы резцов крыс на травму тканей полости рта.

5. Оценить реакцию клеток пульпы резцов крыс по активности ряда ферментов и количеству цитокинов на иммобилизацию, введение экзогенного мелатонина, селективных ингибиторов толл-подобного рецептора-4 и синтеза карнитина.

6. Установить влияние высокосахарозной диеты и добавок селена на активность протеиназ в пульпе развивающихся резцов крыс.

7. Разработать методы диагностики жизнеспособности клеток пульпы зуба и периодонта при воспалении и в динамике лечения пульпита с использованием показателей десневой жидкости.

Научная новизна исследования

Проведены комплексные исследования по установлению роли белков и пептидов в реакции клеток пульпы человека и крыс на различные факторы, ранее не изученные в данном аспекте.

Впервые было проведено сравнительное исследование активности ферментов и содержания широкого спектра растворимых белков и пептидов в пульпе временных и постоянных зубов в норме, при глубоком кариесе и различных формах воспаления пульпы. Изучение количества основного фактора роста фибробластов- β , инсулиноподобного фактора роста-1, β -трансформирующего фактора роста, остеокальцина, аннексина V, гомоцистеина, лактоферрина, каспазы-9, костного изофермента щелочной фосфатазы в пульпе временных и постоянных зубов человека в норме и при воспалении впервые показало возможности пульпы к репарации. Впервые в пульпе временных зубов при воспалении в стадию резорбции корня была выявлена активность глутатионпероксидазы, отсутствующая в пульпе интактных зубов человека и крыс. В пульпе постоянных зубов человека впервые были определены моноаминоксидазы и установлена их роль при остром пульпите. Впервые в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении была изучена роль остеокластактивирующего фактора по коэффициенту sRANKL/OPG. Впервые было сопоставлено количество аннексина V, каспазы-9 и фактора некроза опухоли- α в образцах пульпы временных и постоянных зубов в норме и при хроническом пульпите с результатами электровозбудимости пульпы зуба.

Впервые в десневой жидкости по количеству провоспалительных цитокинов и лактоферрина, активности аспартильной и аланиновой трансаминаз была проведена оценка жизнеспособности клеток пульпы и периодонта временных зубов. Получен патент РФ на изобретение (№2558985 от 09.07.2015). Впервые была разработана и внедрена лечебная паста на основе оксида кальция и борнеола и биохимически подтверждена её эффективность для длительной сохранности жизнеспособности клеток корневой пульпы временных зубов. Получен патент РФ на изобретение (№2554809 от 01.06.2015).

Получены новые экспериментальные модели, позволившие изучить реакцию клеток пульпы резцов крыс на однократное и длительное действие

иммобилизации, введение экзогенного мелатонина, ингибиторов толл-подобного рецептора-4 и синтеза карнитина, высокосахарозной диеты с добавками селена. Впервые по активности щелочной фосфатазы и кальций-связывающих белков выявлена реакция одонтобластов пульпы резцов крыс на повреждение слизистой оболочки полости рта и установку силового модуля с усилием 100 г/с на резцы и моляры крыс.

Теоретическая и практическая значимость работы

Рассмотрена универсальность механизмов возникновения и развития патологического процесса в пульпе зубов человека в различные возрастные периоды. В основе методологии изучения проблемы воспаления пульпы зуба лежит уточнение этиологии и патогенеза отдельных нозологических форм пульпита с обсуждением характерных для них метаболических нарушений связанных с фосфорно-кальциевым обменом, иммунной защитой, апоптозом, регенерацией и каталитической активностью белков. Был использован системно-структурный подход при изучении реакции пульпы зуба на различные факторы, оказывающие действие на организм в целом.

Новые сведения об обменных процессах в пульпе зуба позволили получить значимые теоретические результаты в области прикладной биохимии, изучающей метаболические процессы в тканях полости рта. Инновационные сведения о реактивности и резистентности пульпы зуба вошли в основу учебной образовательной программы ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России по специальности 31.05.03 «Стоматология». Издано учебно-методическое пособие и монография.

Показатели десневой жидкости, наряду с клиническими параметрами, обобщены с целью их использования для диагностики обратимых и необратимых изменений в пульпе зуба и периодонте. На основании изученного спектра белков и целого ряда ферментов показана несостоятельность репаративных процессов при развитии пульпита постоянных зубов для восстановления пульпы до исходного уровня и благоприятный исход лечения возможен только на стадии глубокого кариеса.

В практическое здравоохранение внедрено оригинальное средство для лечения воспаления пульпы временных зубов биологическим методом (патент RU 2554809 от 01.06.2015); получен инновационный результат с коммерческим эффектом по внедрению в НИР неинвазивной методики для диагностики воспалительных процессов в пульпе временного зуба по соотношению активности аспартильной и аланиновой трансаминаз в десневой жидкости (патент RU 2558985 от 09.07.2015).

Методология и методы исследования

Экспериментальная работа на животных выполнена с моделированием различных условий и сравнением данных основных и контрольных групп. Экспериментальными моделями являлись белые крысы-самцы, биоптаты пульпы временных и постоянных зубов человека и десневая жидкость, получение которых отвечало всем требованиям этического комитета по проведению научных исследований. Обработка данных исследования осуществлялась по принципу структуризации с использованием пакета прикладных программ. В исследовании использованы экспериментальные, инструментальные, лабораторные, морфологические, электронно-микроскопические, спектрофотометрический и турбодиметрический методы, иммуноферментный анализ, одномерное электрофоретическое разделение белков, клинические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Показан универсальный характер реакции пульпы человека и животных при воздействии разных факторов, что можно считать подтверждением общности проявлений реактивности и резистентности во всех группах исследования. Установлена разнонаправленная реакция пульпы резцов животных в зависимости от расположения на челюсти.

2. Пульпа временных зубов человека в норме и при воспалении характеризуется значительной интенсивностью обмена аминокислот, высоким содержанием белков, участвующих в апоптозе клеток и резорбции минерализованных тканей.

3. Особенностью пульпы постоянных зубов человека является высокий уровень белков, ответственных за неспецифический иммунитет, что позволяет ей длительное время противостоять действию патогенов, поступающих из кариозной полости.

4. Созданная имитационная модель травмы и иммобилизации у животных позволяет оценить реакцию пульпы зуба по активности ферментов и количества белков, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене.

5. Введение экзогенных веществ в организм животных отражалось в пульпе резцов крыс активацией процессов окислительного дезаминирования аминокислот, гидролиза фосфатсодержащих соединений, свободнорадикального окисления, дисрегуляцией уровня цитокинов и активности лизосомальных ферментов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством проведенных экспериментальных исследований на 245 белых беспородных крысах-самцах (980 образцах пульпы резцов) и 539 образцах пульпы зуба человека с использованием современных методов исследования: электронно-микроскопических, спектрофотометрических и турбодиметрических методов, иммуноферментного анализа, одномерное электрофоретическое разделение белков, статистического анализа.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на: 6-м Всероссийском стоматологическом форуме «Образование, наука и практика в стоматологии» «Дентал-Ревю» (Москва, 2009); 14-й Международной конференции челюстно-лицевых хирургов и стоматологов «Новые технологии в стоматологии» (Санкт-Петербург, 2009); Российской конференции «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии», посвящённая 80-летию со дня рождения Р.И. Лившица (Челябинск, 2009); 8-м Всероссийском стоматологическом форуме «Образование, наука и практика в стоматологии» «Дентал-Ревю» (Москва, 2011); 16-й Международной конференции челюстно-лицевых хирургов и

стоматологов «Новые технологии в стоматологии» (Санкт-Петербург, 2011); 16-й Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине (Омск, 2011); 4th World Astma & Copd Forum (Paris, France, 2011); 6th World Astma & Copd Forum (London, UK, 2013); 11-м Всероссийском стоматологическом форуме «Образование, наука и практика в стоматологии» «Дентал-Ревю» (Москва, 2014); 12th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry (Sopot, Poland, 2014); Симпозиуме «Болезни твердых тканей зубов, пульпы и периодонта. Современные технологии диагностики, лечения, профилактики осложнений», посвященный 75-летию профессора Ю.М. Максимовского (Москва, 2015); VII Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в 21 веке» (Казань, 2015); Российской научно-практической конференции «Зубаировские чтения: Новое в коагулологии». «Медицинская биохимия: достижения и перспективы» (Казань, 2015); 13-м Всероссийском стоматологическом форуме «Образование, наука и практика в стоматологии» «Дентал-Ревю» (Москва, 2016); VIII Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в 21 веке» (Казань, 2016); Всероссийской научно-практической конференции «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2016); 7-й научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», ЦНИИС (Москва, 2016); IX Российской научно-практической конференции «Здоровье человека в 21 веке» (Казань, 2017); совместном заседании кафедр биологической химии, общей и биоорганической химии, нормальной анатомии человека, кариесологии и эндодонтии, пропедевтической стоматологии, хирургической стоматологии, ортопедической стоматологии и протетики ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (Москва, 2017).

По теме диссертации опубликованы 42 печатных работы, из них 17 – в изданиях, включенных в перечень ВАК российских рецензируемых научных журналов, 2 патента РФ на изобретение, монография.

Реализация результатов исследования

Результаты исследования внедрены и используются в учебном процессе кафедр биологической химии, кариесологии и эндодонтии, стоматологии детского возраста ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России. Полученные результаты представлены в российских и международных журналах; лекциях; методическом пособии и монографии; обучающих задачах. Диагностический метод определения состояния пульпы зуба по активности аланиновой и аспартильной трансминаз был внедрен в практическое здравоохранение с инновационным коммерческим эффектом.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 238 страницах и состоит из введения, 3 глав, заключения, списка литературы и приложений, содержит 36 таблиц, иллюстрирована 34 рисунками и микрофотографиями. Указатель литературы содержит 475 источников, из них 106 отечественных и 369 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфологическое строение пульпы зуба

Пульпа зуба является мягкой тканью, окруженной со всех сторон твердыми тканями зуба (рисунок 1). Она является производной соединительной ткани, которая включает нервные волокна, кровеносные и лимфатические сосуды, различные клеточные элементы (Jontell M. et al., 1998; Couve E. et al., 2013).

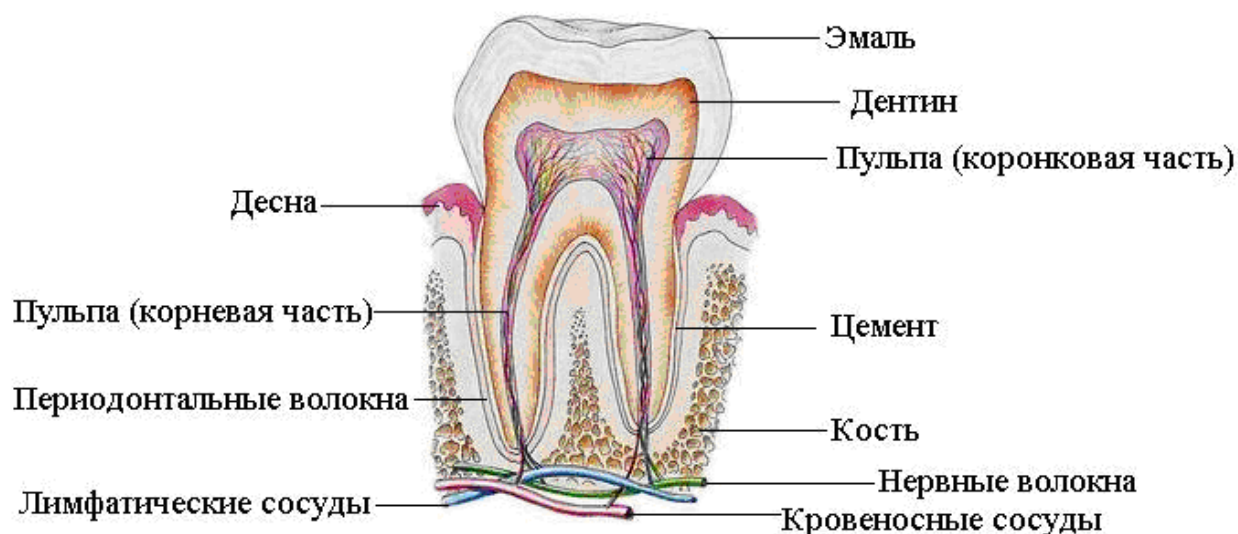


Рисунок 1 - Строение зуба

Кровеносные сосуды и нервный пучок проходят через апикальное отверстие зуба и обеспечивают трофику пульпы и её реакцию на внешнее раздражение (Liu H. et al., 2006). Уникальной особенностью пульпы является способность производить минерализованные ткани в ответ на развитие кариеса, травматические воздействия и реимплантацию зуба (Robertson A. et al., 1997; Ohshima H. et al., 2001; Ikeda-Isogai M. et al., 2012).

Экспериментально это свойство было подтверждено в опытах при пересадке фрагмента пульпарной ткани под кожу (Yamazoe T. et al., 2002). У человека при травме пульпы зуба выявлялась регенерация нервных окончаний в зоне дефекта (Sakurai K. et al., 1999). Было показано, что

лишенная нервных окончаний пульпа зуба, не способна к образованию дентина и быстро подвергается некрозу (Byers M.R., Taylor P.E., 1993).

При старении в зубе облитерируются дентинные трубочки, что приводит к сокращению числа чувствительных афферентных волокон в дентине, поэтому с возрастом в зубах снижается интенсивность болевых симптомов и температурная чувствительность (Ikeda H., Suda H., 2003).

Иммунная система пульпы состоит из дендритных клеток, макрофагов, лимфоцитов, эндотелиальных клеток и различных мезенхимальных клеток, которые являются элементами дентино-пульпарного комплекса. В том случае, когда целостность барьера эмали или дентина зуба нарушена, клетки иммунной защиты не способны определить чужеродные антигены, но обеспечивают необходимые сигналы для активации Т-лимфоцитов, которые в свою очередь организуют другие иммунокомпетентные клетки для борьбы с инфекцией (Jontell M. et al., 1998).

Большое число проведенных исследований позволяет предположить, что стволовые клетки пульпы могут быть использованы для восстановления дентино-пульпарного комплекса (Zivkovic P. et al., 2010; Pramila R., Muthu M., 2012). Установлено, что мезенхимальные клетки пульпы зуба могут дифференцироваться в различные клетки, такие, как хондроциты, одонтобласты, адипоциты, нервные клетки и остеобласты (Iohara K. et al., 2006). Эта способность была продемонстрирована в стволовых клетках пульпы крысы, которые в поврежденной коронковой части резца дифференцировались в одонтогенные клетки (Shima H. et al., 2013). Ряд авторов предполагают, что все стволовые клетки, полученные из пульпы зуба, обладают плюрипотентностью (Pääkkönen V., Tjäderhane L., 2010). Они не только способны формировать минерализованную ткань, но и также могут взаимодействовать с различными биоматериалами (Wang J. et al., 2011).

В качестве двух главных источников стволовых клеток для регенерации дентина рассматриваются стволовые клетки зрелой пульпы и стволовые клетки от резорбированных молочных зубов (Alsanea R. et al., 2011; Sakai V.

et al., 2011). Таким образом, пульпа обладает значительным регенераторным потенциалом, но не известны механизмы его активации.

1.2. Роль белковых молекул в формировании межклеточного матрикса пульпы зуба

Разнообразие клеточного состава в пульпе зуба определяет количество синтезируемых ею белков и пептидов (Emilia E., Neelakantan P., 2015). Пептиды синтезируются из собственных белков и, в отличие от них, не обладают видоспецифичностью, что позволяет пептидам обходить систему иммунной защиты.

В межклеточном матриксе пульпы зуба содержится 56% коллагена I типа, 41-42,6% коллагена III типа, ассоциированного с фибриллами, 2% коллагена V типа и коллаген VI типа. Неколлагеновые белки также участвуют в формировании матрикса пульпы зуба и подразделяются на фосфорилированные и нефосфорилированные (van Amerongen J.P. et al., 1983). К фосфорилированным белкам пульпы зуба относят малый интегрин-подобный гликопротеин, дентинсиалофосфопротеин, матриксный белок дентина-1, костный сиалопротеин, остеопонтин, матричный фосфогликопротеин. Нефосфорилированные белки пульпы зуба представлены остеопонтином, остеокальцином, остеонектином, тенасцином, фибронектином, гликозаминогликанами и протеогликанами. Среди малых протеогликанов в пульпе зуба обнаружены декорин, бигликан, фибромодулин, люмикан, кератокан, остеоадерин, эпификан, мимекан (остеоглицин), большие протеогликаны представлены, преимущественно, версиканом. К нефосфорилированным белкам пульпы также относятся различные факторы роста: фактор роста гепатоцитов, фактор роста фибробластов, трансформирующий фактор роста-бета, фактор некроза опухоли-альфа, костный морфогенетический белок-2, (Smad1, Smad7, BMPs) (Domingues M.G. et al., 2000; Matsui S. et al., 2008; Chang H.-H. et al., 2015).

Наряду со структурными и регуляторными белками в пульпе зуба присутствуют различные ферменты: щелочная и кислая фосфатазы, металлопротеиназы, коллагеназы (ММР-1, ММР-8, ММР-13), ингибиторы металлопротеиназ, цистеиновые катепсины, дипептидилпептидаза 2, эластаза полиморфноядерных лейкоцитов, катепсин G, матрилин-2, -4, интерлейкины (Goldberg M., 2014).

Изучение белкового спектра пульпы сформированного зуба свиньи методом электрофореза на пластинах ацетатцеллюлозы показало, что он практически идентичен белковому спектру сыворотки крови. При этом, количество альбуминов достигает 44%, а содержание белков, соответствующих α - и β -глобулиновым фракциям, значительно меньше (Никулин В.В., 1972).

В настоящее время благодаря нескольким технически сложным исследованиям достаточно подробно был изучен протеом пульпы зуба человека (Pääkkönen V. et al., 2005, 2010; Wei X. et al. 2008; Eckhardt A. et al., 2014, 2015).

Первый протеомный анализ белков пульпы человека был выполнен в 2005 году и показал наличие более 96 различных белков, при этом, большинство белков встречаются в других тканях и только небольшая часть уникальна для пульпы (Pääkkönen V. et al., 2005). С использованием 2DE метода исследования белкового состава лизата образцов пульпы здоровых и кариозных зубов были продемонстрированы лишь небольшие изменения в белковом составе при кариесе, вероятно, потому, что пульпа кариозных зубов практически не была затронута патологическим процессом (Pääkkönen V. et al., 2005). Второй протеомный анализ с использованием того же метода был выполнен на клеточных культурах одонтобластов для выявления белков, участвующих в дифференцировке клеток. Результаты показали, что в раннем одонтогенезе участвуют как минимум 23 белка, а еще четыре белка были выявлены методом Вестерн-блот (Wei X. et al., 2008).

Более позднее исследование протеома пульпы зуба методами двумерного электрофореза в ПААГ и масс-спектрометрии позволило идентифицировать уже 342 белка, 2 из которых были обнаружены впервые; 140 белков были характерны для дентина, 37 из этих белков не выявлялись в плазме крови (Eckhardt A. et al., 2014). Исследованиями U. Eckhardt и др. (2015) в пульпе зуба методом протеомного анализа были выявлены 4332 протеина и 21528 уникальных пептида. Авторы предполагают, что именно эти белки играют ключевую роль в процессах жизнедеятельности зубных тканей.

Таким образом, в настоящее время протеомные исследования (Mrozik K.M. et al., 2010; Chun S.Y. et al., 2011) позволили выделить в пульпе зуба следующие группы белки: *Ферменты*: триозофосфатизомераза, супероксиддисмутаза, хинон – оксидоредуктаза, пируваткиназа нуклеозиддифосфаткиназа, протеиндисульфидизомераза, протеасомная единица активного комплекса 1, пренилцистеиноксидаза, фосфолипаза, фосфоглицератмутаза 1, фосфоглицераткиназа 1, малатдегидрогеназа, ингибитор эластазы лейкоцитов, L-лактатдегидрогеназа, глиоксилаза 1 α – цепь, глицероальдегид- 3-фосфатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа 1, глутатион S-трансфераза (P), глутатион S-трансфераза (Mu 2), енолаза 1,2, дигидропиримидиназа (белок-2), CNDP дипептидаза 2, карбоангидраза I, АТФ-синтаза β цепи, аспартатаминотрансфераза, α 1-антихимотрипсин, α 1-антитрипсин, альдолаза, аконитаза. *Регуляторные белки*: Белок 6 (программирующий апоптоз клеток), порин (31НМ), нейрополипептид h3, α 2-субъединица белка G, связанная с гуанином, фактор инициации эукариотический 4A-II и 4A-I (изоформа 1 и 2), фактор элонгации 1 α 1, фактор элонгации Tu (митохондриальный), аннексин IV, V, VII, II, I. *Транспортные белки*: калиевый канал, содержащий тетрамерную область 12, нуклеохлорид - белок ионного канала, гемоглобин, белок связывающий глюкозу цепь β 78 КДа, ферритин, аполипопротеин А-I, ацил-КоА- связывающий белок (изоформы 1 и 2). *Белки цитоскелета*: виментин, тубулин β 5 цепь, актиноподобный белок -3,-2, актин (β / γ). *Сократительные белки*:

тропомиозин (3 изоформы). *Белки сыворотки крови:* преальбумин, серотрансферрин, антитромбин-III α , β_1 -гликопротеин, альбумин. *Белки неясного генеза:* трансформирующий фактор роста β , индуцируемый белок (IG-H3), трансдукцин β_1 цепь, Т-комплексный белок β_1 - субъединица, септин - 2, ингибитор диссоциации (rho GDP), пероксидоксин -1,-2,-6, моэзин, ламин A β , галактозид, галектин-1,-3, циклофилин A, коллигин -1, 2-кофилин, α - кристаллин β цепь, 14-3-3 белок (α / β), 14-3-3 белок ϵ , 14-3-3 белок γ , 14-3-3 белок тау, 14-3-3 белок зета/дельта. *Связывающие белки:* селен связывающий белок-1, белок-I, связывающий ретиноевую кислоту, иммуноглобулин G, Комплемент C3, α_1 -цепь коллагена VI типа, белок связывающий актин. *Шапероны:* белки теплового шока 27 кДа, 96 кДа. *Структурные белки:* α_1 - α_2 - цепь коллагена I типа.

Полученные результаты убедительно доказывают важнейшую роль регуляторных взаимодействий с участием белков, происходящих в дентинопульпарном комплексе.

Показано, что фибробласты и одонтобластоподобные клетки содержат десмоплакин и плакобиллин – белки, участвующие в межклеточном взаимодействии (Sawa Y. et al., 2005). В пульпе зуба кариозных зубов были выделены антибактериальные белки S100A8, S100A9, и S100A13 (McLachlan J.L. et al., 2004). Эти же исследователи установили повышенную экспрессию двух белков иммунного ответа: альфа-1 кислого гликопротеина-1 (оромукоида-1) и интерлейкина-11 (McLachlan J.L. et al., 2005). В пульпе зуба обнаружены малые протеогликаны, богатые лейцином - бигликан, люмикан и мимекан. Пространственно ориентированные цепи гликозаминогликанов в молекуле бигликана позволяют связывать кальций, что предполагает участие бигликана в инициализации минерализации (Sandanayake N.S. et al., 2011).

Виментин является основным белком цитоскелета пульпы зуба, этот белок играет важнейшую роль в регенерации ткани, стимулируя дифференцировку клеток-предшественников (Murakami M. et al., 2012). Аспорин участвует в регуляции поступления кальция в зону преддентина на

ранних этапах одонтогенеза (Lee J. et al., 2011). Протеогликаны придают пульпе зуба эластичность и устойчивость к сжатию. С возрастом количество протеогликанов в пульпе уменьшается, а качественный их состав, способность к образованию агрегатов и взаимодействию с коллагеном меняются, что отражается на трофике и механических свойствах ткани пульпы (Smith A.J. et al., 2012).

1.3. Реакция пульпы зуба на локальное воспаление

Из-за труднодоступного расположения пульпу зуба длительное время считали объектом, который не подлежит лечению. Предполагалось, что из-за особенностей кровоснабжения в пульпу зуба не поступают вазоактивные низкомолекулярные пептиды, что, в конечном итоге, влияет на протекание патогенетических реакций, особенно в начальных фазах воспаления (Heysaas K.J., Kvinnsland L., 1992).

Основной причиной воспаления пульпы зуба являются патогенные микроорганизмы, попадающие в пульпарную полость из поражённого кариесом дентина (Love R.M., Jenkinson H.F., 2002). В процессе воспаления пульпы активируются врождённые и адаптивные иммунные реакции хозяина в ответ на внедрение бактерий или их метаболиты. Этот ответ снижается после обработки врачом кариозной полости и нейтрализации патогенов иммунной системой пульпы зуба (Hahn C.L., Liewehr F.R., 2007). В случае обширного повреждения дентина, воспаление пульпы не купируется и приобретает хронический бессимптомный характер, сопровождающийся умеренной инфильтрацией, фиброзом и преждевременным апоптозом клеток.

Подобные изменения направлены на предупреждение развития некролиза пульпы и перехода воспаления на периапикальную область. С одной стороны, такая форма защиты пульпы сопровождается потерей ее нормальной функции и влечет за собой снижение устойчивости к будущим инфекциям. С другой стороны, отсутствие воспаления обеспечивает восстановление гомеостаза и объёма жизнеспособной ткани, отсутствие

воспалительного инфильтрата и фиброза, что способствует отложению защитного слоя дентина, формируемого одонтобластами или одонтобластоподобными клетками (Lesot H. et al., 1994). Формирование нового слоя дентина ограничивает пульпу от повреждённых участков дентина или биоматериала, которым заполнена коронковая часть зуба, снижая риск постоянной реакции на внешние химические раздражители или продукты жизнедеятельности бактерий.

Воспаление пульпы вследствие кариозного процесса характеризуется активным синтезом защитными клетками провоспалительных цитокинов, включая ФНО- α , γ -интерферон (γ -ИФН), ИЛ-1 β , -6, -8, -10, -18. ИЛ-10 способствует развитию регуляторных Т-клеток, которые модулируют иммунную систему. Это приводит к снижению иммунного ответа и предотвращает развитие аутоиммунных реакций (Farges J.-C. et al., 2011). На стадии воспаления пульпы важную роль играет оксид азота, который в высоких концентрациях способствует разрушению мембран клеток бактерий (Connelly L. et al., 2001; Di Nardo Di Maio F. et al., 2004; Korkmaz Y. et al., 2011). Кроме того, проведённые эксперименты позволили предположить, что помимо участия в регуляции сосудистого тонуса и ноцицептивной системы, в пульпе зуба оксид азота обеспечивает дифференцировку и пролиферацию одонтобластоподобных клеток, участвующих в формировании третичного дентина (Mei Y.F. et al., 2007; Yasuhara R. et al., 2007).

Особое внимание при изучении воспалительного процесса в пульпе было уделено липополисахарид-связывающему белку (ЛСБ), белку острой фазы, который, как известно, участвует в уменьшении выработки провоспалительных цитокинов макрофагами. Было показано, что этот белок способен предотвращать адгезию бактерий на поверхности клеток макроорганизма путём связывания с компонентами клеточной мембраны бактерий – липополисахаридами, липотейхоевой кислотой, липопептидами и пептидогликанами (Schumann, R.R., 2011; Lee C.C. et al., 2012). В дальнейшем свободные бактериальные липополисахариды утилизируются

липопротеинами высокой плотности и поступают в кровоток (Wurfel M.M. et al., 1995). Между тем, другие исследования не выявили наличие ЛСБ в интактной пульпе зуба (Carrouel F. и др., 2013). Было высказано предположение, что при воспалении пульпы зуба ЛСБ обеспечивает нейтрализацию активности бактерий, прежде, чем их воздействие приведет к некрозу пульпы (Farges J.-C. et al., 2013).

Бактериальные компоненты, которые вызывают неспецифические иммунные реакции, представлены, главным образом, ограниченным числом эволюционно консервативных структурных компонентов, расположенных на внешней стороне клеточной мембраны: у грамотрицательных бактерий – липополисахариды, у грамположительных бактерий – тейхоевые и липотейхоевые кислоты; у грамположительных и грамотрицательных бактерий – пептидогликаны. Эти компоненты клеточных мембран бактерий были объединены в одну группу – патоген-ассоциированная молекулярная структура (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) (Beutler B.A., 2009). Выявление PAMP обеспечивают образраспознающие рецепторы (pattern recognition receptors – PRR), которые могут находиться на поверхности клеточной мембраны или внутри клетки в цитозоле или в эндосомах (Takeuchi O., Akira S., 2010). В пульпе зуба PRR рецепторы были выявлены в клеточной мембране одонтобластов, и считается, что одонтобласты первыми связывают бактериальным PAMP, которые поступают по дентинным трубочкам из зоны повреждения. Остаётся много неясных моментов по иммунолокализации PRR в одонтобластах и одонтобластоподобных клетках в период их активации в ответ на воспаление (Durand S.H. et al., 2006; Veerayutthwilai O. et al., 2007). Показано, что на стимуляцию толл-подобного рецептора 2 (TLR2) – мембранного белка, обеспечивающего функционирование врождённого иммунитета, одонтобласты реагируют активацией сигнальных клеточных путей через фактор транскрипции (NF-κB), контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза, клеточного цикла, и митоген-активируемой

протеинкиназы p38 (p38 MAP kinase) (Carrouel F. et al., 2013). Такая активация приводит к подавлению образования защитного дентина и усилению синтеза провоспалительных молекул, включающих ИЛ-6, хемокины CCL2, CXCL1, CXCL2 и CXCL8, миграцию незрелых дендритных клеток в тот слой одонтобластов, который близок к кариозному дентину (Farges J.-C. et al., 2009). В этом случае ИЛ-10 сдерживает образование цитокинов и хемокинов (Farges J.-C. et al., 2011), а PAMP-стимулируемые одонтобластоподобные клетки обеспечивают защиту против кариесогенных бактерий (Carrouel F. et al., 2013). Это позволяет снизить воспалительную реакцию в пульпе. Для поддержания целостности и гомеостаза пульпы зуба в процесс вовлекаются молекулы, участвующие в паракринной и аутокринной регуляции: липоксины, резолвины, протектины и маресины (Serhan C.N. et al., 2008). Эти соединения являются производными омега-3-ненасыщенных жирных кислот и обладают как противовоспалительными, так и защитными свойствами (Serhan C.N., Petasis N.A., 2011; Uddin M., Levy B.D., 2011).

Таким образом, одонтобласты являются клетками первой линии защиты, которые контролируют все метаболические процессы пульпы зуба в норме и при воспалении (Farges J.-C. et al., 2013).

Острое воспаление начинается со спазма артериол под действием катехоламинов и вазоактивных белков – эндотелинов. Венозный стаз приводит к изменению окислительно-восстановительных процессов в пульпе и к развитию кислородной недостаточности (Григорьян А.С., 1965).

Гипоксия сопровождается накоплением в цитоплазме клеток пульпы органических кислот, которые в норме окисляются в митохондриях: пировиноградной, L-кетоглутаровой, янтарной и др. (Бобрик В.В., 1968). В связи с этим в пульпе зуба при воспалении изменяется не только активность тканевого дыхания, но и распределение изоферментов ЛДГ, активность протеиназ, эстераз и других ферментов (Le Bell Y., Larmas M., 1978). В пульпе зуба, на фоне гипоксии, быстро истощаются эндогенные субстраты дыхания, поглощение кислорода пульпой резко падает, соответственно,

происходит усиление анаэробного гликолиза, что сопровождается повышением активности ЛДГ и альдолаза (Разин А.В., 1969).

Молекула ЛДГ (КФ 1.1.1.27.) представляет собой тетрамер, состоящий из 2-х олигомеров М- и Н-субъединиц, которые кодируются 2-мя локусами генов. Полипептидная цепь М- и Н-субъединиц содержит 330 аминокислотных остатков, и различия в их последовательности составляет более чем четверть длины полипептидной цепи. Две субъединицы М- и Н- в молекуле ЛДГ обладают сходным по строению активным центром с аналогичным набором аминокислотных остатков. Основное отличие в структуре субъединиц ЛДГ, которые формируют третичную структуру, является замена аланина (в М-цепи) на глутамин (в Н-цепи). Молекулярная масса субъединицы ЛДГ составляет 36 кДа, а тетрамера – 140 кДа. В тетрамерной структуре ЛДГ при помощи водородных и ионных связей происходит взаимодействие субъединиц (Бочков В.Н. и др., 2008). В активном центре ЛДГ каталитические активные группы представлены аминокислотами Arg106, Arg169, Thr248, His-193, Arg-99, Asn138. Остаток His-193 наиболее консервативен, он обнаружен не только в молекуле ЛДГ человека, но и других подвидах млекопитающих.

Следует отметить, что модификации ЛДГ различаются не только по физико-химическим свойствам, но и по биологической роли. Так, изофермент ЛДГ₁ преимущественно осуществляет окисление лактата в пируват в тканях с аэробным метаболизмом, а ЛДГ₅, напротив, восстанавливает пируват до лактата в тканях с высоким уровнем гликолиза.

Таким образом, характер распределения изоферментов ЛДГ отражает тенденцию ткани к анаэробному или аэробному метаболизму (Наградова Н.К., 1990; Бочков В.Н. и др., 2008). В пульпе зуба при воспалении была выявлена высокая активность изоферментов ЛДГ, связанных с анаэробным метаболизмом (Messelt E.B., Blix A.S., 1976).

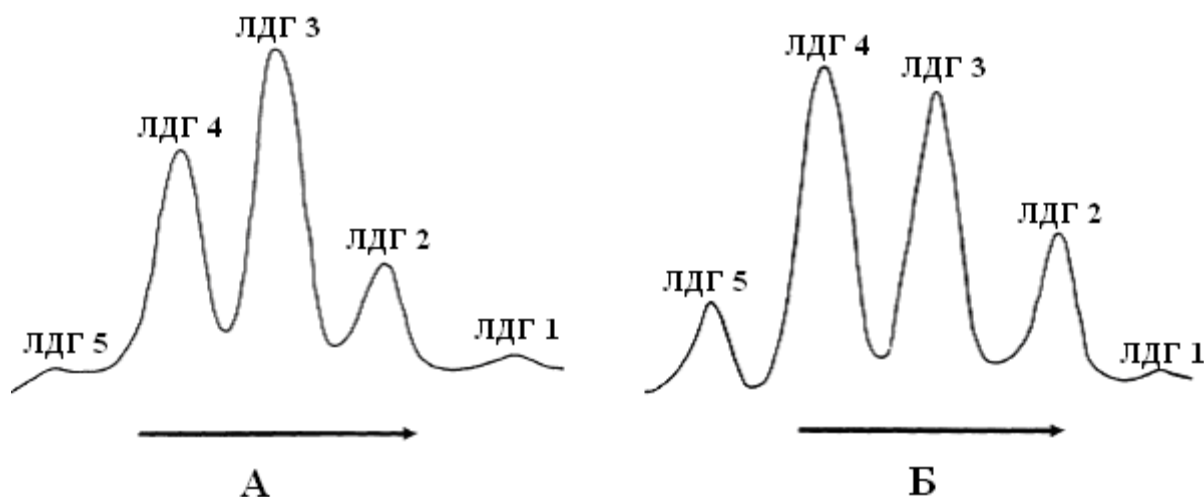


Рисунок 2 - Распределение изоферментов ЛДГ в пульпе зубов человека (стрелкой показано направление к аноду); А) Пульпа постоянных зубов; Б) Пульпа временных зубов (цит. по: Linde A., Ljunggren A.E., 1970)

В норме для пульпы постоянных зубов человека наиболее выражены изофермент ЛДГ₃ и, в меньшей степени ЛДГ₄, в то же время в пульпе временных зубов превалирует изофермент ЛДГ₄ и менее выражен ЛДГ₃ (Linde A., Ljunggren A.E., 1970). Также в пульпе временных зубов изофермент ЛДГ₅ превышает количество такового в пульпе постоянных зубов (рисунок 2). В пульпе резцов мышей были обнаружены ЛДГ₁ и ЛДГ₂ (Linde A., Ljunggren A.E., 1970). При травме зуба в пульпе выявлено увеличение активности ЛДГ₄ и ЛДГ₅ (Klimecky J., Kamaryt J., 1972).

Полученные результаты совпали с данными, полученными при электрофоретическом разделении белков пульпы в норме и при воспалении, в случае которого преимущество оставалось за ЛДГ₅ (Messelt E.B., Vlix A.S., 1976). J. Klimecky и J. Kamaryt (1972) установили, что в пульпе зуба человека при воспалении в тетрамере ЛДГ начинает преобладать М-субъединица, что, по мнению авторов, отражает адаптивные изменения, связанные с переходом на анаэробное энергообеспечение.

При глубоком кариесе и остром пульпите не отмечено существенных изменений в активности МДГ (КФ 1.1.1.37.) (Разин А.С., 1969; Karjalainen S., Mäkinen K.K., 1980). Показано, что активность МДГ в пульпе зуба

повышается после завершения формирования корня зуба (Le Bell Y., Larmas M.A., 1978). Однако, имеется недостаточно сведений об изучении активности МДГ в пульпе зуба.

Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1.) – металлопротеин (в активный центр входит атом цинка), являющийся димером. Фермент катализирует реакцию отщепления фосфатов от органических молекул, например, нуклеиновых кислот. Свою активность щелочная фосфатаза (ЩФ) проявляет в интервале рН 8,6-10,1. Щелочная фосфатаза – гетерогенный фермент, представленный рядом изоферментов с различной локализацией, молекулярной массой и физико-химическими и иммунохимическими свойствами (Cathala G., Brunel C., 1975; Moss, D.W., 1982). ЩФ содержится почти во всех органах и тканях. Щелочная фосфатаза обычно прикрепляется к клеточной мембране посредством фосфоинозитолового типа связи, но исследования *in vitro* показали, что она может отрываться от поверхности в разных фазах клеточного цикла или взаимодействовать с везикулами матрикса (McKenna M.J. et al., 1979).

Фермент ЩФ синтезируется в пульпе зуба одонтобластами, поэтому, минерализация зубных тканей происходит при участии этого фермента и наибольшая активность ЩФ наблюдается при развитии зуба (Wei X. et al., 2009). Предполагается, что действие фермента может реализовываться путем разрушения ингибиторов минерализации, таких, как нитрофосфат, или транспортирования ионов (Coleman, J.E., 1992). Щелочная фосфатаза локализуется в тех участках клетки, где сосредоточена РНК, а поскольку дентиногенез происходит в условиях накопления РНК, то для её биосинтеза необходима фосфорная кислота (Gronthos S. et al., 2000). Н. Ishida et al. (1988) выявили наибольшую активность (91%) щелочной фосфатазы в субодонтобластическом слое пульпы развивающегося зуба. М. Goseki et al. (1990) с помощью электрофореза показали, что ЩФ пульпы зубов имеет молекулярную массу 140 кДа и по некоторым свойствам не отличается от ЩФ костей и почек. Показано, что молекула ЩФ в пульпе зубов крыс имеет

молекулярный вес 155 кДа и состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 77 кДа (Toen T., Hashimoto S., 1999). Этими же авторами установлено, что в пульпе зуба свиньи, костном мозге крысы, почках и остеокластоподобных клетках мыши (МС3Т3-Е1) молекулярная масса ЩФ составляет 185 кДа, 155 кДа, 158 кДа и 157 кДа соответственно.

Данные относительно изменения активности щелочной фосфатазы при патологии достаточно противоречивы. Исследование активности ЩФ в образцах пульпы молодых и пожилых пациентов при обратимых и необратимых формах пульпита показало, что при обратимом пульпите активность ЩФ незначительно повышается, в то время, как в случае перехода воспаления пульпы зуба в необратимую форму, активность этого фермента резко возрастает только у пожилых пациентов (Aslantas E.E., et al., 2015). G. Spoto et al. (2001), напротив, выявили снижение активности ЩФ при необратимом пульпите. Полученные данные подтверждаются исследованиями M. Larmas и S. Kantola (1973), которые показали, что при воспалении пульпы зуба в разрушенных участках одонтобластического и субодонтобластического слоя активность ЩФ не выявляется, что и объясняет снижение общей активности этого фермента.

Обнаруженная исследователями в интактной пульпе человека активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) свидетельствует об активном обмене аминокислот (Spoto G. et al., 2001). В клетках пульпы выявлены две изоформы АСТ (КФ 2.6.1.1): цитоплазматическая (растворимая) и митохондриальная. Они являются димерами, состоящими из двух идентичных субъединиц, с молекулярной массой 93 и 91 кДа. Аминотрансферазные реакции являются первым этапом распада аминокислот, начинающегося с замены аминогруппы на карбонильную.

Кроме того, АСТ выполняет важную роль в функционировании малат-аспаратного челночного механизма переноса восстановительных эквивалентов из цитоплазмы в матрикс митохондрий. G. Spoto et al. (2001)

показали, что при необратимых формах пульпита характерно снижение активности АСТ.

В пульпе зубов человека и животных была изучена активность различных аминоксидаз (Nakano G. et al., 1974; Numata Y. et al., 1986; Inoue K. et al., 2000). В эндотелиальных клетках кровеносных сосудов интактной пульпы человека было выявлено наличие двух форм моноаминоксидаз (MAO) (Inoue K. et al., 2000). Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (SSAO_s) – этот фермент защищает клетки от действия полиаминов, связываясь с молекулой ДНК, блокирует её дезаминирование. Изучение субстратной специфичности показало присутствие двух форм SSAO_s, одна из которых окисляет бензиламин, но не окисляет серотонин, а другая форма, напротив, окисляет серотонин, но не окисляет бензиламин (O'Sullivan M. et al., 2002). В пульпе зуба крыс был изучен метаболизм 5-гидрокситриптамина (серотонина) (Hirafuji M., Ogura Y., 1987).

Ведущая роль в обеспечении защиты клеток пульпы от продуктов перекисного окисления при воспалении принадлежит ферменту каталазе, который катализирует расщепление пероксида водорода на атомарный кислород и воду (Торçи К. et al., 2016). В интактной пульпе и при её воспалении была выявлена активность фермента антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1). (Esposito P. et al., 2003; Bödör C. et al., 2007). Несмотря на наличие других ферментов антиоксидантной защиты, в пульпе сформированного зуба человека исследователями не выявлена активность глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) (Varvara G. et al., 2005).

При усугублении воспалительных изменений в пульпе нарастающий ацидоз активирует лизосомальные гидролазы, участвующих в разрушении компонентов межклеточного матрикса (Shin S.J. et al., 2002). В свою очередь, образовавшиеся продукты распада коллагенов и гликопротеинов межклеточного матрикса повышают осмотическое давление в пульпарной полости. Вслед за гипоксией присоединяются другие механизмы,

усугубляющие нарушение трофики пульпы и определяющие изменение ее гуморальной регуляции. Из-за нарастающего осмотического давления возникает боль в зубе. Важную роль в развитии болевой реакции при воспалении пульпы зуба играет также раздражение рецепторных окончаний продуктами анаэробного гликолиза и повышение их болевой чувствительности медиаторами воспаления (Le Bell Y., 1980).

Процесс образования репаративного дентина, формирование клеточных взаимодействий в комплексе дентин-пульпа происходит под регуляторным воздействием факторов роста. Пульпа зуба содержит большое количество фактора роста тромбоцитов (ФРТ) и трансформирующего фактора роста- β (ТФР- β), низкие концентрации факторов роста эндотелия (ФРЭ) и факторов роста фибробластов (ФРФ) и ещё более низкие уровни эпидермального фактора роста (ЭФР) и других факторов роста (Smith A.J., Lesot H., 2001).

Среди цитокинов, которые влияют на функцию одонтобластов в процессе регенерации дентина, важную роль играет ТФР- β 1, который действует как мощный иммунодепрессант и индуктор формирования межклеточного матрикса (Toyono T. et al., 1997). Молекула ТФР- β представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц. ТФР- β синтезируется в виде предшественника, секретируется в неактивной форме и активируется путём ограниченного протеолиза (Liu J. et al., 2007).

Исследователями выявлено, что в пульпе зуба имеется несколько изоформ трансформирующего фактора роста, которые либо продуцируются одонтобластами, макрофагами, Т- и В-лимфоцитами пульпы зуба в неактивном виде, либо экспрессируются на поверхности плазматической мембраны клеток или связываются с межклеточным матриксом (Ye P. et al., 2003). На клеточной мембране фибробластов и одонтобластов были выявлены 3 типа рецепторов к ТФР- β . Рецепторы типа III, являющиеся поверхностными протеогликанами, обеспечивает доступ ТФР- β к рецепторам I и II типов. Рецепторы I и II типов после связывания ТФР- β образуют

гетеродимер, обладающий протеинкиназной активностью (Sloan A.J. et al., 2001). Одонтобласты под влиянием ТФР- β синтезируют коллаген III типа (Liu J. et al., 2007). При повреждении пульпы ТФР- β 1 стимулирует миграцию защитных и одонтобластоподобных клеток в зону повреждения (Chan C.P. et al., 2007). При попадании в зону воспаления ТФР- β превращается в активную молекулу и стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки мезенхимальных клеток пульпы в одонтобласты, а при уменьшении его синтеза наблюдается некроз и апоптоз клеток пульпы (Thesleff I., Mikkola M., 2002; Goldberg M., Smith A.J., 2004).

Фактор роста фибробластов (ФРФ) – семейство структурно сходных полипептидов, которые оказывают митогенный эффект на различные типы клеток (Arese M. et al., 1999). В настоящее время семейство ФРФ представлено 22 членами с молекулярной массой от 16,8 до 25 кДа. Представители этого семейства – ФРФ-1 (кислый) и ФРФ-2 (щелочной) являются продуктами различных генов и имеют до 53% гомологии аминокислотной последовательности (Olsen S.K. et al., 2003). При исследовании влияния ФРФ на клетки-предшественники пульпы сформированных зубов крыс, было установлено, что ФРФ активирует дифференцировку этих клеток в фибробласты и одонтобласты (Nakao K. et al., 2004).

Инсулиноподобный фактор роста (ИФР) играет важную роль в быстром росте клеток и их дифференцировке. Существуют две изоформы ИФР, которые представляют собой одноцепочечные полипептиды, состоящие из 70 и 67 аминокислот соответственно (Delafontaine P. et al., 2005). Степень гомологии между этими изоформами достигает 62%, причем, 50% аминокислотных остатков в каждом из них идентичны таковым в инсулине. Оба ИФР могут оказывать как аутокринное, так и паракринное действие (Winn N. et al., 2003). При исследовании пульпы зубов человека со сформированными и несформированными корнями, было выявлено, что содержание ИФР было намного больше в зубах с несформированными

корнями (Caviedes-Bucheli J. et al., 2004). Это дает возможность предположить участие ИФР в формировании и минерализации твёрдых тканей зуба, так же, как и в процессе восстановления пульпы зуба.

Помимо минерализации зуба, в пульпе происходят противоположные процессы, связанные с резорбцией твердых тканей зуба. Однако, эти процессы, по сравнению с костной тканью, протекают очень медленно. В пульпе зуба выявлены одонтокласты – клетки, подобные остеокластам, располагающиеся на лакунарной поверхности корня зуба, которые участвуют в деградации неорганических и органических компонентов твёрдых тканей зуба в процессе физиологической резорбции (Brudvik P., Rygh P., 1994; Harokopakis-Hajishengallis E., 2007). Одонтокласты образуются из предшественников преодонтокластов, а те – путем дифференцировки клеток моноцит-макрофагальной линии. Преодонтокласты, как и преостеокласты, имеют мембранные рецепторы RANK, которые при связывании с RANK-лигандами (RANKL) способствуют слиянию нескольких предшественников в одну крупную структуру с формированием зрелых многоядерных одонтокластов (Zhu Y. et al., 2013). Стадия дифференцировки одонтокластов из предшественников блокируется белком остеопротегерином, который, свободно перемещаясь, способен связывать RANKL и таким образом предотвращать взаимодействие RANKL с RANK-рецепторами (Yildirim S., 2008). Более детальные исследования показали, что многоядерные одонтокласты участвуют в формировании лакун на поверхности корневого участка со стороны дентина, а моноядерные осуществляют фагоцитоз разрушенных фрагментов с поверхности лакун (Domon T. et al., 1997).

Изменения в метаболизме клеток пульпы зуба могут вызывать ортодонтические силы натяжения (Perinetti G. et al., 2004). Показано, что на клеточных культурах пульпы зубов при механической нагрузке увеличивается экспрессия сосудистого фактора роста (Derringer K.A. et al., 1996), содержание морфогенетического белка кости-2, фактора роста эндотелия (Derringer K., Linden R., 2007) и активность АСТ (Rohaya M.A.W.

et al., 2008; Veberiene R. et al., 2015), но снижается активность щелочной фосфатазы (Perinetti G. et al., 2005). Повышение содержания ИЛ-1 β и простагландина E2 в пульпе и десневой жидкости собак после установки тяги на зуб сохранялось в течение недели (Lee K-J. et al., 2004).

Таким образом, многочисленные исследования свидетельствуют, что несостоятельность процессов репарации при локальном воспалении в пульпе зуба могут быть связаны с постоянным действием повреждающего фактора и с эффекторными механизмами клеточного иммунитета. Способность дентино-пульпарного комплекса ответить на кариозный раздражитель, даже на самой начальной стадии его прогрессирования, может быть одним из вариантов его детального исследования в будущем (Bjorndal L., Mjor I.A., 2001).

Таким образом, выявленный уникальный комплекс различных белков пульпы зуба обладает сильным регенераторным потенциалом, который позволяет ей сформировать адекватный ответ на повреждение. Для понимания механизмов регенерации, минерализации, иммунной защиты и образования третичного дентина крайне важно всесторонне изучить структуру и свойства белков, участвующих в формировании дентино-пульпарного комплекса. Отсутствие конкретной информации о белках пульпы ограничивает разработку и внедрение эффективных методов, направленных на профилактику и лечение патологий твердых тканей зуба.

1.4. Влияние различных химических веществ, вводимых в организм, на дентино-пульпарный комплекс

Множество исследований посвящено изучению влияния алиментарных факторов на органы и ткани живых систем. Несмотря на то, что в большинстве диет, провоцирующих развитие кариеса, содержание белка и минеральных солей колеблется в пределах физиологической нормы, в твёрдых тканях зуба, костном скелете и в других тканях организма в целом на уровне межклеточного обмена возникают сочетанные нарушения белкового

и минерального обмена. В литературе имеется ограниченное количество данных о реакции клеток пульпы зуба на высокосахарозную диету и абсолютно не изучено влияние избыточных доз селена на эти клетки.

При употреблении животными высокосахарозной диеты наблюдались общие нарушения обмена веществ, в первую очередь, углеводного, что сопровождалось увеличением содержания глюкозы в крови и моче (Carvalho J.C. et al., 1989; Ekstrand K.R., Björndal L., 1997). Исследования на животных установили, что при употреблении больших доз сахарозы ослабляется толерантность к глюкозе и происходит её неферментативное её связывание с белками (Thornalley, P.J., 1999). Конечными продуктами гликирования, высвобождаемыми в результате протеолиза, являются модифицированные остатки аминокислот лизина и аргинина, которые могут связываться с функциональными белками и блокировать их работу (Gallet X. et al., 2000; Oldfield M.D. et al., 2002). Устойчивость тканей к инсулину также зависит от углеводного компонента в пище, например, фруктозы или глюкозы (Thorburn A.W. et al., 1989; Rawana S. et al., 1993). Это объясняется тем, что при расщеплении сахарозы в клетках стенки кишечника высвобождается фруктоза, метаболизм которой в печени осуществляется быстрее, чем глюкозы, так как инсулин не влияет на активность фосфофруктокиназы. Т.П. Вавилова и др. (1991) установили, что употребление с пищей 60% сахарозы сопровождалось повышением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в слизистой оболочке полости рта крыс.

Множество исследований проводилось для установления прямой взаимосвязи между высокосахарозной диетой и кариесом зубов (Mundorff-Shrestha S.A. et al., 1994; van Palenstein Hielderman W.H. et al., 1996). Было доказано, что развитие кариеса прямо пропорционально количеству употребляемой с пищей сахарозы молодыми животными (Björndal L. et al., 1998). Подобные экспериментальные процедуры у взрослых крыс не позволяли получить образование кариеса в зубах (Larmas M. et al., 1992; Nietala E-L., Larmas M., 1992; Nietala E-L. et al., 1997).

С традиционной точки зрения, прогрессирование кариеса должно вызывать активное формирование вторичного дентина, чтобы предотвратить повреждение пульпы зуба (Massler M., 1967). Однако, S. Nuunonen et al. (2001) выявили, что высокосахарозная диета у крыс, напротив, подавляет защитные реакции дентино-пульпарного комплекса против кариеса. Имеются сведения, что на фоне высокосахарозной диеты одонтобласты моляров молодых крыс атрофируются после завершения формирования первичного дентина в срок от 3-х недель до 2-х месяцев после рождения (Romagnoli P. et al., 1990; Kortelainen S. Larmas M., 1994). L.Valikangas et al. (2001) в своих исследованиях на клеточных культурах пульпы установили, что при высокой концентрации глюкозы в молодых одонтобластах ингибируется синтез коллагена I-го типа.

Установлено, что нагрузка сахарозой снижает потенциал одонтобластных клеток, вследствие чего толщина формирующегося дентина уменьшается (Larmas M. et al., 1992; Tjaderhane L. et al., 1995; Nuunonen S. et al., 2001). Это было подтверждено морфологическими исследованиями О.С. Волковой и Е.Н. Рябоконт (2010), которые показали, что у крыс 54% сахарозная диета приводит к апоптозу одонтобластов пульпы, о чём свидетельствовало набухание митохондрий и потеря ими крист, снижение количества секреторных гранул, опустошение сосудистого русла. Также было выявлено, что эта диета в пульпе резцов крыс приводит к снижению активности ЩФ и увеличению активности КФ по сравнению с контролем (Волкова О.С., Рябоконт Е.Н., 2010; Лепский В.В. и др., 2011; Цыбульская В.А. и др. 2014).

Существует гипотеза, что высокосахарозная диета, снижая степень минерализации эмали и дентина зуба вследствие блокирования связывания кальция с органическим матриксом зуба, повышает риск развития кариеса (Tjaderhane L., 1996; Nuunonen S., 1999; Nuunonen S., Larmas M., 1999).

Сходные результаты были получены в ряде экспериментов, где животные находились на диете со сниженным содержанием кальция (Engstrom C. et al., 1977; Lozupone E., Favia A., 1994; Tjaderhane L., 1995).

Было показано, что длительное нахождение животных на высокосахарозной диете способствует увеличению толщины слоя неминерализованного предентина (Hietala E-L., Larmas M., 1995; Autio J. et al., 1997). Считается, что кариесвосприимчивость зубов зависит от их анатомического строения и расположения на челюсти (Hunt H.R. et al., 1970). Показано, что моляры верхней челюсти крыс в меньшей степени подвержены кариесу (Hunt H.R. et al., 1970). Однако, высокосахарозная диета вызывала уменьшение дентина как на верхних, так и на нижних молярах крыс (Larmas M. et al., 1992; Tjaderhane L. et al., 1994; Huuonen S. et al., 2001).

Таким образом, исследования по влиянию высокосахарозной диеты на развитие кариеса зубов у животных проводились в достаточном объеме, однако, в данном аспекте не установлена роль пульпы зуба в иницировании развития кариеса.

Селен является эссенциальным компонентом пищи человека, а его избыток или дефицит приводят к развитию ряда патологических процессов (Тутельян В.А. и др., 2002; McLester, J.S., 1943). Показано, что хронический селеноз совпадает с интенсивным развитием кариеса зубов (Петрович Ю.А. и др., 1981; Hadjimarkos D.M., Bonhorst C.W., 1959; Hadjimarkos, D.M., 1973; Underwood, E.J., 1977).

Селен, поступая с пищей в организм, всасывается в тонкой кишке и попадает в кровь (Kato T. et al., 1992). В плазме крови селен связывается с восстановленным глутатионом с образованием селенглутатиона, который является субстратом для γ -глутамилтрансферазы, обеспечивающей транспорт селена через клеточную мембрану (Gantber, H.E., 1968). Глутатион используется глутатионпероксидазой в качестве кофактора и в ходе ферментативной реакции подвергается окислению (Rotruck J.T. et al., 1973).

Селен и его соединения в виде метилированных форм выводятся из организма с мочой, дыханием и фекалиями (Bopp V.A. et al., 1982; Yang G. et al., 1984; Mozier N.M. et al., 1988; Swanson C.A. et al., 1991). Имеются сведения о медленном выведении органических форм селена, что определяет их токсичность в высоких дозах (Голубкина Н.А. и др., 1996; Lonnecker M.P. et al., 1996).

В живых тканях выявлено 35 селенопротеинов, которые участвуют в регуляции биохимических процессов тканей мозга, гипофиза, щитовидной железы (Boyington J.C. et al., 1997). В настоящее время охарактеризовано 12 ферментов, содержащих в активном центре селен (Lee B.J. et al., 1996). К селеносодержащим белкам относятся глутатионпероксидазы (ГПО), тиоредоксинредуктазы, тиреоиддейодиназы, а также селенопротеины Р, W, Т, М и др. (Петрович Ю.А., Гуткин Д.В., 1981). Количество селеносодержащих белков варьирует в зависимости от длительности приёма селена и его химической формы в пищевом рационе (Reasbeck P.G. et al., 1981).

Селен во многом повторяет химические свойства серы и поэтому способен замещать серу в серосодержащих аминокислотах с образованием селенометионина и селеноцистеина (Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., 1961; Kuklinski B. et al., 1992). Эти селеносодержащие аминокислоты обладают выраженным антиоксидантным эффектом, снижая количество свободных радикалов (Ермаков В.В., Ковальский В.В., 1974; Сидельникова В.Д., 1999; Тутельян В.А. и др., 2002). Механизмы токсичности селена до сих пор точно не известны. Имеются предположения, что это связано с избытком дегидрогеназ, ответственных за утилизацию селена, либо замещением селеном сульфгидрильных групп, необходимых для участия в окислительных процессах (Levander O.A., Morris V.C., 1984; Clark L.C. et al., 1996).

Было изучено действие селена на зрелые и развивающиеся зубы крысят. После внутрибрюшинного введения меченого селена ^{75}Se крысятам было

выявлено, что по сравнению с костной тканью, в эмали зуба концентрация ^{75}Se сохраняется до 4-х суток (Bawden J.W., Hammarström L.E., 1977).

Сходные исследования были проведены T.R. Shearer (1975) с включением в рацион беременных самок крыс селенметионина. Предполагается, что селен селективно инкорпорируется в белках твёрдых тканей зуба и содержится в виде растворимого связанного Se, стабильно связанного с белком селенотрисульфида и Se (Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., 1961; Claycomb C.K. et al., 1961; Thomassen P.R., Leicester H.M., 1964). Было установлено косвенное влияние селена на секреторные амелобласты (Neves E.G. et al., 2013).

В современной медицине для лечения патологии и профилактики различных заболеваний используются разработки фармакологических групп и химической промышленности. Между тем, оказываемое влияние синтетических химических соединений на организм в целом, обходят вниманием ткани зуба.

В этом плане представляет интерес гормон эпифиза – мелатонин. Ввиду того, что существуют ограничения по его внедрению в клиническую стоматологическую практику, проводятся экспериментальные исследования на животных.

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) является производным аминокислоты триптофана (Kalsbeek A., Vuijs R.M., 2002). Мелатонин был выделен из шишковидной железы коров и расшифрована его структура (Lerner A.B. et al., 1958). Уникальная липофильная природа мелатонина обеспечивает его доступность для каждой клетки, он был обнаружен в митохондриях и ядре (Claustrat B. et al., 2005; Reiter R.J. et al., 2009). Выявлен антиоксидантный эффект мелатонина при лечении болезни Паркинсона (Mayo J.C. et al., 2005), Альцгеймера (Pappalla M.A. et al., 2003), эпилепсия (Srinivasan V. et al., 2006), инфекционных и воспалительных заболеваний (Mayo J.C. et al., 2005). Рядом исследований *in vivo* и *in vitro* показано, что мелатонин обладает противоопухолевым действием (Lissoni P., 2002; Reiter

R.J. et al., 2004; Miller S.C. et al., 2006; García-Santos G. et al., 2006; Martin V. et al., 2006). Противовоспалительный эффект мелатонина опосредован действием на системы циклооксигеназа/простагландины и NO-синтаза/оксид азота (Konturek S.J. et al., 2007).

Предполагается, что в полости рта мелатонин выполняет защитную роль (Vakkuri O. et al., 1985). Установлена положительная корреляция между концентрацией мелатонина в крови и слюне (Nowak R. et al., 1987). В экспериментах показано положительное влияние мелатонина на заживление раны после удаления зубов, лечении стоматита и ксеростомии (Czesnikiewicz-Guzik M. et al., 2007; Cutando A. et al., 2007; Aras H.Ç., Ekström J., 2008). В опытах на алиментарной модели показано, что мелатонин снижает и сезонно влияет на развитие кариеса зубов (Mechin J.C., Toury S., 1973). Было предложено местное использование мелатонина в стоматологии для лечения воспалительных процессов в пародонте (Cutando A. et al., 2006, 2007). В экспериментальных исследованиях на животных и клеточных культурах остеобластов показано, что мелатонин усиливает деление остеобластов и способствует быстрой остеоинтеграции вокруг установленного имплантата (Nakade O. et al., 1999; Koyama H. et al., 2002; Simon P.A., Watson Z., 2002; Cutando A. et al., 2008; Calvo-Guirado J.L. et al., 2010). Обнаружен цитостатический эффект мелатонина в отношении мономера метилметакрилата, что предполагает его использование в качестве ополаскивателя после установки зубных протезов (Blasiak J. et al., 2011).

Доказана роль мелатонина в циркадном ритме роста зуба (Ohtsuka-Isoya M. et al., 2001; Smith T.M., 2006). Изучение клеток развивающегося зуба *in vitro* выявило наличие на поверхности секреторных амелобластов, одонтобластов, эпителиоцитов 1α -рецептора к мелатонину (Kumasaka S. et al., 2010). Ежедневное добавление физиологической дозы мелатонина в культуры клеток зубного сосочка приводило к увеличению активности ЩФ и концентрации дентинфосфопротеина, и преждевременному формированию центров минерализации (Liu J. et al., 2013). В другом исследовании на крысах

аналогичные дозы мелатонина, напротив, подавляли формирование дентина зуба (Liu J. et al., 2013). Авторы выдвинули предположение, что мелатонин, в основной среде угнетает работу I и IV комплексов дыхательной цепи митохондрий, а в остеогенной среде, наоборот, усиливает работу этих комплексов.

Противовоспалительный эффект мелатонина был выявлен в модельном эксперименте на животных с воспалением пульпы зуба (Wang Y. et al., 2013). На модели 5-дневного пульпита изучались эффекты экзогенного мелатонина на репаративные процессы в повреждённой пульпе (Wang Y. et al., 2013; Li J.G. et al., 2015). Результаты показали, что на фоне острого пульпита в плазме крови крыс наблюдалось снижение уровня эндогенного мелатонина и увеличение количества цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ФНО- α . Ежедневные инъекции мелатонина животным с острым пульпитом достоверно снижали уровни исследованных цитокинов в крови, в пульпе зуба количество толл-подобного рецептора 4 (TLR4), ядерного фактора транскрипции каппа В (NF- κ B), ФНО- α и ИЛ-1 β . Полученные данные позволили авторам высказать предположение, что мелатонин обеспечивает модуляцию сигнальных путей TLR4/NF- κ B в клетках пульпы зуба. Показано, что эффект мелатонина в клетках пульпы зуба проявляется на уровне транскрипции генов опосредовано через митоген-активированную протеинкиназу и модуляцию костного морфогенетического белка-2 (Cho Y.A. et al., 2015). Выявлен *in vitro* остеогенный потенциал у комбинации стволовых клеток пульпы зуба с мелатонином, гиалуроновой, масляной и ретиноевой кислотами (Maioli M. et al., 2016). Было установлено, что в культурах клеток пульпы зуба при 7-ми дневной инкубации с мелатонином в дозе 10^{-8} моль/л наблюдалась высокая активность ЩФ, а на 14 день инкубации уже были сформированы центры минерализации (He H. et al., 2016). Опыты *in vitro* с культурами фибробластов пульпы также подтвердили регенераторный потенциал мелатонина (Sloan A.J., Smith A.J., 2007; Hirao K. et al., 2009). В пробирке с культурами фибробластов пульпы и липополисахаридом бактерий после

добавления мелатонина наблюдалось подавление сигнала TLR4/NF-κB. Полученные результаты указывают, что использование мелатонина может быть многообещающей стратегией при лечении пульпита.

Известно, что система врожденного иммунитета играет важную роль в процессах регенерации ран, особенно значимую на воспалительном этапе раневого процесса. Рецепторы врожденного иммунного ответа экспрессируются широким спектром клеток, образующихся или присутствующих в коже, включая иммунокомпетентные клетки. В частности, рецептор TLR-4 экспрессируется кератиноцитами, эндотелиальными клетками, макрофагами, фибробластами, адипоцитами и др. (Miller L.S., Modlin R.L., 2007). Активация TLR рецепторов инициирует ряд сигнальных каскадов, что приводит к увеличению секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов адгезии, протеолитических ферментов – факторов, принимающих участие в процессе регенерации. В настоящее время проведены обширные исследования по изучению TLR4 в качестве ключевого маркера воспалительных процессов как инфекционного, так и неинфекционного характера, однако информация о его влиянии на клетки пульпы зуба в норме и при патологии весьма ограничена.

Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) – белок богатый лейцином, располагается во внеклеточном пространстве и цитоплазме клеток и участвует в трансмембранной передаче сигнала сходной с ИЛ-1 (Alizadeh H. et al., 2014). Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) принадлежит к семейству рецепторов PRRs, обеспечивая, таким образом, первую линию защиты от инфекции. Давно известно, что молекула TLR4 чувствительна к полисахариду грамотрицательных бактерий (LPS). В дополнение к этому, он связывает эндогенные молекулы, которые образуются в результате повреждения тканей. Следовательно, TLR4 представляет собой ключевой рецептор, на котором сходятся инфекционные и неинфекционные стимулы, вызывающие провоспалительный ответ. Воспалительная реакция с участием

TLR4, вызванная экзогенными или эндогенными лигандами, протекает в острой и хронической форме (Molteni M. et al., 2016).

В проведенных исследованиях было показано, что выраженная активация TLR4 наблюдалась при воспалении пульпы и периодонта, а также при многих других воспалительных процессах в полости рта (Jiang H.W. et al., 2006; Mutoh N. et al., 2007). При обработке клеточной суспензии фибробластов пульпы зуба липополисахаридами (эндотоксином) авторы выявили, что механизм активации TLR4 происходит через сигнальные пути MAPK (англ. *mitogen-activated protein kinase* – митоген-активируемая протеинкиназа), которые контролируют транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз и другие процессы путём опосредованного влияния на синтез цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, простагландина E2 и его ключевого фермента циклооксигеназы-2 (Staquet M.J. et al., 2008; Hirao K. et al., 2009; Botero T.M. et al., 2010). Выявлена способность TLR4 к усилению фосфорилирования ингибитора ядерного фактора транскрипции- α (I κ B- α), киназы фокальной адгезии (FAK) – нерецепторной тирозинкиназы, задействованной в передаче сигнала, опосредованном интегрином, киназы RAC (англ. *alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha* – альфа серин/треонин протеинкиназа, протеинкиназа B-альфа) – ключевого фермента сигнального пути, который вовлечен в регуляцию пролиферации клеток, сигнального пути ERK (англ. *extracellular signal-regulated kinase* – внеклеточная регуляторная сигнальная киназа), обеспечивая жизнеспособность, пролиферацию и подвижность клеток. Все эти сигнальные пути обеспечивают адгезию и миграцию одонтобластов пульпы зуба (Park J.H. et al., 2011). Кроме того, активация ядерного фактора NF- κ B имеет решающее значение для развития воспалительного процесса в различных тканях, поэтому его ингибирование при участии TLR4 позволит снизить распространение воспаления на здоровые участки тканей. Активация ядерного фактора NF- κ B сопровождается усиленным синтезом провоспалительных цитокинов, таких,

как ИЛ-1 β и ФНО- α (Karki R., Igwe O., 2013; Lin X.W. et al., 2013). ИЛ-1 β обладает сильным провоспалительным эффектом, обеспечивая активацию врождённого иммунитета (Davis B.K. et al., 2011; Chen X. et al., 2013). В одних случаях эти реакции важны для иммунного ответа на бактериальную инвазию, в других они усиливают разрушение клеток при переходе воспаления в хроническую форму и при остром повреждении тканей (Sahoo M. et al., 2011; Lopez-Castejon G., Brough D., 2011).

У опытных животных при остром воспалении пульпы максимальная активация TLR4 наблюдалась в той части пульпы, которая была обращена к ране, что сопровождалось увеличением концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ФНО- α . Эти цитокины являются молекулами исполнительного элемента сигнальной активации, а именно, соотношения TLR4/NF- κ B, сдвиги которого, возможно, свидетельствует о развитии некроза в ткани пульпы. Выявлено, что противовоспалительный эффект можно получить путём ингибирования NF- κ B и уровня цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , а это, в свою очередь, приводит к снижению секреции TLR4 (Wu Y. et al., 2012).

В последнее время разработаны и внедрены в клиническую практику противовоспалительные препараты, действующие на различные цитокины, лиганды PRR-рецепторов и сами PRR-рецепторы. Интерес исследователей вызывают ингибиторы Toll-like рецепторов (*TLR*). Они являются подвидами PRR-рецепторов, входящих в состав системы врожденного иммунитета, реагирующих на молекулы PAMP и DAMP, и появляющихся в тканях и в крови в начале инфекционного процесса.

Компанией Takeda Pharmaceuticals (Япония) был создан и апробирован химический аналог ингибитора TLR-4 – препарат ТАК-242 (*Resatorvid*), который применяется для лечения опухолей и септических состояний. Молекулярная формула: C₁₅H₁₇ClFNO₄S (рисунок 3).

Исследования *in vitro* действия ТАК-242 на культуры макрофагов мышей (RAW264.7) показали, что ТАК-242 полностью подавляет реакцию на

липополисахарид и на 50% ингибирует экспрессию генами ФНО- α и ИЛ-6 (Li M. et al., 2006).

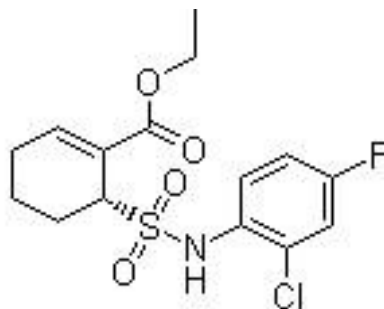


Рисунок 3 - Структурная формула ингибитора TLR-4

Эффект ингибирования TAK-242 был оценён в клетках крови человека, он опосредованно влиял на связывание TLR-4 с внутриклеточным адаптерным белком, относящегося к группе интерлейкин-1-подобных рецепторов, участвующих в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов (Matsunaga N. et al., 2011). У мышей на фоне введения липополисахарида патогенных бактерий действие TAK-242 выразилось в подавлении количества циркулирующих в плазме крови ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-10, MIP-2 (воспалительный белок макрофагов) и оксида азота (NO) (Tramullas M. et al., 2013). Введение поражённым токсинами мышам ингибитора TAK-242 в дозе 1 мг/кг предотвращало гибель животных в 100% случаях (Sha T. et al., 2007).

Таким образом, пульпа зуба, как и весь организм, пациента находится под воздействием огромного количества различных факторов, совокупность которых и определяет стратегию её лечения и его успех. В связи с этим максимальное понимание механизмов влияния этих факторов на ткани, подвергаемые терапии, представляется очень важным. Проведенные нами исследования позволяют приблизиться к комплексному пониманию процессов, происходящих в пульпе зуба в норме и при патологии, что может обеспечить врачей стоматологов информацией, влияющей на выбор терапевтических подходов и профилактических процедур.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились с 2004 по 2016 гг. в лабораториях кафедры биохимии МГМСУ им. А.И. Евдокимова (зав. кафедрой – д.м.н., профессор Т.П. Вавилова), ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» (зав. лабораторией системных механизмов эмоционального стресса – член-корр. РАН, д.м.н. профессор, С.С. Перцов), ГУ НИИ БМХ РАМН им. В.Н. Ореховича (зав. лабораторией фармакопротеомики – д.б.н. профессор А.Е. Медведев), ФГБНУ НИИ Морфологии Человека (директор – д.м.н. профессор О.В. Макарова).

2.1. Дизайн экспериментальных исследований на животных

Экспериментальные исследования проведены на 245 белых беспородных крысах-самцах: 64 животных весом 30-40 гр и 181 животных весом 200-400 гр. в соответствии с нормативами, предусмотренными «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ETS № 123 от 18.03.1986г.) и Федеральным Законом № 52 «О животном мире» от 24.04.1995г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре помещения +22-25°C, с искусственным освещением и доступом к питьевой воде. После доставки из питомника, животных ежедневно в течение 5 дней подвергали процедуре хэндлинга – тактильного контакта с руками экспериментатора в течение 15 мин для предотвращения стресса при контакте с человеком в эксперименте.

В настоящей работе было проведено 8 серий экспериментов с участием животных.

I серия

Данный эксперимент проводился с сотрудниками кафедры биохимии под руководством профессора Т.П. Вавиловой. В опытах были использованы 64 белых крысят-отъёмышей с исходной массой 30-40 г. с размещением в одной клетке (таблица 1). Животных содержали на экспериментальных

диетах. Крыс кормили высокосахарозной пищей, разработанной сотрудниками кафедры биохимии ММСИ, которая состояла из 60% сахарозы, 18% казеина, 10% свиного сала, 4% солевой взвеси Джонсона и водо- и жирорастворимых витаминов. Животные контрольной группы питались сходным рационом, разработанным сотрудниками института питания АМН СССР (Шарпенак А.Э. и др., 1959), в котором сахароза была заменена на крахмал. Все животные получали необходимый витаминный комплекс, включающий: ретинол (3000 мЕ), эргокальциферол (300 мЕ), тиамин (4 мг), рибофлавин (4 мг), никотинамид (15 мг), пиридоксин (4 мг), пантотенат кальция (4 мг), цианкобаламин (0,33 мг), инозит (0,3 мг), фолиевую кислоту (2 мг) из расчета на 1 кг рациона. В двух группах крысятам добавляли раствор селенита натрия из расчета 100 мкг/кг.

Таблица 1 - Дизайн I серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=64)
I	основная	сахароза 60% + раствор селенита натрия 100 мкг/кг	30 и 60	16
II	сравнения	сахароза 60%	30 и 60	16
III	сравнения	раствор селенита натрия 100 мкг/кг	30 и 60	16
IV	контрольная	стандартная диета	30 и 60	16

II серия

Данный эксперимент проводился совместно с к.б.н., доцентом Ю.Г. Гаверовой В опытах использовали 30 белых беспородных крыс самцов массой 250-300 гр. (таблица 2). В каждой клетке размещали по 5 особей и держали на стандартном рационе вивария. Животным основной группы в

икроножную мышцу одно-, двух- и трехкратно вводили ингибитор синтеза карнитина (GRINDEX АО, Латвия), а животным группы сравнения 0,9% раствор NaCl.

Таблица 2 - Дизайн II серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=30)
I	основная	внутримышечное введение 0,15 мл 0,5% р-ра ингибитора синтеза карнитина 1 раз в сутки	1,2,3	15
II	сравнения	внутримышечное введение 0,15 мл 0,9% р-ра NaCl 1 раз в сутки	1,2,3	15

III серия

Эксперимент проводился совместно с сотрудниками ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» под руководством чл.-корр. РАН, д.м.н. профессора С.С. Перцова. В опытах использовали 14 белых беспородных крыс самцов массой 250-300 гр. (таблица 3). В каждой клетке размещали по 3 или 4 особи и держали на стандартном рационе вивария.

Таблица 3 - Дизайн III серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=14)
II	основная	внутрибрюшинное введение 2 мкг/кг CLI-095 разведенного в 1 мл 0,9% р-ра NaCl	1	7
III	контрольная	внутрибрюшинное введение 1 мл 0,9% р-ра NaCl	1	7

Опытной группе животных в 9 утра однократно внутрибрюшинно вводили специфический селективный ингибитор TLR4 (CLI-095, InvivoGen, США), а животным контрольной группы аналогично при тех же условиях вводили 1 мл 0,9% р-ра NaCl. Крыс декапитировали на следующие сутки под эфирным наркозом.

IV серия

Эксперимент проводился совместно с сотрудниками ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» под руководством член-корреспондента РАН, д.м.н. профессора С.С. Перцова. В опытах задействовано 10 белых беспородных крыс самцов массой 250-300 гр. (таблица 4). В каждой клетке размещали по 5 особей и держали на стандартном рационе вивария.

Таблица 4 - Дизайн VI серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=10)
I	основная	внутрибрюшинное введение мелатонина 10 мкг/кг разведенного в 1 мл 0,9% р-ра NaCl	8	5
II	сравнения	внутрибрюшинное введение 1 мл 0,9% р-ра NaCl	8	5

Опытной группе животных в 9 утра в течение 8 дней внутрибрюшинно вводили 10 мг/кг синтетического аналога мелатонина (Sigma, США), разведённого в 1 мл 0,9% р-ра NaCl, а животным контрольной группы аналогично при тех же условиях вводили 1 мл 0,9% р-ра NaCl. Крыс декапитировали на 9-е сутки под эфирным наркозом.

V серия

Данный эксперимент проводился совместно с соискателем И.В. Тарасенко. В опытах использовано 60 белых беспородных крыс самцов массой 250-300 гр. (таблица 5). В каждой клетке размещали по 5 особей.

Таблица 5 - Дизайн V серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=60)
I	основная	Эрбиевый лазер с энергией 350 мДж, длительностью импульса 700 мкс (режим «long»), частотой 20 Гц и экспозицией 15 сек. с водно-воздушным охлаждением	1, 5, 8, 15	20
II	сравнения	Хирургический скальпель	1, 5, 8, 15	20
III	контрольная	Не проводили иссечение слизистой щеки	1, 5, 8, 15	20

У животных под эфирным наркозом хирургическим инструментом проводили иссечение слизистого лоскута на внутренней стороне щеки слева. После операции рану обрабатывали настойкой йода и не ушивали. В рацион оперированных животных включали мягкие питательные смеси. Контрольной группе животных не проводилась перфорация слизистой оболочки щеки. Животных декапитировали под эфирным наркозом на 1,5,8 и 15 сутки заживления раны.

VI серия

Данный эксперимент проводился совместно с соискателем С.В. Шишкиным. В опытах использовано 40 белых беспородных крыс самцов массой 300-350 гр. (таблица 6). В каждой клетке размещали по 5 особей.

Таблица 6 - Дизайн VI серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=40)
I	основная	До удаления зуба в переходную складку 0,2 мл изотонического раствора. per os 0,5 мл 0,9% р-ра NaCl 3 р/сут	7, 14	10
II	сравнения	До удаления зуба в переходную складку 0,2 мл изотонического раствора. per os 0,5 мл эмульсии преп. «Амоксиклав» в дозе 4мг/1кг 3 р/сут	7, 14	10
III	сравнения	До удаления зуба в переходную складку 0,2 мл раствора Траумель С. per os 0,5 мл водного р-ра преп. «Лимфомиозот» 3 р/сут	7, 14	10
IV	контрольная	Без введения веществ и удаления зуба	7, 14	10

Животным экспериментальных групп проводилось удаление моляров верхней и нижней челюсти. После операции животные в течение 7 и 14 дней получали медикаментозную терапию. В рацион оперированных животных

включали мягкие питательные смеси. Животных декапитировали под эфирным наркозом на 7 и 14 сутки заживления раны.

VII серия

Эксперимент проводился совместно с сотрудниками ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» под руководством чл.-корр. РАН, д.м.н., профессора С.С. Перцова. В опытах использовано 24 белых беспородных крыс самцов массой 250-300 гр. (таблица 7).

Таблица 7 - Дизайн VII серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=24)
I	основная	Иммобилизация на 4 часа в сутки	1	7
II	контрольная	Без иммобилизации	1	7
III	основная	Иммобилизация на 4 часа в сутки	8	5
IV	контрольная	Без иммобилизации	8	5

Для моделирования ограничения подвижности животных ежедневно на 4 часа (9:00 – 13:00) помещали в индивидуальные пластиковые пеналы. В качестве контроля служили интактные особи, которых не подвергали иммобилизации. Крыс всех экспериментальных групп декапитировали на 1-е и 9-е сутки под эфирным наркозом.

VIII серия

Данный эксперимент проводился совместно с соискателем Д.А. Селезневым. В опытах использовано 10 белых беспородных крыс самцов массой 350 гр. В каждой клетке размещали по 5 особей (таблица 8).

Таблица 8 - Дизайн VIII серии эксперимента

№ группы	Статус группы	Модель эксперимента	Сроки эксперимента (сутки)	Кол-во животных (n=10)
I	основная	Силовая пружина с усилием 100 гс/см. Рабочая сторона челюсти.	9	10
		Контрлатеральная сторона челюсти без пружины.		

У экспериментальных животных на нижнюю челюсть между первым левым моляром и резцом одноименной стороны под эфирным наркозом по методу Кобояши устанавливали силовую пружину с усилием 100 гс/см (рисунок 4).

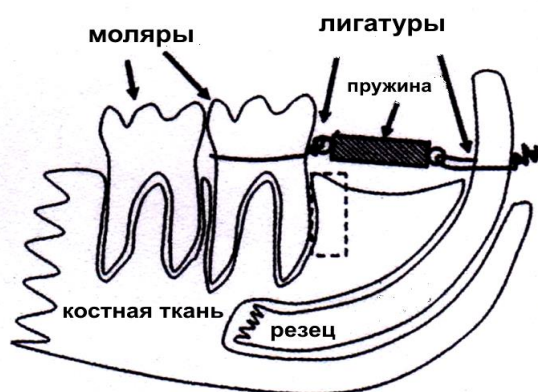


Рисунок 4 - Экспериментальная модель: фиксация пружины у опытных животных (вид сбоку)

Фиксация пружины обеспечивалась лигатурным креплением. Свободные концы лигатур для предупреждения травмы слизистой оболочки запечатывали композитным материалом. В рацион животных после

установки пружины включали мягкие питательные смеси. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 9 дней после установки пружины.

2.2. Исследования пульпы постоянных и временных зубов человека

Были исследованы 539 образцов пульпы, из которых 306 образцов извлечены из постоянных и 233 из временных зубов человека (таблица 9, таблица 10). Состояние пульпы человека диагностировали по МКБ-10 (ВОЗ, 1999).

Таблица 9 - Количество образцов пульпы постоянных зубов человека, полученных для исследования

Состояние пульпы зуба	Код МКБ	Количество (n)
Гиперемия пульпы (глубокий кариес)	K02.1	25
Острый пульпит	K04.01, K04.02	38
Хронический пульпит	K04.03	143
Полип пульпы	K04.05	5
Некроз пульпы	K04.1	5
Интактная пульпа	-	90
Всего		306

Образцы пульпы зуба в норме и при воспалении были извлечены по медицинским показаниям у пациентов обоего пола в возрасте от 1 года до 58 лет, которым оказывалась стоматологическая помощь в амбулаторных условиях Клинического центра МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Воспаленная пульпа была извлечена из зубов с кариозными полостями.

Интактная пульпа постоянных зубов была извлечена по ортопедическим и ортодонтическим показаниям: при подготовке зуба, дивергированного в

щечно-язычном или щёчно-небном направлении более чем на 45 градусов к препарированию под опорную коронку; из здоровых зубов, удалённых по ортодонтическим показаниям.

Таблица 10 - Количество образцов пульпы временных зубов человека, полученных для исследования

Состояние пульпы зуба	Состояние корней зубов	Код МКБ	Количество (n)
Хронический пульпит	сформированные корни	K04.03	104
	стадия резорбции корня		66
Интактная пульпа		-	63
Всего			233

Интактная пульпа временных зубов была извлечена из удалённых задержавшихся, ретинированных или сверхкомплектных зубов.

Все пациенты подписывали информированное согласие на проведение эндодонтического лечения зубов после удаления пульпы. Хранение информации о донорах пульпы зуба проводилось в условиях конфиденциальности.

2.2.1. Получение образцов пульпы человека и животных для исследования

У животных после декапитации выделяли фрагменты челюстей с зубами и помещали в лоток со льдом. Зубы извлекали из верхней и нижней челюсти, пульпу отделяли от минерализованной оболочки зуба при помощи байонетных щипцов и металлического пинцета.

У человека с помощью турбинного наконечника, со скоростью вращения 3000 об/мин., с непрерывным охлаждением, зуб рассверливался до вскрытия пульпарной камеры, далее пульпа извлекалась с применением пульпоэкстрактора. Перед извлечением пульпы для остановки кровотечения

полость зуба обрабатывали дистиллированной водой и накладывали плотный сухой ватный шарик.

При работе с интактными зубами, удалёнными по ортодонтическим показаниям, зуб фиксировался в гипсовом цоколе, пульпарная камера вскрывалась с использованием турбинного наконечника, со скоростью вращения 3000 об/мин., с постоянной подачей водяного охлаждения, и далее пульпа извлекалась при помощи пульпоэкстрактора.

2.2.2. Получение образцов пульпы зуба человека и элюатов десневой жидкости до и после лечения пульпита временных зубов

Было проведено лечение хронического пульпита 125 временных зубов методом пульпотомии у 75 детей от 3-х до 8-ми лет. Хронический пульпит был диагностирован согласно Международной классификации ВОЗ (1999) по данным анамнеза, ЭОД и рентгенографии. Все пациенты были разделены на 3 группы по методу лечения пульпита. Компоненты лечебных паст, которыми проводили лечение хронического пульпита временных зубов, представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Компоненты лечебных паст

Компоненты	Производитель
Порошок: оксид кальция	ЗАО «ОЭЗ «ВладМиВа», Россия
Порошок: дексаметазон; тимол; гидроксид кальция; трикальций фосфат; сульфат бария; окись цинка. Жидкость: эвгенол; прополис; мятное масло.	«Омега-Дент», Россия
Жидкость: d-Борнеол 35%	Sinoborneol Technology, Китай

Пациентам I группы (n=25) на корневую пульпу помещали лечебную пасту, состоящую из оксида кальция (группа сравнения). Пациентам II группы (n=25) в качестве лечебной прокладки использовали оксид кальция

и эвгенол (группа сравнения). У пациентов III группы (n=25) лечебная паста состояла из оксида кальция и борнеола (основная группа).

На начальном этапе лечения пульпита проводилась девитализация коронковой части пульпы зуба. Во всех случаях реставрация после пульпотомии проводилась с помощью композита светового отверждения. Результаты лечения оценивались через 6 и 12 месяцев по данным рентгенографии, электроодонтодиагностики (ЭОД), показателям десневой жидкости (ДЖ).

2.3. Методика оценки электровозбудимости пульпы зуба

Для электроодонтодиагностики пульпы зуба использовался портативный ручной тестер фирмы «Паркелл». Пульпа интактных зубов реагирует на силу тока в пределах от 2 до 20 мкА. Снижение электровозбудимости до 25 мкА свидетельствует о поражении коронковой пульпы, 40-60 мкА – корневой пульпы, 80 мкА и выше – некроз всей пульпы.

2.4. Подготовка образцов пульпы зуба человека и животных для биохимического исследования

После извлечения пульпу животного или человека промывали в 0,9% растворе NaCl, образец высушивали фильтровальной бумагой и взвешивали на электронных весах (вес пульпы человека колеблется от 3 до 10 мкг, крысы – от 10 до 25 мкг). Ткань помещали в предварительно охлаждённую фарфоровую ступку с добавлением 5 мкг алюмосиликатного порошка и 0,5 молярным раствором трис-HCl буфера (pH=7,3) из расчёта на вес ткани 1мкг/10мкл. С помощью фарфоровой ступки смесь доводили до гомогенного состояния и отбирали при помощи дозатора. Полученный гомогенат помещали в стерильную пластиковую пробирку с плотной крышкой и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. После центрифугирования из пробирки аккуратно извлекали надосадочную

жидкость (супернатант). Пробирку с супернатантом плотно закрывали, маркировали и помещали в морозильную камеру при температуре -30°C .

2.5. Получение и подготовка образцов десневой жидкости человека для исследования

Перед исследованием ДЖ изготавливались полоски из хроматографической бумаги длиной 15 мм, шириной 4 мм, один край полоски был заострѐн. Перед введением полосок хроматографической бумаги в десневые борозды временные зубы протирали от зубного налѐта и высушивали ватными тампонами. После этого чистые полоски острым концом вводили в устье десневой борозды, продвигая на глубину до 1 мм по направлению ко дну борозды. Время забора ДЖ составляло 5 минут. Полоску с ДЖ извлекали из борозды и помещали в пробирку, содержащую 0,5–1,0 мл нейтрального буфера, и оставляли для элюации при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ на 4 ч при периодическом помешивании. До начала исследования элюаты ДЖ хранились на холоде при -30°C .

2.6. Подготовка образцов пульпы зуба животных для гистологического исследования

Морфологическое исследование проводилось у животных VII серии эксперимента. Извлекали нижнюю челюсть, выделяли резцы с фрагментами костной ткани до первого моляра с опытной и контрлатеральной сторон. Удаленные зубы раскалывали и помещали в альдегидный фиксатор, а затем подвергали деминерализации в 10% растворе ЭДТА в течение 5 недель с добавлением декстрана с молекулярной массой 40 кДа для предотвращения повреждений ультраструктуры клеток. Затем пульпу извлекали, препараты окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Маллори и Ван Гизон. С помощью электронного микроскопа с увеличением до $\times 1000$ изучали состояние пульпы нижних резцов опытной и контрлатеральной сторон.

2.7. Оборудование, реактивы и препараты, используемые в исследовании

Препараты: CLI-095 – ингибитор TLR4 («InvivoGen», США); Мелатонин («Sigma», США); Траумель С, Лимфомиозот (Heel, Германия); Амоксиклав («Лек», Словения); Милдронат («Гриндекс», Латвия); 0,9% р-р хлорида натрия; субстраты MAO –5-гидрокситриптамин, фенилэтиламин-гидрохлорид, ингибиторы MAO – паргилин, семикарбазид.

Реактивы, растворы и буферы: 50 мМ карбонатно-фосфатный буфер (pH 10.2), 50 мМ трис-HCl буфер (pH 7.3), 0,088 мМ глициновый буфер (pH 10.0), 50 мМ фосфатный буфер (pH 7.2, 7.4), 1/15 мМ фосфатный буфер (pH 8.0), 2% раствор денатурированного гемоглобина (pH=3.8). Реактивы для определения кислых (pH=3.8) и слабощелочных протеиназ (pH=7.5) по L. Anson (1938) в модиф. Т.П. Вавиловой (1991); общий белок по О.Н. Lowry et al. (1951); 10% раствор формалина; реактив Фолина; этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) («БиоВитрум», Россия), нитросиний тетразолий-п хлорид (НСТ), трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Диа·М, Россия), гематоксилин (США), эозин (Калибр74, Россия), парафин, кумасси бриллиантовый синий R 250 (Biochem, Франция). Остальные реактивы приведены в таблице 12.

Оборудование: Спектрофотометры: СФ -46 (Россия), Stat Fax 2000 и 2200 (США), BioChem SA Plus (НТИ, США); емкость для водяной бани, центрифуга БЛ-200, гомогенизатор SilentCrusher S (Heidolph, Германия), весы аналитические 0,001 Radwag AS, весы торсионные ВТ-500, пробирки 1,5-2 мл, полуавтоматические пипетки («Eppendorf», Австрия), стеклянная и пластиковая лабораторная посуда, световой микроскоп Leika DM 2000 (Германия), компьютерная программа AxioVision для микрофотосъёмки, стёкла предметные («ПанЭко», Россия), санный микротом SM 2000R Leica (США), пинцет, ножницы, щипцы байонетные, зонд стоматологический, скальпель, лазерная установка «Smart 2940D plus» (Италия).

Таблица 12 - Биохимические показатели, определяемые в образцах*

Наименование	Метод	Производитель	Сокращ. назв.	Ед.изм.	Авторы
Количество общего белка	Спектрофотометрия	-	ОБ	мг/г ткани	Lowry O.H. et al. (1951)
Активность кислых протеиназ (рН=3.8)	Спектрофотометрия		КП	мкмоль/мин·г ткани	Anson L. (1938) в модиф. Вавиловой Т.П. (1991)
Активность слабощелочных протеиназ (рН=7.5)	Спектрофотометрия		СЦП	мкмоль/мин·г ткани	
Активность общей супероксиддисмутазы	Спектрофотометрия	«Randox» (Великобритания)	СОД	мкмоль/мин·г ткани	Beauchamp C., Fridovich I. (1981)
Активность глутатионпероксидазы	Спектрофотометрия		ГПО	мкмоль/мин·г ткани	Paglia, Valentine, (1983)
Активность малатдегидрогеназы	Спектрофотометрия	Sigma (США)	МДГ	ммоль/мин·г ткани	Кочетов Г.А. (1980)
Продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой	Спектрофотометрия	«Биоконт» (Россия)	ТБК-АП	мкмоль/мин·г ткани	Стальная И.Д., Гаришвили Г.Г. (1977)
Активность щелочной фосфатазы	Спектрофотометрия	ЗАО Вектор-Бест (Россия)	ЩФ	мкмоль/мин·г ткани	Young D.S. (1997)
Активность α-гликозидазы	Спектрофотометрия		α-Гликозидаза	ммоль/мин·г ткани	Young D.S. (2001)
Активность лактатдегидрогеназы	Спектрофотометрия		ЛДГ	мкмоль/мин·г ткани	Wróblewski F., La Due S.S. (1955, 1956)
Активность аспаратаминотрансферазы	Спектрофотометрия		АСТ	мкмоль/мин·г ткани	
Активность аланинаминотрансферазы	Спектрофотометрия		АЛТ	мкмоль/мин·г ткани	

Продолжение таблицы 12

Активность кислой фосфатазы	Спектрофотометрия		КФ	мкмоль/мин · г ткани	Hillmann G. (1971)
Активность моноаминоксидаз типа А и В	Спектрофотометрия		МАО А МАО В	нмоль/мин · г ткани	Anderson M.C., Tipton K.F. (1994) в модиф. Medvedev A.E. et al. (1994; 1998)
Активность семикарбазид-чувствительной аминоксидазы	Спектрофотометрия		SSAO	нмоль/мин · г ткани	
Количество интерлейкинов-1 β , -4, -6, -10	ИФА	ЗАО Вектор-Бест (Россия)	ИЛ	пг/мг ткани	Turner N.A. et al. (2007)
Количество фактора некроза опухоли- α	ИФА		ФНО- α	пг/мг ткани	
Количество лактоферрина	ИФА		ЛФ	пг/мг ткани	Школьникова Т.В. и др. (2012)
Количество аннексина V	ИФА	Bender Medsystems, (Австрия)	анV	пг/мг ткани	Koopman G. et al. (1994)
Количество остеопротегерина	ИФА		OPG	пг/мг ткани	Simonet W.S. et al. (1997)
Количество β -трансформирующего фактора роста	ИФА		ТФР- β	нг/мг ткани	Montuenga L.M. et al. (1999)
Количество каспазы-9	ИФА		Кас-9	нг/мг ткани	Coen L. et al. (2007)
Количество остеокальцина	ИФА		Immunodiagnostic Systems Holdings PLC (IDS), Великобритания	ОК	пг/мг ткани

Окончание таблицы 12					
Количество растворимого рецептора ядерного фактора транскрипции каппа В	ИФА	Biomedica (Австрия)	sRANKL	нмоль/г ткани	Terpos E. et al. (2003)
Количество гомоцистеина	ИФА	Axis-Shield (Норвегия)	Нсу	мкмоль/г ткани	Thambyrajah J., Townend J.N. (2000)
Количество иммуноглобулинов А, G, М	Турбидиметрия	Human (Германия)	IgA, IgG, IgM	мг/%	Shumann G., Dati F. (1995)
Количество основного фактора роста фибробластов-β	ИФА	Biosource (США)	оФРФ-β	пг/мг ткани	Bugler B. et al. (1991)
Количество инсулиноподобного фактора роста -1	ИФА	Diagnostic Systems Laboratories (DSL) (США)	ИФР-1	нг/мг ткани	Soliman A.T. et al. (1986)
Количество костного изофермента щелочной фосфатазы	ИФА	QUIDEL corporation (США)	КЩФ	нг/мг ткани	Garnero P. et al. (1994)

* Подробные сведения о ходе проведения анализа каждого показателя приведены в приложении 3.

Примечание: макропептиды (белки) (Mr ~ от 100 000 Да): ЛДГ, АСТ, АЛТ, ЩФ, КФ, MAO A, MAO B, SSAO, СОД, ГПО, МДГ, Ig A, G, M, каспаза 9, КИЩФ; полипептды (Mr ~ до 100 000 Да): ИЛ-1β, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α, ЛФ, оФРФ-β, ИФР-1, β-ТФР, аннексин V, OPG, sRANKL; пептиды (Mr ~ до 10 000 Да): остеокальцин; аминокислоты: Нсу.

2.8. Методы статистической обработки результатов исследования

Для оценки правильности определяли достоверность различий результатов и наличие статистической связи при помощи теста Стьюдента по формуле:

$$\frac{X-Y}{\sqrt{m_x^2+m_y^2}},$$

где X , Y – средние арифметические результатов, сравниваемых методов; m – ошибка средней арифметической.

При распределении малого числа наблюдений использовали непараметрические критерии – тест Вилкоксона. Если число наблюдений было невелико и критерий знаков не выявлял различий, то применялся критерий Т – парный критерий Вилкоксона. Если $p < 0,05$, то различия между методом-кандидатом и сравнительным методом были достоверны. Если $p > 0,05$, то различия на достигнутом уровне значимости были недостоверны. Дальнейшая обработка результатов состояла в оценке статистической связи.

Для оценки статистической связи использовался корреляционный метод по Спирмену. Для определения корреляции рассчитывали линейный коэффициент корреляции R и коэффициент корреляции r , при расчете которого результаты оценивали порядковыми номерами – рангами от меньших к большим. Для расчета R использовали формулу:

$$r = \frac{\sum^n (X - \bar{X}) \cdot (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum^n (X - \bar{X})^2 \cdot \sum^n (Y - \bar{Y})^2}},$$

где X , Y – результаты отдельных определений; \bar{X} , \bar{Y} – средние арифметические каждого ряда определений; $(X - \bar{X})$, $(Y - \bar{Y})$ – отклонения каждого из определений от средней арифметической.

Коэффициенты корреляции колебались от 0 до +1 при положительной корреляции и от 0 до -1 – при отрицательной корреляции.

Подгонку теоретического распределения к наблюдаемым переменным мы оценивали по графику Quantile-quantile.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование белкового состава пульпы зуба человека в норме и при локальном воспалении

3.1.1. Спектры растворимых белков в пульпе временных и постоянных зубов в норме и при пульпите, выявленные методом электрофореза

Электрофорез в полиакриламидном геле водорастворимых белков пульпы постоянного зуба человека позволил нам разделить белки не только по заряду, но и по молекулярной массе (Mг) и форме молекул (таблица 13).

В интактной пульпе постоянных и временных зубов было выявлено по 8 белковых фракций с разной степенью электрофоретической подвижности. Это высокомолекулярные белки от 407 до 251 кДа, белки со средней Mг от 135 до 89 кДа и низкомолекулярные белки от 67 до 41 кДа. При этом, доля высоко- и низкомолекулярных белков была выше в пульпе постоянных зубов, а белки со средней Mг преобладали в пульпе временных зубов человека. В отличие от пульпы постоянных зубов, в пульпе временных зубов выявлялись белки с Mг 309 и 102 кДа. При остром пульпите в пульпе постоянных зубов определялось 4 белковые фракции. Исчезали белки с Mг 400, 251, 135, 89 и 41 кДа, но появлялись белки с Mг 309, 170 и 102 кДа. Следует также отметить, что при остром пульпите происходит изменение не только белкового спектра, но и уменьшается как общее количество белка, так и белка в каждой белковой фракции.

При хроническом пульпите в пульпе постоянных зубов исчезают высокомолекулярные белки 400 и 251 кДа, но увеличивается количество белков во фракциях с электрофоретической подвижностью $R_f = 0,5$ и $0,75$, что соответствует белкам с Mг 67, 41 и 32 кДа. Расположение белковых фракций было близко к показателям здоровой пульпы, но четко выявляется увеличение протеинов с малой молекулярной массой и исчезновение высокомолекулярных белков.

Таблица 13 - Содержание белка (усл. ед.) в белковых фракциях экстракта пульпы временных и постоянных зубов (интенсивность поглощения)

Mr, кДа	Rf	Постоянные зубы			Временные зубы	
		Интактная	Острый Пульпит	Хрон. пульпит	Интактная	Хрон. пульпит
407	0,10	6,99	---	---	5,06	---
309	0,17	---	---	---	1,77	---
275	0,20	1,11	0,52	0,42	1,24	---
251	0,21	6,11	---	---	---	---
170	0,30	1,01	---	1,17	3,83	1,25
135	0,35	2,03	---	1,50	4,87	---
102	0,40	---	1,03	2,07	1,45	---
89	0,45	---	---	---	---	3,33
67	0,50	1,74	1,6	4,05	1,67	1,11
41	0,60	0,04	---	4,00	---	---
32	0,75	3,68	1,11	4,21	1,58	1,13
Все го	-	22,71	4,26	18,77	21,47	6,82

Обозначения: **Rf** – относительная электрофоретическая подвижность

Выявленные изменения при хроническом пульпите постоянных зубов, возможно, обусловлены повышенным поступлением из плазмы крови альбуминов, которые соответствуют белковой фракции с молекулярной массой 67-69 кДа ($Rf = 0,60$), а также распадом высокомолекулярных белков до низкомолекулярных. При хроническом пульпите временных зубов выявлялись 4 белковые фракции и белки с молекулярной массой 89 кДа. Таким образом, количественный белковый состав в интактной пульпе временных и постоянных зубов различен, а при воспалении он существенным образом меняется.

3.1.2. Сравнительный анализ активности ферментов и содержания белков в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека

Нами были выявлены существенные различия в активности ряда ферментов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека (таблица 14). Так, в пульпе временных зубов человека, в отличие от пульпы постоянных зубов, активность ЛДГ не отличается ($p > 0,1$), а активность МДГ ($p > 0,05$) незначительно понижена.

Таблица 14 - Активность ферментов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека ($M \pm m$)

Ферменты	Интактная пульпа	
	Временные зубы (n=9)	Постоянные зубы (n=33)
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	30,3± 3,14	27,2±3,11
МДГ (ммоль/мин·г ткани)	7,44±2,15	10,2±0,41
СОД (мкмоль/мин·г ткани)	2,91± 0,12	6,30±1,26*
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	84,8±10,7	2,40±0,79**
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	254±34,7	17,1±3,14**
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	72,1±9,51	40,2±8,45*

Примечание: достоверность отличий * $*p < 0,001$; $*p < 0,05$ по сравнению с данными интактной пульпы временных зубов

Исследование активности ферментов антиоксидантной защиты показало, что в интактной пульпе временных и постоянных зубов не была выявлена активность ГПО, но определялась активность СОД, которая в пульпе временных зубов в 2 раза ниже по сравнению с пульпой постоянных зубов.

Активность ЩФ, АСТ и АЛТ в пульпе временных зубов достоверно ($p < 0,001$; $p < 0,05$) выше, чем в пульпе постоянных зубов.

Помимо исследования ферментативной активности в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека было проведено сравнительное

определение количества ряда других биологически активных растворимых белков и пептидов (таблица 15).

Таблица 15 - Содержание растворимых белков и пептидов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека (M±m)

Показатели	Ед.изм	Временные зубы (n=45)	Постоянные зубы (n=229)
ИЛ-1β	пг/мг ткани	10,4±0,89	168±4,58**
ИЛ-4	пг/мг ткани	0,29±0,05	0,52±0,07*
IgG	мг/%	432±34,7	276±28,7*
IgM	мг/%	254±10,2	1381±99,8**
Лактоферрин	пг/мг ткани	5,61±0,91	10,5±1,00*
Каспаза-9	нг/мг ткани	1,37±0,70	1,53±0,31
Аннексин V	пг/мг ткани	1,82±0,34	0,67±0,11*
ФНО-α	пг/мг ткани	22,7±0,93	12,3±0,21*
ОК	нг/мг ткани	3,71±1,12	5,11±1,27
ВAP	нг/мг ткани	199±21,8	174±15,4
sRANKL	пмоль/мг ткани	0,67±0,05	-
OPG	пмоль/мг ткани	0,07±0,02	-
оФРФ-β	пг/мг ткани	94,6±10,1	94,9±8,64
ИФР-1	пг/мг ткани	3,08±0,24	5,64±0,73
ТФР-β	пг/мг ткани	2500±126	3319±400

Примечание: достоверность отличий * *p<0,001; *p<0,05 по сравнению с данными интактной пульпы временных зубов

В интактной пульпе постоянных зубов человека количество белков неспецифического иммунитета – провоспалительного ИЛ-1β, противовоспалительного ИЛ-4 и белка антибактериальной защиты лактоферрина было достоверно (p<0,001; p<0,05) выше, чем в пульпе временных зубов. Также в интактной пульпе временных и постоянных зубов достоверно (p<0,001; p<0,05) отличалось количество иммуноглобулинов М и G, и не выявлялся IgA. Количество IgG было выше в пульпе временных зубов, а содержание IgM превалировало в пульпе постоянных зубов.

В пульпе временных зубов человека было выявлено высокое (p<0,05) содержание белков маркеров апоптоза аннексина V и ФНО-α и повышенное (p<0,05) количество костного изофермента ЩФ.

В интактной пульпе постоянных зубов человека, в отличие от пульпы временных зубов, не выявлялись sRANKL и OPG. Содержание остеокальцина, факторов роста - фибробластов- β , трансформирующего- β , инсулиноподобного-1, а также каспазы-9 не имело досовременных отличий между изученными образцами пульпы.

Пульпа временных и постоянных зубов также отличалась и по содержанию аминокислоты гомоцистеина (Hcy), которое в пульпе постоянных зубов было достоверно ($p < 0,05$) выше ($0,57 \pm 0,18$ мкмоль/г ткани) по сравнению с пульпой временных зубов человека ($0,11 \pm 0,03$ мкмоль/г ткани) (рисунок 5).

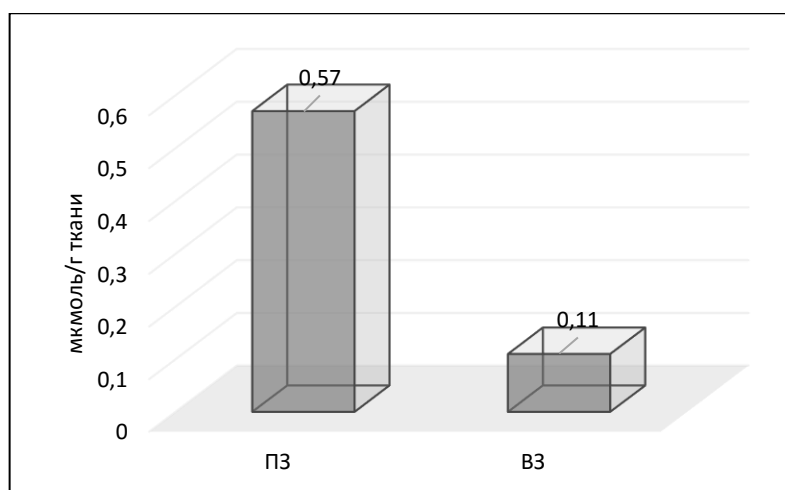


Рисунок 5 - Содержание гомоцистеина (мкмоль/г ткани) в интактной пульпе временных (ВЗ) и постоянных зубов (ПЗ) человека

Таким образом, в пульпе временных зубов выявляются заметные отличия в активности АСТ, АЛТ, ЩФ и СОД, связанные с более интенсивной перестройкой межклеточного матрикса дентина. Анаэробные процессы в пульпе временных и постоянных зубов протекают на одинаковом уровне, а аэробные процессы несколько выше в пульпе постоянных зубов. В пульпе постоянных зубов выше уровни белков неспецифического иммунитета, а в пульпе временных зубов содержание белков-маркеров апоптоза и резорбции минерализованных тканей, что отражает различия в

сроках жизни и перспективах сохранения жизнеспособности временных и постоянных зубов.

3.1.3. Активность ферментов в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении

В пульпе постоянных и временных зубов изучены белки с каталитической активностью, отражающие функциональное состояние клеток пульпы зуба при развитии воспаления (таблица 16).

При гиперемии пульпы постоянных зубов человека активность СОД и ЩФ достоверно ($p < 0,001$) повышалась, а активность АЛТ существенно ($p < 0,05$) снижалась по сравнению с интактной пульпой. Активность МДГ, АСТ, ЛДГ и α -гликозидазы достоверно не отличалась ($p > 0,05$) от таковой в пульпе интактных зубов.

При остром пульпите наблюдалось достоверное ($p < 0,001$; $p < 0,05$) повышение активности ЛДГ, ЩФ, α -гликозидазы и снижение активности МДГ АСТ, АЛТ по отношению к данным, полученным в интактных образцах. При хроническом пульпите выявлена достоверно ($p < 0,05$) низкая активность АСТ, АЛТ, ЩФ и ЛДГ и высокая активность α -ГЛ по сравнению с интактной пульпой, что свидетельствует о снижении интенсивности метаболических процессов. Нами не обнаружены достоверные различия в активности СОД при остром и хроническом пульпите по сравнению с нормой.

Полип пульпы представляет собой разрастание грануляционной ткани с покровным неороговевающим плоским эпителием в полости зуба (Freitas P. et al., 2007). В образцах полипа пульпы зуба человека выявлялась крайне низкая ($p < 0,05$) активность ЛДГ, МДГ, СОД и ЩФ на фоне значительного повышения ($p < 0,05$) активности АСТ, АЛТ и α -ГЛ по сравнению с активностью этих ферментов в интактной пульпе и другими формами воспаления пульпы.

Таблица 16 - Активность ряда ферментов в пульпе постоянных зубов человека при воспалении ($M \pm m$)

Состояние пульпы зуба по МКБ-10	Ферменты						
	АСТ (ммоль/мин·г ткани)	АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	ЛДГ (мкмоль/мин· г ткани)	МДГ (ммоль/мин·г ткани)	СОД (мкмоль/мин· г ткани)	ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	α -ГЛ (ммоль/мин·г ткани)
Интактная пульпа (n=33)	17,1 \pm 3,14	2,40 \pm 0,79	27,2 \pm 3,11	10,2 \pm 1,41	6,30 \pm 1,26	40,2 \pm 8,45	1,20 \pm 0,07
Гиперемия пульпы (K04.00) (n=12)	18,8 \pm 3,08	0,54 \pm 0,13*	20,0 \pm 4,08	12,4 \pm 0,12	42,3 \pm 5,14**	122 \pm 23,5**	1,00 \pm 0,13
Острый пульпит (K04.01) (n=11)	11,4 \pm 0,70*	0,76 \pm 0,19*	47,5 \pm 7,30**	6,90 \pm 0,33*	5,40 \pm 0,80	135 \pm 21,5**	18,0 \pm 3,80**
Хронический пульпит (K04.03) (n=24)	5,60 \pm 0,15**	0,01 \pm 0,006**	1,30 \pm 0,04**	1,34 \pm 0,03**	6,30 \pm 1,40	13,0 \pm 2,30**	3,00 \pm 0,20**
Пульпарный полип (K04.05) (n=5)	41,5 \pm 6,18**	18,6 \pm 4,10**	13,0 \pm 2,10**	4,53 \pm 0,09**	0,34 \pm 0,04**	9,50 \pm 1,80**	61,0 \pm 12,4**

Примечание: достоверность отличий * * $p < 0,001$; * $p < 0,05$ по сравнению с данными интактной пульпы

В пульпе временных зубов при воспалении активность ЛДГ, АЛТ и ЩФ достоверно ($p < 0,001$; $p < 0,05$) повышалась, а активность АСТ, МДГ и СОД значимо не отличалась ($p > 0,05$; $p > 0,1$) от данных, полученных в интактной пульпе (таблица 17).

Таблица 17 - Активность ряда ферментов в пульпе временных зубов при хроническом пульпите ($M \pm m$)

Ферменты	Состояние пульпы по МКБ-10	
	Интактная пульпа (n=9)	Хронический пульпит (n=28)
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	30,3± 3,14	59,1±7,28**
МДГ (ммоль/мин·г ткани)	7,44±2,15	8,41±2,83
СОД (мкмоль/мин·г ткани)	2,91± 0,12	2,24±1,34
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	84,8±10,7	233±35,4**
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	254±34,7	191±34,5
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	72,1±9,51	365±47,4**

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с данными интактной пульпы

Таким образом, активность ферментов в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении изменяется. Результатами исследования установлена низкая способность системы антиоксидантной защиты пульпы временных и постоянных зубов противостоять действию патогенов при воспалении. Активность ЛДГ при острой стадии пульпита постоянных зубов и хроническом воспалении пульпы временных зубов существенно возрастала. При дальнейшей хронизации воспалительного процесса в пульпе постоянных зубов активность этого фермента подавлялась.

3.1.4. Активность моноаминоксидаз в пульпе постоянных зубов человека при остром пульпите

Аминоксидазы катализируют реакцию окислительного дезаминирования биогенных аминов (адреналин, норадреналин, дофамин, серотонин, гистамин и др.). С учетом того, что в других органах и тканях эти ферменты относят к числу основных «поставщиков» пероксида водорода – ключевого метаболита, вовлеченного в развитие свободнорадикальных реакций и окислительного стресса, есть все основания предположить, что моноаминоксидазы могут играть определенную роль в развитии воспалительного процесса в пульпе.

На основании ингибиторного анализа нами было установлено, что в пульпе зубов человека, кроме MAO A и B, присутствует также семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (SSAO) (рисунок 6).

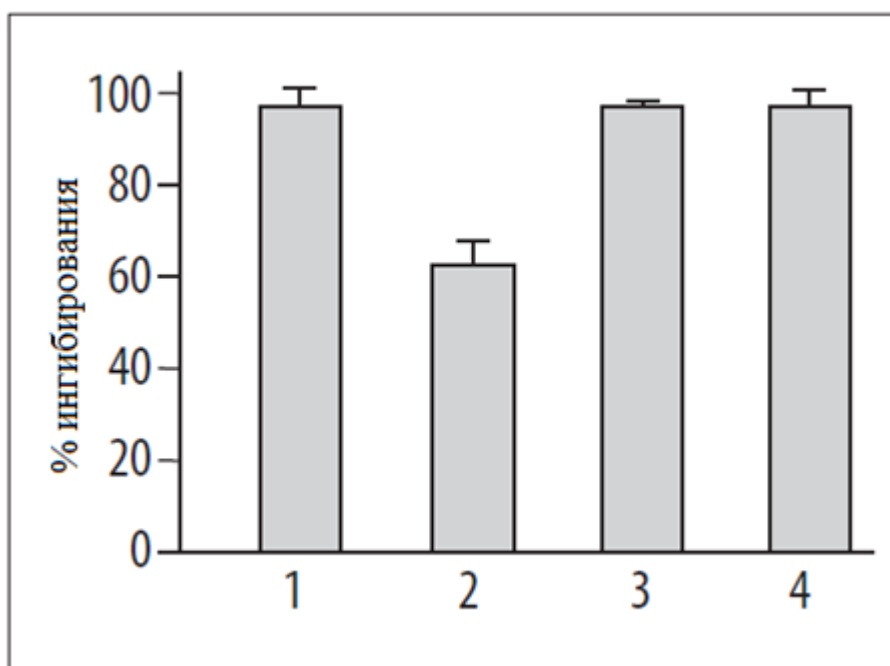


Рисунок 6 - Проявление эффектов ингибиторов 1 mM хлоргилина (1–4) и 10 mM семикарбазида (3) на дезаминирование 5-гидрокситриптамина (4), а также низкой (10 μ M; 1) и высокой (50 μ M; 2, 3) концентрации фенилэтиламина гидрохлорида в гомогенатах пульпы (1–3, 4)

В присутствии хлоргилина активность MAO A и B полностью подавляется. Однако, в пульпе зубов при высокой концентрации

фенилэтиламина остаточная аминоксидазная активность составила $34,3 \pm 7,1\%$ от исходного уровня. Это свидетельствует о наличии аминоксидазы, отличной от MAO A или B. Использование семикарбазида в сочетании с хлоргилином приводило к 100%-му ингибированию аминоксидаз в образцах пульпы. Таким образом, в пульпе зубов человека присутствует MAO A, MAO B и SSAO.

Согласно полученным результатам, в пульпе постоянных зубов человека наибольшую активность проявляет MAO типа A ($0,18 \pm 0,10$ нмоль/мин·мг ткани), достоверно ($p < 0,05$) меньше была активность у MAO типа B ($0,08 \pm 0,01$ нмоль/мин·мг ткани) и самой низкой активностью обладает SSAO ($0,02 \pm 0,004$ нмоль/мин·мг ткани) (рисунок 7).

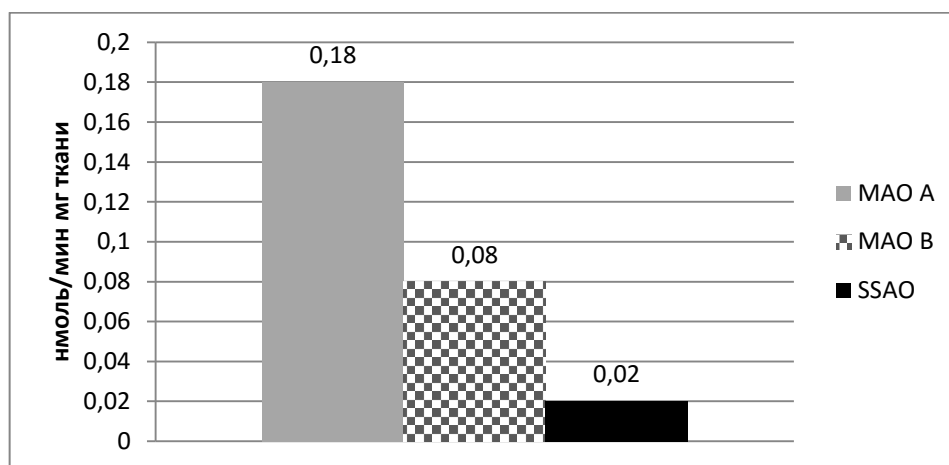


Рисунок 7 - Активность моноаминоксидаз (нмоль/мин·мг ткани) в интактной пульпе постоянных зубов человека

При остром воспалении пульпы постоянного зуба суммарная MAO-активность была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в интактной пульпе ($0,08 \pm 0,03$ против $0,03 \pm 0,02$ нмоль/мин·мг ткани). На фоне острого пульпита активность MAO типа A была сопоставима с её уровнем в интактной пульпе, активность MAO типа B существенно снижалась ($p < 0,001$), а активность семикарбазид-чувствительной аминоксидазы (SSAO) достоверно возрастала ($p < 0,05$) (рисунок 8).

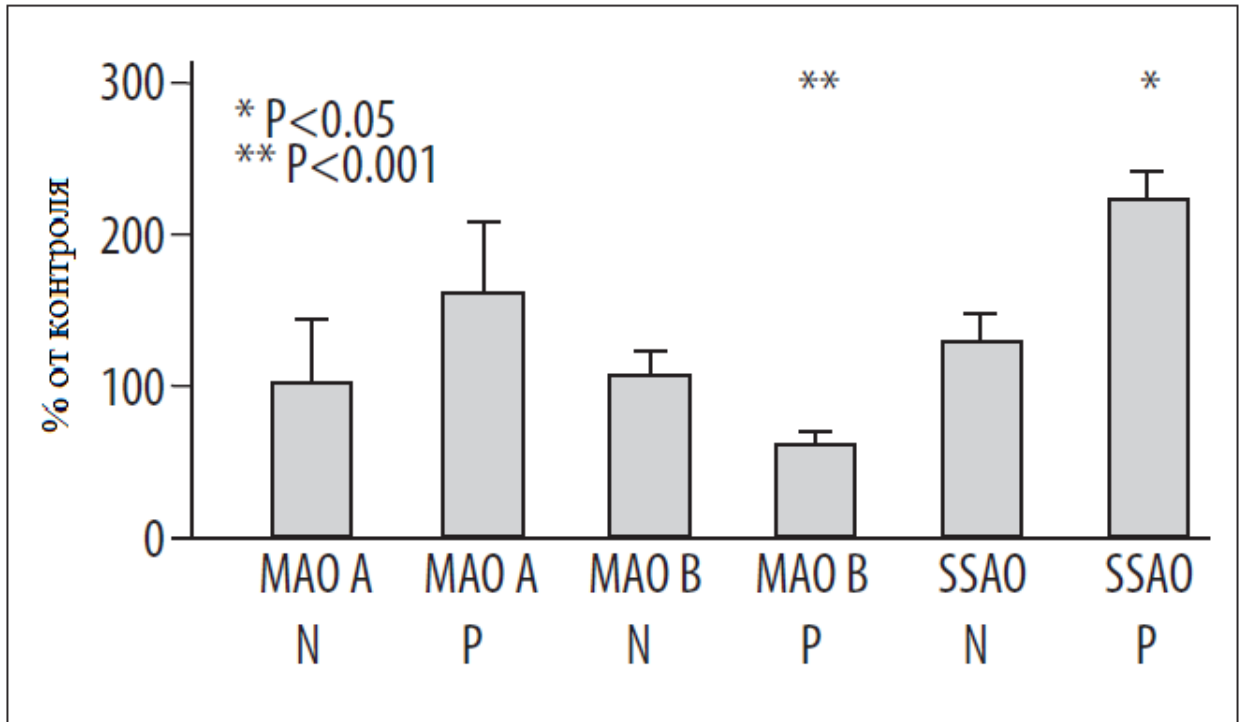


Рисунок 8 - Активность моноаминоксидаз (нмоль/мин·мг ткани) в пульпе постоянных зубов человека в норме (N) и при остром воспалении (P). За 100% принимали активность MAO A, MAO B и SSAO в интактной пульпе

Снижение активности MAO B, субстратом которой является дофамин, очевидно, снижает образование H_2O_2 , одного из участников свободно-радикального повреждения клеток при воспалении. Сохранение активности MAO A, имеет смысл для инактивации медиатора воспаления – серотонина. Возрастание SSAO возможно вызвано увеличением проницаемости сосудов пульпы при воспалении и поступлением этого фермента из плазмы крови.

3.1.5. Содержание белков неспецифического иммунитета в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении

Многочисленные исследования выявили активное участие пульпы зуба в иммунном ответе на различные воздействия факторов внешней и внутренней среды, которые реализуют различные иммунокомпетентные клетки с участием защитных белков и пептидов.

При гиперемии пульпы постоянных зубов содержание IgM достоверно ($p < 0,001$) возрастает, а содержание IgG не отличается ($p > 0,05$) от значений,

полученных в пульпе интактных постоянных зубов человека. При остром пульпите постоянных зубов практически не изменяется количество IgM ($p>0,05$) и не определяется IgG (таблица 18).

Таблица 18 - Содержание иммуноглобулинов в пульпе постоянных зубов при воспалении ($M\pm m$)

Состояние пульпы зуба по МКБ-10	Иммуноглобулины (мг/%)		
	IgM	IgG	IgA
Интактная пульпа (n=33)	1381±99,8	276±28,7	-
Гиперемия пульпы (K04.00) (n=12)	1880±80,3**	297±34,5	-
Острый пульпит (K04.01) (n=10)	1378±67,8	-	-
Хронический пульпит (K04.03) (n=52)	1226±112	566±45,4**	-
Хронический язвенный пульпит (K04.04) (n=9)	1223±89,4	-	-
Пульпарный полип (K04.05) (n=5)	-	-	36,3±4,56**
Хронический пульпит в стадии обострения (K04.08) (n=19)	1171±93,7	438±21,5**	-

Примечание: достоверность отличий * $p<0,001$ по сравнению с данными интактной пульпы

При хроническом пульпите выявляется тенденция ($p>0,05$) к снижению уровня IgM, а количество IgG достоверно увеличивается ($p<0,001$). При хроническом язвенном пульпите сохраняется тенденция к понижению IgM ($p>0,05$) и выявляется отсутствие IgG. Стадия хронического пульпита в период обострения сопровождалась еще большим ($p>0,05$) понижением IgM по сравнению с интактной пульпой и другими формами патологического состояния пульпы зуба. Это понижение происходит на фоне достоверного роста количества IgG ($p<0,001$). Для пульпарного полипа не определялось содержание IgM и IgG, но наблюдалось появление IgA ($p<0,001$). Это свидетельствует о принципиальном гистологическом отличии этого патологического образования от ткани, формирующей пульпу зуба.

Источником IgA в полипе пульпы постоянных зубов, вероятно, являются клетки эпителия, покрывающие полип.

При хроническом воспалении в пульпе временных зубов количество IgG практически не менялось ($p > 0,5$), а содержание IgM, напротив, достоверно возросло ($p < 0,05$) по сравнению с значениями, полученным в интактной пульпе (таблица 19).

Таблица 19 – Содержание иммуноглобулинов в пульпе временных зубов при хроническом пульпите ($M \pm m$)

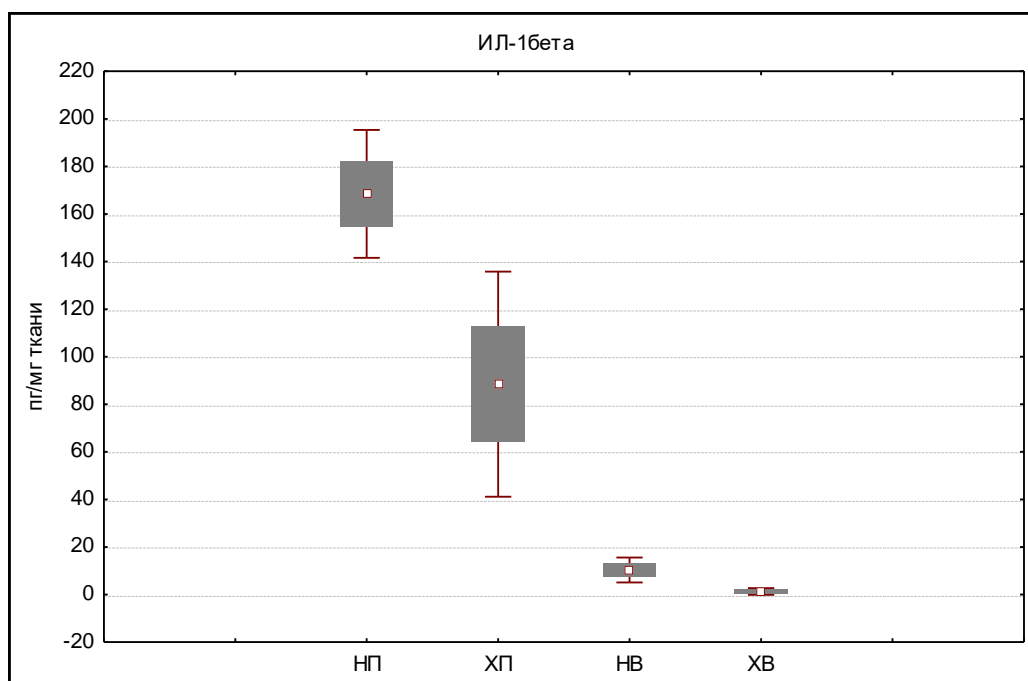
Иммуноглобулины (мг/%)	Состояние пульпы по МКБ-10	
	Интактная пульпа (n=6)	Хронический пульпит (n=10)
Ig G	432±34,7	400±82,4
Ig M	254±10,2	472±48,4*

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$ по сравнению с данными интактной пульпы

В активации иммунного ответа важная роль отводится цитокинам – гормоноподобным пептидам, которые действуют на клетки аутокринно и паракринно. Роль цитокинов при развитии воспаления заключается в действии провоспалительных и противовоспалительных пептидов в качестве сигнальных мессенджеров для защитных клеток, а также клеток, участвующих в ангиогенезе и репарации тканей.

В пульпе зуба в синтезе провоспалительного ИЛ-1, помимо клеток моноцит-макрофагальной линии, участвуют клетки одонтобластического слоя. В случае воспаления в пульпе зуба ИЛ-1 обеспечивает приток лейкоцитов, усиливает пролиферацию лимфокинов и лимфоцитов для снижения распространения очага воспаления (Bletsa A. et al., 2006). При развитии хронического воспаления количество ИЛ-1 β достоверно ($p < 0,05$) снижалось в пульпе как временных (1,29±0,24 пг/мг ткани), так и постоянных зубов (88,4±8,05 пг/мг ткани) (рисунок 9). Вместе с тем, содержание этого

цитокина в пульпе постоянных зубов при хроническом пульпите оставалось выше, чем в пульпе временных зубов ($p < 0,05$).



Примечание: НП и НВ - интактная пульпа постоянных и временных зубов; ХП и ХВ – хронический пульпит постоянных и временных зубов

Рисунок 9 - Количество интерлейкина-1 β (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

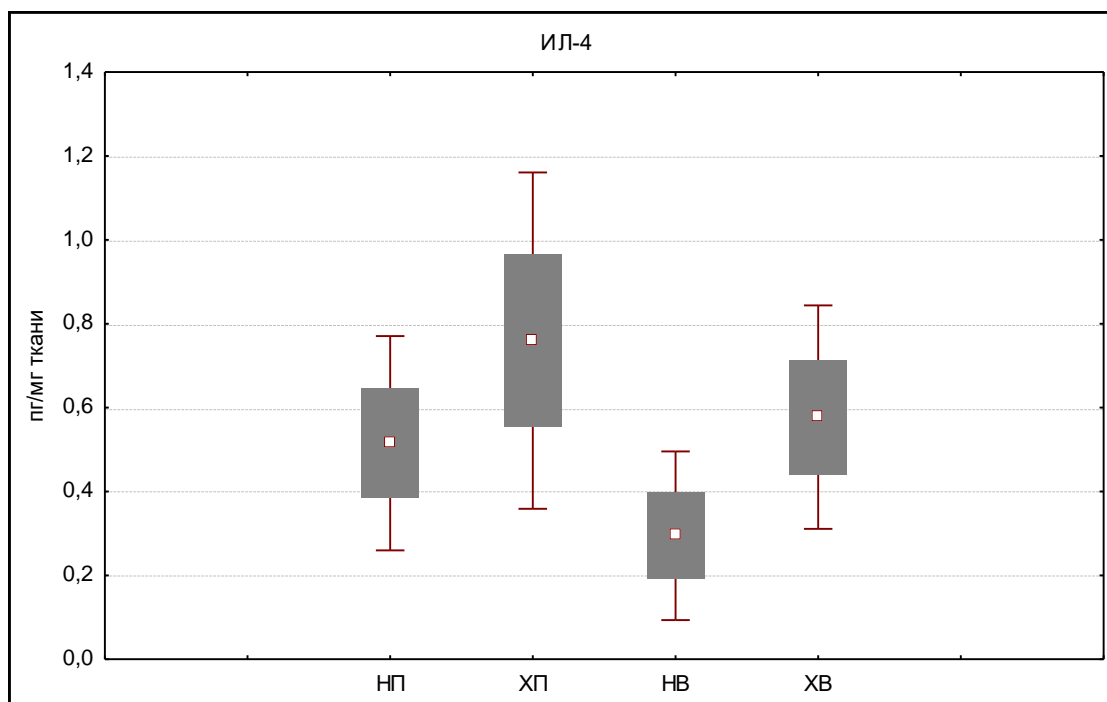


Рисунок 10 – Количество интерлейкина-4 (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Противовоспалительный цитокин ИЛ-4 синтезируется Т-лимфоцитами и побуждает В-лимфоциты активно синтезировать иммуноглобулины. Содержание ИЛ-4 в образцах интактной пульпы постоянных зубов ($0,52 \pm 0,07$ пг/мг ткани) было достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в интактной пульпе временных зубов ($0,29 \pm 0,05$ пг/мг ткани) (рисунок 10). При развитии хронического воспаления количество ИЛ-4 как в пульпе постоянных зубов ($0,76 \pm 0,12$ пг/мг ткани), так и временных зубов ($0,58 \pm 0,07$ пг/мг ткани) имело тенденцию к увеличению ($p > 0,05$).

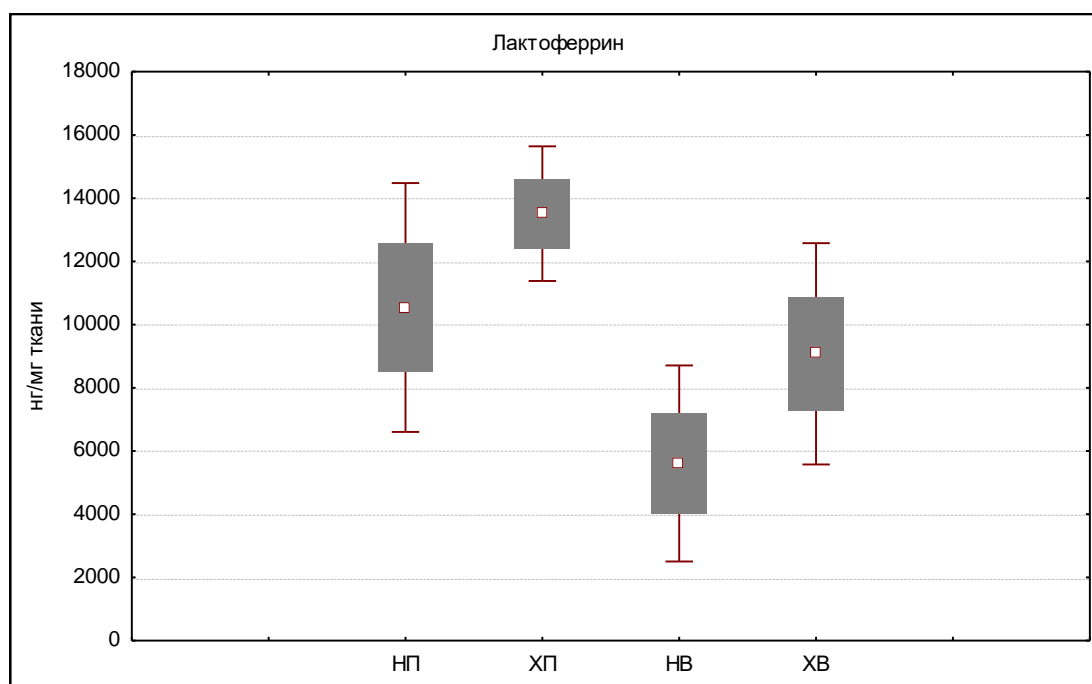


Рисунок 11 – Количество лактоферрина (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Лактоферрин обеспечивает защитные свойства путем конкурентного связывания с бактериальными клетками за ион железа (Chapple D.S. et al., 2004; Velliyagounder K., 2014). Развитие хронического воспаления в пульпе зуба сопровождается достоверным ($p < 0,05$) увеличением содержания лактоферрина в пульпе временных зубов (9075 ± 893 нг/мг ткани) по отношению к значениям, полученным в образцах пульпы интактных зубов (рисунок 11). В пульпе постоянных зубов (13509 ± 627 нг/мг ткани) содержание лактоферрина также увеличивалось по отношению к данным интактной пульпы, но это повышение было недостоверным ($p > 0,05$).

Таким образом, изучение содержания белков неспецифического иммунитета в пульпе временных и постоянных зубов человека показало, что их защитные свойства в большей степени выражены в пульпе постоянных зубов человека и их количество меняется при развитии патологического процесса.

3.1.6. Содержание белков-маркеров апоптоза в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении

В здоровом организме в рамках установленных законов биологии происходит ежедневное обновление клеток. Запрограммированная гибель клеток – апоптоз - протекает постепенно и безболезненно. Регулируют процессы апоптоза протеиназы, рецепторы «смерти» на поверхности клеток, митохондрии, в частности цитохром с, про- и антиапоптозные белки. Вторичными мессенджерами выступают активные формы кислорода и Ca^{2+} .

При хроническом воспалении в пульпе постоянных зубов не выявлялось изменение ($p>0,05$) количества каспазы-9 ($1,02\pm 0,10$ нг/мг ткани), а в пульпе временных зубов наблюдалось достоверное ($p>0,05$) её увеличение до $4,71\pm 0,54$ нг/мг ткани (рисунок 12).

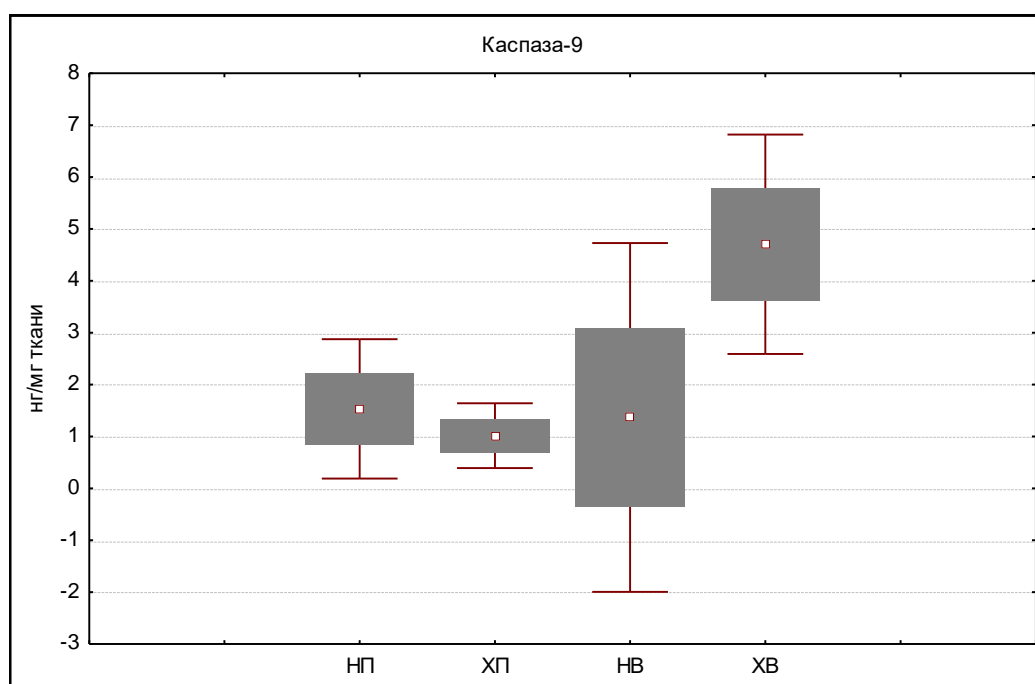


Рисунок 12 – Количество каспазы-9 (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Корреляционный анализ с использованием графика Quantile-quantile показал высокодостоверную ($p < 0,05$) прямую корреляционную зависимость данных электровозбудимости (ЭОД) пульпы зуба и уровня каспазы-9 в образцах (рисунок 13). На этом графике показана хорошая связь между наблюдаемыми значениями переменных.

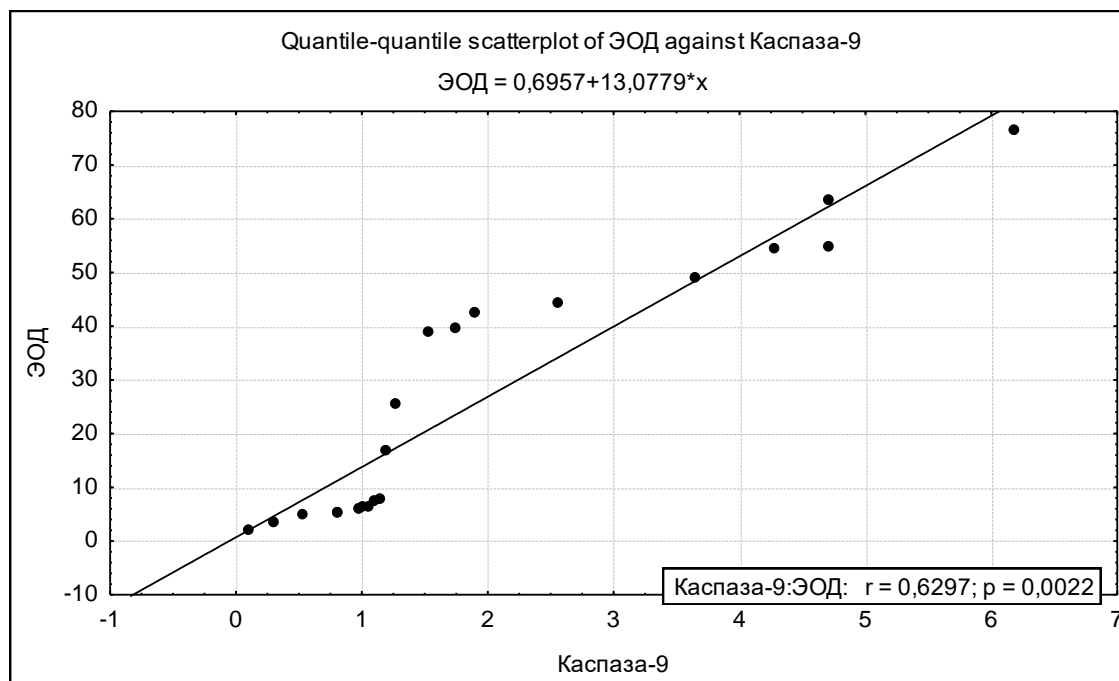


Рисунок 13 – Распределение наблюдаемых данных ЭОД с количеством каспазы-9 в пульпе постоянных и временных зубов человека

Установлено, что ранними проявлениями апоптоза является перемещение фосфатидилсерина с внутренней части мембраны клетки на внешнюю часть. Белок аннексин V, связываясь с фосфатидилсерином на поверхности клетки, предотвращает активацию апоптоза (Kirsch T. et al., 1997). В молекуле аннексина V имеется пять участков связывания с кальцием, поэтому он также принимает участие в его транспортировке в зону преддентина зуба (Balcerzak M. et al., 2003; Goldberg M., Smith A.J., 2004).

Хронический пульпит в постоянных ($0,88 \pm 0,03$ пг/мг ткани) и временных ($4,90 \pm 0,70$ пг/мг ткани) зубах человека сопровождался увеличением количества аннексина V по сравнению с данными, полученными в интактной пульпе (рисунок 14). Увеличение этого белка в пульпе постоянных зубов было достоверно ($p < 0,05$) значимым.

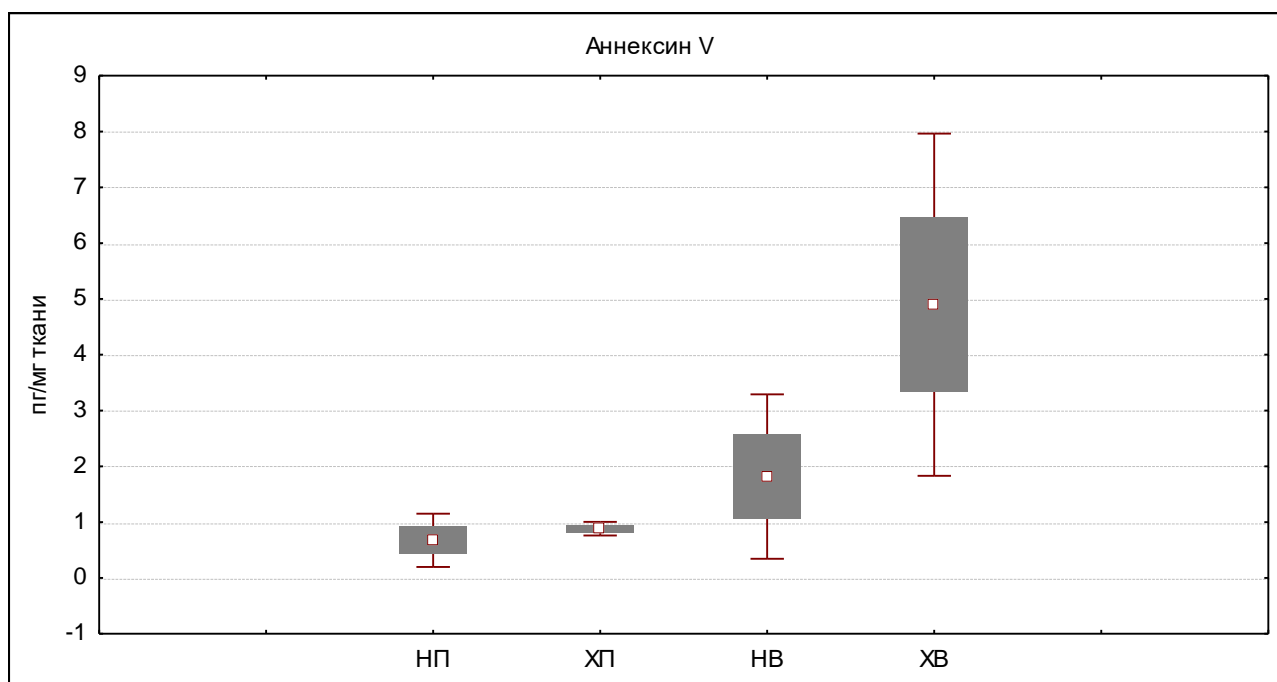


Рисунок 14 – Количество аннексина V (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Показана прямая высокодостоверная ($p < 0,005$) положительная связь между значениями ЭОД и количества аннексина V в пульпе зуба (рисунок 15).

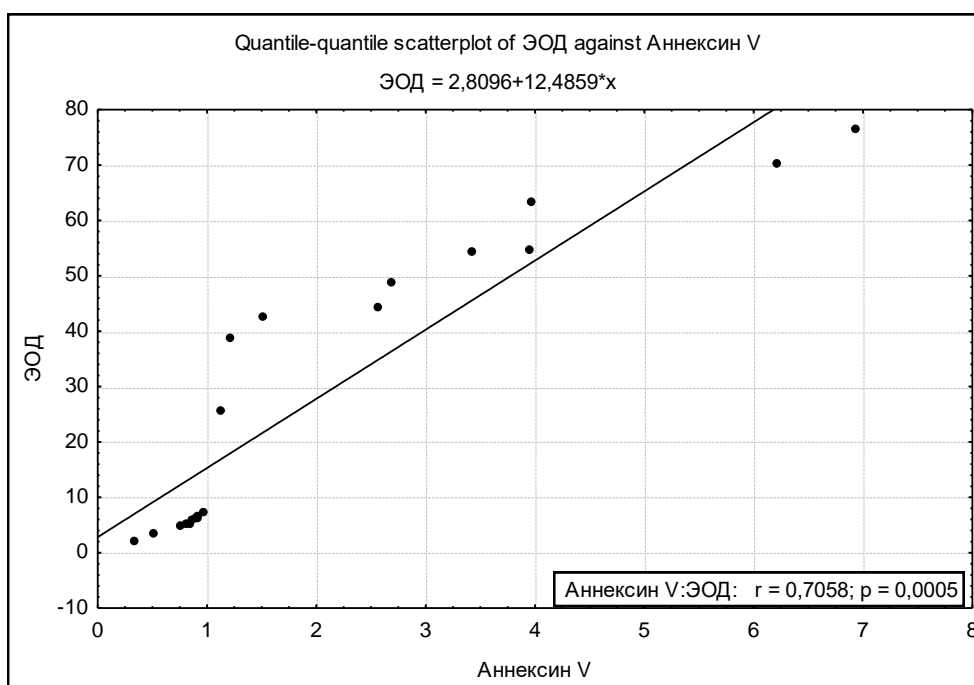


Рисунок 15 – Распределение наблюдаемых данных ЭОД с количеством аннексина V в пульпе постоянных и временных зубов человека

Секретируемый моноцитами, макрофагами, Т-лимфоцитами фактор некроза опухоли запускает внутриклеточный каскад активации каспаз и способен вызывать некроз клеток в очаге воспаления (Козлов В.А., 2002; Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю., 2002; Nedrebo T. et al., 1999).

При воспалении в пульпе постоянных зубов количество ФНО- α недостоверно ($p>0,05$) возросло до $14,7\pm 0,87$ пг/мг ткани, а в пульпе временных зубов это увеличение было более выражено ($p<0,05$) и достигало $33,0\pm 1,64$ пг/мг ткани (рисунок 16).

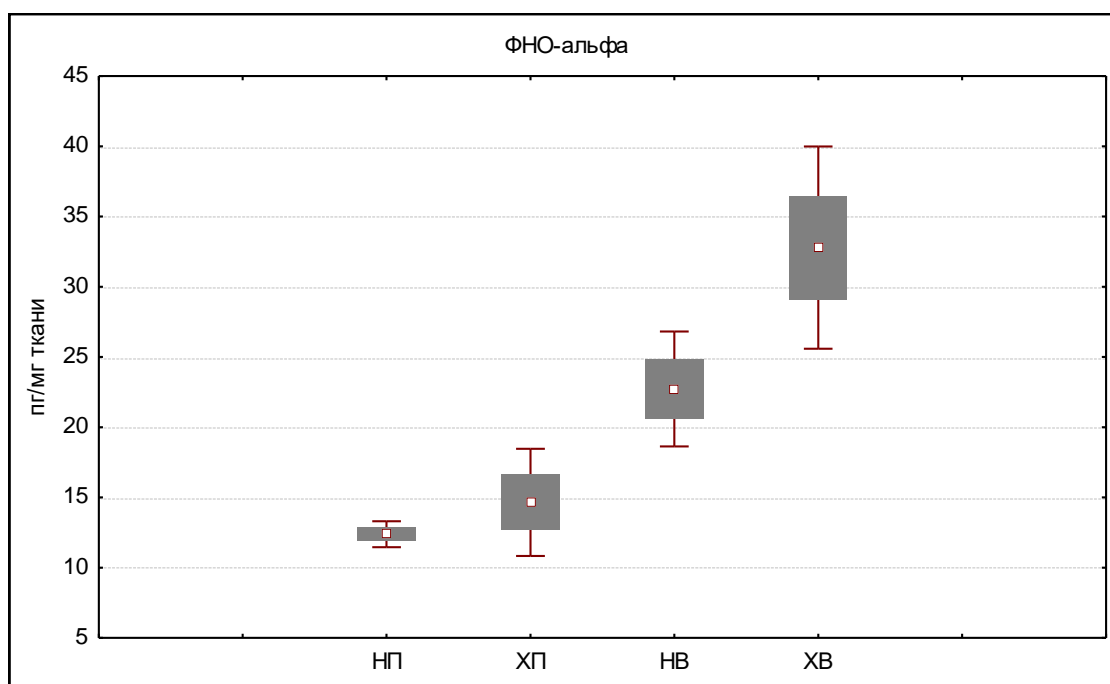


Рисунок 16 – Количество ФНО- α (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Корреляционный анализ показал прямую высокодостоверную взаимосвязь между количеством ФНО- α и ЭОД в пульпе зубов ($R=0,59$; $p=0,006$), что свидетельствует о значительной взаимосвязи между повышением уровня ФНО- α в биоптатах пульпы зубов и понижением электровозбудимости клеток пульпы.

Картина сопоставления переменных ЭОД с количеством ФНО- α в пульпе временных и постоянных зубов человека представлена на графике Квантиль (рисунок 17).

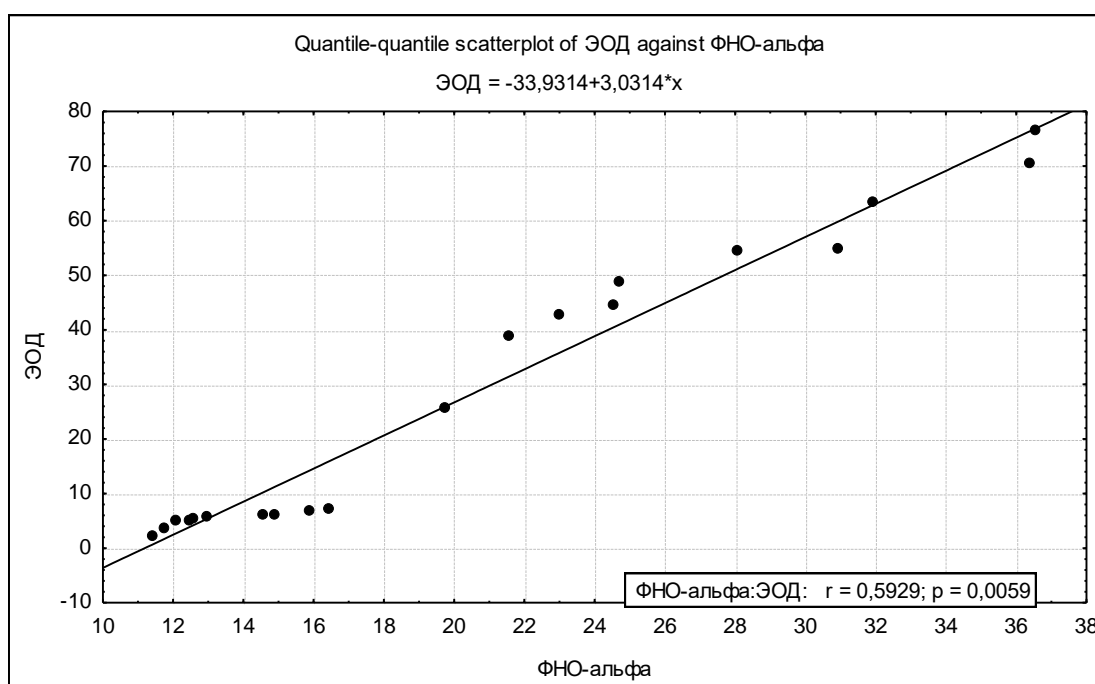


Рисунок 17 – Распределение наблюдаемых данных ЭОД пульпы зуба с количеством ФНО- α в пульпе постоянных и временных зубов человека

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 постоянных зубов при хроническом пульпите незначительное повышение в содержании аннексина V, каспазы-9 и ФНО- α может свидетельствовать о сохранении длительного воспаления с отсроченной гибелью клеток пульпы.

3.1.7. Содержание белков, влияющих на состояние минерализованного матрикса зуба, в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении

Остеокальцин синтезируется в пульпе зуба одонтобластами и участвует в транспорте ионов Ca^{2+} в зону преддентина (Abd-Elmeguid A. et al., 2013). Развитие хронического пульпита в постоянных и временных зубах человека сопровождалось недостоверным ($p > 0,5$) понижением количества остеокальцина до $2,12 \pm 0,62$ и $1,77 \pm 0,39$ нг/мг ткани соответственно от значений, полученных в образцах интактной пульпы (рисунок 18).

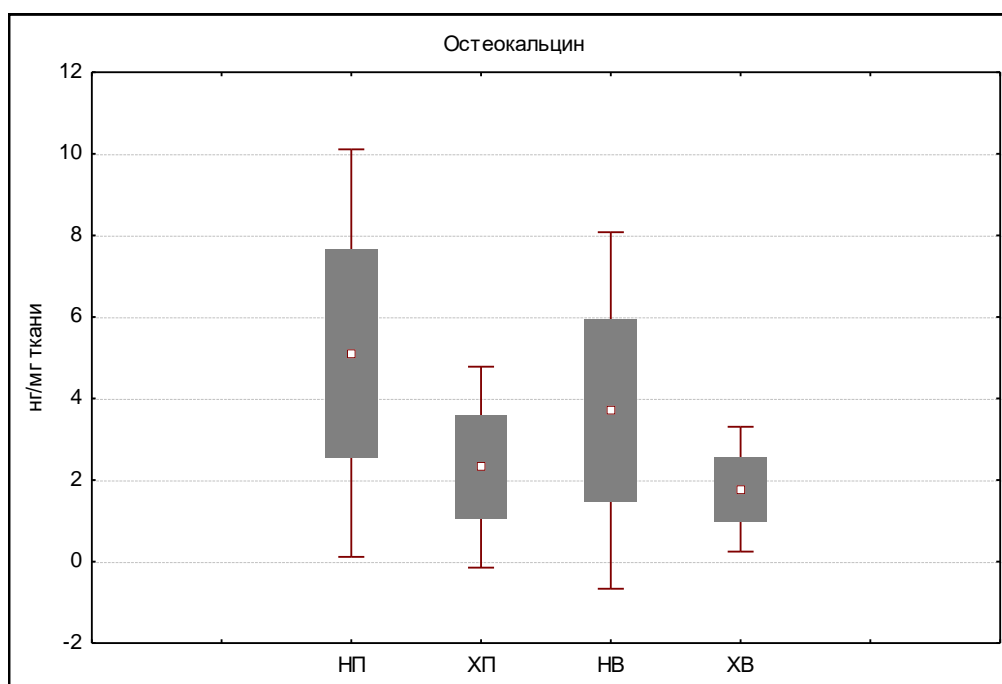


Рисунок 18 – Количество остеокальцина (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Помимо кальций-связывающих белков, локальную концентрацию фосфатов в минеральном матриксе зуба обеспечивают фосфогидролазы, которые отщепляют фосфатные группы от органических соединений.

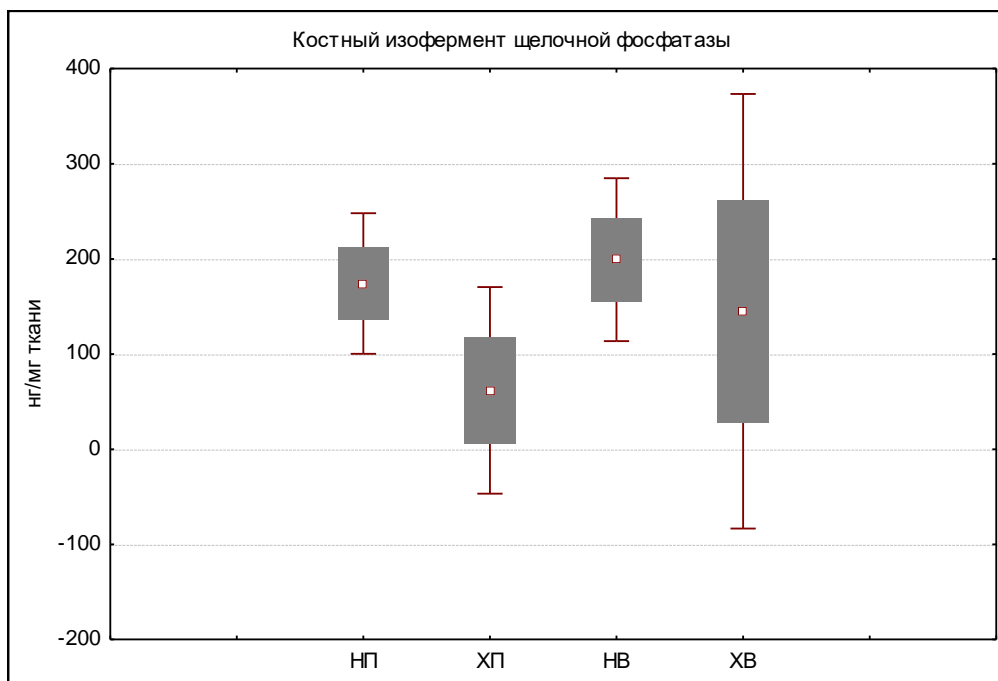


Рисунок 19 – Количество костного изофермента щелочной фосфатазы (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

При хроническом воспалении в образцах пульпы постоянных зубов наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) снижение количества КИЩФ ($61,8 \pm 27,7$ нг/мг ткани), а в пульпе временных зубов достоверных отличий не обнаружено ($145 \pm 52,1$ нг/мг ткани) (рисунок 19).

Итак, на фоне хронического воспаления, снижается количество КИЩФ и остеокальцина, что свидетельствует о нарушении трофической функции клеток пульпы зуба и, по всей вероятности, может сказаться на формировании репаративного дентина.

В образцах пульпы постоянных зубов при хроническом воспалении sRANKL выявляется в количестве $3,36 \pm 0,81$ пмоль/мг ткани ($p < 0,001$). В пульпе временных зубов при воспалении содержание sRANKL недостоверно ($p > 0,05$) возрастает до $1,53 \pm 0,48$ пмоль/мг ткани (рисунок 20).

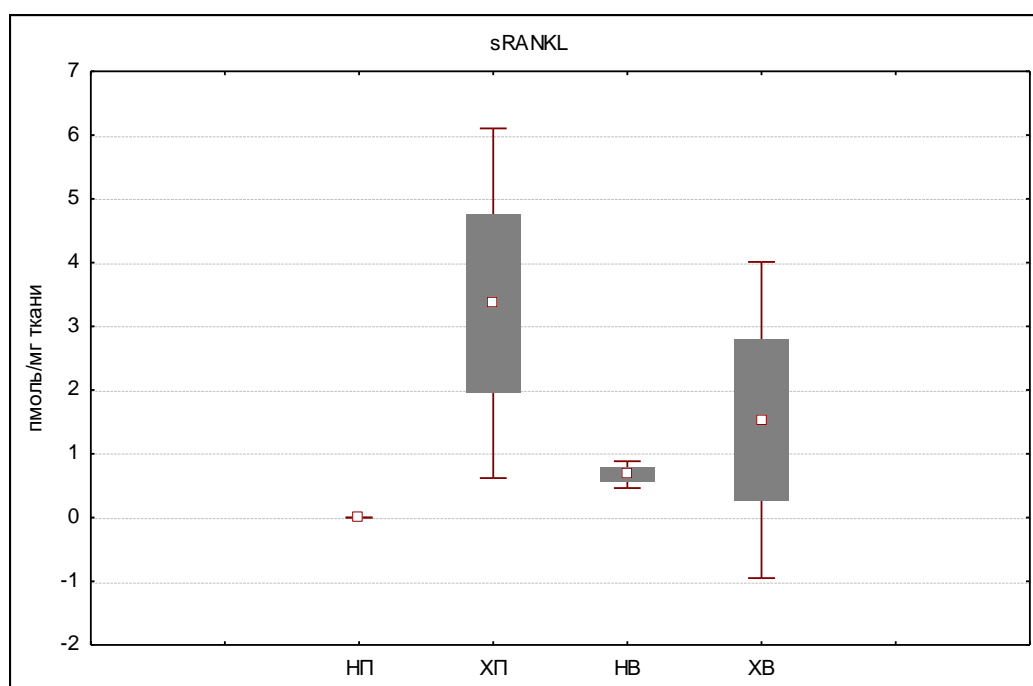


Рисунок 20 – Количество sRANKL (пмоль/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Развитие хронического воспаления приводило к появлению остеопротегерина в пульпе постоянных зубов ($0,07 \pm 0,008$ пмоль/мг ткани) и достоверному ($p < 0,001$) снижению его количества в пульпе временных зубов ($0,006 \pm 0,001$ пмоль/мг ткани) (рисунок 21).

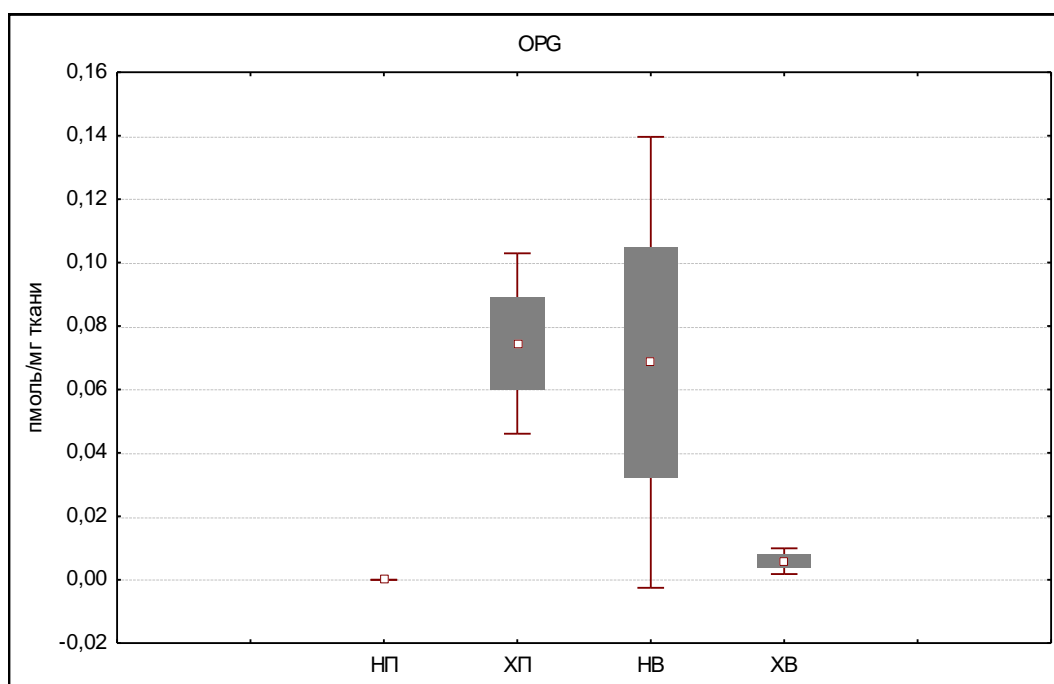


Рисунок 21 – Количество остеопротегерина (OPG) (пмоль/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Для оценки степени резорбции твердых тканей зуба в пульпе временных и постоянных зубов человека при воспалении мы рассчитали соотношение RANKL/OPG (рисунок 22).

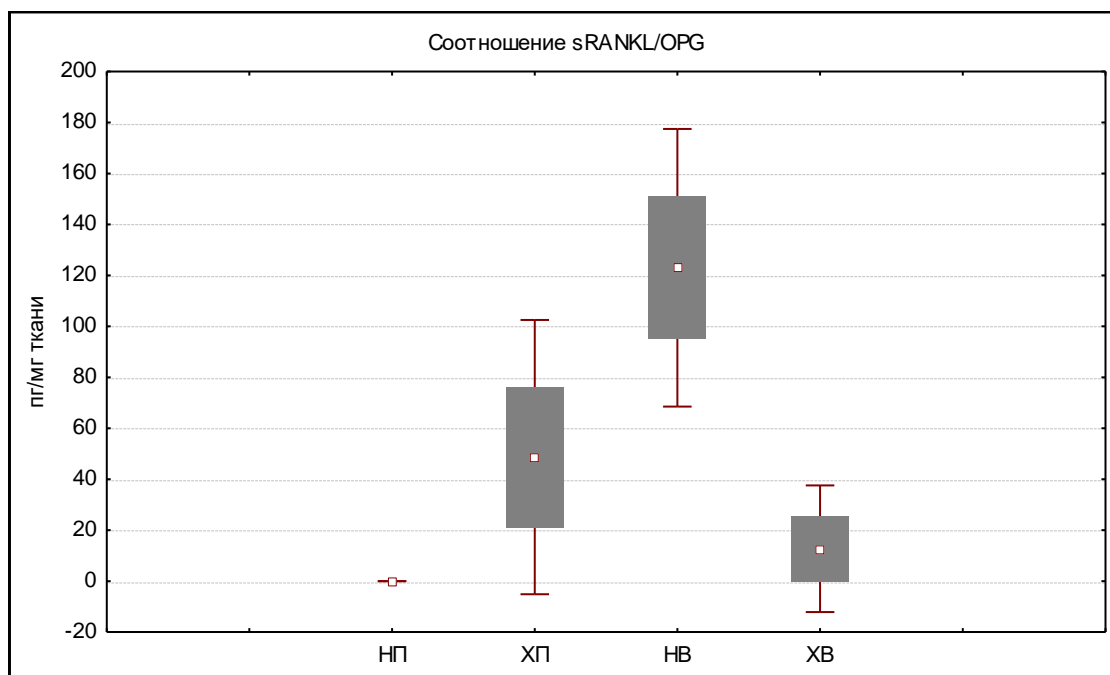


Рисунок 22 – Соотношение sRANKL/OPG в пульпе временных и постоянных зубов человека в норме и при хроническом воспалении

Оказалось, что в пульпе постоянных зубов при хроническом воспалении этот коэффициент достигал 48,7, тогда как в пульпе временных зубов эта цифра составила 12,7. Наибольшие значения коэффициента были получены в образцах интактной пульпы временных зубов ($RANKL/OPG = 123$), что свидетельствует о постоянно идущих процессах резорбции.

Таким образом, в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении на фоне увеличения sRANKL количество остеопротегерина падает, что свидетельствует о подавлении процессов минерализации и активации процессов резорбции в зубе.

3.1.8. Оценка регенераторной способности клеток пульпы временных и постоянных зубов при воспалении по количеству факторов роста

Показано, что стимулируемые фактором роста фибробластов клетки синтезируют коллаген, фибронектин, остеокальцин, остеопонтин, протеогликаны, гликозаминогликаны и др. компоненты (Маянский Д.Н., Урсов И.Г., 1997), которые необходимы для обновления и поддержания состава соединительнотканного матрикса пульпы зуба. Однако, регенерация межклеточного матрикса соединительной ткани невозможна без увеличения количества клеток, дифференцировку и быстрый рост которых обеспечивает ИФР-1. Установлено, что регенерация повреждённых участков пульпы зуба происходит при тесном взаимодействии фибробластов с другими клетками. Фибробласты способны вырабатывать ряд факторов роста - тромбоцитарный, трансформирующий- 1β , фибробластов и эндотелиальный, под влиянием которых активно продуцируют коллаген (Thesleff I., Mikkola M., 2002). Роль коллагена на фазе репарации заключается в формировании первичного каркаса или провизорного матрикса, и таким образом стимулируется формирование фиброзного рубца (Маянский Д.Н., Урсов И.Г., 1997).

Согласно полученным нами данным о содержании факторов роста ТФР- 1β , ИФР-1 и оФРФ- β в интактной пульпе постоянных и временных зубов количество ТФР- 1β превышает содержание оФРФ- β и ИФР-1. При развитии хронического пульпита в пульпе временных ($109 \pm 26,5$ пг/мг ткани)

и постоянных ($101 \pm 12,7$ пг/мг ткани) зубов количество оФРФ- β практически не изменялось ($p > 0,5$) (рисунок 23).

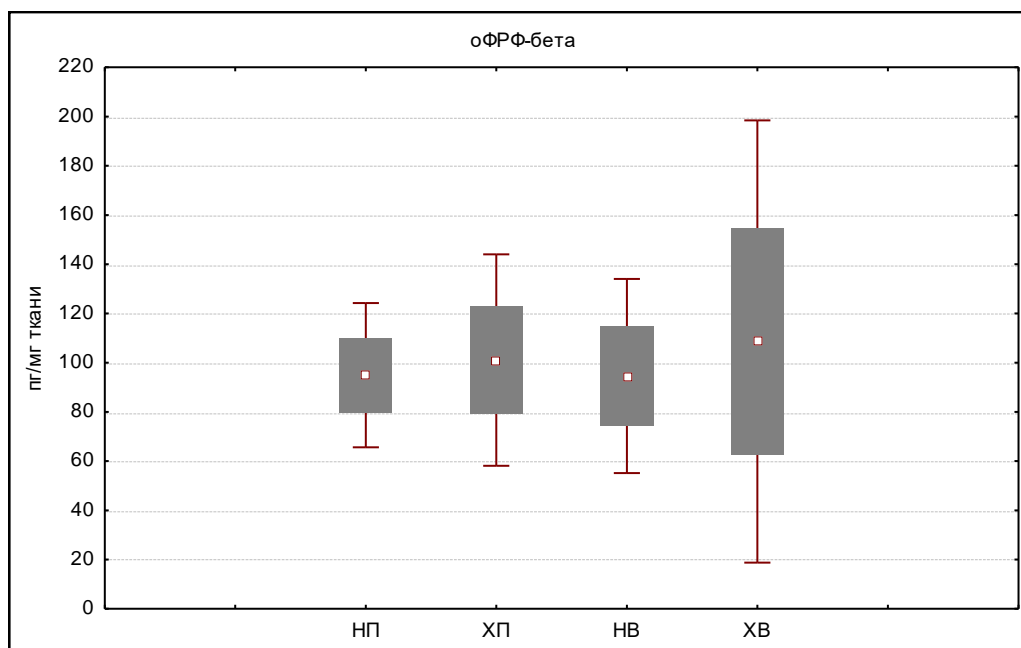


Рисунок 23 – Количество основного фактора роста фибробластов- β (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

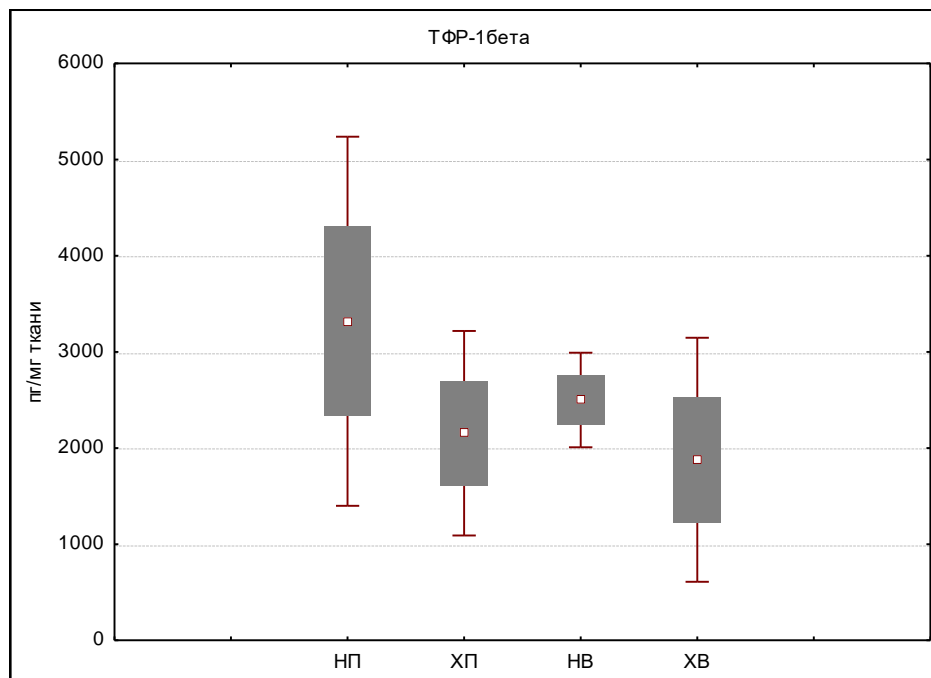


Рисунок 24 – Количество трансформирующего фактора роста-1 β (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Развитие воспаления в пульпе зуба сопровождалось недостоверным ($p>0,05$) понижением уровня β -трансформирующего фактора роста в пульпе временных (1878 ± 324 пг/мг ткани) и постоянных (2154 ± 243 пг/мг ткани) зубов (рисунок 24). Количество ИФР-1 при воспалении возрастало, как в пульпе постоянных ($9,86\pm 1,63$ пг/мг ткани), так и временных зубов ($6,97\pm 2,81$ пг/мг ткани), но это увеличение было недостоверным ($p>0,05$) (рисунок 25).

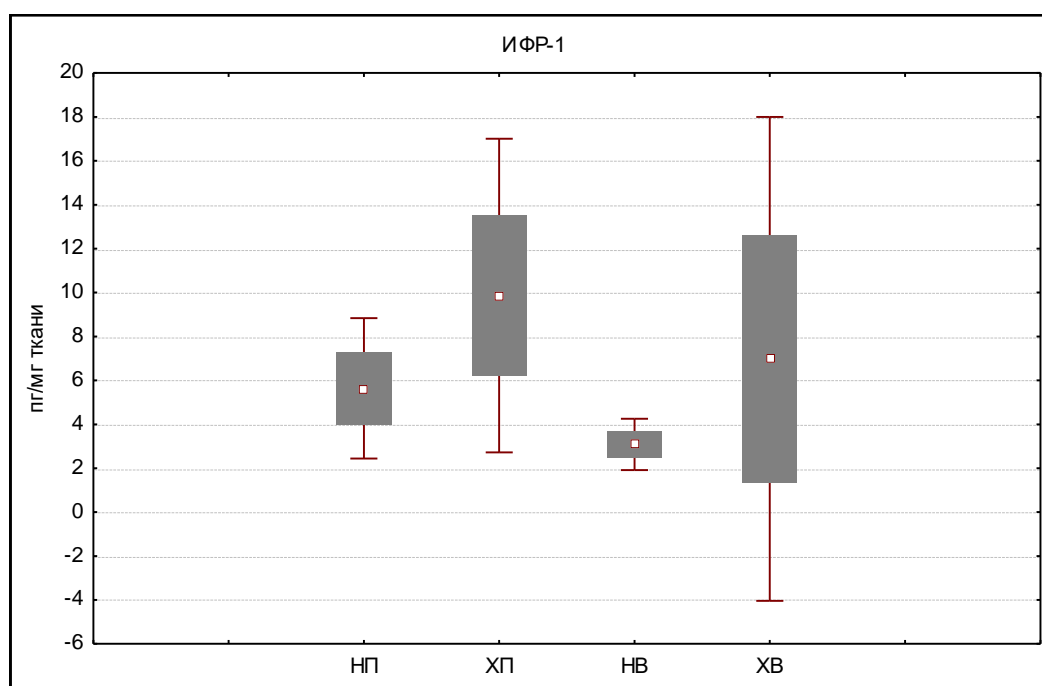


Рисунок 25 – Количество инсулиноподобного фактора роста-1 (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Полученные результаты констатируют, что при развитии хронического пульпита в пульпе временных и постоянных зубов наблюдаемые изменения в снижении ТФР-1 β и повышении ИФР-1 могут отражать явления пролиферативного фиброза в пульпе зуба и снижении способности формировать клеточную структуру, характерную для пульпы зуба.

3.1.9. Содержание гомоцистеина в пульпе постоянных и временных зубов в норме и при воспалении

В пульпе временных зубов при воспалении количество гомоцистеина значительно возрастало до $0,71\pm 0,10$ мкмоль/г ткани, и это увеличение было

достоверным ($p < 0,05$). В пульпе постоянных зубов при воспалении количество гомоцистеина ($0,57 \pm 0,07$ мкмоль/г ткани) не менялось ($p > 0,1$) (рисунок 26).

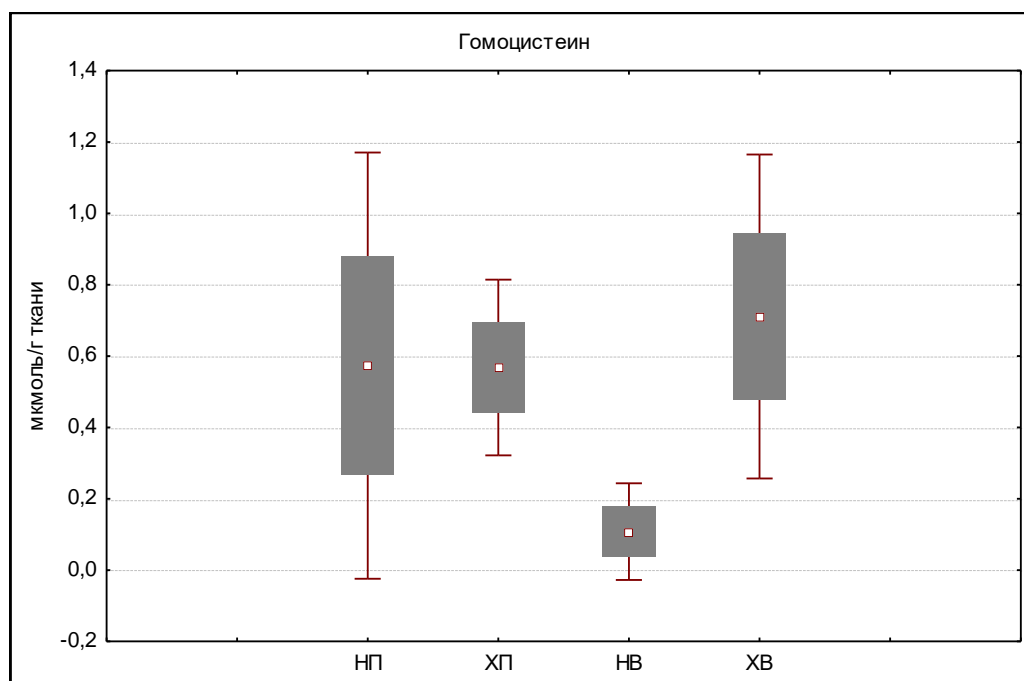


Рисунок 26 – Количество гомоцистеина (мкмоль/г ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении

Показано, что в пульпе временных зубов человека при воспалении имеется повреждение эндотелия сосудов, о чем свидетельствует значительное увеличение уровня гомоцистеина. В то время как в пульпе постоянных зубов человека при развитии хронической воспалительной реакции подобных изменений не наблюдается.

3.2. Содержание белков и пептидов в пульпе временных зубов в стадии резорбции корня при хроническом пульпите

3.2.1. Активность ферментов в пульпе временных зубов в стадии резорбции корня при воспалении

На определенном этапе жизни человека происходит смена временных зубов на постоянные. Этот процесс связан с разрушением корня временного зуба. Изучение активности ферментов в пульпе временных зубов в стадии резорбции корня показало достоверное увеличение активности ЛДГ

($p < 0,001$) и снижение активности МДГ ($p < 0,05$) по отношению к данным полученным в интактной пульпе и в пульпе временных зубов с хроническим пульпитом в стадии физиологического покоя корня зуба (таблица 20).

Полученные результаты свидетельствуют об активации анаэробных и подавления аэробных процессов, что свидетельствует о нарастающей гипоксии клеток пульпы резорбируемых временных зубов при воспалении.

Таблица 20 – Активность ряда ферментов в пульпе временных зубов при хроническом пульпите в стадии резорбции корня зуба ($M \pm m$)

Ферменты	Состояние пульпы по МКБ-10		
	Интактная (n=9)	Хронический пульпит (n=28)	Хронический пульпит в СРК (n=12)
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	30,3± 3,14	59,1±7,28	237±26,9 $p < 0,001$; $p^1 < 0,001$
МДГ (ммоль/мин·г ткани)	7,44±2,15	8,41±2,83	4,23±1,01 $p < 0,05$; $p^1 < 0,05$
СОД (мкмоль/мин·г ткани)	2,91± 0,12	2,24±1,34	6,73± 1,33 $p < 0,05$; $p^1 < 0,05$
ГПО (ммоль/мин·г ткани)	-	-	0,39± 0,06 $p < 0,001$; $p^1 < 0,001$
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	84,8±10,7	233±35,4	636±50,8 $p < 0,001$; $p^1 < 0,001$
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	254±34,7	191±34,5	325±38,1 $p < 0,05$; $p^1 < 0,05$
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	72,1±9,51	365±47,4	708±76,9 $p < 0,001$; $p^1 < 0,001$

Примечание: p - достоверность различий при по отношению к показателям интактной пульпы; p^1 - по отношению к показателям воспалённой пульпы в стадии физиологического покоя корня зуба. *Сокращения:* СРК – стадия резорбции корня зуба

Ранее исследователями установлено, что в пульпе резорбируемых временных зубов образуется большое количество продуктов перекисного

окисления (Cvek M., Lindvall A.M., 1989). Поэтому, в пульпе временных зубов в стадии резорбции корня зуба выявлялось достоверное ($p < 0,05$) увеличение активности СОД и выявление фермента ГПО ($p < 0,001$).

Воспалительные изменения в пульпе временного зуба в сочетании с его резорбцией сопровождались значительным увеличением активности АСТ, АЛТ и ЩФ ($p < 0,001$; $p < 0,05$) по сравнению с данными, полученными в интактной и воспаленной пульпе временных зубов в стадии физиологического покоя корня зуба.

В воспаленной пульпе временных зубов с резорбированными корнями содержание аннексина V достоверно возрастало ($p < 0,05$). Это повышение отличалось как по сравнению с данными как интактной пульпы, так и пульпы с хроническим воспалением в стадии физиологического покоя корня зуба (таблица 21).

Таблица 21 – Содержание ряда белков и пептидов в воспалённой пульпе временных зубов при хроническом пульпите в стадии резорбции корня зуба ($M \pm m$)

Показатели	Состояние пульпы по МКБ-10		
	Интактная (n=6)	Хронический пульпит (n=20)	Хронический пульпит в СРК (n=26)
оФРФ-β (пг/мг ткани)	94,3±18,5	127±10,2	71,4±12,5 $p > 0,1$; $p^1 < 0,05$
ФНО-α (пг/мг ткани)	4,93±1,34	13,6±1,87	19,8±2,78 $p < 0,05$; $p^1 < 0,05$
Аннексин V (пг/мг ткани)	5,50±0,09	4,76±0,42	15,0±1,33 $p < 0,05$; $p^1 < 0,05$
OPG (пмоль/мг ткани)	0,006±0,0004	0,02±0,004	0,06±0,003 $p < 0,05$; $p^1 < 0,05$
sRANKL (пмоль/мг ткани)	0	0	2,50±0,45 $p < 0,001$; $p^1 < 0,001$

Примечание: p - достоверность различий при по отношению к показателям интактной пульпы; p^1 - по отношению к показателям воспалённой пульпы в стадии физиологического покоя корня зуба

В стадии резорбции корня зуба в воспаленной пульпе определялось наибольшее количество ФНО- α ($p < 0,05$). Большое количество ФНО- α и аннексина V в пульпе в стадии резорбции корня зуба на наш взгляд, свидетельствует в пользу апоптотических изменений в клетках, которое, возможно, связано с деградацией органических компонентов клеток и межклеточного матрикса на фоне начинающейся физиологической резорбции корня временного зуба.

В воспалённой пульпе в стадии резорбции корня зуба содержание гомоцистеина достоверно возрастало ($p < 0,05$), а содержание ФРФ- β снижалось, как по сравнению с данными интактной пульпы, так и при хроническом пульпите с завершённым апексогенезом.

О гибели клеток пульпы и периодонта временных зубов в стадии резорбции корня свидетельствуют полученные нами данные о содержании маркёров резорбции костной ткани sRANKL и OPG. Одновременные процессы резорбции корня зуба и воспаления характеризуются ещё большим увеличением в пульпе sRANKL и увеличением содержания OPG ($p < 0,001$; $p < 0,05$).

Резорбция корня зуба при воспалении пульпы сопровождается повреждением эндотелия сосудов, о чём свидетельствует накопление большого количества гомоцистеина (рисунок 27).

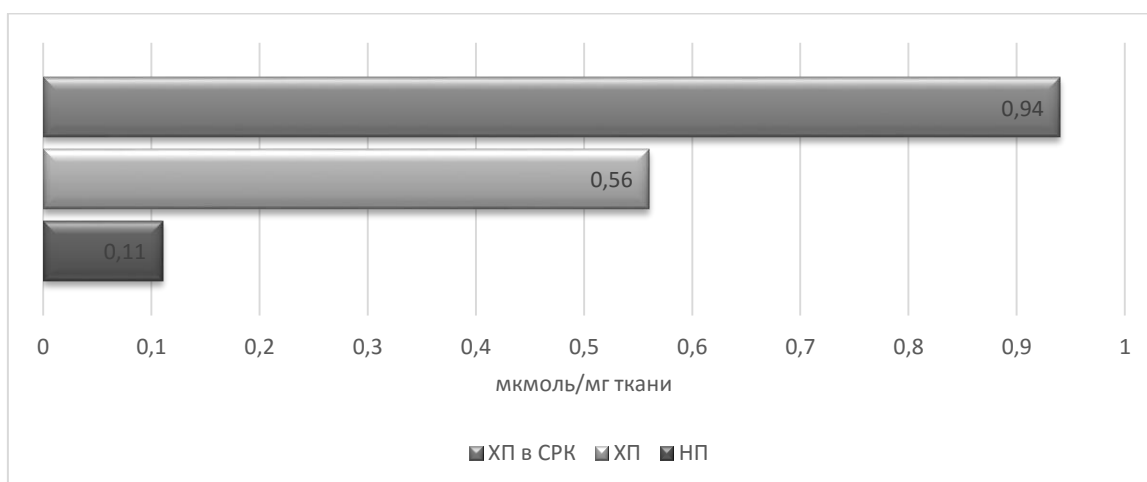


Рисунок 27 – Количество гомоцистеина (мкмоль/мг ткани) в пульпе временных зубов при хроническом воспалении в стадии резорбции корня

Таким образом, клетки пульпы временных зубов, находящихся в начальной стадии физиологической резорбции корня, принимают активное участие в запрограммированном разрушении зуба. При этом снижение содержания факторов роста приводит к подавлению процессов восстановления клеточных структур на фоне активации белков, участвующих в апоптозе и разрушении костных структур пародонта. Наблюдается переход на анаэробные процессы и снижение аэробного метаболизма. На фоне активации СРО мобилизуется антиоксидантная защита с участием ферментов. Чрезмерная активность трансаминаз и ЩФ свидетельствует о разрушении матрикса зубных тканей. Очевидно, что воспаление в пульпе зубов в стадии резорбции корня ускоряет процессы разрушения минерализованного матрикса, что способствует скорейшей эвакуации воспаленного зуба из полости рта.

3.3. Определение состояния пульпы временных зубов по показателям десневой жидкости

Определение состояния пульпы зуба является существенным критерием для диагностики и лечения зуба (Rowe A.H., Pitt Ford T.R., 1990). Для оценки жизнеспособности пульпы зуба используют тепловые и электрические тесты, которые экстраполируют сенсорный ответ. Все известные на сегодняшний день физические методики чувствительности пульпы зуба широко используются в клинической практике, так как они обладают финансовой и потребительской доступностью. Методы лазерной доплерографии и пульсоксиметрии применяются для определения состояния сосудистого русла, которое является показателем жизнеспособности ткани.

В перспективе планируется вытеснить тесты на чувствительность пульпы тестами на жизнеспособность. Однако, для точной диагностики состояния пульпы зуба должны быть установлены стандарты и вычислен процент отклонения, поскольку ложные результаты могут привести к ошибочному диагнозу, а это, в свою очередь, к неправильному лечению.

3.3.1. Исследование активности аспартильной и аланиновой трансаминаз в десневой жидкости временных зубов человека в норме и при пульпите

Для оценки степени воспалительных изменений в пульпе зуба не всегда возможно извлечение пульпы, а процедура оценки электровозбудимости пульпы зуба (ЭОД) бывает для пациента болезненна, особенно в педиатрической практике. Поскольку плазма крови из сосудов пульпы зуба попадает в пародонт, а оттуда транссудировается в десневую жидкость (ДЖ), то мы использовали данную биологическую жидкость для оценки состояния пульпы зуба. В ДЖ была исследована активность АСТ и АЛТ и рассчитан коэффициент АСТ/АЛТ. Полученный коэффициент был сопоставлен с результатами ЭОД.

Согласно данным, представленным в таблице 22 в ДЖ зубов с воспалением пульпы наблюдалась тенденция ($p > 0,05$) к понижению активности АСТ и АЛТ по отношению к данным, полученным из ДЖ интактных зубов.

Таблица 22 – Показатели десневой жидкости и ЭОД в пульпе временных зубов в норме и при воспалении ($M \pm m$ [min-max])

Показатели	Интактная (n=54)	Воспаление (n=72)
ЭОД (мкА)	4,52±0,64 [2,1;6,2]	38,0±3,57** [14,2;54,3]
АСТ (МЕ/л)	4,15±0,50 [2,6;5,7]	3,64±0,56 [2,13;7,8]
АЛТ (МЕ/л)	3,28±0,31 [2,3;4,5]	2,12±0,55 [0,94;6,4]
АСТ/АЛТ	1,26±0,03 [0,97;1,50]	1,96±0,59* [1,53;2,93]

Примечание: достоверность отличий ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ по сравнению с данными интактной пульпы

Расчет коэффициента, полученного путем деления показателей активности АСТ и АЛТ, показал, что в пульпе временных зубов при развитии воспаления соотношение АСТ/АЛТ достоверно возросло ($p < 0,05$) по сравнению с коэффициентом, рассчитанного для пульпы интактных зубов. Значения коэффициента АСТ/АЛТ в зубах с воспаленной пульпой колебались в пределах от 1,53 до 2,93, что позволило оценить этот коэффициент в ДЖ зубов с воспалением пульпы зуба, выше 1,26.

Корреляционный анализ показал, что имеется достоверная ($p < 0,05$) отрицательная взаимосвязь между активностью АСТ и коэффициентом АСТ/АЛТ, и прямая положительная между активностью АЛТ и коэффициентом АСТ/АЛТ (рисунок 28).

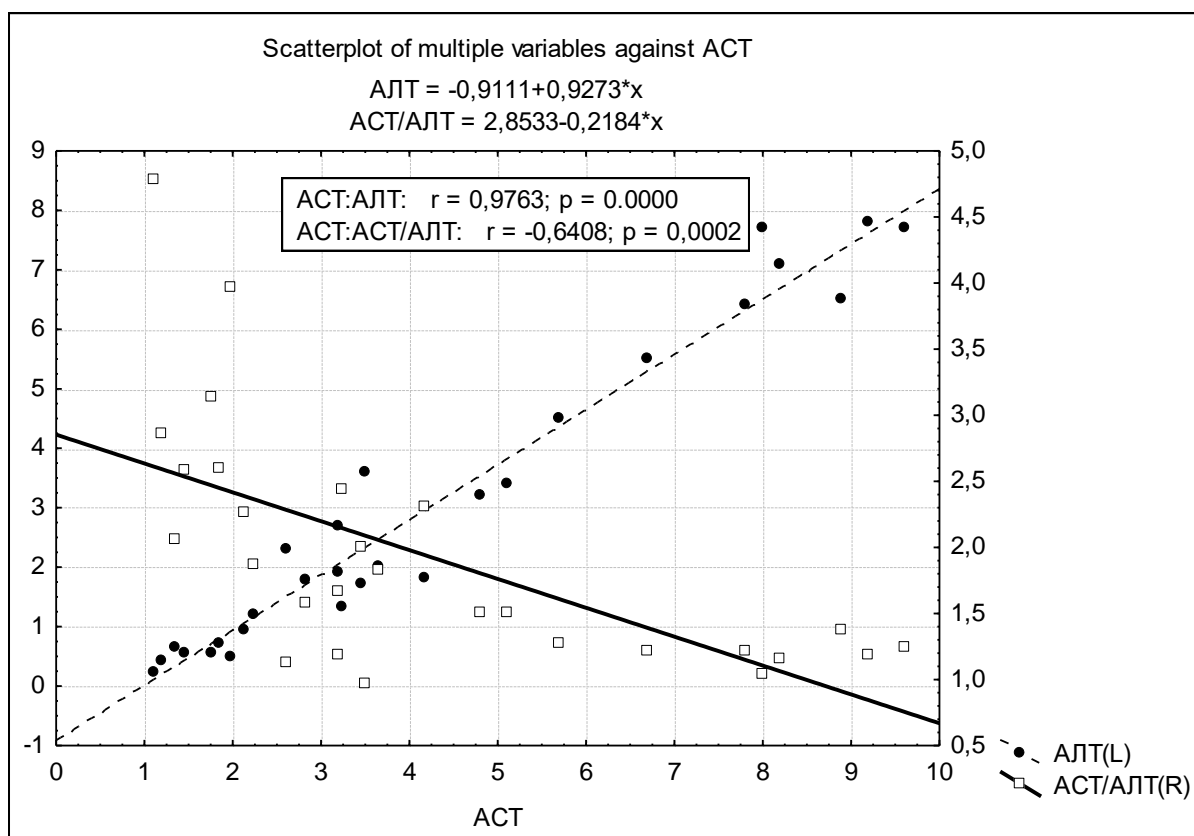


Рисунок 28 – График линейной зависимости активности АСТ и АЛТ в элюатах ДЖ пациентов с пульпитом от значений АСТ/АЛТ

3.3.2. Исследование показателей десневой жидкости временных зубов человека после лечения пульпита с применением различных препаратов

Была изучена реакция пульпо-периодонтального комплекса на применение лечебных паст, содержащих оксид кальция, эвгенол и борнеол для лечения пульпита во временных зубах человека.

Борнеол ($C_{10}H_{17}OH$) предельный спирт (эндо-1,7,7-триметилбицикло-[1,2,2]-гептанол-2) семейства бициклических терпенов (рисунок 29). Его получают из камфарного дерева (*Dryobalanops camphora*), произрастающего на островах Борнео и Суматре (Индонезия) в форме крупных кристаллических образований (80% борнеола и 20% изоборнеола) с температурой плавления $203-204^{\circ}$ и кипения 217° , растворимых в спирте и не растворимых в воде. Борнеол оказывает обезболивающее, антисептическое, антиспазматическое, противовирусное, заживляющее, стимулирующее, тонизирующее действие (Pharmacopoeia of PRC, 2000).

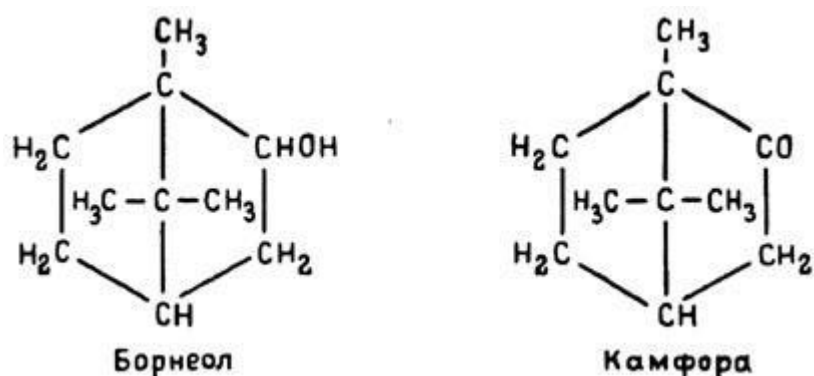


Рисунок 29 – Химическая структура борнеола и камфоры

Борнеол входит в состав большого числа лекарственных препаратов, как для внутреннего, так и для наружного применения, применяющихся в лечении широкого спектра заболеваний. Он легко проникает в организм и выводится с почками в виде глюкуронидов (Наумова Э.М., Валентинов Б.Г., 2005).

Нами было установлено, что на фоне развития пульпита временных зубов в элюате десневой жидкости в 2 раза увеличивалось количество ИЛ-1 β , и выявлялся защитный белок лактоферрин, который в норме отсутствует.

Лечение хронического пульпита препаратом, содержащего оксид кальция, через 6 месяцев приводило к достоверному увеличению в элюате ДЖ содержания ИЛ-1 β ($p < 0,001$) по отношению к данным, полученным до лечения и контрольных образцов (рисунок 30). Содержание лактоферрина в элюате ДЖ существенно снижалось ($p < 0,001$) по отношению к данным ДЖ, полученной из десневой борозды зубов с хроническим пульпитом. Через 12 месяцев количество исследованных показателей в элюате ДЖ после лечения пульпита препаратом, содержащим оксид кальция, не отличалось от данных контрольных образцов.

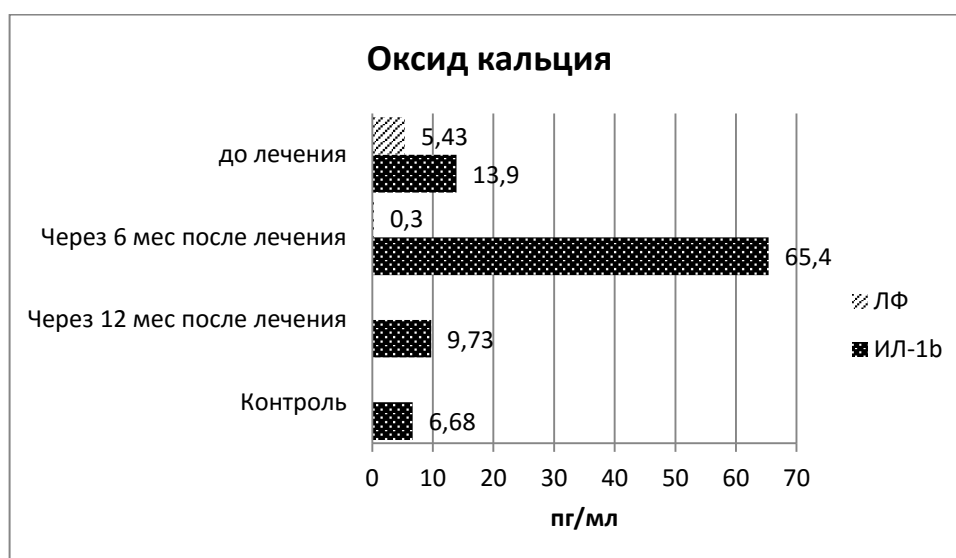


Рисунок 30 – Содержание ИЛ-1 β и лактоферрина (ЛФ) в элюатах десневой жидкости до и после лечения пульпита оксидом кальция

В группах пациентов, которым проводилось лечение пульпита препаратом, содержащим оксид кальция и эвгенол, через 6 месяцев в ДЖ достоверно ($p < 0,05$) увеличивалось количество ИЛ-1 β по отношению к исходным значениям (рисунок 31), но эта цифра была достоверно ($p < 0,05$) ниже данных, полученных в этот срок в ДЖ пациентов, которым лечили хронический пульпит пастой, содержащей оксид кальция. В этот срок в ДЖ отсутствовал лактоферрин.

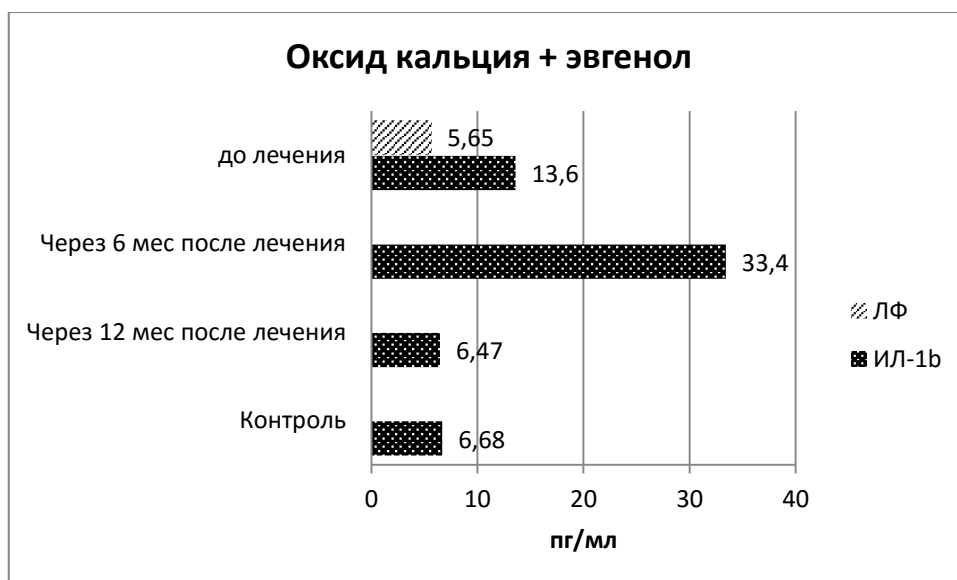


Рисунок 31 – Содержание ИЛ-1β и лактоферрина (ЛФ) в элюатах десневой жидкости до и после лечения пульпита оксидом кальция и эвгенолом

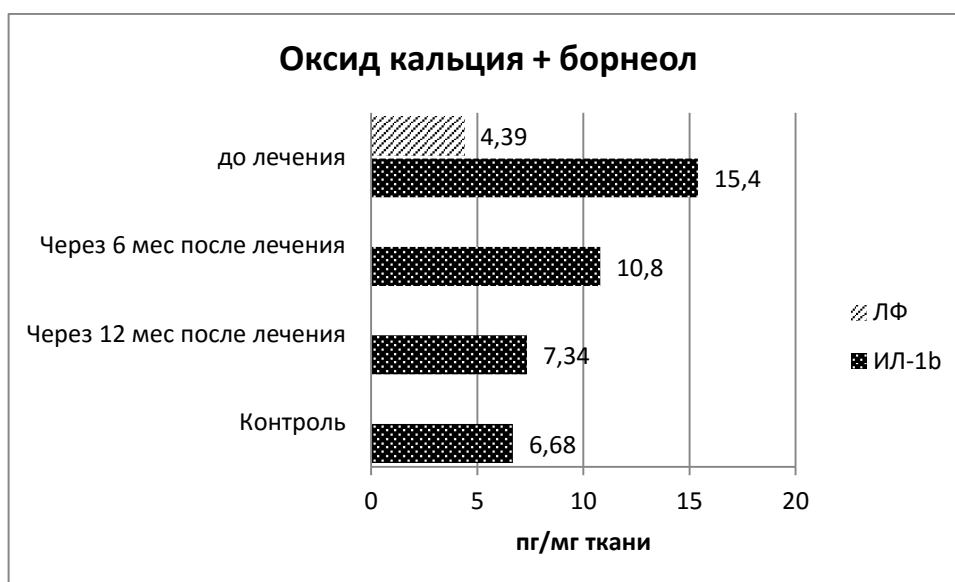


Рисунок 32 – Содержание ИЛ-1β и лактоферрина (ЛФ) в элюатах десневой жидкости до и после лечения пульпита оксидом кальция и борнеолом

Результаты лечения пульпита временных зубов оксидом кальция и борнеолом показали стабильные значения состояния периодонта по количеству ИЛ-1β и лактоферрина по сравнению с показателями ДЖ интактного зуба ($p > 0,1$) (рисунок 32). В этом случае наблюдалось наименьшее содержание ИЛ-1β в ДЖ через 6 месяцев после лечения, по

сравнению с данными других групп исследования, а количество ЛФ в элюатах ДЖ в этот срок уже не обнаруживалось.

Положительный эффект сочетанного применения оксида кальция и борнеола на пульпу зуба был подтвержден исчезновением болевой реакции у пациентов в тот же день, снижением воспалительных явлений в периодонте, отсутствием антибактериального белка лактоферрина и существенно низким уровнем ИЛ-1 β в ДЖ, по сравнению с группами пациентов, которым проводилось лечение пульпита оксидом кальция и оксидом кальция в сочетании с эвгенолом. Данная методика лечения воспаления пульпы зуба была защищена патентом (приложение 2).

3.4. Изучение реакции пульпы резцов крыс на травму в полости рта и иммобилизацию

Показано, что при проведении хирургических операций, сопровождающихся нарушением целостности тканей организма, пациенты испытывают эмоциональное напряжение, которому сопутствуют повышение артериального давления, частоты пульса, уровня глюкозы в крови и т.д. (Барабощин А.Т., 2007). При тяжелых травмах или послеоперационном периоде основной лечебной мерой является длительная иммобилизация, которая впоследствии сказывается на психоэмоциональном состоянии пациента (Вёрткин А.Л. и др., 2012). Поэтому, в данном разделе будут изложены результаты изучения реакции пульпы резцов опытных крыс на травму в полости рта и иммобилизацию.

3.4.1. Сравнительная характеристика активности ферментов и содержания ряда белков в интактной пульпе зубов человека и резцов крыс

Модельные эксперименты на животных, в частности, на крысах, кроликах и собаках, проводятся для установления истины возникновения частных и системных патологий у человека (Alzarea В.К., 2014). Показано, что коренные зубы и пульпа зуба крысы обладают сходными

анатомическими, гистологическими, биологическими и физиологическими особенностями с коренными зубами человека, хотя морфологические стадии развития зубов крыс во временном промежутке протекают намного быстрее (Костиленко Ю.П., Саркисян Е.Г., 2014; Maurice C.G., Schour I., 1955; Kiryati A.A., 1958; Kozlov M., Massler M., 1960; Sasaki T., Kawamata-Kido H., 1995; Dammaschke T., 2010).

Изучение обменных процессов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека и резцов крыс выявило ряд видовых особенностей (таблица 23, таблица 24). Так, в пульпе зубов человека и крыс активность МДГ в 1000 раз выше, чем активность ЛДГ, что свидетельствует о преобладании в этой ткани аэробных процессов. В пульпе резцов крыс активность ЛДГ была достоверно выше ($p < 0,001$), а активность МДГ не отличалась от данных, полученных в пульпе зубов человека.

Таблица 23 – Активность ферментов в интактной пульпе зубов человека и крысы ($M \pm m$)

Ферменты	Временные зубы (n=30)	Постоянные зубы (n=33)	Резцы крыс (n=55)
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	30,3± 3,14	27,2±3,11	62,4± 2,15**
МДГ (ммоль/мин·г ткани)	7,44±2,15	10,2±2,31	12,4±1,21
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	84,8±10,7	2,4±0,79**	56,7±3,54
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	254±34,7	17,1±3,14**	41,3±4,17**
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	72,1±9,51	40,2±8,45*	768±84,7**
СОД (мкмоль/мин·г ткани)	2,91± 0,12	6,12±1,54*	10,1±2,13*

Примечание: достоверность отличий ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ по сравнению с данными интактной пульпы временных зубов

В интактной пульпе временных зубов выявлена достоверно ($p < 0,001$) высокая активность трансаминаз по отношению к этим показателям в пульпе

постоянных зубов человека и резцов крыс. Однако, в пульпе резцов крыс активность АСТ и АЛТ была достоверно ($p < 0,001$) выше значений, полученных в пульпе постоянных зубов человека. Полученные данные свидетельствуют о более интенсивном обмене аминокислот во временных зубах человека и резцов крыс. Такая высокая активность трансаминаз во временных зубах, возможно, связана с готовностью к резорбции, а в пульпе резцов крыс к постоянному обновлению по причине стирания резцов.

Полученные нами результаты о высокой активности ЩФ в пульпе резцов крыс по сравнению с человеком ($p < 0,001$) предполагает участие этого фермента в накоплении неорганического фосфата для постоянного роста резцов в течение жизни животного. Активность этого фермента в пульпе временных зубов также достоверно ($p < 0,05$) выше, по сравнению с пульпой постоянных зубов.

Активность антиоксидантного фермента СОД в пульпе резцов крыс достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у человека, в то время как в пульпе временных зубов активность общей СОД в 2 раза ниже, чем в пульпе постоянных зубов.

Определение количества аннексина V в пульпе зубов человека показало, что его содержание достоверно выше ($p < 0,001$; $p < 0,05$), чем в пульпе резцов крыс (таблица 24). Сопоставление показателей выявило, что наибольшее количество аннексина V выявлялось в пульпе временных зубов человека, а наименьшее у крыс. Сходные данные, как и при исследовании количества аннексина V, были получены при определении содержания ФНО- α в интактной пульпе крыс и постоянных и временных зубов человека.

Наибольшее содержание ИЛ-1 β определялось в пульпе постоянных зубов человека ($p < 0,001$) по сравнению с данными, полученными в пульпе временных зубов человека и резцов крыс. Однако, его количество в пульпе резцов крыс достоверно ($p < 0,05$) превышало таковое в пульпе временных зубов человека.

Таблица 24 – Содержание белков и пептидов в интактной пульпе зубов крыс и человека ($M \pm m$)

Показатели	Временные зубы (n=30)	Постоянные зубы (n=33)	Резцы крыс (n=55)
Аннексин V (пг/мг ткани)	1,82±0,34	0,67±0,11*	0,35±0,18**
ФНО-α (пг/мг ткани)	22,7±0,93	12,4±0,21*	10,8±0,96*
ИЛ-1β (пг/мг ткани)	10,4±0,89	168±4,58**	28,6±1,90*
IgG (мг/%)	432±34,7	276±28,7*	25,1±3,42**
IgM (мг/%)	254±10,2	1381±99,8**	4,31±0,43**

Примечание: достоверность отличий ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ по сравнению с данными интактной пульпы временных зубов

Содержание исследованных иммуноглобулинов в интактной пульпе резцов крыс было достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с их количеством в пульпе зубов человека. В пульпе резцов крыс и временных зубов человека превалирует содержание IgG, а в пульпе постоянных зубов количество IgM.

В пульпе постоянных зубов количество IgM ($p < 0,001$) было существенно выше значений, полученных в пульпе временных зубов человека и резцов крыс, а в пульпе временных зубов это превосходство наблюдалось в отношении IgG ($p < 0,05$).

Сопоставление белков, обладающих каталитической активностью, в интактной пульпе человека и крыс показало отличия в их активности, но сходность в качественном составе. Усиление реакций гликолиза и цикла Кребса, антиоксидантной защиты и щелочной фосфатазы в клетках пульпы резцов крыс отражает эволюционно поставленные задачи видовой принадлежности. В то время как повышенное содержание ФНО-α, ИЛ-1β и аннексина V в пульпе постоянных зубов человека направлено на обеспечение сохранности минерализованного матрикса, который не имеет возможности к регенерации. В пульпе резцов крыс выявлено невысокое количество белков

местного иммунитета, что отражает отсутствие необходимости обеспечения резцов крыс защитными реакциями из-за большой скорости обновления клеток пульпы у этих животных.

3.4.2. Изучение активности щелочной фосфатазы в пульпе резцов крыс после нанесения травмы в полости рта

Выбор режущего инструмента для проведения оперативного вмешательства в хирургической практике является важной проблемой, поскольку это влияет на сроки реабилитации пациентов в послеоперационном периоде. Инновационные внедрения в практическое здравоохранение лазерных установок снизило послеоперационные осложнения и сроки нахождения пациентов в стационаре (Тарасенко И.В., Вавилова Т.П., 2010).

3.4.2.1. Исследование активности щелочной фосфатазы в пульпы резцов крыс после нанесения травмы на слизистую оболочку щеки скальпелем и эрбиевым лазером

В данном разделе представлены результаты реакции клеток пульпы резцов крыс на раневой дефект в слизистой оболочке щеки крыс, сформированный различными хирургическими инструментами – скальпелем и излучением эрбиевого лазера (таблица 25, таблица 26). Реакцию клеток пульпы резцов опытных животных в ответ на травму в слизистой оболочке рта мы оценивали по активности щелочной фосфатазы – фермента, отражающего реакцию одонтобластов – клеток пульпы, ответственных за поддержание жизнедеятельности матрикса дентина зуба.

При сравнении активности этого фермента в зависимости от локализации зубов на челюсти было установлено, что она не зависела от локализации резцов на челюсти и имела практически одинаковые значения.

После создания раневого дефекта скальпелем на слизистой оболочке щеки крыс на 1-е сутки реакция пульпы резцов крыс верхней челюсти сопровождалась достоверным ($p < 0,05$) увеличением активности ЩФ после

воздействия скальпеля. Воздействие излучения эрбиевого лазера было не столь травматичным, чем создание раны скальпелем, о чем свидетельствует отсутствие достоверных ($p > 0,05$) изменений в увеличении активности ЩФ в пульпе резцов этой группы животных (таблица 25).

Таблица 25 – Активность щелочной фосфатазы (ммоль/мин·г ткани) в пульпе резцов крыс после повреждения слизистой оболочки щеки в динамике заживления дефекта ($M \pm m$)

Локализация резцов на челюсти	Верхняя			Нижняя		
	Контроль (n=20)	Скальпель (n=20)	Er:YAG лазер (n=20)	Контроль (n=20)	Скальпель (n=20)	Er:YAG лазер (n=20)
Хирургический инструмент						
Сроки исследования						
1 сутки	517±76,1	1127±161*	859±169	510±82,3	498±109	451±53,0
5 сутки	647±280	1280±125*	607±163	489±129	437±136	353±175
8 сутки	585±123	678±215	614±141	614±136	645±140	540±168
15 сутки	511±164	496±70,2	500±221	555±167	469±238	597±168

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$ по отношению к данным контрольной группы

Со стороны клеток пульпы резцов нижней челюсти не выявлено реакции, так как в них активность ЩФ не отличалась ($p > 0,5$) от значений, полученных в контрольной группе интактных животных.

На 5-е сутки заживления раны слизистой оболочки щеки, вызванной скальпелем, в пульпе резцов животных верхней челюсти сохранялась достоверная повышенная активность ЩФ ($p < 0,05$), а при дефекте, образованном эрбиевым лазером, активность фермента в пульпе резцов не отличалась от значений контрольной группы ($p > 0,1$). В пульпе резцов нижней челюсти активность ЩФ после травмы соответствовала показателям

контрольной группы, а после лазерного излучения полученные значения были несколько ниже.

На 8-е и 15-е сутки показатели активности ЩФ в пульпе резцов, как на верхней, так и на нижней челюсти у животных всех опытных групп с раневым дефектом на слизистой оболочке щеки были сопоставлены со значениями, полученными в пульпе резцов животных контрольной группы.

Таким образом, пульпа резцов животных реагирует на травму, вызванную нарушением целостности слизистой оболочки щеки. Наиболее существенная реакция пульпы резцов животных проявлялась на верхней челюсти в первые и пятые сутки эксперимента после повреждения тканей щеки скальпелем.

3.4.2.2. Исследование активности щелочной фосфатазы в пульпе резцов крыс после травмы, вызванной удалением соседних моляров

В следующей серии эксперимента была исследована реакция пульпы на травму, созданную путем удаления соседних моляров из челюсти. Было установлено, что удаление моляров у крыс сопровождалось достоверным увеличением ЩФ ($p < 0,001$) в пульпе верхних и нижних резцов на 7-е сутки эксперимента, которое сохранялось и к 14-м суткам опыта (таблица 26).

Для ускорения заживления раны животным в переходную складку слизистой оболочки рта и *per os* вводили гомеопатические средства. Это сопровождалось повышением активности ЩФ к 7-м суткам эксперимента в пульпе резцов верхней челюсти крыс в 3,9 раза, а в пульпе нижних резцов в 3 раза по сравнению со значениями активности данного фермента в пульпе резцов животных контрольной группы. В этой же группе животных к 14-м суткам активность ЩФ в пульпе верхних резцов снижалась в 1,9 раза по сравнению с 7-ми сутками приема препаратов, но оставалась достоверно повышенной ($p < 0,001$) по отношению к контролю.

Таблица 26 – Активность щелочной фосфатазы (ммоль/мин·г ткани) в пульпе резцов крыс после удаления моляров ($M \pm m$)

Опытные группы	Сроки эксперимента			
	7 дней		14 дней	
	Верхние резцы	Нижние резцы	Верхние резцы	Нижние резцы
0,9% NaCl (n=10)	1140±98,1**	985±35,4*	1228±67,3**	1005±83,7**
Траумель С+ Лимфомиозот (n=10)	2121±55,4**	1581±78,9**	1320±98,1**	1493±78,5**
Амоксиклав (n=10)	1302±90,3**	406±56,3	1281±108**	419±78,5
Контрольная (n=10)	546±54,7	516±27,0	528±92,4	592±51,8

Примечание: достоверность отличий ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ по сравнению с данными контрольной группы

В пульпе нижних резцов показатели активности ЩФ 7-х и 14-х суток имели сходные значения, которые были достоверно ($p < 0,001$) выше значений пульпы зубов животных контрольной группы. Сравнение активности ЩФ в пульпе верхних и нижних резцов животных, получавших антигомотоксическую терапию с активностью этого фермента у крыс, которым по аналогичной схеме вводили 0,9% раствор NaCl и контрольной группы показало, что активность этого энзима была достоверно выше ($p < 0,001$; $p < 0,05$).

Другой опытной группе животных после удаления моляров в челюсти вводили per os эмульсию препарата Амоксиклав. У этих животных, по сравнению с данными контрольной группы, в пульпе верхних резцов на 7-е сутки опыта выявлялся достоверный ($p < 0,001$) рост активности ЩФ, который сохранялся до 14 суток эксперимента. Вместе с тем, исследование

активности ЩФ в пульпе нижних резцов, напротив, выявило недостоверное ($p > 0,1$) снижение активности фермента, но это понижение было достоверным ($p < 0,001$) как по отношению к данным крыс, получавших антигомтоксическую терапию, так и 0,9% раствор NaCl. В то же время показатели активности ЩФ в пульпе верхних резцов оставались в тех же пределах и достоверно не отличались ($p > 0,5$) от показателей животных других опытных групп.

Полученные нами данные в модельных опытах показали, что пульпа резцов крыс реагирует как на травму, вызванную удалением моляров, так и на введение препаратов. Введение животным препаратов Траумель С и Лимфомиозот вызывало активацию одонтобластов пульпы как верхних, так и нижних резцов, а приём препарата Амоксиклав, напротив, подавляло их функцию, и более существенно на нижней челюсти.

3.4.3. Исследование содержания белков и пептидов, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене, в пульпе резцов крыс после воздействия ортодонтического силового модуля

Изменения в пульпе могут появляться при ортодонтическом перемещении зубов, когда применяются силы, превышающие физиологическую выносливость периодонтальной связки. Во время перемещения зубов сдавливаются кровеносные и лимфатические сосуды пульпы и периодонта, клеточные элементы и нервные окончания. Нарушение питания клеток на ограниченном участке пульпы зуба может привести к её локальной атрофии.

Морфологическое исследование показало, что у животных опытной группы при приложении сил натяжения на резец наблюдаются реактивные изменения в пульпе зуба, которые характеризуются изменениями в системе микроциркуляторного русла, структуры и клеточного состава пульпы.

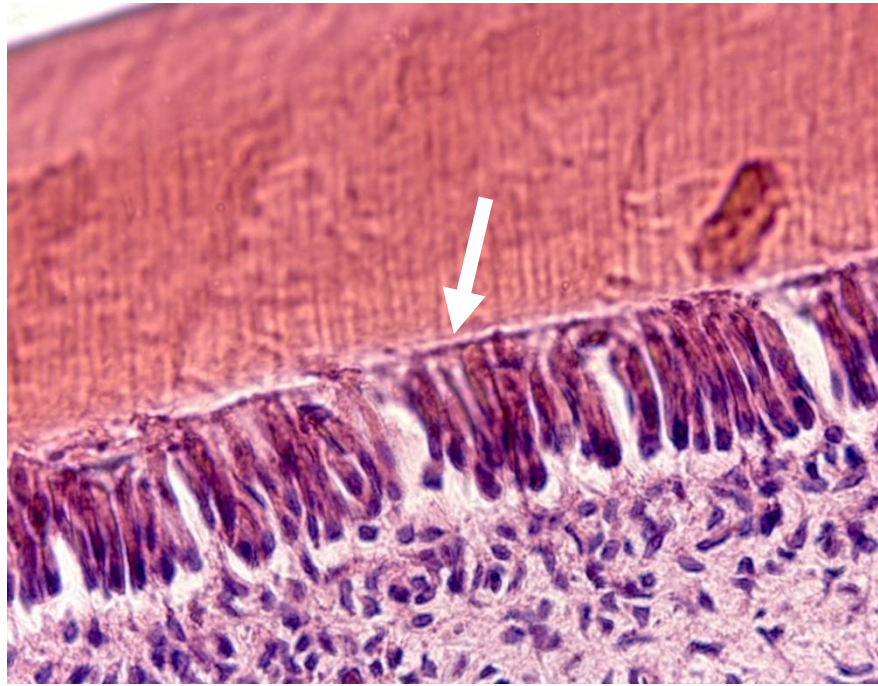


Рисунок 33 – Пульпа резцов опытных крыс, после воздействия ортодонтического силового модуля. Микрофотография. Окр.: гематоксилином и эозином; ув.: х600

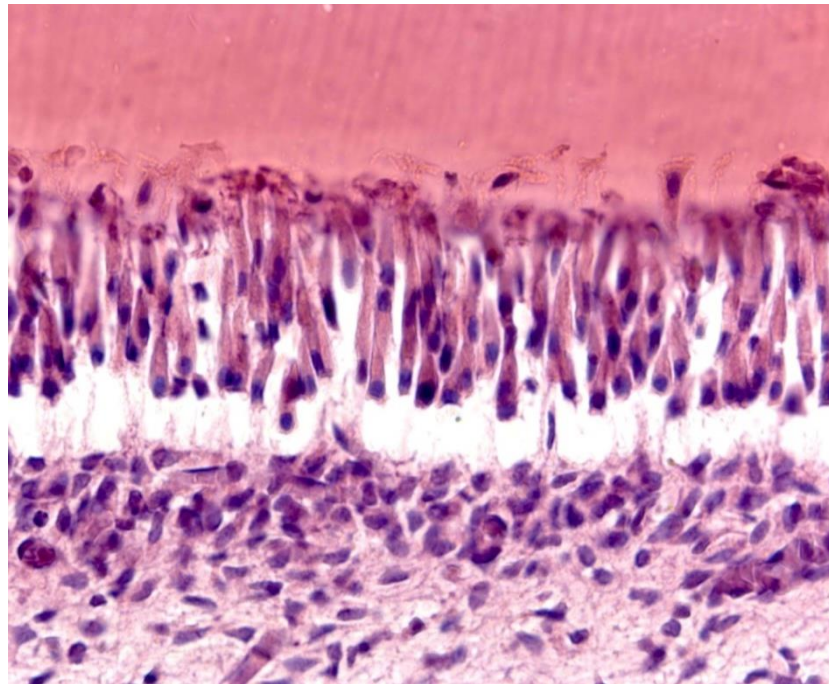


Рисунок 34 – Пульпа интактных резцов крыс. Микрофотография. Окр.: гематоксилином и эозином; ув.: х600

При микроскопическом исследовании видны редко расположенные одонтобласты со смещёнными ядрами, наблюдается миграция мелких малодифференцированных клеток из преодонтобластического слоя в слой Вейля. На границе тел одонтобластов выявляется расширенный слой предентина (стрелка) (рисунок 33).

Слоистое расположение клеток в пульпе сохраняется, но отмечается сужение одонтобластического слоя до 3-4-х рядов клеток. Одонтобласты располагаются редко, имеют пикнотично измененные ядра, которые смещены в сторону отростков, и резко оксифильную вакуолизированную цитоплазму. В одонтобластическом слое выявлены скопления макрофагов и лейкоцитов, а слой Вейля сужен из-за миграции клеток из преодонтобластического слоя. При этом преодонтобластический слой характеризуется более редким расположением клеток, чем в контроле (рисунок 34).

Клетки преодонтобластического слоя содержат гиперхромные ядра, а центральный слой пульпы инфильтрирован лимфоцитами, плазматическими клетками, нейтрофилами и эозинофилами.

Кровеносные сосуды сопровождаются набуханием эндотелия и выраженными периваскулярными и интерстициальными отеками.

В сосудах одонтобластического, преодонтобластического слоев и в зоне Вейля отмечаются застойные явления микроциркуляторного русла.

Наряду с выраженными тканевыми изменениями в пульпе резцов крыс, на которые оказывали давление, выявлялся расширенный слой предентина со светлыми участками, что свидетельствует о нарушении процессов синтеза и минерализации органического матрикса дентина.

Воздействие силового модуля усилием 100 гс/см приводило не только к структурным изменениям в пульпе резцов животных, но и метаболическим сдвигам. Воздействие пружинной тяги на резцы животных сопровождается достоверным снижением в пульпе - активности фермента ЩФ ($p < 0,001$), количества пептида остеокальцина и полипептида аннексина V ($p < 0,05$) (таблица 27).

Таблица 27 – Содержание белков и пептидов, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене, в пульпе резцов крыс после воздействия силового модуля ($M \pm m$)

Показатели	Пульпа резцов крыс	
	Опытная (n=10)	Контрлатеральная (n=10)
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	231±9,47**	880±11,4
Остеокальцин (пг/мг ткани)	3,45±0,12*	4,84±0,33
Аннексин V (пг/мг ткани)	0,43±0,02*	0,64±0,01

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$ по отношению к данным, полученным из пульпы резцов с контрлатеральной стороны

Таким образом, пульпа резцов крыс реагирует на силовые воздействия компенсаторной перестройкой клеток и сосудистого русла.

3.4.4. Исследование активности ферментов в пульпе резцов крыс, находящихся в условиях иммобилизации

Эксперименты на животных проводились в условиях однократной и многократной иммобилизации. На фоне однократной иммобилизации выявлено высокодостоверное ($p < 0,001$) повышение активности АСТ, как в пульпе верхних, так и нижних резцов опытных животных (таблица 28). В то же время, активность АЛТ в пульпе резцов животных в ответ на проводимую иммобилизацию не изменялась ($p > 0,1$).

В пульпе верхних резцов животных опытной группы активность фермента гликолиза ЛДГ достоверно повышалась ($p < 0,05$), а в пульпе нижних резцов ($p < 0,05$) понижалась ($p < 0,05$). Активность ЩФ на фоне иммобилизации недостоверно снижалась только в пульпе резцов нижней челюсти, а в пульпе верхних резцов не отличалась от значений животных контрольной группы.

Таблица 28 – Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после однократной иммобилизации ($M \pm m$, [min; max])

Ферменты	Группы			
	Пульпа верхних резцов		Пульпа нижних резцов	
	Опытная (n=7)	Контрольная (n=7)	Опытная (n=7)	Контрольная (n=7)
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	234±53,4** [76,9;418]	73±30,1 [65;109]	270±39,3** [123;338]	46,2±10,5 [12,8;99,6]
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	24,7±1,53 [17,9;28,8]	24,4±0,65 [21,6;26,8]	20,9±2,27 [12,8;25,8]	21,6±1,76 [13,0;25,5]
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	412±108* [117;791]	293±28,3 [199;411]	299±48,2* [106;406]	339±57,0 [119;612]
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	761±41,7 [621;830]	751±197 [128;1520]	565±103 [165;864]	688±201 [117;1655]

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с данными контрольной группы

Таблица 29 – Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после многократной иммобилизации ($M \pm m$, [min; max])

Ферменты	Группы			
	Пульпа верхних резцов		Пульпа нижних резцов	
	Опытная (n=5)	Контрольная (n=5)	Опытная (n=5)	Контрольная (n=5)
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	90,5±14,0 [53,0;126]	51,9±17,1 [22,0;95,7]	59,9±13,3 [23,5;106]	63,2±15,9 [25,5;94,4]
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	12,4±3,06 [7,20;21,1]	17,9±3,99 [7,80;27,3]	30,4±10,0* [10,6;62,6]	16,8±3,79 [9,75;23,5]
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	318±48,6* [202;497]	204±37,4 [122;291]	164±16,2* [110;208]	210±7,71 [194;226]
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	1049±102* [820;1420]	788±35,7 [715;865]	833±4,06 [825;845]	913±33,9 [840;1000]

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$ по сравнению с данными контрольной группы

Множественная иммобилизация животных вызывала изменения в активности ферментов пульпы как верхних, так и нижних резцов (таблица 29). На фоне множественной иммобилизации выявлялся достоверный ($p < 0,05$) рост активности ЛДГ и ЩФ в пульпе верхних резцов крыс по сравнению с данными животных, которых не подвергали иммобилизации.

В пульпе верхних резцов крыс выявлена тенденция ($p > 0,05$) к повышению активности АСТ и понижению АЛТ. В пульпе нижних резцов животных, которых подвергали длительной иммобилизации, наблюдалось достоверное повышение активности АЛТ и снижение активности ЛДГ ($p < 0,05$) по отношению к данным контрольной группы.

Таким образом, в пульпе резцов опытных животных однократная иммобилизация вызывала достоверное увеличение активности АСТ, а множественная иммобилизации не влияла на активность этого фермента. Активность ЛДГ при проведении однократной и множественной иммобилизации была сходна – в пульпе верхних резцов повышалась, а в пульпе нижних резцов снижалась. Активность ЩФ в пульпе нижних резцов опытных крыс, как при однократной, так и при множественной иммобилизации имела тенденцию к снижению, тогда как активность этого фермента в пульпе верхних резцов достоверно увеличивалась при длительной иммобилизации.

3.5. Влияние экзогенных химических веществ на пульпу зуба

Различные химические вещества, вводимые в организм перорально, внутривенно или внутримышечно могут влиять на обменные процессы. Это могут быть вещества, используемые как в пищевой промышленности, так и в медицинской практике (лекарственные препараты, биологически активные добавки). В основном исследования проводятся на биологическом материале – печени, сердечной мышце и других органов, но не изучена реакция клеток пульпы зуба. Поэтому в настоящей главе будут представлены результаты исследования влияния различных экзогенных химических веществ на метаболические процессы в пульпе резцов крыс.

3.5.1. Влияние ингибитора синтеза карнитина на активность НАД⁺-зависимых дегидрогеназ и показателей антиоксидантной защиты в пульпе резцов крыс

Карнитин, участвующий в транспорте ацилов в митохондрию, синтезируется в организме человека из аминокислот лизина и метионина при участии фермента γ -бутиробетаингидроксилазы, накапливается в печени и миокарде, и выводится почками, преимущественно в виде ацильных эфиров (Спасов А.А., Иежица И.Н., 2005). Для медицинских целей ингибиторы карнитина используют для лечения ишемии мозга, миокарда, поскольку блокируют β -окисление жирных кислот, при котором потребляется большое количество кислорода, с целью включения в энергообеспечение распад глюкозы. Селективным ингибитором γ -бутиробетаингидроксилазы является 3(2,2,2-триметилгидразиний)пропионат. Вместе с тем, дефицит карнитина может приводить к снижению энергообеспечения организма (Marchetti P. et al., 1996).

Однократное введение ингибитора синтеза карнитина приводило к повышению в пульпе зубов крыс активности НАД⁺-зависимых дегидрогеназ - ЛДГ и МДГ (таблица 30).

Вторая и третья инъекция ингибитора приводили к ещё большему достоверному увеличению активности ЛДГ ($p < 0,001$), но не влияют на активность МДГ, показатели которой не отличались от значений, полученных при однократном введении ингибитора ($p > 0,5$). Менее выраженное повышение активности МДГ при введении ингибитора, вероятно, связано с тем, что не хватает ацетил-КоА, который является субстратом цитратного цикла.

При однократном введении ингибитора синтеза карнитина в пульпе зуба наблюдалось достоверное увеличение ($p < 0,01$) активности СОД, которое поддерживалось последующими инъекциями ингибитора синтеза карнитина. Мы ожидали, что избыток пероксида водорода в пульпе резцов крыс может инактивироваться глутатионпероксидазой, однако данный фермент в пульпе

резцов крыс нами не был обнаружен. На фоне увеличения активности СОД в пульпе резцов крыс достоверно возрастает содержание ТБК-АП, что свидетельствует об активации перекисного окисления жирных кислот. По всей видимости, это связано с активацией свободнорадикального окисления жирных кислот вследствие нарушения их транспорта для митохондриального окисления.

Таблица 30 – Активность ферментов и содержание ТБК-АП в пульпе резцов крыс при введении ингибитора синтеза карнитина ($M \pm m$)

Ферменты	Экспериментальные группы животных			
	Однократное введение (n=8)	2-х кратное введение (n=8)	3-х кратное введение (n=8)	Контрольная (n=8)
ЛДГ (мкмоль/мин г ткани)	55,4± 4,19 $p^1 < 0,001$	76,3±3,78 $p^1 < 0,001$ $p^2 < 0,001$	97,1± 8,21 $p^1 < 0,001$ $p^2 < 0,001$ $p^3 < 0,05$	11,3± 1,35
МДГ (ммоль/мин г ткани)	16,4±1,52 $p^1 < 0,05$	15,2±1,14 $p^1 < 0,05$ $p^2 > 0,5$	16,6±1,87 $p^1 < 0,05$ $p^2 > 0,5$ $p^3 > 0,5$	10,2±1,18
СОД (мкмоль/мин г ткани)	27,7±3,83 $p^1 < 0,01$	25,0±1,27 $p^1 < 0,01$ $p^2 > 0,5$	24,3±2,86 $p^1 < 0,01$ $p^2 > 0,5$ $p^3 > 0,5$	15,8±3,25
ТБК-АП (мкмоль/ г ткани)	14,2±3,45 $p^1 < 0,05$	15,6±2,13 $p^1 < 0,01$ $p^2 > 0,5$	18,3±4,16 $p^1 < 0,001$ $p^2 > 0,05$ $p^3 > 0,5$	8,45±2,21

Примечание: достоверность отличий: p^1 – с контрольной группой; p^2 – с группой однократного введения ингибитора синтеза карнитина; p^3 – с группой 2-х кратного введения ингибитора синтеза карнитина

Полученные данные можно расценивать таким образом, что энергообеспечение в клетках пульпы осуществляется не только за счет распада глюкозы, но и β -окисления жирных кислот. Недостаток карнитина сопровождается адаптацией пульпы зуба посредством переключения на обмен глюкозы, преимущественно в анаэробных условиях.

3.5.2. Влияние мелатонина и ингибитора TLR4 на активность ферментов и цитокиновый профиль пульпы резцов крыс

Установлено, что мелатонин проявляет свои иммуномодулирующие свойства опосредовано через TLR4 рецептор, поэтому он с недавнего времени рассматривается как модулятор TLR4 (Xia M.Z. et al., 2012; Nduhirabandi F. et al., 2016).

Согласно полученным нами данным, внутрибрюшинное введение экзогенного мелатонина в течение 8 дней приводило к достоверному ($p < 0,001$) увеличению активности АСТ как в пульпе верхних резцов, так и нижних (таблица 31).

Таблица 31 – Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после длительного введения экзогенного мелатонина ($M \pm m$, [min;max])

Ферменты	Группы			
	Пульпа верхних резцов		Пульпа нижних резцов	
	Опытная (n=5)	Контрольная (n=5)	Опытная (n=5)	Контрольная (n=5)
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	126±26,2** [49,2;186]	51,9±17,1 [22,0;95,7]	107±32,8** [32,9;223]	63,2±15,9 [25,5;94,4]
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	14,8±2,97 [6,89;23,8]	17,9±3,99 [7,80;27,3]	25,2±6,73 [8,54;42,7]	16,8±3,79 [9,75;23,3]
ЛДГ (мкмоль/мин·г ткани)	258±52,3 [161;414]	204±37,4 [122;291]	632±133* [169;990]	210±7,71 [194;226]
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	831±3,67 [825;840]	788±35,7 [715;865]	829±13,4 [785;870]	913±33,9 [840;1000]

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с данными контрольной группой

При исследовании АЛТ в пульпе опытных животных наблюдалась тенденция ($p > 0,05$) к понижению активности в верхних и повышению активности данного фермента в нижних резцах. Активность ЛДГ в пульпе резцов животных увеличивалась, но это увеличение было достоверным ($p < 0,05$) только в пульпе нижних резцов. Изучение активности ЩФ в пульпе

резцов крыс показало, что при введении экзогенного мелатонина в пульпе как верхних, так и нижних резцов активность этого фермента практически не отличалась от данных контрольной группы ($p>0,1$).

Активность ферментов в клетках пульпы зуба в ответ на однократное внутримышечное введение ингибитора TLR4 изменялась в зависимости от расположения резцов на челюсти (таблица 32).

Таблица 32 – Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после однократного введения ингибитора TLR4 ($M\pm m$, [min;max])

Ферменты	Группы			
	Пульпа верхних резцов		Пульпа нижних резцов	
	Опытная (n=7)	Контрольная (n=7)	Опытная (n=7)	Контрольная (n=7)
АСТ (ммоль/мин·г ткани)	324±62,2** [128;521]	53,4±13,1 [34,2;109]	161±41,9* [25,9;349]	46,2±10,5 [12,8;99,6]
АЛТ (ммоль/мин·г ткани)	21,5±2,31 [15,9;32,5]	24,4±0,65 [21,6;26,8]	21,8±1,26 [16,0;24,8]	21,6±1,76 [13,0;25,5]
ЛДГ (мкмоль/мин· г ткани)	293±28,3* [199;411]	348±49,6 [128;509]	284±44,8* [130;422]	339±57,0 [119;612]
ЩФ (ммоль/мин·г ткани)	589±72,3* [350;840]	751±197 [128;1520]	994±238* [182;1710]	688±201 [117;1655]

Примечание: достоверность отличий * $p<0,05$; ** $p<0,001$ по сравнению с данными контрольной группы

Выявлена достоверно ($p<0,001$; $p<0,05$) более высокая активность АСТ в пульпе резцов как верхней, так и нижней челюсти по отношению к контролю, и эта активность была наибольшей в пульпе резцов верхней челюсти.

Активность АЛТ в пульпе резцов животных, получивших инъекцию ингибитора TLR4, практически не отличалась от значений контрольной группы животных ($p>0,1$).

По активности ЛДГ оценивали смещение процесса распада глюкозы на анаэробный гликолиз. В случае применения антагониста активность этого фермента сходно снижалась ($p < 0,05$) как в пульпе верхних, так и нижних резцах.

Таким образом, клетки пульпы резцов крыс реагируют на длительное введение мелатонина интенсивным увеличением активности АСТ, но это повышение было ещё более значимым при введении ингибитора TLR4. Эти изменения были более выраженными в пульпе верхних резцов опытных животных.

Гликолитические процессы при введении мелатонина активировались, что отражалось в повышенной активности ЛДГ и в большей степени в пульпе резцов нижней челюсти.

При однократном введении ингибитора TLR4 анаэробные процессы, напротив, подавлялись в равной степени как в пульпе резцов верхней, так и нижней челюсти. При введении мелатонина в пульпе верхних резцов крыс активность ЩФ имела тенденцию к увеличению, а в пульпе нижних резцов – к понижению, а на фоне применения ингибитора TLR4 наблюдаемые изменения были прямо противоположными.

В группе животных, которым вводили мелатонин, выявлено достоверное ($p < 0,001$) увеличение количества ИЛ-6 в пульпе резцов верхней челюсти по отношению к данным животных, которые получали 0,9% раствор NaCl (таблица 33).

Не наблюдалось достоверных отличий ($p > 0,05$; $p > 0,1$) в количественном соотношении ИЛ-1 β в пульпе зубов опытных крыс по сравнению с контролем.

У крыс, получавших мелатонин, уровень ФНО- α недостоверно ($p > 0,05$) понижался в пульпе верхних резцов, а в пульпе нижних зубов не отличался ($p > 0,5$) от значений, полученных у животных контрольной группы.

Таблица 33 – Содержание цитокинов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после длительного введения экзогенного мелатонина ($M \pm m, [min; max]$)

Цитокины (пг/мг ткани)	Группы			
	Пульпа верхних резцов		Пульпа нижних резцов	
	Опытная (n=5)	Контрольная (n=5)	Опытная (n=5)	Контрольная (n=5)
ИЛ-6	25,3±1,51** [23,3;26,9]	13,9±3,81 [9,85;18,9]	18,6±1,74 [17,0;20,5]	16,4±3,37 [11,0;19,7]
ИЛ-1β	37,4±2,38 [30,9;42,3]	30,7±3,06 [23,9;35,4]	24,2±1,47 [21,3;28,0]	27,0±2,41 [21,5;33,0]
ФНО-α	43,8±6,62 [21,3;56,8]	52,0±5,22 [22,7;67,2]	43,1±2,77 [20,1;56,2]	45,3±2,24 [20,6;60,5]

Примечание: достоверность отличий ** $p < 0,001$ по сравнению с данными контрольной группы

Как было описано в обзоре литературы, TLR способен стимулировать секрецию цитокинов. Было показано, что действие этого ингибитора вызывало значительное ($p < 0,05$) понижение количества ФНО-α в пульпе резцов как верхней, так и нижней челюсти (таблица 34).

Таблица 34 – Содержание цитокинов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после однократного введения ингибитора TLR4 ($M \pm m, [min; max]$)

Цитокины (пг/мг ткани)	Группы			
	Пульпа верхних резцов		Пульпа нижних резцов	
	Опытная (n=7)	Контрольная (n=7)	Опытная (n=7)	Контрольная (n=7)
ИЛ-6	18,3±1,15* [14,7;30,8]	14,9±1,67 [12,8;27,5]	15,1±0,50 [13,4;16,1]	14,3±1,40 [11,2;26,2]
ИЛ-1β	29,2±4,15 [21,2;45,2]	30,3±1,74 [27,0;33,9]	36,0±4,63 [29,4;54,1]	36,9±4,52 [24,4;45,0]
ФНО-α	24,9±4,63* [13,3;31,3]	53,7±8,35 [31,3;76,4]	30,0±2,91* [18,9;46,7]	44,2±4,53 [34,1;71,2]

Примечание: достоверность отличий * $p < 0,05$ по сравнению с данными контрольной группы

Количество ИЛ-6 достоверно ($p < 0,05$) повышалось в пульпе резцов верхней челюсти, а в образцах пульпы нижних резцов - это повышение было недостоверным ($p > 0,5$). Содержание провоспалительного цитокина ИЛ-1 β на фоне введения ингибитора TLR4 опытными животными в пульпе резцов как верхней, так и нижней челюсти не отличалось ($p > 0,1$) от значений, полученных у крыс контрольной группы.

Таким образом, содержание цитокинов в пульпе резцов опытных животных после введения мелатонина практически не отличались от данных животных, которым вводили 0,9% раствор NaCl. Имелись отличия только в увеличении количества ИЛ-6, и более значимо в пульпе верхних резцов.

Введение антагониста TLR4 сопровождалось значительным подавлением синтеза ФНО- α как в пульпе верхних, так и нижних резцов. Повышение ИЛ-6 в пульпе резцов имело место, но это увеличение было менее выраженным, чем при применении мелатонина.

3.5.3. Влияние высокого содержания сахарозы и селена на метаболические процессы в пульпе резцов молодых крыс

Для получения модели экспериментального кариеса опытными животными дают диеты, содержащие высокие дозы сахарозы и селена (Шарпенак А.Э. и др., 1959). Проводились визуальные оценки количества кариозных полостей после таких диет, но не установлена роль пульпы зуба в этом процессе. Т.П. Вавиловой (2008) показано, что развитие твердых тканей зубов тесно связано с ограниченным протеолизом при участии различных протеиназ, поэтому, в данном разделе рассматривается, как меняется активность кислых и слабощелочных протеиназ, кислой фосфатазы и лактатдегидрогеназы в пульпе развивающихся резцов крысят на фоне высокосахарозной диеты и добавок селена.

В наших опытах было показано, что у крысят-отъемышей, получающих в течение 30 дней высокосахарозную диету, в пульпе резцов имелась

тенденция к снижению количества общего белка ($p>0,05$) и достоверно снижалась активность СЩП ($p<0,01$) (таблица 35).

Таблица 35 – Активность ферментов и содержание белка в пульпе резцов крыс, получающих различные диеты в течение 30 дней ($M\pm m$)

Показатели	Экспериментальные диеты			
	Синтетическая (n=8)	Синтетическая + селен (n=8)	Высоко- сахарозная (n=8)	Высоко- сахарозная +селен (n=8)
Общий белок (мг/г ткани)	58,8±3,96	67,4±7,88 $p^1>0,05$	53,6±2,60 $p^1>0,05$	66,4±3,76 $p^1>0,05$ $p^2<0,001$
КП (мкмоль/мин· г ткани)	0,17±0,03	0,05±0,007 $p^1<0,001$	0,14±0,01 $p^1>0,1$	0,04±0,009 $p^1<0,001$ $p^2<0,001$
КФ (мкмоль/мин· г ткани)	1,43±0,26	2,11±0,20 $p^1<0,05$	2,58±0,18 $p^1<0,001$	2,07±0,11 $p^1<0,05$ $p^2<0,05$
СЩП (мкмоль/мин· г ткани)	0,06±0,03	0	0,03±0,008 $p^1<0,01$	0
ЛДГ (мкмоль/мин· г ткани)	33,0±3,10	27,1±3,67 $p^1>0,1$	35,9±4,30 $p^1>0,5$	30,5±1,72 $p^1>0,5$ $p^2>0,1$

Примечание: достоверность различий p^1 – по сравнению с контрольной группой; p^2 – между подгруппами животных с селеном и без селена

Это можно рассматривать как угнетение ограниченного протеолиза, что не позволяет открываться центрам инициации минерализации. Введение сахарозы в организм животных в течение 30 дней не оказывало влияние на гликолитические процессы, о чём свидетельствует отсутствие изменений в активности ЛДГ.

В этот период наиболее выражено действие селена, как на синтетической диете, так и высокосахарозной. Введение селена способствовало к недостоверному увеличению количества общего белка в пульпе зубов крыс ($p>0,05$). Активность лизосомальных катепсинов (КП) снижалась в 3,4 раза на синтетической диете с добавлением селена и 4,2 раза

на высокосахарозной диете. При употреблении высоких доз селена в пульпе зубов опытных животных активность слабощелочных протеиназ полностью подавлялась, активность ЛДГ недостоверно ($p > 0,5$) понижалась, а активность КФ достоверно ($p < 0,05$) возрастала.

Продолжающееся действие экспериментальных диет на организм опытных животных в течение 60 дней несколько изменил метаболизм пульпы резцов (таблица 36).

Таблица 36 – Активность ферментов и содержание белка в пульпе резцов крыс, получающих различные диеты в течение 60 дней ($M \pm m$)

Показатели	Экспериментальные диеты			
	Синтетическая (n=8)	Синтетическая + селен (n=8)	Высоко- сахарозная (n=8)	Высоко- сахарозная +селен (n=8)
Общий белок (мг/г ткани)	70,3±6,89	74,9±7,66 $p^1 > 0,5$	63,2±8,27 $p^1 > 0,05$	63,0±3,95 $p^1 > 0,05$ $p^2 > 0,1$
КП (мкмоль/мин· г ткани)	0,12±0,01	0,08±0,003 $p^1 > 0,05$	0,10±0,01 $p^1 > 0,05$	0,10±0,03 $p^1 > 0,05$ $p^2 > 0,5$
КФ (мкмоль/мин· г ткани)	2,46±0,14	2,02±0,10 $p^1 < 0,05$	1,92±0,08 $p^1 < 0,05$	2,16±0,08 $p^1 < 0,05$ $p^2 > 0,1$
СЦП (мкмоль/мин· г ткани)	0,03±0,01	0,01±0,006 $p^1 > 0,1$	0,02±0,01 $p^1 > 0,1$	0,04±0,01 $p^1 > 0,1$ $p^2 > 0,1$
ЛДГ (мкмоль/мин· г ткани)	62,5±5,63	49,2±2,07 $p^1 < 0,05$	46,4±1,09 $p^1 < 0,05$	47,5±5,62 $p^1 < 0,05$ $p^2 > 0,05$

Примечание: достоверность различий p^1 – по сравнению с контрольной группой; p^2 – между подгруппами животных с селеном и без селена

Так, к 60-му дню у крыс, получающих синтетическую диету, по сравнению с 30-м днём возрастало количество общего белка. Активность КП в пульпе резцов крыс контрольной группы на 60 день эксперимента не отличалась от данных, полученных на 30 день. В то же время, включение селена в пищу животных, увеличило активность этих протеиназ, особенно в

той группе животных, которым давали высокосахарозную диету с селеном ($p < 0,001$). На 60 день употребление диеты, состоящей только из сахарозы, практически не влияло на активность СЩП в пульпе резцов крыс. Активность ЛДГ в пульпе резцов всех групп животных, находящихся как на высокосахарозной диете, так и на селене, увеличилась в 1,5-2 раза по отношению к 30 дню, но была достоверно ниже ($p < 0,05$) данных животных, получающих синтетическую диету.

Таким образом, употребление диеты, содержащей 60% сахарозы, молодыми крысятами в течение 30 дней приводило к активации КФ и понижению активности СЩП. В этот сроки эксперимента более выражено действие селена, на фоне приема которого понижалась активность КП и не выявлялась активность СЩП. Дальнейшее кормление животных селеном уже не оказывало существенного влияния на метаболические процессы в пульпе зуба, а наиболее выраженный эффект наблюдался при употреблении больших доз сахарозы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивность живого организма вызывается действием самых различных факторов: средовых, психоэмоциональных и социальных. Поэтому, одной из важнейших задач нашего исследования является изучение механизмов, которые лежат в основе реактивности и резистентности пульпы зуба, поскольку от них зависит сопротивляемость и устойчивость твердых тканей зуба к воздействию факторов внешней и внутренней среды.

Электрофорез растворимых белков в ПААГ позволил установить, что в постоянных зубах при остром пульпите и временных зубах при хроническом пульпите происходит существенное изменение не только белкового спектра, но и уменьшается количество белка в каждой белковой фракции. При хроническом пульпите постоянных зубов расположение белковых фракций близко к показателям интактной пульпы, при этом выявлялось увеличение протеинов с малой молекулярной массой и исчезновение высокомолекулярных белков. Сходная картина была получена и в пульпе временных зубов при хроническом воспалении, но количество белков в отдельно взятой фракции отличалось от пульпы постоянных зубов. Такие изменения в белковых спектрах свидетельствуют об активации и торможении различных процессов и о существенной роли белков пульпы в этих процессах. Однако, использованный нами метод электрофореза не позволил определить состав белковых фракций и установить, какие индивидуальные белки участвуют в ответной реакции пульпы зуба и какую роль они играют. Поэтому полученные сведения об изменении белкового спектра при воспалении пульпы зуба человека потребовали исследований отдельных белков и пептидов.

Временные и постоянные зубы человека имеют отличия в развитии, морфологии и жизненном цикле. Установлено, что они по-разному реагируют на внешние стимулы, такие как тест на чувствительность, травма зуба и биоматериалы для временных и постоянных пломб (Robertson A. et al., 1996; Egan C.A. et al., 1999; Fuks A.B., 2000). Возможно, способность пульпы

временных и постоянных зубов дать адекватный ответ на внешние стимулы зависит от количественного и качественного состава белков и пептидов.

Проведенное нами сравнительное исследование белков и пептидов в интактной пульпе временных и постоянных зубов показало, что в пульпе постоянных зубов преобладают белки, ответственные за неспецифический гуморальный иммунитет (ИЛ-1 β , ИЛ-4, лактоферрин, иммуноглобулин М). В интактной пульпе временных зубов выявлены высокие концентрации белков-маркеров апоптоза (фактора некроза опухоли- α , аннексина V), белков, участвующих в резорбции минерализованных тканей (остеопротегерина и sRANKL), иммуноглобулина G и костного изофермента ЩФ. Это находит своё подтверждение в том, что пульпа временных зубов характеризуется набором специализированных генов, не сходных с таковыми в пульпе постоянных зубов человека (Kim J.-H. et al., 2014). Так, авторы выявили в пульпе постоянных зубов более высокую экспрессию генов, связанных с минерализацией и передачей нервного импульса, тогда как в пульпе временных зубов имелось больше генов, контролирующих рост и деление клеток, и их избирательную гибель в онтогенезе – апоптоз. Например, специфические онкогены, которые обнаруживаются в эмбриогенезе и раковых заболеваниях других органов. Вероятно, запуск такой самоубийственной программы в пульпе временных зубов является необходимым элементом общего развития организма.

Для таких реакций в клетках, как синтез биологических макромолекул, активный транспорт через мембраны необходимо энергообеспечение, источником которого может быть расщепление глюкозы и жирных кислот. Причем распад глюкозы может служить источником АТФ и в бескислородных условиях. В интактной пульпе временных и постоянных зубов активность МДГ и ЛДГ была практически сопоставима, но при этом активность МДГ в 1000 раз превышала активность ЛДГ. Это свидетельствует о значительном преобладании аэробных процессов получения энергии в клетках пульпы зуба. Установлено, что в пульпе постоянных зубов

преобладает изофермент ЛДГ₃ (Linde A., Ljunggren A.E., 1970). Это позволяет предположить возможность использования лактата в качестве субстрата для окисления в условиях достаточного обеспечения кислородом и образование лактата как конечного продукта распада глюкозы при дефиците кислорода и переключении на бескислородный метаболизм. Способность пульпы человека длительное время существовать в анаэробии была подтверждена исследованиями J. Caviedes-Bucheli и др. (2006).

При недостаточном поступлении кислорода к клеткам пульпы при воспалении происходит компенсация потребности в энергии за счёт реакций субстратного фосфорилирования, активно протекающих в гликолизе. Это позволяет предположить, что пульпа зуба занимает промежуточное положение по использованию энергоресурсов, т.е. использует кислород, но может долго существовать даже при полном его отсутствии. В свою очередь, снижающаяся на фоне воспаления пульпы активность МДГ свидетельствует о возможном сдвиге в соотношении АДФ/АТФ в клетках этой ткани.

Мы установили, что в пульпе зуба человека активно протекают реакции трансаминирования аминокислот при участии аминотрансфераз. Биологической задачей реакций переаминирования аминокислот является перераспределение аминного азота через включение в состав глутаминовой аминокислоты (Фершт Э., 1980). В клетках человека АСТ локализуется в митохондриях и цитоплазме, а АЛТ, преимущественно, в цитоплазме клетки (Давыдова А.В., 2013).

По нашим данным соотношение АСТ и АЛТ в интактной пульпе временных зубов человека достигает 3.0, а в пульпе постоянных зубов более чем в 2 раза выше - 7.13. Высокие значения активности трансаминаз в пульпе временных зубов, вероятно, связаны с более активной работой малат-аспартатного челночного механизма, о чём косвенно свидетельствует высокая активность МДГ, которая сопоставима в пульпе постоянных и временных зубов.

При гиперемии пульпы постоянных зубов активность АСТ не отличалась от таковой в интактной пульпе, что отражает отсутствие дистрофических изменений. При остром и хроническом пульпите активность этого фермента снижалась, что, возможно, связано с замедлением работы малат-аспартатного челночного механизма в условиях гипоксии. Наблюдаемое нами уменьшение активности АЛТ в пульпе постоянных зубов при воспалении может быть связано с тем, что реакция переаминирования аланина протекает медленнее, что приводит к снижению образования глутамата и пирувата, т.е., возможно, переключение обменных процессов на гликолиз.

В пульпе временных зубов при хроническом воспалении активность АСТ понижалась, а активность АЛТ существенно увеличивалась, в то время как в стадию резорбции корня зуба выявлено значительное увеличение активности как АСТ, так и АЛТ по отношению к активности этих ферментов в интактной пульпе. Это свидетельствует о готовности или происходящей гибели клеток. В пульпе зуба в стадию резорбции корня зуба увеличение активности АСТ может носить компенсаторный характер, связанный с увеличением синтеза глутамата, участвующего в ряде биохимических процессов, в том числе и в связывании аммиака, частичное обезвреживание которого происходит за счёт синтеза глутамина. Увеличение активности АСТ и АЛТ также свидетельствует о значительном протеолизе при воспалении и утилизации аминокислот. Таким образом, наблюдаемые разнонаправленные изменения в активности АСТ и АЛТ в пульпе временных и постоянных зубов при воспалении связаны с усилением процессов обмена аминокислот и обезвреживания аммиака, что является одним из механизмов адаптации пульпы зуба к неблагоприятным условиям.

Щелочная фосфатаза представляет собой Zn^{2+} -зависимый фермент, и проявляет свою активность в щелочной среде (рН оптимум <9.0) (Moss D.W., 1992). ЩФ проявляет активность в димерной форме и участвует в расщеплении фосфорилированных соединений (Buchet R. et al., 2013).

Определена центральная роль ЩФ в регуляции процессов активации и ингибирования центров минерализации (Gaur T. et al., 2005; 2006; Garimella R. et al., 2006; Addison W.N. et al., 2007). Подавление активности фермента приводит к депонированию в тканях фосфатсодержащих субстратов. Это приводит к ингибированию минерализации, и, как следствие, развитию общесистемных патологий (Whyte M.P., 2010).

Установлено, что ЩФ является ключевым ферментом в обеспечении минерализации зуба в норме и патологических состояниях (Aslantas E.E. et al., 2015). Благодаря стабильности молекулы и простоте исследования, активность ЩФ используется в качестве маркера минерализации тканей. Выявленная нами активность ЩФ в интактной пульпе временных зубов была почти в 2 раза выше по сравнению с пульпой постоянных зубов. Подобное свойство пульпы временных зубов, по всей вероятности, связано с более активным образованием фосфорилированных субстратов, которые нуждаются в утилизации и дальнейшем использовании освободившегося фосфата на нужды минерализованных тканей временного зуба (Georgiev Z. et al., 2005). Высокая активность ЩФ, наблюдаемая при гиперемии и остром воспалении пульпы постоянных зубов и хроническом воспалении временных зубов человека связана, на наш взгляд, с увеличением транспорта фосфат-ионов через плазматические мембраны клеток для обеспечения минерализации защитного слоя дентина.

Присутствие ферментов антиоксидантной защиты в интактной пульпе было установлено нами и целым рядом исследователей (Davis W.L. et al., 1991; Bowles W.H., Burns H., 1992; Tulunoglu O. et al., 1998). Мы установили, что в интактной пульпе временных зубов активность общей СОД в 2 раза ниже, чем в пульпе постоянных зубов. В интактной пульпе человека не выявлена активность ГПО, которая только была обнаружена в пульпе временных зубов при воспалении в стадию резорбции корня. Это совпадает с данными W.H. Bowles и H. Burns (1992), которые также не обнаружили активности ГПО в интактной пульпе человека. Эти авторы

высказали предположение, что ключевая роль в инактивации пероксида водорода в пульпе зуба принадлежит не ГПО, а каталазе, которая и обеспечивает защиту клеток от повреждения. Напрашивается гипотеза, согласно которой в пульпе зуба источником каталазы являются эритроциты. Пойманные в ловушку эритроциты, в расширенных кровеносных сосудах при воспалении могут быть частично ответственны за повышение активности каталазы (Roos D. et al., 1980; Aebi H., 1984).

Наше исследование демонстрирует незначительную биологическую систему обороны против эндогенного H_2O_2 в интактной пульпе зуба человека. Есть предположение, что задачами пульпы зуба является использование образующегося эндогенного пероксида водорода для естественного отбеливания зубов и не предусматривает необходимость в его полной утилизации. Точный механизм транспорта эндогенного пероксида водорода в пульпе зуба не изучен, но имеются сведения, что попадающие в дентинные каналы с током крови цветные хромофоры вступают в реакцию с пероксидом водорода (Nathoo S., 1997). Молекулы цветных хромофоров, найденные в зубах, имеют органическую природу с простыми и двойными связями, которые после реакции с нестабильными радикалами разрываются, что обеспечивает эффект белизны зубов (Joiner A., 2006).

В ответ на воспалительный стимул клетки, в частности макрофаги, выделяют пероксид водорода, который в больших количествах накапливается в межклеточном матриксе (Babior V.M., 1984; Forman H.J., Torres M., 2001). Прямая или косвенная защита против образовавшихся активных форм кислорода обеспечивается нейтрофильными клетками, которые секретируют медь/цинк зависимую супероксиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу (Freeman B.A., Crapo J.D., 1982). W.L. Davis et al. (1991) было выявлено повышение активности цитозольной Cu^{2+} -зависимой супероксиддисмутазы в пульпе зуба при воспалении по сравнению с интактной пульпой зуба, а O.Tulunoglu et al. (1998) установили различия в активности данного фермента только при обратимом пульпите.

Наши исследования показали, что активность общей СОД значительно увеличивается только при гиперемии пульпы постоянного зуба, а усугубление воспалительного процесса приводит к снижению активности этого фермента. При хроническом воспалении пульпы временных и постоянных зубов активность общей СОД достоверно не меняется. По-видимому, на стадии кариозного процесса утилизация супероксида и образование H_2O_2 при участии СОД необходимы для развития реакции на повреждение дентина, а при воспалении в самой пульпе роль СОД становится не столь значимой. Похоже, что при воспалении нет задачи сохранения нативного состояния пульпы, а идет подготовка к её гибели или перерождению в фиброзную ткань. При таком сценарии можно предположить, что O_2^- играет роль сигнальной молекулы (Меньшикова Е.Б. и др., 2006), стимулирующей апоптоз одонтобластов и замещение их фиброзной тканью.

Активность ГПО не была обнаружена нами не только в интактной пульпе зубов человека, но и при воспалении. В пульпарном полипе активность СОД была крайне низкая, что является свидетельством образования метаболически неактивной ткани, сходной с рубцом.

Показано, что воспалительный процесс характеризуется не только нарастанием количества активных форм кислорода, но и изменением уровня гомоцистеина в периферической крови (Шевченко О.П. и др., 2002). В пульпе временных зубов в стадии резорбции корня зуба при воспалении выявлялись высокие значения количества гомоцистеина – аминокислоты, содержащей тиоловую группу. Показано, что в избытке гомоцистеин может вызывать окислительное повреждение мембран клеток эндотелия сосудов (Бутенко А.В., 2016; Refsum H., Ueland P.M., 1990; Ueland P.M., 1995; Ganguly P., Sreyoshi F.A., 2015).

В нашем исследовании мы установили, что в окислительное дезаминирование 100 мМ серотонина и 10 мМ фенилэтиламина вовлечены, как MAO A, так и MAO B, а в дезаминировании высоких концентраций

фенилэтиламина (50 мМ) участвует SSAO. Наши данные отличаются от результатов, полученных М. O'Sullivan et al. (2002), так как мы не обнаружили дезаминирования 100 мМ серотонина в пульпе зуба при участии SSAO. Возможно, что концентрация серотонина, использованная нами, была просто недостаточной, так как K_m SSAO для серотонина в 3 раза выше. Согласно нашим результатам, при развитии острого пульпита достоверно снижается общая активность моноаминоксидаз, при этом уменьшается активность MAO B, но достоверно увеличивается активность SSAO.

В то же время, достоверных изменений в активности MAO A при остром пульпите не обнаружено. Трёхкратное снижение связывания паргилина предполагает уменьшение количества фермента, чем и вызвано снижение активности MAO A. Мы не изучали количество белка с активностью SSAO, поэтому трудно установить, с чем именно связано повышение активности этого фермента при воспалении пульпы зуба. Имеется несколько вариантов предположений, и каждое нуждается в дополнительном исследовании. Первое опирается на исследование М. O'Sullivan et al. (2003), которые обнаружили в пульпе зуба свиньи 2 формы SSAO, ассоциированные с микросомами. Мы не можем подтвердить или опровергнуть существование этих форм SSAO в пульпе зубов человека, но не можем и исключить их вклад в увеличение активности SSAO при пульпите. Второе связано с возможным выходом мембраносвязанной SSAO из клеток в кровь (Boomsma F. et al., 2005). Показано, что при воспалении увеличивается проницаемость сосудов пульпы зуба (Takahashi K., 1992), и из крови могут поступать достаточно крупные молекулы. Можно предположить, что SSAO поступает в воспаленную пульпу из плазмы крови. Впрочем, любые предположения нуждаются в дальнейшем исследовании.

Различия в активности трёх изученных ферментов свидетельствуют о разнообразии их роли для пульпы человека. Неизменённая MAO A может участвовать в защите пульпы зуба от избытка серотонина – медиатора воспаления и боли. Причина снижения активности MAO B не ясна.

Возможно, это связано с понижением количества единственного субстрата MAO В – дофамина, который присутствует в пульпе зуба наряду с норадреналином, но он не должен повышаться при воспалении. Однако, ингибирование MAO В может приводить обязательно к снижению продукции H_2O_2 , повреждающего ткани при воспалении (Fang J. et al., 2009).

Рядом исследований установлено, что SSAO является участником воспалительных процессов в разных тканях, а при его ингибировании воспаление затухает (Inoue K. et al., 2000; O'Sullivan M. et al., 2002; Salter-Cid L.M. et al., 2005; Noda K. et al., 2008). Поскольку SSAO из плазмы крови может вызывать сшивку внеклеточных белков (Gubisne-Haberle D. et al., 2004), то повышение этого фермента внутри клетки может вызывать аналогичные модификации внутриклеточных белков при переходе острого процесса в хроническую стадию.

В крайне редких случаях хроническое воспаление в пульпе зуба сопровождается образованием полипа, который морфологически состоит из фиброзной ткани, покрытой сверху эпителиальной оболочкой (Southam J.C., Hodson J.J., 1973; Smulson M.H., Sieraski S.M., 1996). Адгезию эпителиальных клеток к соединительнотканному матриксу пульпы обеспечивает белок ламинин-5 (Fukumoto S. et al., 2006). На поверхности фибробластов полипа пульпы выявлено большое количество рецепторов к эстрогенам (Whitaker S.B. et al., 1994; Raslan N., Wetzel W.-E., 2006). Выступающий край гранулемы пульпы содержит инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, плазменных клеток и нейтрофилов (Piskin B. et al., 1993), поэтому, в данном случае, развитие воспалительной реакции связано с мононуклеарными клетками, а не с полиморфноядерными лейкоцитами (Маянский Д.Н., Урсов И.Г., 1997). Надо заметить, что истинную причину образования полипа пульпы до настоящего времени установить не удаётся.

При пролиферативных изменениях в пульпе зуба человека выявлена специфичная метаболическая активность некоторых ферментов. Так, исследования выявили крайне низкую активность ЛДГ, СОД и ЩФ на фоне

значительного повышения активности АСТ, АЛТ и α -гликозидазы по сравнению с активностью этих ферментов в интактной пульпе. Гликозидазы оказывают влияние на специфический рост трансформированных клеток, а высокая активность этого фермента указывает на возможное его участие в активной пролиферации фиброзной ткани. Повышенная активность трансаминаз свидетельствует об усиленной деградации белков, вследствие повреждения клеток при гипертрофическом пульпите. При пролиферативном воспалении в пульпе изменениям подвергаются все тканевые и клеточные структуры, проявляясь как их гиперплазией, так и инволюцией ряда клеточных элементов. Низкая активность ЛДГ, СОД, ЩФ скорее всего отражает замещение нативной ткани пульпы на фиброзную и снижение способности образования репаративного дентина.

Воспаление сопровождается мобилизацией иммунокомпетентных клеток из крови через эндотелиальный барьер к месту повреждения (Matsushima K. et al., 1998; Freitas P. et al., 2007). Для ограничения распространения воспаления необходимо устранение патогенов и провоспалительных посредников, в котором ролевую функцию исполняют регуляторные белки и пептиды (Serhan C.N. et al., 2008; Serhan C.N., Petasis N.A., 2011). Одним из участников в процессе регуляции воспаления являются цитокины и эйкозаноиды, а также стероидные гормоны. Антагонисты к рецептору интерлейкина-1 (ИЛ-1), фактор некроза опухоли (ФНО), ИЛ-10, оксид азота, гемоксигеназа-1, а также Т-лимфоциты участвуют в уменьшении воспаления и восстановлении гомеостаза ткани (Gilroy D.W. et al., 2004; Eming S.A. et al., 2007; Blancou P., Anegon I., 2010; Buckley C.D. et al., 2013). Исходя из вышеизложенного, купирование воспаления является активным, многофакторным и высокоорганизованным процессом (Uddin M., Levy B.D., 2011; Rius B. et al., 2012).

В настоящем исследовании в пульпе постоянных зубов при хроническом воспалении выявлено повышение количества ИЛ-1 β , ИЛ-4, ФНО- α и лактоферрина. В пульпе временных зубов, напротив, уровень ИЛ-1 β снижен,

но увеличено количество ИЛ-4 и лактоферрина. В постоянных зубах, развивающееся воспаление, активно переходящее в хроническое, сопровождается увеличением в пульпе ИЛ-1 β , а во временных зубах с интактными корнями наблюдается попытка ограничения воспаления. Лактоферрин, оказывающий антибактериальное действие, активируется в ответ на бактериальную инвазию из кариозной полости.

В интактной пульпе временных зубов содержание ФНО- α крайне низкое, но оно достоверно возрастает при развитии хронического воспаления и наибольшее его количество определяется в воспалённой пульпе при резорбции корня зуба. Возможно, повышенная концентрация ФНО- α в пульпе временных зубов при воспалении на стадии резорбции корня зуба стимулирует апоптоз и позволяет ускорить эвакуацию поврежденного зуба из челюсти.

Уровень IgM в интактной пульпе постоянных зубов человека превышает содержание IgG. Однако, имеющееся небольшое количество IgA при полипе пульпы постоянных зубов можно связать с его синтезом эпителиальными клетками, покрывающими полип. В пульпе постоянных зубов при остром пульпите снижается количество IgM и исчезает IgG, в то время как при хроническом пульпите концентрация IgG и IgM близка к количеству этих иммуноглобулинов в интактной пульпе. Отсутствие иммуноглобулина G и снижение количества IgM при остром пульпите, по всей видимости, связано с нарушением микроциркуляции и эти белки, возможно, не поступают из плазмы крови, или же происходит образование стабильно связанных комплексов иммуноглобулинов с антигенами. Повышение количества иммуноглобулина класса G наряду с аннексином V в пульпе постоянных зубов при воспалении свидетельствует о хроническом процессе, а выявление повышенного уровня IgM вместе с аннексином V в пульпе временных зубов при воспалении говорит либо об остром процессе, либо об обострении хронического. Аннексин V в частности рассматривается как белок, обладающий антикоагулянтными свойствами. Его увеличение можно

рассматривать в качестве фактора, предотвращающего тромбообразование в сосудах пульпы при воспалении (Rand J.H. et al., 2010).

Клетки пульпы зуба, в основном одонтобласты, синтезируют большое количество белков и пептидов, которые определяют процессы минерализации дентина (Вавилова Т.П., 2008). На фоне хронического воспаления снижается активность фермента щелочной фосфатазы, количество пептида остеокальцина и незначительно увеличивается содержание аннексина V. Эти изменения отражают нарушения трофической функции клеток пульпы зуба и не способствуют поддержанию постоянства минерализованного матрикса твёрдых тканей зуба, что отражается на формировании репаративного дентина. В интактной пульпе постоянных зубов sRANKL и OPG не определялись, но при хроническом воспалении эти полипептиды выявлялись в незначительном количестве. Процесс воспаления характеризуется увеличением в пульпе временных зубов sRANKL и понижением содержания OPG, что свидетельствует о разрушении матрикса пульпы зуба. Коэффициент, отражающий соотношение sRANKL/ OPG был выше в пульпе постоянных зубов при хроническом воспалении, что определяет более высокую готовность клеток к резорбции поврежденных тканей.

В процессе восстановления клеток пульпы зуба образования репаративного дентина в ответ на воспаление в пульпе зуба важную роль отводят факторам роста, обеспечивающим пролиферацию и дифференцировку клеток. В воспалённой пульпе постоянных и временных зубов имелась тенденция к увеличению содержания инсулиноподобного-1 фактора роста и основного фактора роста фибробластов- β и снижению трансформирующего фактора роста 1β . Отсутствие изменений в количестве изученных полипептидов свидетельствуют о незначительной пролиферативной активности клеток пульпы зуба на фоне воспаления.

В физиологических условиях апоптоз обеспечивает равновесие митоза клеток (Гордеева А.В. и др., 2004; Arends M.J., Wyllie A.H., 1991; Nishikawa

S., Sasaki F., 1999; Sasaki T., 2003). Пульпа зуба, благодаря митозу и апоптозу, как и большинство жизнеспособных тканей, постоянно обновляется и требует энергетических затрат, необходимых для синтеза и деградации белковых молекул (Cohen J.J., 1993). При хроническом воспалении в пульпе временных зубов процессы апоптоза усиливаются, а в пульпе постоянных зубов, наоборот, подавляются. Установлено, что излишняя активация апоптотической гибели клеток приводит к истощению защитных систем, а ее ингибирование - к хронизации воспалительного процесса (Часовских Н.Ю. и др., 2007). Наблюдаемое, в пульпе временных зубов повышение белков-маркеров апоптоза обосновано, так как по биологическим законам они не рассчитаны на долговечное пребывание в челюсти. А в пульпе постоянных зубов наблюдается вялотекущее хроническое воспаление и образование капсулы вокруг очага воспаления.

Изучением апоптоза и его роли в процессе физиологической резорбции корня временного зуба занималась лишь незначительная часть исследовательских групп (Nishikawa S., Sasaki F., 1999; Harokopakis-Hajishengallis E., 2007; Domon T. et al., 2008; Yildirim S. et al., 2008; Monteiro J. et al., 2009). Одновременно с прорезыванием постоянного зуба происходит резорбция корня временного зуба. Хотя эти два процесса протекают одновременно, но они имеют разные физиологические механизмы. Это можно проследить на примере, когда при отсутствии зачатка постоянного зуба, процессы резорбции временного зуба не отменяют законы физиологии (Marks S.C., Schroeder H.E., 2001; Eronat C. et al., 2002).

В процессе резорбции корней временных зубов принимают участие, локализующиеся в пульпе многоядерные одонтокласты, фибробласты и макрофаги (Liao S.C., Chang H.P., 1990; Yildirim S. et al., 2008). Было выявлено, что при физиологической резорбции корня временного зуба наблюдается активация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и кислой фосфатазы (Foster E., Robinson P., 1994; Goldberg M., Smith A.J., 2004). Исследователи считают, что это связано с усиленным образованием восстановленного

НАДФ, который необходим для защиты тканей, окружающих зуб, от активных форм кислорода.

Воспаление пульпы временного зуба может развиваться и в период смены зубов, который сопровождается резорбцией корня зуба. Показано, что воспалительная реакция пульпы зуба в этом случае имеет свою специфичность, которая обусловлена образованием в зоне повреждения нерегулярного дентина (Goldberg M., Smith A.J., 2004). Увеличение активности трансаминаз, оксидоредуктаз и щелочной фосфатазы, а также количества аннексина V, гомоцистеина, ФНО- α , остеопротегерина и sRANKL в пульпе временных зубов при воспалении в стадию резорбции корня зуба, по всей видимости, отражает ускорение процесса запрограммированной гибели клеток для предупреждения распространения воспаления на область зачатков постоянных зубов.

Установлено, что воспаление пульпы зуба (пульпит) в 35-50% развивается как осложнение кариеса (Боровский Е.В., 1998; Александрова Л.Л. и др., 2010; Плюхина Т.П. и др., 2016) и клинические проявления в пульпе зуба у детей существенно отличаются от таковых у взрослых (Адашкина Н.Ю., 2005). В педиатрической практике считается, что у детей хроническая стадия воспаления пульпы чаще развивается не вследствие перехода из острой стадии, а как первично-хронический процесс (Сергеева Н.Д., Виноградова А.В., 2009). Наши же исследования показали, что воспалительный процесс в пульпе временных зубов протекает по типу острой реакции. Ввиду того, что анатомически временный зуб имеет широкое апикальное отверстие. Это позволяет быстрее выводить продукты деградации белковых молекул из пульпарной камеры в околозубное пространство. Поэтому симптомы воспаления пульпы зуба у детей ярко выражены в течение нескольких часов, а затем развивается абсцесс в периапикальных тканях. Клиническими исследованиями В.Д. Ландиновой (2004) показано, что для пульпита в постоянных зубах характерна длительность течения. Возможно, узкое апикальное отверстие корня зуба не

позволяет при воспалении пульпы постоянного зуба расширенным кровеносным сосудам осуществлять транспорт токсинов и бактериальных метаболитов за пределы зуба, что требует от пульпы мобилизации всех своих защитных сил для ограничения распространения воспаления. Одним из способов защитной реакции пульпы постоянных зубов является перерождение ткани, которое сопряжено с активным синтезом коллагена фибробластами пульпы для изоляции очага воспаления. Поэтому течение пульпита в постоянных зубах отсрочено во времени.

Для сохранения пульпы зуба было предложено большое количество методов, однако, терапевты-стоматологи являются сторонниками радикального метода лечения пульпита, так как в широкой практике биологический метод даёт большое количество осложнений (Кисельникова Л.П. и др., 2002). Считается, что эти осложнения связаны с ошибками в первичной диагностике степени распространённости воспалительного процесса (Анохин А.С., 1988; Елизарова В.М., 1998; Мельниченко Э.М. и др., 2001), но, при этом, не всегда учитываются физиологические особенности пульпы временных зубов, находящихся на стадии формирования или резорбции корня зуба (Жилина В.В., 1985; Котомин Б.В. и др., 1999).

Поэтому, перспективными являются те стадии пульпита, которые позволяют оставлять пульпу живой, а также метод витальной ампутации с сохранением корневой ее части (Камышникова, И.О., 1992). Вместе с тем, несмотря на большое количество разработанных способов лечения пульпита и используемых лекарственных средств, проблема остается открытой.

При биологическом методе лечения пульпита основной задачей фармакологического воздействия на пульпу зуба являются ликвидация воспалительного процесса и стимуляция репаративных процессов. Анализ отдаленных результатов лечения пастами, содержащими сульфаниламиды (Марченко А.И. и др., 1988), антибиотики или глюкокортикоиды (Кортуков И.Е., 1997; Рзаева Т.А., 1986) показал, что воспалительные процессы в пульпе приобретают хроническое бессимптомное течение (Дмитриева Л.А. и

др., 1993). При этом в пульпе выявлялось снижение количества тучных клеток, подавление пролиферации фибробластов, угнетение синтеза коллагена I типа и неколлагеновых белков, в том числе, протеогликанов и остеопонтина (Love R.M., Jenkinson H.F. 2002).

Так как пульпа зуба сообщается с волокнами периодонта через сеть общих кровеносных сосудов, то мы оценили возможность неинвазивной прижизненной диагностики её состояния по количеству белков и пептидов в десневой жидкости. Поэтому для оценки жизнеспособности пульпы зуба при прямом её покрытии лечебными пастами нами было проведено исследование десневой жидкости, которая содержит низкомолекулярные белки и пептиды, поступающие из кровеносных сосудов периодонта и клеток эпителия десны. Выявленное в элюате ДЖ количество провоспалительных пептидов ИЛ-1 β и ФНО- α , а также антибактериального белка лактоферрина достоверно показали реакцию клеток неспецифического иммунитета пульпы временных зубов на лечебные пломбировочные материалы, содержащих эвгенол, оксид кальция и борнеол. Нами было показано, что эвгенол обладает антисептическим, противовоспалительным и обезболивающим эффектом, но другими исследованиями доказан его цитотоксический эффект (Комнов Д.В., 1989; Алексеева Т.В., 1998). При применении лечебного материала, содержащего только оксид кальция, выявлялась несостоятельность клеток неспецифической иммунной защиты пульпы зуба в противодействии воспалительной реакции. Установлено, что оксид кальция в разных прописях не вызывает структурных изменений в пульпе зуба (Данилевский Н.Ф. и др., 2003; Kolips A., Rask-Andersen M., 1983), но обладает низкой антимикробной защитой (Салова А.В., 1997). Достоверный противовоспалительный эффект через 6 месяцев после лечения пульпита оказывала паста, содержащая борнеол. В этом случае количество провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО- α было самым низким и приближалось к показателям здоровых зубов.

Использование модельных опытов на крысах позволило изучить реакционноспособность и адаптивность клеток пульпы к вышеописанным условиям изменяющейся среды.

Мы впервые создали целый ряд моделей, позволяющих экстраполировать различные ситуации, которым ежедневно подвергается организм человека. В качестве экспериментальных моделей предпочтение отдавалось крысам, что согласуется с другими исследователями (Baker D.E. et al., 1979; Fagundes D.J., Taha M.O., 2004; Dannan A., Alkattan F., 2007; Struillou X., 2010; Struillou X. et al., 2010; Sengupta P., 2012; Alzarea B.K., 2014). Показано, что биологические реакции пульпы коренных зубов крысы при различных патологических состояниях сходны с человеком (Murray P.E. et al., 2002), однако, эксперименты представляют трудности из-за их небольшого размера (Dammaschke T., 2010). В этом случае интерес для исследования представляют резцы крыс, их рост продолжается в течение всей жизни и прорезывается только одно поколение зубов, а у человека зубы прорезываются два раза - временные и постоянные (König K.G. et al.1958; Hunt A.M. et al.,1970; Lange A., Hammarström L., 1984). Г.А. Клевезаль (1981) установила, что у обыкновенной полёвки скорость роста резцов позволяет им полностью обновляться за 27 дней. Поэтому для достоверности полученных результатов или выбора дизайна исследования необходимо учитывать видовые отличия у грызунов и человека (Paynter K.J., Hunt A.M., 1964; Hunt A.M. et al., 1970; Navia J.M., Narkates A.J., 1980; Alves M.J., Colli W., 2006; Sengupta P., 2013). Мы установили различие в количестве белков и активности ферментов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека и резцов половозрелых крыс-самцов в возрасте 5-6 месяцев. В пульпе резцов крыс, по сравнению с пульпой постоянных и временных зубов человека, отмечается более высокая активность окислительно-восстановительных ферментов – лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы; а также щелочной фосфатазы. Для формирования минерализованного матрикса дентина в участке стирания резцов у крыс

требуется постоянное поступление неорганических ионов, а поставщиком фосфата выступает фермент щелочная фосфатаза. Обновление клеток в пульпе резцов крыс требует участия кислородных радикалов, время полужизни которых контролирует фермент супероксиддисмутаза. Высокая активность АСТ и АЛТ свидетельствует как в пользу повышенного распада аминокислот с освобождением α -кетокислот, так и образования глутаминовой и аспарагиновой кислоты. Образовавшиеся свободные аминокислоты могут использоваться в синтезе белков *de novo* или подвергаться дезаминированию, что удовлетворяет потребности постоянно растущих резцов крыс.

В пульпе резцов крыс содержание аннексина V и ФНО- α , IgG и IgM по сравнению с пульпой человека было достаточно низким. Между тем, количество ИЛ-1 β в пульпе резцов крыс было выше, чем в пульпе постоянных зубов человека. Полученные данные можно расценивать как отсутствие необходимости поддерживать истирающуюся часть резцов, компенсирующейся, вероятно, за счет значительной толщины минерализованной ткани зуба.

Любые повреждения в полости рта, связанные с удалением зуба, перфорацией слизистой оболочки щеки скальпелем или излучением эрбиевого лазера, сопровождаются реакцией клеток пульпы зуба, о чем свидетельствует повышение активности щелочной фосфатазы в пульпе резцов крыс. Экспериментальная модель сдвигания зуба позволила создать биологическую ситуацию, возникающую у человека при ортодонтическом лечении. Это исследование позволило оценить, как осуществляется метаболизм в клетках пульпы резцов крыс в течение 9-ти дней после оказываемого натяжения на зуб с усилием 100 г/с. Наши результаты показали, что силы, произведенные во время экспериментального движения зуба, угнетают фосфорно-кальциевый обмен в пульпе резцов опытных животных.

Полученные нами данные в других модельных опытах показали, что пульпа резцов крыс реагирует на удаление отдаленно расположенных моляров, что, по-видимому, связано с выбросом в кровь биологически активных веществ, участвующих в восстановлении структуры костной ткани челюсти. Введение антигомотоксических препаратов «Граумель С» и «Лимфомиозот» вызывает активацию ЩФ в пульпе верхних и нижних резцов, а антибиотик «Амоксиклав» (клавулановая кислота+амоксициллин), напротив, подавляет активность фермента, и в большей степени, на нижней челюсти.

Пульпа зубов животных реагирует не только на удаление соседних зубов, но и на нарушение целостности слизистой оболочки щеки, что наиболее ярко отражает активность щелочной фосфатазы в пульпе резцов верхней челюсти на первые и пятые сутки эксперимента после повреждения тканей щеки скальпелем. В то же время, при травме слизистой оболочки щеки излучением эрбиевого лазера с энергией 350 мДж, длительностью импульса 700 мкс (режим «long»), частотой 20 Гц и временем экспозиции 15 секунд пульпа резцов крыс не реагировала, так как активность щелочной фосфатазы не отличалась от данных, полученных в пульпе резцов интактных животных. Очевидно, лазерное воздействие более щадящее и не вызывает выраженного болевого стресса, отражающегося на состоянии пульпы зуба.

Полученные результаты воздействия травмы и приложение силы натяжения на зуб отражают адаптационно-приспособительную реакцию одонтобластов пульпы в ответ на болевой стресс, вызываемый травмой тканей полости рта. Вместе с тем, избыточный синтез щелочной фосфатазы может привести к истощению клеток пульпы, их вакуолизации и апоптозу, а также образованию кальцификатов в этой ткани.

Однократная и многократная иммобилизация животных также сопровождается реакцией со стороны пульпы. Однократная иммобилизация животных сопровождалась увеличением активности АСТ и ЛДГ в пульпе как верхних, так и нижних резцов, что свидетельствует об общей реакции клеток

на изменяющиеся условия внешней среды. На фоне длительной иммобилизации активность ЛДГ и ЩФ в пульпе верхних резцов увеличивалась, а в пульпе нижних резцов параллельно с повышением активности АСТ, активность ЩФ и ЛДГ, напротив, снижалась. В данном случае, разнонаправленность в активации ферментов в зависимости от расположения зубов на челюсти, возможно, связана с анатомическими различиями в количестве сосудов и нервных волокон.

Ранее было установлено, что в цитозоле одонтобластов локализуются жирные кислоты (Goldberg M., Septier D., 1984). Было высказано предположение, что они не только входят в состав структурных липидов мембран этих клеток, но и могут использоваться как источник энергии (Kirimoto T. et al., 1996). Мы решили проверить данную гипотезу путем выключения реакции окисления жирных кислот. Так, в транспорте ацилов в матрикс митохондрий участвует карнитин, ингибирование образования которого должно приводить к блокированию использования клетками ацилов в качестве энергетического источника, а возникший энергодефицит может компенсироваться за счёт активного потребления глюкозы. В наших экспериментах ежедневное 3-х кратное введение ингибитора синтеза карнитина сопровождалось значительным увеличением ЛДГ и МДГ в пульпе резцов крыс (в 8,5 и 1,6 раз соответственно). Полученными нами данными было убедительно доказано, что в энергообеспечение клеток пульпы зуба существенный вклад вносит как распад глюкозы, так и окисление жирных кислот. Однако, введение ингибитора синтеза карнитина - γ -бутиробетаингидроксилазы опытными животными сопровождается ростом в пульпе зуба активности супероксиддисмутазы и количества продуктов свободно-радикального окисления. С каждой последующей инъекцией селективного ингибитора синтеза карнитина эти процессы нарастали. Мы ожидали, что избыток пероксида водорода в пульпе резцов крыс будет инактивироваться ГПО, однако данный фермент в пульпе резцов крыс нами был не обнаружен. Таким образом, вмешательство в процессы

энергообеспечения клеток пульпы резцов крыс путем ингибирования транспорта жирных кислот в матрикс митохондрий сопровождается переключением на анаэробный распад глюкозы и активацией свободно-радикального окисления. То есть можно сделать вывод, что в энергетическом обмене пульпы зуба окисление жирных кислот занимает определенное место.

Важная роль в возникновении зубных патологий отводится характеру питания, в частности употреблению пищи, содержащей большое количество углеводов. Было показано, что высокосахарозная диета оказывает влияние на метаболические процессы в дентино-пульпарном комплексе (Valikangas L. et al., 2001). Полученные нами данные о снижении активности кислых и слабощелочных протеиназ в пульпе крыс, получающих кариеогенную диету, свидетельствуют о возможном нарушении структуры формирующейся белковой матрицы дентина, а обнаруженное повышение активности КФ и ЛДГ является показателем нарушения формирования минеральной матрицы. При этом явные изменения в метаболизме наблюдались на 30-й день опыта, а к 60 дню происходила адаптация пульпы к модельным условиям: либо менялся возраст животных, либо закрывались центры минерализации и протеолиз белков на завершающем этапе развития зуба был уже неактуален.

Отсутствие протеолитической активности слабощелочных протеиназ на 30-й день опыта в пульпе резцов крыс, получающих с пищей субтоксические дозы селена, гипотетически объясняется возможным присоединением селена к гидроксильной группе треонина, который присутствует в активном центре ферментов протеасомного комплекса. Кислые протеиназы, в частности, катепсин В, содержат в активном центре цистеин и серосодержащая тиольная группа может быть заменена на селеносодержащую с образованием селеноцистеина, что изменяет свойства фермента. В опытах с использованием меченого селена Se^{75} было показано, что в минерализованных тканях селен интенсивно связывается с белками (Подорожная Р.П., 1973). В другом случае, возможно связывание селена с серином на этапе посттрансляционной модификации синтеза коллагеновых и

неколлагеновых белков, что может привести к формированию химически неустойчивых минерализованных структур зуба.

Показана важная роль иммунных молекул в поддержании физиологических функций и гомеостаза у млекопитающих (Судаков К.В. и др., 2011). В данном эксперименте изучалось участие мелатонина и ингибитора TLR4 рецептора в реализации иммунного ответа клеток пульпы зуба по активности ферментов и количеству провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Изучение роли трансмембранных толл-подобных рецепторов играющих ключевую роль в системе врожденного иммунитета и запускающих продукцию цитокинов, вызвало у ряда исследователей интерес (Абрамова А.Ю., Перцов С.С., 2014; Takeuchi O., Akira S., 2010; Kawai T., Akira S., 2011). Также было высказано предположение, что мелатонин, обладающий свойствами иммуномодулятора, стресспротектора и остеоиндуктора, проявляет свой индукторный ответ опосредованно через TLR4 рецептор (Перцов С.С., 2003, 2006; Attanasio A. et al., 1986; Karasek M., 2007; Tamura H. et al., 2008; Xia M.Z. et al., 2012; Nduhirabandi F. et al., 2016; Shino H. et al., 2016).

Введение мелатонина животным в качестве плацебо установило его роль в пульпе резцов крыс как регулятора интенсивности белкового обмена и реакций гликолиза. При введении ингибитора TLR4 в пульпе резцов крыс анаэробные процессы подавлялись, и наблюдалось интенсивное увеличение активности трансаминаз, которая была более выраженной в пульпе верхних резцов. Реакция одонтобластов, которую отражает фермент щелочная фосфатаза, при введении мелатонина в пульпе верхних резцов крыс имела тенденцию к увеличению, а в пульпе нижних резцов – к понижению. В случае применения ингибитора TLR4 наблюдаемые изменения в активности щелочной фосфатазы были обратно пропорциональны. Содержание цитокинов в пульпе резцов опытных животных после введения мелатонина практически не отличались от данных интактных животных, которым вводили 0,9% раствор NaCl. Имелись отличия только в увеличении

количества ИЛ-6, они были более значимыми в пульпе верхних резцов. Введение антагониста TLR4 сопровождалось значительным подавлением синтеза ФНО- α как в пульпе верхних, так и нижних резцов. Повышение ИЛ-6 в пульпе резцов имело место, но это увеличение было менее существенным, чем при введении мелатонина. Похоже в пульпе резцов крыс существуют иные механизмы действия мелатонина и TLR4 рецептора на клетки пульпы, возможно даже, что мелатонин действует не напрямую через TLR4 рецепторы, а через посредника, действие которого сам же и блокирует.

Таким образом, проведённые нами исследования констатируют, что при воспалении пульпы человека не наблюдается способности клеток к восстановлению, а скорее свидетельствуют о развитии необратимых процессов. Выявленные в эксперименте на животных изменения в метаболизме пульпы зуба можно назвать регрессивными и/или дегенеративными. Однако, они только свидетельствуют о возможных изменениях в метаболических процессах, не связанных с утратой биологической жизнеспособности пульпы. Пульпа зуба считается надёжно изолированной тканью от внешней среды, поэтому, вероятно, метаболизм адаптирован к её функциональным потребностям. Поскольку существует разница в активности метаболических процессов в пульпе зуба в зависимости от раздражающего фактора, это определяет важность системного подхода к реализации методов профилактики и лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метаболические процессы в пульпе зуба осуществляются с участием различных белков и пептидов, что позволяет ей считаться равноправным членом в биологической иерархии живого организма. Полость рта сообщается с внешней средой, поэтому первой подвергается воздействию биологических и химических неблагоприятных факторов. Это действие вызывает повреждение мягких и твердых тканей полости рта, что сопровождается реакцией со стороны клеток пульпы зуба. Метаболический ответ пульпы зуба на раздражение, реализуемый посредством белков и пептидов, а также при участии других молекул, направлен на поддержание и сохранение жизнеспособности зубочелюстной системы.

Наши исследования были посвящены изучению обмена белков и пептидов в пульпе временных и постоянных зубов. Если пульпа постоянных зубов являлась предметом научных изысканий в мировом сообществе, то пульпе временных зубов не уделено должного внимания. Возможно, это связано с тем, что пульпа временных зубов как объект для исследования непонятен, ввиду недолговечности пребывания временного зуба в организме человека. Однако, его преждевременное или позднее удаление приводит к дисрегуляции сроков прорезывания постоянных зубов, что влечет за собой развитие патологий в зубочелюстной системе, связанной с нарушением функции жевания, речи, эстетики. Поэтому в нашем исследовании представлялось важным установить характер метаболизма пульпы временных зубов, что позволит использовать полученные сведения в клинической практике. Особенности обменных процессов в пульпе временных зубов по нашим данным заключались в более низкой антиоксидантной защите, высокой интенсивности реакций трансаминирования и реакций гидролиза фосфатсодержащих соединений по сравнению с пульпой постоянных зубов. Сопоставление активности ферментов, участвующих в реакциях энергетического метаболизма - распада глюкозы и активности ферментов цикла Кребса, не установило

существенных отличий в обеспечении клеток энергией как в пульпе временных, так и постоянных зубов. Это наводит на мысль, что имеющиеся отличия в метаболизме пульпы временных и постоянных зубов каким-то образом связаны с гормональными процессами, которые активно курируют растущий организм. Показаны структурные отличия минеральной составляющей временных и постоянных зубов, заключающихся в объеме и прочности ткани зуба. Пульпа постоянных зубов эволюционно рассчитана на долговечное пребывание в организме, поэтому имеется необходимость в закладке более мощных механизмов защиты, представленных как белками неспецифического иммунитета, так и белками и пептидами, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене, которые необходимы для поддержания толщины слоя дентина зуба. Несмотря на это, зубы всё-таки подвергаются разрушению, и тогда пульпе зуба приходится мобилизовать все свои клетки для ограничения проникновения активной биомассы из очага разрушения. Традиционно заживление раны в тканях организма следует четкой хронологической схеме при участии защитных механизмов, и, как только, в значительной степени происходит устранение раздражающего фактора, начинают активироваться процессы репарации. Однако, развитие воспалительной реакции и механизмы её устранения в пульпе временных и постоянных зубов имеют свои особенности течения. Наши исследования показали, что в пульпе постоянных зубов воспалительная реакция проходит несколько стадий - от острой до хронической, тогда как в пульпе временных зубов имеющаяся воспалительная реакция сходна только с острой, так как реакция белков, обладающих функциональной активностью в пульпе постоянных зубов в острую стадию воспаления сходна с данными, полученными в пульпе временных зубов при хроническом воспалении. Острофазная реакция воспаления пульпы у детей подтверждается активацией анаэробного гликолиза, реакций трансаминирования с участием аланина и активности щелочной фосфатазы, а также повышением содержания иммуноглобулина М. Врачи-стоматологи всегда считали, что острая стадия

воспаления пульпы зуба у детей проходит в течение нескольких часов, так как когда маленький пациент приходит на приём к врачу острая стадия уже переходит в хроническую. Однако, врачами не принимается во внимание тот факт, что распространение воспаления в ткани окружающих зуб у детей с образованием отека и накоплением экссудата происходит в десятки раз быстрее, чем у взрослого человека. Перестройка пульпы постоянных зубов при воспалении происходит медленно в течение нескольких недель или месяцев, сопровождаясь повторными обострениями, как бы напоминая о своем существовании. А затем наступает стадия апоптоза клеток пульпы зуба или в худшем своем варианте некроз с разрушением структурных белков. В клинической практике не отмечается высокая частота встречаемости периостита челюсти как осложнение пульпита у взрослых людей (5-7%) по сравнению с детьми (30-60%). Особый интерес вызывают полученные данные о развитии воспалительной реакции в пульпе временных зубов в стадию резорбции корня зуба. Эта реакция сопровождается преобладанием анаэробных процессов над аэробными, активацией ферментов антиоксидантной защиты – СОД и ГПО, усилением реакций трансаминирования с участием аланина и аспартата, повышением активности ЩФ. Присутствие глутатионпероксидазы в пульпе временных зубов при воспалении и резорбции корня зуба можно объяснить достаточно хорошим кровоснабжением пульпы за счёт широкого апикального отверстия и свободного поступления этого фермента из плазмы крови. В пульпе временных зубов в стадию резорбции корня зуба увеличение уровня маркеров апоптоза и остеокластактивирующего фактора может быть связано с попыткой организма избавиться от очага воспаления путем разрушения проблемного зуба.

Активность ферментов в пульпе постоянных зубов изменяется в зависимости от стадии воспаления. Разрастание обширной полости в зубе, населенной патогенами, сопровождается увеличением активности щелочной фосфатазы и супероксиддисмутазы. Эта защитная мера необходима для

подавления свободнорадикальных процессов и формирования третичного дентина на границе пульпы с кариозной полостью. При глубоком кариесе активность ферментов энергетического метаболизма и ферментов, участвующих в переносе аминокруппы, не отличается от здоровой пульпы. Полученные данные позволяют сделать вывод, что стадия очаговой гиперемии пульпы позволяет применить метод лечения с сохранением жизнеспособности пульпы.

При остром воспалении в пульпе постоянных зубов полученные результаты свидетельствуют о нарастающей гипоксии клеток, усилении гидролиза фосфатсодержащих соединений, которые высвобождаются при разрушении клеток и тканевых структур. Можно предположить, что в пульпе зуба при остром воспалении повышается концентрация токсичных метаболитов, что способствует нарастанию эндогенной интоксикации, о чем свидетельствует увеличение активности семикарбазид-чувствительной аминоксидазы. По мере нарастания их концентрации может сработать компенсаторный механизм по типу аллостерического ингибирования, в результате чего происходит торможение активности MAO B. При отсутствии лечения воспаление в пульпе зуба переходит в хроническую стадию, которая характеризуется развитием необратимых процессов на фоне уменьшения популяции клеточных элементов, снижения активности ферментов и разрушения сложных белковых комплексов.

В пульпе постоянных зубов при хроническом воспалении отсутствие изменений в количестве гомоцистеина имеет существенные отличия от пульпы временных зубов. Это наводит на мысль о том, что увеличение уровня гомоцистеина в пульпе временных зубов при воспалении свидетельствует о распаде аминокислот не только путем дезаминирования, но и десульфатирования.

Удивляет тот факт, что при развитии воспаления в пульпе временных и постоянных зубов абсолютно не меняется активность супероксиддисмутазы и отсутствует глутатионпероксидаза, которые в других органах и тканях при

воспалении активно участвуют в их защите от перекисного окисления липидов. Возможно, в пульпе образование пероксида водорода сопряжено с другими процессами, направленными на обеспечение собственных нужд. Одна из наших гипотез (которая, конечно требует подтверждения) предполагает, что пероксид водорода участвует в отбеливании зуба путем разрушения цветных хромофоров, попадающих в дентинные каналы с током крови. Крайне низкая активность супероксиддисмутазы в пульпе временных зубов может свидетельствовать об активном образовании пероксида водорода, возможно, поэтому временные зубы имеют более интенсивный молочно-белый цвет. Особая форма защиты пульпы от распространения воспалительной реакции связана с образованием полипа, в котором выявляется интенсивность распада белков и полисахаридных комплексов, сопряженные с высокой активностью α -гликозидазы и аминотрансфераз. В этом случае наблюдается неспецифическое отличие в активности исследованных ферментов, являющихся ключевыми участниками основных метаболических процессов, что определяет особый обмен нехарактерный для пульпы зуба. Таким образом, изучение образцов пульпы зуба человека позволило установить неспособность пульпы противостоять действию воспалительных агентов, что сопровождается изменениями, направленными на полное уничтожение или перерождение клеточных элементов и тканевых структур. Поэтому, на сегодняшний день рассматривать пульпу зуба человека как орган способный к исходному восстановлению и регенерации преждевременно.

Несмотря на неутешительные итоги, мы провели исследование на предмет оптимальных пульпосохраняющих методов во временных зубах с воспалением пульпы и незавершенным апексогенезом. Данное мероприятие проводится в педиатрической стоматологической практике с целью сохранения зуба в зубном ряду до прорезывания постоянного зуба. В противном случае при преждевременной потере временного зуба маленький пациент рискует развитием челюстно-лицевых патологий при формировании

постоянного прикуса. В качестве лечебного средства был применен оксид кальция в сочетании с эвгенолом или борнеолом. Наши данные показали, что оксид кальция необходимо применять в сочетании с эвгенолом или борнеолом, противовоспалительный эффект которых был доказан снижением уровня провоспалительных цитокинов и отсутствием лактоферрина в десневой жидкости. Однако, в случае использования борнеола количество исследованных белков и пептидов в десневой жидкости временного зуба с воспалением пульпы было ниже, чем при применении эвгенола. Десневая жидкость привлекла нас не только как объект оценки проводимого лечения пульпита, но и как инструмент для диагностики состояния пульпы зуба человека. С этой целью мы изучили, как изменяется активность аланиновой и аспартильной трансаминаз в десневой жидкости при воспалении пульпы зуба. Было установлено оптимальное соотношение этих ферментов, позволяющее получить коэффициент жизнеспособности пульпы зуба. В здоровом зубе коэффициент АСТ/АЛТ в десневой жидкости достигает 1.26, а при воспалении пульпы зуба повышается. Разработанный нами неинвазивный метод позволяет получить достоверные сведения о состоянии пульпы зуба.

Для установления причин, вызывающих реакцию, а затем структурные и метаболические изменения в пульпе зуба нами были смоделированы различные ситуации на крысах. Нами было показано, что метаболизм пульпы резцов крыс имеет отличия от пульпы зубов человека, но это не помешало использовать пульпу животных в качестве модели для проводимых исследований. Изучение пульпы зуба в созданных нами модельных экспериментах показало, что для обеспечения энергией клеток в качестве субстрата используется глюкоза. В дополнение к этому вопросу хотелось установить роль жирных кислот в энергетическом метаболизме пульпы зуба. Для достижения поставленной задачи животным вводили ингибитор синтеза карнитина, участвующего в переносе ацильных остатков из цитозоля клетки в матрикс митохондрий. Ингибирование переноса жирных кислот в матрикс

митохондрий сопровождалось усилением как аэробных, так и анаэробных процессов, что позволило установить важную роль жирных кислот в энергообеспечении клеток пульпы зуба. Усиление механизмов захвата и окисления глюкозы за счет блокирования транспорта жирных кислот в условиях нормальной кислородной обеспеченности животного сопровождается в пульпе резцов активацией свободнорадикального окисления, которое провоцирует накопленные свободные жирные кислоты в цитозоле клеток. Подобная ситуация может привести к повреждению мембран клеток пульпы. Введение экзогенного мелатонина и ингибитора TLR 4 усиливает в клетках пульпы резцов крыс работу малат-аспартатного челночного механизма и анаэробное окисление глюкозы. Подобная реакция наблюдалась в пульпе резцов крыс при иммобилизации животных.

На ранних этапах развития зубочелюстной системы действие избытка сахарозы и селена проявляется в нарушении эндогенного протеолиза, что подтверждалось угнетением активности кислых и слабощелочных протеиназ в пульпе резцов крыс. Дело в том, что начальные этапы амело- и дентиногенеза связаны с формированием крупных молекулярных структур для создания органического матрикса зуба. По мере созревания зубной ткани высокомолекулярные структуры путем ограниченного протеолиза гидролизуются на более мелкие, которые либо выводятся экзоцитозом, либо используются на нужды созревающего зуба.

Любые повреждения в полости рта, связанные с удалением зуба, перфорацией слизистой оболочки щеки скальпелем или излучением эрбиевого лазера, сопровождаются реакцией клеток пульпы зуба, о чем свидетельствует повышение активности щелочной фосфатазы в пульпе резцов крыс. Это свидетельствует о том, что болевой стресс сопровождается экспрессией щелочной фосфатазы одонтобластами пульпы, частота повторений которой, в конечном итоге, может привести к образованию кальцификатов в пульпе зуба и тем самым вызвать её воспаление. В этом случае может подстерегать и другая опасность: вследствие интенсивного

образования вторичного дентина из-за избытка освобожденных фосфатов со временем произойдет сужение и облитерация пульпарной камеры, и редукция собственно ткани пульпы.

Экспериментальная модель сдвигания зуба позволила создать биологическую ситуацию, возникающую у человека при ортодонтическом лечении. После оказываемого натяжения на зуб с усилием 100 г/с в течение 9-ти дней угнетается фосфорно-кальциевый обмен в пульпе резцов опытных животных, что, по-видимому, сопряжено с сдавлением кровеносных сосудов периодонта и развитием кислородной недостаточности в пульпе зуба.

Подводя итоги проведенного исследования необходимо подчеркнуть важность понимания процессов, происходящих в комплексе пульпа-периодонт. Представленный объект для исследования – пульпа зуба, как и многие другие ткани, обеспечивает свою жизнедеятельность согласно существующим законам биологии. Несмотря на надёжную изоляцию от внешней и внутренней среды, пульпа зуба реагирует на различные факторы и способна дать адекватный ответ на раздражающий стимул.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. В интактной пульпе временных зубов человека преобладают процессы окислительного дезаминирования аминокислот и гидролиза фосфатсодержащих соединений, апоптоза клеток и резорбции минерализованных тканей. В пульпе постоянных зубов выявляется преобладание количества белков-маркеров, ответственных за неспецифический иммунитет, и гомоцистеина.
2. В пульпе постоянных зубов человека при остром воспалении наблюдается повышение активности НАД–зависимых оксидоредуктаз, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и α -гликозидазы, моноаминоксидаз типа А и семикарбазид-чувствительной. При хроническом воспалении выявлено затухание всех окислительно-восстановительных процессов. В пульпе временных зубов человека при этой форме воспаления наблюдается существенное увеличение каталитической активности белков, секреции остеокластактивирующего фактора и количества гомоцистеина.
3. Выявлена повышенная готовность клеток пульпы временных зубов человека к преждевременной реализации запуска механизма апоптоза в результате воспаления, выражающаяся в активном синтезе белков-маркеров апоптоза аннексина V, каспазы-9, фактора некроза опухоли- α на фоне снижения электровозбудимости пульпы зуба.
4. Несостоятельность процессов репарации в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом пульпите подтверждается снижением количества β -трансформирующего фактора роста, участвующего в пролиферации и росте клеток, и незначительным повышением уровня инсулиноподобного-1 фактора роста и основного фактора роста фибробластов- β .
5. В интактной пульпе резцов крыс по сравнению с интактной пульпой временных и постоянных человека выявляется высокая активность оксидоредуктаз и щелочной фосфатазы. В интактной пульпе временных

зубов человека выше активность аспартильной и аланиновой трансминаз, количество аннексина V, фактора некроза опухоли- α , иммуноглобулина G. В пульпе постоянных зубов человека количество интерлейкина- 1β и иммуноглобулина M значительно выше, чем в пульпе резцов крыс и временных зубов человека.

6. Травма в полости рта, вызванная удалением соседних моляров и повреждением слизистой оболочки щеки скальпелем, вызывает увеличение активности щелочной фосфатазы в пульпе верхних резцов крыс. Применение сил натяжения на резцы и моляры крыс, напротив, снижает активность щелочной фосфатазы и уровни аннексина V и остеокальцина в пульпе резцов крыс.

7. Однократная иммобилизация животных сопровождается в пульпе резцов крыс более значимым увеличением активности аспартаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы по сравнению с многократной.

8. Введение мелатонина и ингибитора толл-подобного рецептора 4 сопровождается увеличением в пульпе резцов крыс активности аспартаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы и количества интерлейкина-6. На фоне введения ингибитора толл-подобного рецептора 4 в пульпе резцов крыс наблюдается снижение образования фактора некроза опухоли- α . Ингибирование синтеза карнитина приводит к существенному увеличению в пульпе резцов крыс активности НАД⁺-зависимых оксидоредуктаз и показателей свободнорадикального окисления.

9. Употребление молодыми крысами субтоксических доз селена и 68% сахарозы в кормовой смеси в течение 30 дней приводило в пульпе резцов крыс к снижению активности кислых и слабощелочных протеиназ и увеличению активности кислой фосфатазы, а к 60-му дню наблюдалось только снижение активности лактатдегидрогеназы.

10. Для диагностики пульпита временных и постоянных зубов использовать определение количества лактоферрина активности, аспартаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в десневой

жидкости, коэффициент соотношения которых при воспалении пульпы зуба составляет от 1,25 и выше.

11. Противовоспалительный эффект при лечении пульпита временных зубов биологическим методом при использовании лечебной пасты, содержащей оксид кальция и борнеол, был подтвержден снижением уровня интерлейкина-1 β и отсутствием лактоферрина в десневой жидкости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ	– Аланинаминотрансфераза
АСТ	– Аспартатаминотрансфераза
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГПО	– Глутатионпероксидаза
ИЛ	– Интерлейкин
ИФА	– Иммуноферментный анализ
ИФН	– Интерферон
ИФР-1	– Инсулиноподобный фактор роста-1
КП	– Кислые протеиназы
КФ	– Кислая фосфатаза
КЩФ	– Костный изофермент щелочной фосфатазы
ЛДГ	– Лактатдегидрогеназа
ЛФ	– Лактоферрин
МАО	– Моноаминоксидаза
мг	– Миллиграмм
мкмоль	– Микромоль
МДГ	– Малатдегидрогеназа
МКБ-10	– Международная классификация болезней 10 пересмотра
мМ	– мкмоль
НАД	– Никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	– Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
нг	– Нанограмм, 10^{-10}
ОБ	– Общий белок
ОК	– Остеокальцин
ПААГ	– Полиакриламидный гель
пг	– Пикограмм, 10^{-12}
оФРФ- β	– Основной фактор роста фибробластов- β
СОД	– Супероксиддисмутаза
СЩП	– Слабощелочная протеиназа
ТБК-АП	– Продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
ТФР- β	– Трансформирующий фактор роста- β
ТХУ	– Трихлоруксусная кислота
ФАД	– Флавинадениндинуклеотид
ФНО- α	– Фактор некроза опухоли- α
ФРЭ	– Фактор роста эндотелия
ЩФ	– Щелочная фосфатаза

ЭДТА	– Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭФР	– Эпидермальный фактор роста
CLI-095	– Синтетический аналог ингибитора толл-подобного рецептора 4
DAMP	– Молекулярный фрагмент, ассоциированный с опасностью
Hcy	– Гомоцистеин
ERK	– Внеклеточная сигнал-регулирующая киназа
Er:YAG	– Эрбиевый лазер
Ig	– Иммуноглобулин
IkB- α	– Ингибитор ядерного фактора транскрипции- α
FAK	– Киназа фокальной адгезии
МАРК	– Митоген-активированная протеинкиназа
MIP	– Воспалительный белок макрофагов
MMP	– Матриксные металлопротеиназы
NF- κ B	– Ядерный фактор транскрипции каппа В
NO	– Оксид азота
OPG	– Остеопротегерин
PAMP	– Патоген-ассоциированный молекулярный паттерн
PRR	– Рецепторы опознавания паттерна
sRANKL	– Растворимый лиганд к рецептору, активирующему фактор транскрипции каппа В
RGD	– Аргинилглициласпартильная кислота
Se	– Селен
SSAO	– Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза
ТАК-242	– Синтетический аналог ингибитора толл-подобного рецептора 4
TLR4	– Толл-подобный рецептор 4

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

1. Амоксиклав - антибиотик группы пенициллинов широкого спектра действия с ингибитором бета-лактамаз.
2. Белки - высокомолекулярные органические вещества, состоящие из альфа-аминокислот, соединённых пептидной связью.
3. Борнеол - (эндо-1,7,7-триметилбицикло-[1,2,2]-гептанол-2) - предельный спирт, производное бициклических терпенов.
4. Гомеопатические средства – фитоконпоненты с очень малой концентрацией.
5. Иммуноферментный анализ – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.
6. Милдронат – триметил-гидразиния пропионат, структурный аналог гамма-бутиробетаина.
7. Пептиды – семейство веществ, молекулы которых построены из двух и более остатков аминокислот, соединённых в цепь пептидными (амидными) связями.
8. Пульпа зуба – рыхлая волокнистая соединительная ткань, заполняющая полость зуба, с большим количеством нервных окончаний, кровеносных и лимфатических сосудов.
9. Ферменты – белковые молекулы, катализирующие химические реакции в живых системах.
10. Электрофорез – электрокинетическое явление перемещения частиц коллоидных или белковых растворов в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.
11. Сахароза – олигосахарид, состоящий из двух моносахаридов: α -глюкозы и β -фруктозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, А.Ю. Липополисахариды и ноцицепция [Текст] / А.Ю. Абрамова, С.С. Перцов // Российский журнал боли. - 2014. - Т. 43, № 2. - С. 30-38.
2. Адашкина, Н.Ю. Возрастные особенности эпидемиологии и клиники пульпита и эффективность его лечения с помощью импульсных лазеров: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Н.Ю. Адашкина. - Санкт-Петербург, 2005. - 24 с.
3. Александрова, Л.Л. Причины развития и патогенез заболеваний пульпы: учеб.-метод. пособие [Текст] / Л.Л. Александрова, С.В. Латышева, Т.В. Будевская. - Минск: БГМУ, 2010. - 43 с.
4. Алексеева, Т.В. Сравнительный анализ результатов лечения различных форм пульпита и периодонтита с использованием цинк эвгенольной пасты, гуттаперчи и корпасты [Текст] / Т.В. Алексеева // Актуальные вопросы медицины: материалы итоговой научной конференции ММСИ. - М., 1998. - С. 49-49.
5. Анохин, А.С. Лечение пульпита методом витальной ампутации с применением лизоцима (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / А.С. Анохин. - М., 1988. - 18 с.
6. Барабошин, А.Т. Психоэмоциональный статус и возможности его коррекции у больных общехирургического профиля: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / А.Т. Барабошин. - Ярославль, 2007. - 115 с.
7. Бобрик, В.В. Пародонт и пульпа зубов при гипоксии: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / В.В. Бобрик. - Калинин, 1968. - 15 с.
8. Большаков, Г.В. Влияние температурного фактора на активность лизосомальных ферментов пульпы зуба [Текст] / Г.В. Большаков, Н.Ф.Трусова // Стоматология. - 1988. - Т. 67, № 4. - С. 14-16.
9. Боровский, Е.В. Терапевтическая стоматология [Текст] / Е.В. Боровский, В.С. Иванов, Ю.М. Максимовский - М.: Медицина, 1998.- С.272-307.

10. Боровский, Е.В. Распространенность осложнений кариеса и эффективность эндодонтического лечения [Текст] / Е.В. Боровский, М.Ю.Протасов // Клиническая стоматология. - 1998. - № 3. - С. 3-5.
11. Бутенко, А.В. Гомоцистеин: влияние на биохимические процессы в организме человека [Текст] / А.В. Бутенко // Молодой ученый. - 2016. - № 1. - С. 78-82.
12. Быков, В.Л. Гистология и эмбриология органов полости рта человека [Текст] / В.Л. Быков. - СПб.: СпецЛит, 1998. - 248 с.
13. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта [Текст] / Т.П. Вавилова. - М.: ГЭОТАР Медиа, 2008. - 208 с.
14. Вавилова, Т.П. Антимикробные пептиды – многофункциональная защита тканей полости рта [Текст] / Т.П. Вавилова Н.И. Деркачева, И.Г. Островская // Российская стоматология. - 2015. – Т. 8, № 3. - С.3-12.
15. Вавилова, Т.П. Биохимия и физиология пульпы зуба [Текст] / Т.П. Вавилова, И.Г. Островская. - М.: Медиа-Сфера, 2008. - 136 с.
16. Вавилова, Т.П. Практикум по биохимии: учебное пособие [Текст] / Т.П. Вавилова, О.Л. Евстафьева, И.Г. Островская. - М.: ВЕДИ, 2010. - 128 с.
17. Вавилова, Т.П. Реакция пульпы интактных резцов крыс на удаление моляров и применение медикаментозной терапии [Текст] / Т.П. Вавилова, И.Г. Островская, С.В. Шишкин // Эндодонтия. - 2009. - №2. - С.23-25.
18. Вавилова, Т.П. Ферментные системы жидкостей и тканей полости рта при пародонтите: дис. ... д-ра мед. наук [Текст] / Т.П. Вавилова. - М., 1991. - 431 с.
19. Велиханова, Л.К. Применение стволовых клеток пульпы зуба в заместительной клеточной терапии [Текст] / Л.К. Велиханова, И.В. Фирсова // Bulletin of Medical Internet Conferences. - 2013. - Vol. 3, Iss.2. - P. 346-348.
20. Вёрткин, А.Л. Длительная иммобилизация – неизученная реальность. Часть 1 [Текст] / А.Л. Вёрткин, В.А. Шевцова, А.А. Сокол // Архивъ внутренней медицины. - 2012. - № 6(8). - С. 20-24.

21. Влияние высокого содержания сахарозы и селена на метаболические процессы в пульпе зубов крыс [Текст] / Т.П. Вавилова, О.Л. Евстафьева, И.Г. Островская // Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины: сб. науч.-практ. конф. - Астрахань, 2005. - С.108-109.

22. Влияние высокосахарозной диеты на активность ферментов слизистой оболочки полости рта крыс [Текст] / Т.П. Вавилова [и др.] // Стоматология. - 1991. - Т. 70, вып. 3. - С. 11-13.

23. Влияние модулятора и ингибитора TLR4 на биохимические показатели пульпы резцов крыс [Текст] / И.Г.Островская [и др.] // Эндодонтия today. - 2016. - №4. - С.7-11.

24. Влияние экзогенного мелатонина на метаболические процессы в пульпе резцов крыс при иммобилизационном стрессе [Текст] / И.Г. Островская [и др.] // Эндодонтия today. - 2017. -№1. - С.16-19.

25. Волкова, О.С. Электронно-микроскопические изменения в пульпе крыс, содержащихся на кариесогенной диете с добавлением лецитина [Текст] / О.С. Волкова, Е.Н. Рябоконт // Медицина сегодня и завтра. - 2010. - № 2/3. - С. 47 - 48.

26. Гемонов, В.В. Развитие и строение органов ротовой полости и зубов [Текст] / В.В. Гемонов, Э.М. Лаврова, Л.И. Фалин. - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. - 256 с.

27. Гордеева, А.В. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция. Обзор [Текст] / А.В. Гордеева, Ю.А. Лабас, Р.А. Звягильская // Биохимия. – 2004. - Т. 69, вып. 10. - С. 1301-1313.

28. Григорьян, А.С. Гистологическое и гистохимическое изучение пульпы зубов в норме и при воспалении: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / А.С. Григорьян. - М., 1965. - 16 с.

29. Давыдова, А.В. Клиническая интерпретация биохимического анализа крови при заболеваниях печени: учебное пособие для студентов [Текст] / А.В. Давыдова.- Иркутск: ГОУ ВПО ИГМА, 2013.- 46с.

30. Данилевский, Н.Ф. Пульпит [Текст] / Н.Ф. Данилевский, Л.Ф. Седельникова, Ж.И. Рахний. - Киев: Здоровья, 2003. - 44с.
31. Диагностическая ценность слюны у пациентов с различной соматической патологией [Текст]/ Т.П. Вавилова [и др.]//Российская стоматология.- 2017.- №1.- С.96-97.
32. Дмитриева, Л.А. Применение трикальцийфосфата при витальной субтотальной экстирпации пульпы [Текст] / Л.А. Дмитриева, А.А. Чумаков, Д.В. Комнов // Стоматология. - 1993. - № 3. - С. 14-15.
33. Елизарова, В.М. Воспалительные заболевания в челюстно-лицевой области у детей [Текст] / В.М. Елизарова. - М.: Детстомиздат, 1998. - 272 с.
34. Ермаков, В.В. Биологическое значение селена [Текст] / В.В. Ермаков, В.В. Ковальский. - М.: Наука, 1974. - 58 с.
35. Жилина, В.В. Эффективность методов сохранения пульпы несформированных зубов у детей [Текст] / В.В. Жилина // Проблемы стоматологии детского возраста: сб. науч. тр. - М., 1985. - С. 3-5.
36. Зюзьков, Д.И. Состояние пульпы зуба при воспалительных заболеваниях пародонта: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Д.И. Зюзьков. - Тверь, 2004. - 102 с.
37. Изучение морфологических изменений в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита [Текст] / С.В. Сирак [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2011. - Т. 23, № 3. - С. 29-33.
38. Иммунные звенья системной организации поведения [Текст] / К.В. Судаков [и др.] // Успехи физиологических наук. - 2011. - Т. 42, № 3. - С. 81-96.
39. Исследование ингибирования транспорта жирных кислот в матрикс митохондрий клеток пульпы резцов крыс [Текст] / И.Г. Островская [и др.] // CATHEDRA. Стоматологическое образование. - 2015. - №53. - С.12-16.

40. Исследование факторов, влияющих на развитие некариозных поражений зубов у больных с хронической почечной недостаточностью [Текст] / А.В. Митронин [и др.] // Эндодонтия Today.- 2016. - №4.- С. 3-6.

41. Камышникова, И.О. Разработка и обоснование витальных методов лечения пульпита у лиц пожилого возраста: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / И.О. Камышникова. - Краснодар, 1992. - 20 с.

42. Кисельникова, Л.П. Методы лечения пульпита временных зубов [Текст] / Л.П. Кисельникова, С.В. Гончарова, О.А. Кочеткова // Институт стоматологии. - 2002. - № 4. - С. 28-29.

43. Клевезаль Г.А. Формирование суточных слоёв в дентине резцов у грызунов [Текст] / Г.А. Клевезаль // Онтогенез. - 1981. - Т. 12, №5. - С.443-452.

44. Клиническая биохимия: учебное пособие [Текст] / В.Н. Бочков [и др.]. - М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2008. - 264 с.

45. Козлов, В.А. Некоторые аспекты проблемы цитокинов [Текст] / В.А. Козлов // Цитокины и воспаление. - 2002. - Т. 1, № 1. - С. 5-8.

46. Комнов, Д.В. Сравнительная морфологическая характеристика пульпы на прямое покрытие различными лечебными прокладками [Текст] / Д.В. Комнов // Стоматология. - 1989. - № 2. - С. 4-6.

47. Концентрации некоторых цитокинов и лактоферрина в крови и супернатантах культур клеток периферической крови больных псориазом [Текст] / Т.В. Школьникова [и др.] // Медицинская иммунология. - 2012. - Т. 14, № 4-5. - С. 409-414.

48. Коржукова, М.В. Анализ состояния тканей полости рта и смешанной слюны у пациентов, пользующихся современной несъемной ортодонтической техникой: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / М.В. Коржукова. - М., 2001. - 23 с.

49. Кортуков, И.Е. Разработка прогностических критериев при лечении глубокого кариеса и различных форм пульпита: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / И.Е. Кортуков. - М., 1997. - 17 с.

50. Костиленко, Ю.П. Морфометрический анализ нижних больших коренных зубов человека [Текст] / Ю.П. Костиленко, Е.Г. Саркисян // Экспериментальная и клиническая медицина. - 2014. - Т.63, №2. - С. 87-90.

51. Костиленко, Ю.П. Сравнительная анатомия зубочелюстной системы кролика и крысы [Текст] / Ю.П. Костиленко, Е.Г. Саркисян // Украинский стоматологический альманах. - 2014. - № 5-6. - С. 5-9.

52. Котомин, Б.В. Анализ результатов лечения пульпита в постоянных несформированных зубах методом девитальной ампутации [Текст] / Б.В. Котомин, Ю.П. Суханов, Т.А. Турина // Тез. докл. II Общерос. науч.-практ. конф. детских стоматологов. - Самара, 1999. - С. 31-31.

53. Кочетов, Г.А. Практическое руководство по энзимологии: учеб. пособие для студентов биологических спец. университетов [Текст] / Г.А. Кочетов; под общ. ред. С.Е. Северина. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Высшая школа, 1980. - 272 с.

54. Краснова, Е.А. Влияние остеовита на развитие экспериментального кариеса у крыс [Текст] / Е.А. Краснова, О.В. Деньга // Таврический медико-биологический вестник. - 2011. - Т.14, №4(56). - С. 96-98.

55. Ландинова, В.Д. Обоснование возможностей повышения эффективности консервативной терапии и профилактики болезней пульпы постоянных зубов у детей: дис. ... д-ра мед. наук [Текст] / В.Д. Ландинова. - Омск, 2004. - 278 с.

56. Лепский, В.В. Эффективность применения комплексной терапии на модели кариеса и гингивита у животных [Текст] / В.В. Лепский, О.В. Деньга, О.А. Макаренко // Теоретическая медицина. - 2012. - Т. 27, №1. - С. 8-11.

57. Лолаева, А.В. Клинико-экспериментальное применение зубных эликсиров для лечения и профилактики заболеваний полости рта: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / А.В. Лолаева. - Ставрополь, 2012.- 110 с.

58. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) [Текст] / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов. - М.: Медицина, 2001. - 192 с.

59. Максимовский, Ю.М. Терапевтическая стоматология. Руководство к практическим занятиям: учеб. пособие [Текст] / Ю.М. Максимовский, А.В. Митронин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 432 с.

60. Марченко, А.И. Лечение заболеваний в детской терапевтической стоматологии [Текст] / А.И. Марченко, Е.Ф. Конович, Т.А. Солнцева. - Киев: Здоров'я, 1988. - 160 с.

61. Махмудов, Д.Т. Функциональное состояние пульпы зубов, подвергшихся влиянию светового потока фотополимеризаторов: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Д.Т. Махмудов. - М., 2007. - 128 с.

62. Маянский, Д.Н. Лекции по клинической патологии [Текст] / Д.Н. Маянский, И.Г. Урсов. - Новосибирск: Ин-т теплофизики, 1997. - 249 с.

63. Мельниченко, Э.М. Современные методы лечения пульпитов у детей [Текст] / Э.М. Мельниченко, Е.А. Кармалькова, А.И. Яцук // Современная стоматология. - 2001. - № 3. - С. 3-6.

64. Метод получения экспериментального кариеса у белых крыс [Текст] / А.Э. Шарпенак [и др.] // Стоматология. - 1959. - № 6. - С. 3-9.

65. Митохондриальный, TNF- и p53-опосредованные пути реализации апоптотической программы моноклеаров в условиях окислительного стресса *in vitro* и при остром воспалении [Текст] / Н.Ю. Часовских, [и др.] // Актуальные проблемы медицины: материалы межрегион. науч.-практ. конф. - Абакан, 2007. - С. 29 - 30.

66. Митронин, А.В. Лабораторная оценка влияния лазерного излучения на структуру дентина корневых каналов при эндодонтическом лечении [Текст] / А.В. Митронин, А.А. Чунихин // Стоматология для всех. - 2010. - №1. - С. 44-48.

67. Мороз, Б.Т. Пороги электровозбудимости пульпы различных групп зубов и их изменения под влиянием анальгина, амидопирина и диазепама [Текст] / Б.Т. Мороз, Ю.Д. Игнатов, В.И. Калинин // Стоматология. - 1989. - Т. 68, №5. - С. 30 -32.

68. Московский, А.В. Морфофункциональная характеристика пульпы зуба и оценка иммунного статуса при кариесе, его осложнениях и заболеваниях пародонта: дис. ... д-ра мед. наук [Текст] / А.В. Московский. - Саранск, 2009. - 251 с.

69. Мюле, В. Качественный состав и количественное содержание общих фосфолипидов и фосфолипидных фракций в пульпе, пародонте и субклеточных структурах пульпарной ткани зубов крыс: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / В. Мюле. - Иваново, 1972. - 15 с.

70. Наградова, Н.К. Белок-белковые взаимодействия в функционировании НАД⁺ - зависимых дегидрогеназ: 44-е Баховское чтение [Текст] / Н.К. Наградова. - М.: Наука, 1990. - 56 с.

71. Наумова, Э.М. Борнеол как компонент лекарственных препаратов: опыт и перспективы применения в клинике [Текст] / Э.М. Наумова, Б.Г. Валентинов // Вестник новых медицинских технологий. - 2005. - Т.12, № 3-4. - С.96.

72. Никулин, В.В. Изучение некоторых физико-химических и иммунологических свойств белков тканей зуба в онтогенезе: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / В.В. Никулин. - М., 1972. - 14 с.

73. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты: монография [Текст] / Е.Б. Меньшикова [и др.]. - М.: Слово, 2006. - 554 с.

74. Островская, И.Г. Влияние стресса на метаболические процессы в пульпе зуба: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / И.Г. Островская. - М., 2008. - 157 с.

75. Островская, И.Г. Реакция пульпы резцов крыс на повреждение слизистой оболочки щеки [Текст] / И.Г. Островская // Стоматология. - 2016. - Т.95, №3. - С. 71-71.

76. Паразян, Л.А. Особенности регенерации и терапии патологии пульпы зуба с частичным или полным сохранением её жизнеспособности (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Л.А. Паразян. - Ставрополь, 2017. - 180 с.

77. Перцов, С.С. Десинхроноз и эрозивно-язвенные поражения слизистой оболочки желудка у активных и пассивных в открытом поле крыс: эффект экзогенного мелатонина [Текст] / С.С. Перцов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2003. - Т. 135, № 3. - С. 399-402.

78. Перцов, С.С. Роль супрахиазматического ядра гипоталамуса в реализации эффектов мелатонина на тимус, надпочечники и селезенку у крыс [Текст] / С.С. Перцов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2006. - Т. 141, № 4. - С. 364-367.

79. Перцов, С.С., Сравнительный анализ действия цитокинов на состояние тимуса, надпочечников и селезенки у крыс с разными поведенческими характеристиками [Текст] / С.С. Перцов, Е.В. Коплик, Л.С. Калиниченко // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2010. - Т. 150, № 9. - С. 244-247.

80. Петрович, Ю.А. Глутатионпероксидазы в системе антиоксидантной защиты мембран [Текст] / Ю.А. Петрович, Д.В. Гуткин // Патол. физиология и эксперим. терапия. - 1981. - № 5. - С. 76 - 78.

81. Петрович, Ю.А. Селен и заболевания органов полости рта [Текст] / Ю.А. Петрович, Р.П. Подорожная, Т.П. Вавилова // Стоматология. - 1981. - №2.- С. 68-72.

82. Петрович, Ю.А. Селеноэнзимы и другие селенопротеиды, их биологическое значение [Текст] / Ю.А. Петрович, Р.П. Подорожная // Успехи современной биологии. - 1961. - Т. 9, № 91. - С. 127-143.

83. Подорожная, Р.П. Возрастные особенности биохимии смешанной слюны, обызвествленных тканей и транспорта в слюнных железах в условиях физиологии и стоматологической патологии: дис. ... д-ра мед. наук [Текст] / Р.П. Подорожная. - М., 1973. - 344 с.

84. Путь, В.А. Оценка состояния пульпы опорных зубов под искусственными коронками методом радиоволновой диагностики: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / В.А. Путь. - М., 2005. - 132 с.

85. Разин, А.С. Активность ферментов пульпы в норме и патологии: автореф. дис. ... канд. мед наук [Текст] / А.С. Разин. - М., 1969. - 21 с.

86. Рассадина, А.В. Реактивность микрососудов пульпы зуба при лечении кариеса дентина современными композиционными материалами: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / А.В. Рассадина. - М., 2008. - 121 с.

87. Реакция пульпы резцов крыс на силовой модуль / И.Г. Островская [и др.] // Эндодонтия Today. - 2014. - №2. - С.32-39.

88. Рзаева, Т.А. Применение лизоцимсодержащих паст для сохранения пульпы [Текст] / Т.А. Рзаева // Проблемы стоматологии детского возраста: сб. науч. тр. - М., 1986.- С. 5-8.

89. Салова, А.В. Сравнительное изучение лекарственных композиций при лечении глубокого кариеса зубов с применением метода реодентографии: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / А.В. Салова. - СПб., 1997. - 16 с.

90. Селезнев, Д.А. Адаптивные свойства альвеолярной костной ткани, актуализированные направленным приложением ортодонтических сил [Текст] / Д.А. Селезнев, Э.А. Базикян, Ю.А. Гиоева // Российский стоматологический журнал. - 2010. - № 4. - С. 47-48.

91. Селен в организме человека [Текст] / В.А. Тутельян [и др.]. - М.: РАМН, 2002. - 224 с.

92. Селенобогащённые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [Текст] / Н.А. Голубкина [и др.] // Биотехнология. - 1996. - № 75. - С. 52-57.

93. Сергеева, Н.Д. Пульпиты у детей: учеб. пособие [Текст] / Н.Д. Сергеева, А.В. Виноградова. - Иркутск: ГОУ ИГМУ, 2009. - 47 с.

94. Сидельникова, В.Д. Геохимия селена в биосфере [Текст] / В.Д. Сидельникова // Проблемы биогеохимии и геохимической экологии. - М.: Наука, 1999. - Т. 23. - С. 81-99.

95. Спасов, А.А. Стереофармакологические особенности карнитина [Текст] / А.А. Спасов, И.Н. Иежица // Русский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2005. - № 12. - С. 42-47.

96. Сравнительные данные использования линкомицина и лизоцима в составе паст для биологического метода лечения пульпита [Текст] / Л.А. Дмитриева [и др.] // Профилактика и лечение стоматологических заболеваний: сб. науч.тр. - Алма-Ата, 1985. - С. 34-38.

97. Стальная, И.Д. Современные методы в биохимии [Текст] / И.Д. Стальная, Г.Г. Гаришвили. - М.: Медицина, 1977. - 240 с.

98. Стоматологическая заболеваемость детей Москвы по данным детского отделения клинического центра стоматологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова [Текст] / Т.П. Плюхина [и др.] // Российская стоматология. - 2016. - Т. 9, №1. - С.68-69.

99. Стюф, Я.В. Оценка состояния пульпы зуба при профессиональной гигиене полости рта: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Я.В. Стюф. – СПб., 2007. - 140 с.

100. Тарасенко, И.В. Особенности заживления раневого дефекта слизистой оболочки щеки у крыс после воздействия эрбиевого лазера [Текст] / И.В. Тарасенко, Т.П. Вавилова // Образование, наука и практика в стоматологии: сб. тр. VII Всероссийской науч.-практ. конф. - М., 2010. - С. 111-113.

101. Фершт, Э. Структура и механизм действия ферментов: пер. с англ. [Текст] / Э. Фершт. - М., 1980. - 430 с.

102. Харченко, Д.А. Применение лазерных технологий при ортопедическом лечении CEREC реставрациями больных с дефектами коронок премоляров верхней челюсти: дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Д.А. Харченко. - М., 2013. - 185 с.

103. Цыбульская, В.А. Экспериментальная оценка эффективности комплексной профилактики вторичного кариеса зубов [Текст] / В.А. Цыбульская, О.В. Деньга, О.А. Макаренко // Инновации в стоматологии. - 2014. - № 4. - С. 19-24.

104. Чунихин, А.А. Клиническая оценка эффективности применения диодного лазера при эндодонтическом лечении хронических форм пульпитов

[Текст] / А.А. Чунихин, А.В. Митронин // Эндодонтия Today. - 2010. - № 2. - С. 15.

105. Шамхалов, Д.И. Реакция микрососудов пульпы на препарирование зубов при ортопедическом лечении: автореф. дис. ... канд. мед. наук [Текст] / Д.И. Шамхалов. - М., 2013. - 26 с.

106. Шевченко, О.П. Гомоцистеин - патохимия крови и мочи [Текст] / О.П. Шевченко, Г.А. Олиференко, Н.В. Червякова. - М., 2002. - 48 с.

107. A combination of serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1, CA 19-9 and interleukin-6 differentiate biliary tract cancer from benign biliary structures [Text] / N.S. Sandanayake [et al.] // Brit J Cancer. - 2011. - Vol. 105. - P.1370-1378.

108. A fast method to predict protein interaction sites from sequences [Text] / X.Gallet [et al.] // Mol. Biol. - 2000. - Vol. 302. - P.917-926.

109. A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (ТАК-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling [Text] / M. Ii [et al.] // Mol. Pharmacol. - 2006. - Vol. 69, №4. - P.1288-1295.

110. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide [Text] / P. Esposito [et al.] // Eur. J. of Oral Sciences. - 2003. - Vol. 111, Iss. 5. - P. 454-456.

111. Absent in Melanoma 2 (AIM2) in Rat Dental Pulp Mediates the Inflammatory Response during Pulpitis [Text] / Y. Wang [et al.] // J. Endod. - 2013. - Vol. 39. - P. 1390-1394.

112. Aebi, H. Catalase in vitro [Text] / H. Aebi // Methods Enzymol. - 1984. - Vol. 105. - P. 121-126.

113. Age-related Changes in the Alkaline Phosphatase Activity of Healthy and Inflamed Human Dental Pulp [Text] / E.E. Aslantas [et al.] // JOE. - 2015. - Vol. 12. - P. 1-4.

114. Alkaline phosphatase activity in dental pulp of orthodontically treated teeth [Text] / G. Perinetti [et al.] // *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* - 2005. - Vol. 128. - P.492-496.
115. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps [Text] / G. Spoto [et al.] // *Endod.* - 2001. - Vol. 27. - P.180-182.
116. Alteration in the expression of heat shock protein (Hsp) 25-immunoreactivity in the dental pulp of rat molars following tooth replantation [Text] / H. Ohshima [et al.] // *Arch. Histol. Cytol.* - 2001. - Vol. 64. - P.425-437.
117. Alves, M.J. Animal experimentation: A controversy about the scientific work [Text] / M.J. Alves, W. Colli // *Ienc Hoje.* - 2006. - Vol. 39. - P.24-29.
118. Alzarea, B.K. Selection of Animal Models in Dentistry: State of Art, Review Article [Text] / B.K. Alzarea // *Animal and Veterinary Advances.* - 2014. - Vol. 13, Iss. 18. - P. 1080-1085.
119. Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis [Text] / V. Pääkkönen [et al.] // *Eur. J. Oral Sci.* - 2005. - Vol. 113. - P.369-379.
120. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies [Text] / P.E. Murray [et al.] // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* - 2002. - Vol. 13, №6. - P.509-520.
121. Analysis of the soluble human tooth proteome and its ability to induce dentin/tooth regeneration [Text] / S.Y. Chun [et al.] // *Tissue Eng. A.* - 2011. - Vol. 17. - P.181-191.
122. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis [Text] / G. Koopman [et al.] // *Blood.* - 1994. - Vol. 84, №5. - P.1415-1420.
123. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition. Implications for cartilage mineralization [Text] / T. Kirsch [et al.] // *Biochemistry.* - 1997. - Vol. 36. - P. 3359-3367.

124. Anson, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin [Text] / M.L. Anson // *General Physiology*. - 1938. - Vol. 22, №1. - P.79-89.
125. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages [Text] / J.C. Mayo [et al.] // *Neuroimmunology*. - 2005. - Vol. 165, №1-2. - P.139-149.
126. Anti-inflammatory effects of inhibiting the amine oxidase activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase [Text] / L.M. Salter-Cid [et al.] // *Pharmacol. Exp. Ther.* - 2005. - Vol. 315. - P. 553-562.
127. Antioxidative therapy of pancreatitis - an 18-month interim evaluation [Text] / B. Kuklinski [et al.] // *Gesamte Inn Med.* - 1992. - Vol. 47, №6. - P.239-245.
128. Apoptosis of odontoclasts under physiological root resorption of human deciduous teeth [Text] / T. Domon [et al.] // *Cell Tissue Res.* - 2008. - Vol. 331. - P.423-433.
129. Aras, H.Ç. Melatonin-evoked in vivo secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat [Text] / H.Ç. Aras, J. Ekström // *Pineal Research*. - 2008. - Vol. 45, №4. - P.413-421.
130. Arends, M.J. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology [Text] / M.J. Arends, A.H. Wyllie // *Internat Rev. Exp. Pathol.* - 1991. - Vol. 32. - P.223-254.
131. Asn19Lys substitution in the osteoclast inhibitory lectin (OCIL) gene is associated with a reduction of bone mineral density in postmenopausal women [Text] / B. Pineda [et al.] // *Calcif.Tissue Int.* - 2008. - Vol. 82. - P. 348-353.
132. Aspartate aminotransferase activity in the pulp of teeth treated for 6 months with fixed orthodontic appliances [Text] / R. Veberiene [et al.] // *The Korean Journal of Orthodontics*. - 2015. - Vol. 45, №5. - P.261-267.

133. Attanasio, A. Ontogeny of circadian rhythmicity for melatonin, serotonin, and N-acetylserotonin in humans [Text] / A. Attanasio, K. Rager, D. Gupta // *Pineal Res.* - 1986. - Vol. 3. - P. 251-256.

134. Autio, J. The effect of two sucrose diets on formation of dentin and predentin in growing rats [Text] / J. Autio, E.-L. Hietala, M. Larmas // *Acta Odontol Scand.* - 1997. - Vol. 55. - P.292-295.

135. Babior, B.M. Oxidants by phagocytes: agents of defense and destruction [Text] / B.M. Babior // *Blood.* - 1984. - Vol. 64. - P. 959-966.

136. Bagramian, R.A. The global increase in dental caries. A pending public health crisis [Text] / R.A. Bagramian, F. Garcia-Godoy, A.R. Volpe // *Am. J. Dent.* - 2009. - Vol. 22. - P. 38.

137. Baker, D.E. Reproduction and breeding [Text] / D.E. Baker // *The Laboratory Rat: Biology and Diseases* / eds.: H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth. - New York: Academic Press, 1979. - Vol. 1. - P. 154-168.

138. Bawden, J.W. Autoradiography of Selenium-75 in Developing Rat Teeth and Bone [Text] / J.W. Bawden, L.E. Hammarström // *Caries Res.* - 1977. - Vol. 11. - P.195-203.

139. Beauchamp, C. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrilamide gels [Text] / C. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* - 1971. - № 3. - P. 276-287.

140. Bender, I.B. Pulpal pain diagnosis-a review [Text] / I.B. Bender // *Endod.* - 2000. - Vol. 26. - P. 175-179.

141. Beutler, B.A. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases [Text] / B.A. Beutler // *Immunol. Rev.* - 2009. - Vol. 227, №1. - P.248-263.

142. Biologically active molecule and dental tissue repair, a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with induction of odontoblast differentiation in vitro [Text] / H. Lesot [et al.] // *Cells Mater.* - 1994. - Vol. 4. - P.199-218.

143. Biomimetic approach to perforation repair using dental pulp stem cells and dentin matrix protein 1 [Text] / R. Alsanea [et al.] // *Endo.* - 2011. - Vol. 37. - P.1092-1097.
144. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide [Text] / L. Connelly [et al.] // *J. Immunol.* - 2001. - Vol. 166. - P. 3873-3881.
145. Björndal, L. A quantitative light microscopic study of the odontoblasts and subodontoblastic reactions to active and arrested enamel caries without cavitation [Text] / L. Björndal, T. Darvann, A. Thylstrup // *Caries Res.* - 1998. - Vol. 32. - P.59-69.
146. Björndal, L. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4. Dental caries characteristics of lesions and pulpal reactions [Text] / L. Björndal, I.A. Mjör // *Quintessence Int.* - 2001. - Vol. 32. - P.717-736.
147. Blancou, P. Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else [Text] / P. Blancou, I. Anegon // *Leukoc. Biol.* - 2010. - Vol. 87. - P.185-187.
148. Bödör, C. Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue [Text] / C. Bödör, A. Matolcsy, M. Bernáth // *Int. J. Endodontic.* - 2007. - Vol. 40, Iss. 2. - P. 128-132.
149. Bopp, B.A. Metabolic rate of selected selenium compounds in laboratory animal and man [Text] / B.A. Bopp, R.C. Sonders, J.W. Kesterson // *Drug Metab. Rev.* - 1982. - Vol. 13. - P. 271-318.
150. Bowles, W.H. Catalase/peroxidase activity in dental pulp [Text] / W.H. Bowles, H. Burns // *Endodont.* - 1992. - Vol. 18. - P. 527-529.
151. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Text] / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* - 1976. - Vol. 72. - P.248-254.
152. Bugler, B. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor [Text] / B. Bugler, F. Amalric, H. Prats // *Molecular and Cellular Biology.* - 1991. - Vol. 11. - P.573-577.

153. Byers, M.R. Effect of sensory denervation on the response of rat molar pulp to exposure injury [Text] / M.R. Byers, P.E. Taylor // *Dent Res.* - 1993. - Vol. 72. - P.613-618.
154. Calcified tissue formation of subcutaneously transplanted mouse dental pulp [Text] / M. Ikeda-Isogai [et al.] // *Acta Histochem.* - 2012. - Vol. 114. - P.55-61.
155. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression [Text] / T. Gaur [et al.] // *Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280. - P. 33132-33140.
156. Cariogenic potential of foods II. Relationship of food composition, plaque microbial counts and salivary parameters to caries in the rat model [Text] / S.A. Mundorff-Shrestha [et al.] // *Caries Res.* - 1994. - Vol. 28. - P.106-115.
157. Cariogenicity depends more on diet than prevailing mutans streptococcal species [Text] / W.H. Van Palenstein Helderma [et al.] // *Dent Res.* - 1996. - Vol. 75. - P.535-545.
158. Carvalho, J.C. Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption [Text] / J.C. Carvalho, K.R. Ekstrand, A. Thylstrup // *Dent Res.* - 1989. - Vol. 69. - P.773-779.
159. Caspase-9 regulates apoptosis/proliferation balance during metamorphic brain remodeling in *Xenopus* [Text] / L. Coen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2007. - Vol. 104, №20. - P. 8502-8507.
160. Cathala, G. Bovine kidney alkaline phosphatase. Purification, subunit structure, and metalloenzyme properties [Text] / G. Cathala, C. Brunel // *Biol. Chem.* - 1975. - Vol. 250. - P. 6040 - 6045.
161. Claustrat, B. The basic physiology and pathophysiology of melatonin [Text] / B. Claustrat, J. Brun, G. Chazot // *Sleep Medicine Reviews.* - 2005. - Vol. 9, №1. - P.11-24.
162. Cohen, J.J. Apoptosis [Text] / J.J. Cohen // *Immunol Today.* - 1993. - Vol. 14. - P.126-130.

163. Coleman, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase [Text] / J.E. Coleman // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* - 1992. - Vol. 21. - P.441-483.
164. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment [Text] / P. Garnero [et al.] // *Clin. Endocrinol. Metab.* - 1994. - Vol. 79. - P.1693-1700.
165. Coordinate expression of transforming growth factor-beta1 and adrenomedullin in rodent embryogenesis [Text] / L.M. Montuenga [et al.] // *Endocrinology.* - 1998. - Vol. 139, №9. - P. 3946-3957.
166. Cootauco, C.J. Immunocytochemical distribution of human PMN elastase and cathepsin-G in dental pulp [Text] / C.J. Cootauco, C.R. Rauschenberger, R.K. Nauman // *Dent. Res.* - 1993. - Vol. 72, №11. - P. 1485-1490.
167. Copper–zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp [Text] / G. Varvara [et al.] // *Endodont.* - 2005. - Vol. 38, Iss. 3. - P. 195-199.
168. Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue [Text] / W.L. Davis [et al.] // *Endodont.* - 1991. - Vol. 17. - P. 316-318.
169. Couve, E. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging [Text] / E. Couve, R. Osorio, O. Schmachtenberg // *Dent. Res.* - 2013. - Vol. 92. - P.765-772.
170. Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and Fe₄S₄ cluster [Text] / J.C. Boyington [et al.] // *Science.* - 1997. - Vol. 275. - P. 1305-1308.
171. Cvek, M. External root resorption following bleaching of pulpless teeth with oxygen peroxide [Text] / M. Cvek, A.M. Lindvall // *Endo Dent. Traumatol.* - 1985. - Vol.1. - P.56-60.

172. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement [Text] / J.-C. Farges [et al.] // Immunobiology. - 2011. - Vol. 216. - P.513-517.
173. Cytokine signalling in rat pulp interstitial fluid and transcapillary fluid exchange during lipopolysaccharide-induced acute inflammation [Text] / A. Bletsa [et al.] // Physiol. - 2006. - Vol. 573, №1. - P.225-236.
174. Dammaschke, T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry [Text] / T. Dammaschke // Lab. Anim. - 2010. - Vol. 44, №1. - P.16-16.
175. Dannan, A. Animal models in periodontal research: A mini-review of the literature [Text] / A. Dannan, F. Alkattan // Veterinary Medicine. - 2007. - Vol. 5, №1. - P.1-9.
176. Davis, B.K. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases [Text] / B.K. Davis, H. Wen, J.P. Ting // Annu. Rev. Immunol. - 2011. - Vol. 29. - P.707-735.
177. Deciduous Dental Pulp Enzymatic Activity / Z. Georgiev [et al.] // Balkan J. of Stomatology. - 2005. - Vol.9, №3. - P.182-185.
178. Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption [Text]/ Y. Zhu [et al.] // Cell Physiol. - 2013. - Vol. 228, №1. - P.207-215.
179. Delafontaine, P. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels [Text] / P. Delafontaine, Y.H. Song, Y. Li // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2005. - Vol. 24, №3. - P 435-444.
180. Demarco, F.F. Dental pulp tissue engineering [Text] / F.F. Demarco // Braz Dent. - 2011. - Vol. 22. - P. 313-313.
181. Dentine as a bioactive extracellular matrix [Text] / A.J. Smith [et al.] // Arch Oral Biol. - 2012. - Vol. 57. – P.109-121.
182. Derringer, K. Epidermal growth factor released in human dental pulp following orthodontic force [Text] / K. Derringer, R. Linden // Eur. J. of Orthodontics. - 2007. - Vol. 29. - P.67-71.

183. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity [Text] / M.J. Staquet [et al.] // Dent. Res. - 2008. - Vol. 87. - P. 256-261.
184. Differential expression of transforming growth factor – beta 1, beta 2, beta 3 and type I, II, III receptors in the epithelia of inflamed gingival [Text] / P. Ye [et al.] // Pathology. - 2003. - Vol. 35. - P. 384-392.
185. Differential regulation of immune responses by odontoblasts [Text] / O. Veerayutthwilai [et al.] // Oral Microbiol. Immunol. - 2007. - Vol. 22. - P.5-13.
186. Differentially expressed protein profile of human dental pulp cells in the early process of odontoblast-like differentiation in vitro [Text] / X. Wei [et al.] // Endodont. - 2008. - Vol. 34. - P.1077-1084.
187. Direct measurement of selenium absorption in vivo: triple-lumen gut perfusion in the conscious dog [Text] / P.G. Reasbeck [et al.] // Proc. New Zealand Workshop on Trace Elements Dunedin. - 1981. - P. 107-107.
188. Distinctive Genetic Activity Pattern of the Human Dental Pulp between Deciduous and Permanent Teeth [Text] / Ji-Hee Kim [et al.] // PLoS One. - 2014. - Vol. 9, №7. - P.102893-102893.
189. Effect of Melatonin on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells [Text] / H. He [et al.] // ESPE. - 2016. - Vol.13. - P.86-86.
190. Effect of xylitol on dentin formation in molars of adult rats [Text] / L. Tjäderhane [et al.] // Eur. J. Oral Sci. - 1996. - Vol. 104. - P.409-411.
191. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid [Text] / K.J. Lee [et al.] // Am. J. of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. - 2004. - Vol. 125. - P.168-177.
192. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin [Text] / L.C. Clark [et al.] // JAMA. - 1996. - Vol. 276, № 26. - P. 1957-1963.
193. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells [Text] / S. Matsui [et al.] // Oral Sci. - 2008. - Vol. 50, №1. - P.75-81.

194. Effects of tgf-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro [Text] / C.P. Chan [et al.] // Arch. Oral Biol. - 2005. - Vol. 50, №5. - P.469-479.

195. Ekstrand, K.R. Structural analyses of plaque and caries in relation to the morphology of the groove-fossa system on erupting mandibular third molars [Text] / K.R. Ekstrand, L. Björndal // Caries Res. - 1997. - Vol. 31. - P.336-348.

196. Emilia, E. Biomarkers in the dentin-pulp complex: role in health and disease [Text]/ E. Emilia, P. Neelakantan // Clin. Pediatr. Dent. - 2015. - Vol. 39, №2. - P.94-99.

197. Eming, S.A. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms [Text] / S.A. Eming, T. Krieg, J. M. Davidson // Invest. Dermatol. - 2007. - Vol. 127. - P.514-525.

198. Engström, C. Odontoblast metabolism in rats deficient in vitamin D and calcium I: a histochemical survey [Text] / C. Engström, A. Linde, B.C. Magnusson // Oral Pathol. - 1977. - Vol. 6. - P.359-366.

199. Eronat, C. Histological investigation of physiologically resorbing primary teeth using Ag-NOR staining method [Text] / C. Eronat, N. Eronat, M. Aktug // Int. J. Paed. Dent. - 2002. - Vol. 12. - P.207-214.

200. Evidence for intestinal release of absorbed selenium in a form with hepatic extraction [Text] / T. Kato [et al.] // Am. J. Physiol. - 1992. -Vol. 262. - P. 854-858.

201. Experimental Animal Models in Periodontology [Text] / X. Struillou [et al] // A Review Open Dent. J. - 2010. - Vol. 4. - P.37-47.

202. Expression of cytokeratins in human enamel organ [Text] / M.G. Domingues [et al.] // Eur. J. Oral Sci. - 2000. - Vol. 108. - P.43-47.

203. Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor in Human Pulp Tissue [Text] / J. Caviedes-Bucheli [et al.] // JOE. - 2004. - Vol. 30, Iss. 11. - P. 767-769.

204. Expression of mineralization markers in dental pulp cells [Text] / X. Wei [et al.] // Endod. - 2007. - Vol. 33. - P.703-708.

205. Expression of TGF-beta receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization [Text] / A.J. Sloan [et al.] // *Adv. Dent. Res.* - 2001. - Vol. 15. - P.63-67.
206. Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp [Text] / T. Toyono [et al.] // *Dent Res.* - 1997. - Vol. 76, №9. - P.1555-1560.
207. Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue [Text] / H.W. Jiang [et al.] // *Endod.* - 2006. - Vol. 32. - P. 747-751.
208. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp [Text] / N. Mutoh [et al.] // *Endod.* - 2007. - Vol. 33. - P. 1183-1186.
209. Fagundes, D.J. Choices criteria and current animal specimens [Text] / D.J. Fagundes, M.O. Taha // *Acta Cir. Bras.* - 2004. - Vol. 19. - P.59-65.
210. FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells [Text] / K. Nakao [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2004. - Vol. 325, №3. - P.1052-1059.
211. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs [Text] / S.K. Olsen [et al.] // *Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278, №36. - P.34226-34236.
212. Forman, H.J. Redox signaling in macrophages [Text] / H.J. Forman, M. Torres // *Mol. Aspects Med.* - 2001. - Vol. 22. - P. 189-216.
213. Freeman, B.A. Biology of disease: free radicals and tissue injury [Text] / B.A. Freeman, J.D. Crapo // *Lab. Invest.* - 1982. - Vol. 47. - P. 412-426.
214. Frost, H.M. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis [Text] / H.M. Frost, W.S.S. Jee // *Bone Miner.* - 1992. - Vol. 18. - P.227-236.
215. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats [Text] / A.W. Thorburn [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition.* - 1989. - Vol. 49, №6. - P.1155-1163.

216. Fuks, A.B. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions [Text] / A.B. Fuks // Dent. Clin. North Am. - 2000. - Vol. 44. - P.571-596.

217. Ganguly, P. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease [Text] / P. Ganguly, F.A. Sreyoshi // Nutrition. - 2015. - Vol. 14. - P.6-6.

218. Gantber, H.E. Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid [Text] / H.E. Gantber // Biochemistry. - 1968. - Vol. 7. - P. 2898-2898.

219. Gene expression of bone matrix proteins in a calcified tissue appeared in subcutaneously transplanted rat dental pulp [Text] / T. Yamazoe [et al.] // Med Dent. Sci. - 2002. - Vol. 49. - P.57-66.

220. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries [Text] / J.L. Mclachlan [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. - 2005. - Vol. 1741. - P.271-281.

221. Genetic utility of broadly defined bipolar schizoaffective disorder as a diagnostic concept [Text] / M.L. Hamshere [et al.] // Br. J. Psychiatry. - 2009. - Vol.195. - P. 23-29.

222. Goldberg, M. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp a biological basis for repair and tissue engineering [Text] / M. Goldberg, A.J. Smith // Crit. Rev. Oral Biol. Med. - 2004. - Vol. 15. - P. 13-27.

223. Goldberg, M. The dental pulp. Biology, pathology, and regenerative therapies [Text] / M. Goldberg. - London: Springer; Hiedelberg; New York; Dordrecht, 2014. - 277 p.

224. Hadjimarkos, D.M. Selenium in Relation to Dental Caries [Text] / D.M. Hadjimarkos // Cosmet. Toxicol. - 1973. - Vol. 11. - P. 1053-1095.

225. Hadjimarkos, D.M. The Selenium Content of Human Teeth [Text] / D.M. Hadjimarkos, C.W. Bonhorst // Oral Surg. - 1959. - Vol. 12. - P. 113 - 116.

226. Hahn, C.L. Innate immune responses of the dental pulp to caries [Text] / C.L. Hahn, F.R. Liewehr // Endod. - 2007. - Vol. 33. - P.643-651.

227. Harokopakis-Hajishengallis, E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events [Text] / E. Harokopakis-Hajishengallis // Oral Sci. - 2007. - Vol. 49. - P. 1-12.
228. Heyeraas, K.J. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation [Text] / K.J. Heyeraas, L. Kvinnsland // Proceedings of the Finnish Dental Society. - 1992. - Vol. 88. - P.393-401.
229. Hietala, E-L. Effects of xylitol and carbohydrate diets on dental caries, dentine formation and mineralization in young rats [Text] / E-L. Hietala, M. Larmas // Archs. Oral Biol. - 1995. - Vol. 40. - P.1137-1141.
230. Hietala, E-L. Evidence that high-sucrose diet reduces dentin formation and disturbs mineralization in rat molars [Text] / E-L.Hietala, M. Larmas // Dent Res. - 1995. - Vol. 74. - P.1899-1903.
231. Hietala, E-L. The effect of ovariectomy on dentin formation and caries in adult rats [Text] / E-L.Hietala, M. Larmas // Acta Odontol. Scand. - 1992. - Vol. 50. - P.337-343.
232. High sucrose diet reduces defensive reactions of the pulp-dentinal complex to dentinal caries in young rats [Text] / S. Huuonen [et al.] // Acta Odontol. Scand. - 2001. - Vol. 59. - P.83-87.
233. Hillmann, G. Acid phosphatase by colorimetric test by Hillmann method [Text] / G. Hillmann, Z. Klin // Biochem. - 1971. - Vol. 9. - P. 273-273.
234. Hillmann, G. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages [Text] / G. Hillmann, W. Geurtsen // Cell Tissue Res. - 1997. - Vol. 289. - P.145-154.
235. Hirafuji, M. 5-hydroxytryptamine stimulates the release of prostacyclin but not thromboxane A₂ from isolated rat dental pulp [Text] / M. Hirafuji, Y. Ogura // European J. Pharmacol. - 1987. - Vol. 136. - P. 433.
236. Human (⁷⁴Se) selenomethionine metabolism: a kinetic model [Text] / C.A. Swanson [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. - 1991. - Vol. 54. - P. 917-926.

237. Hunt, H.R. Formation of cariogenic impactions in rats [Text] / H.R. Hunt, S. Rosen, C.A. Hoppert // Dent Res. - 1970. - Vol. 49. - P.515-525.

238. Hunt, H.R. Morphology of molar teeth and occlusion in young rats [Text] / H.R. Hunt, S. Rosen, C.A. Hoppert // Dent Res. - 1970. - Vol. 49. - P.508-514.

239. Huuonen, S. An electron probe x-ray microanalytical study of dentine minerals in sucrose-fed or glucocorticoid-medicated rats [Text] / S. Huuonen, M. Larmas // Calcif. Tissue Int. - 1999. - Vol. 65. - P.223-225.

240. Huuonen, S. The effect of impaired dentin formation on dental caries [Text] / S. Huuonen // Acta Univ. Oul. D. - 1999. - Vol. 517. - P.13-60.

241. Identification of novel function of vimentin for quality standard for regenerated pulp tissue [Text] / M. Murakami [et al.] // Endod. - 2012. - Vol. 38. - P.920-926.

242. Ikeda, H. Sensory experiences in relation to pulpal nerve activation of human teeth in different age groups [Text] / H. Ikeda, H. Suda // Arch. Oral Biol. - 2003. - Vol. 48. - P.835-841.

243. Immune defense mechanisms of the dental pulp [Text] / M. Jontell [et al.] // Crit. Rev. Oral Biol. Med. - 1998. - Vol. 9. - P.179-200.

244. Immunocytochemical Localization of Serotonin, Monoamine Oxidase and Assessment of Monoamine Oxidase Activity in Human Dental Pulp [Text] / K. Inoue [et al.] // Brain Res. - 2000. - Vol. 853, №2. - P.374-376.

245. O'Sullivan, M. Immunolocalization of semicarbazide-sensitive amine oxidase in human dental pulp and its activity towards serotonin [Text] / M. O'Sullivan, K.F. Tipton, W.E. McDevitt // Arch. Oral Biol. - 2002. - Vol. 47. - P. 399-406.

246. Incidence of pulp necrosis subsequent to pulp canal obliteration from trauma of permanent incisors [Text] / A. Robertson [et al.] // Endod. - 1996. - Vol. 22. - P. 557-560.

247. Gu, L. Increased expression of IGF II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with

ovarian cancer [Text] / L.Gu, K.Shigemasa, K.Ohama // Int. J. Oncol. - 2004. - Vol. 24. - P. 671-678.

248. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery [Text] / D.W. Gilroy [et al.] // Nat. Rev. Drug Discov. - 2004. - Vol. 3. - P.401-416.

249. Inhibition of monoamine oxidase by novel antidepressant tetrindole [Text] / A.E. Medvedev [et al.] // Biochem Pharmacol. - 1994. - Vol. 47. - P.303-308.

250. Inhibition of vascular adhesion protein-1 suppresses endotoxin-induced uveitis [Text] / K. Noda [et al.] // FASEB. - 2008. - P. 1094-1103.

251. Insulin-like growth factor isoforms in skeletal muscle aging, regeneration, and disease [Text] / N. Winn [et al.] // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. - 2003. - Vol. 67. - P.507-518.

252. Intracellular distribution of desmoplakin in human odontoblasts [Text] / Y. Sawa [et al.] // Histochem Cytochem. - 2005. - Vol. 53. - P.1099-1108.

253. Irreversible inflammation is associated with decreased levels of the alpha1-, beta1-, and alpha2-subunits of sGC in human odontoblasts [Text] / Y. Korkmaz [et al.] // Dent. Res. - 2011. - Vol. 90. - P.517-522.

254. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes [Text] / A.B. Lerner [et al.] // Am. Chem. Soc. - 1958. - Vol. 80, №10. - P. 2587-2587.

255. Jaber, L. Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite [Text] / L. Jaber, C. Mascres, W. Donohue // Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol. - 1992. - Vol. 73, Iss. 1. - P. 92-98.

256. Johnson, C. R. Caspase-9 regulation: an update [Text] / C.R. Johnson, W.D. Jarvis // Apoptosis. - 2004. - Vol. 9, №4. - P.423-427.

257. Joiner, A. The bleaching of teeth: a review of the literature [Text] / A. Joiner // Dentistry. - 2006. - Vol. 34, №7. - P. 412-419.

258. Kalsbeek, A. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting

[Text] / A. Kalsbeek, R.M. Buijs // Cell and Tissue Res. - 2002. - Vol. 309, №1. - P.109-118.

259. Karasek, M. Does melatonin play a role in aging processes [Text] / M. Karasek // Physiol. Pharmacol. - 2007. - Vol. 58. - P. 105-113.

260. Karjalainen, S. Variable Ratios of Lactate and Malate Dehydrogenase-Like Enzyme Activities and LDH Isoenzyme Distribution in the Odontoblast-Predentine Region of Intact and Carious Human Teeth [Text] / S. Karjalainen, K.K. Mäkinen // Caries Res. - 1980. - Vol. 14. - P.121-127.

261. Karki, R. Toll-like receptor 4-mediated nuclear factor kappa B activation is essential for sensing exogenous oxidants to propagate and maintain oxidative/nitrosative cellular stress [Text] / R. Karki, O. Igwe // PLoS One. - 2013. - Vol. 8. - P. 73840-73840.

262. Kawai, T. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins [Text] / T. Kawai, S. Akira // EMBO Mol. Med. - 2011. - Vol. 3, № 9. - P. 513-527.

263. Ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced astrocytes activation by suppressing TLR4/NF- κ B pathway [Text] / Y. Wu [et al.] // Cell Physiol. Biochem. - 2012. - Vol. 30. - P. 609-617.

264. Kiryati, A.A. The effect of hydrocortisone plus polyantibiotics upon the damaged and infected dental pulp of rat molars [Text] / A.A. Kiryati // Dent Res. - 1958. - Vol. 37. - P.886-901.

265. Kolips, A. The blood capillaries in the subodontoblastic region of the human dental pulp as demonstrated by free-refracturing [Text] / A. Kolips, M. Rask-Andersen // Acta Odontol.Scand.-1983.- Vol.6.- P.333-341.

266. König, K.G. Methodik der kurzfristig erzeugten rattenkaries [Text] / K.G. König, T.M. Marthaler, H.R. Mühlemann // Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd. - 1958. - Bd. 29. - S.99-127.

267. Kortelainen, S. Effect of fluoride on the rate of dentin apposition and caries progression in young and old Wistar rats [Text] / S. Kortelainen, M. Larmas // Scand J Dent Res. - 1994. - Vol. 102. - P.30-33.

268. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation [Text] / H. Koyama [et al.] // *Bone and Mineral Res.* - 2002. - Vol. 17, №7. - P.1219-1229.

269. Kozlov, M. Histologic effects of various drugs on amputated pulps of rat molars [Text] / M. Kozlov, M. Massler // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* - 1960. - Vol. 13. - P.455-469.

270. Kuwata, F. Properties of malate dehydrogenase isozymes in rabbit dental pulp [Text] / F. Kuwata, K. Otsuka, K. Suzuki // *Dent Res.* - 1980. - Vol. 59, №7. - P. 1170-1170.

271. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Text] / U.K. Laemmli // *Nature.* - 1970. - Vol. 227. - P. 680-685.

272. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape [Text] / S. Fukumoto [et al.] // *Biol. Chem.* - 2006. - Vol.281. - P.5008-5016.

273. Lange, A. Cell sizes and apposition of dental hard tissues in rats [Text] / A. Lange, L.Hammarström // *Acta Odontol. Scand.* - 1984. - Vol. 42. - P.215-223.

274. Larmas, M. A histochemical study of arylaminopeptidases and alkaline phosphatases in sound and carious human teeth [Text] / M. Larmas, S. Kantola // *Acta Odontol. Scand.* - 1973. - Vol. 31, Iss. 3. - P. 179-185.

275. Le Bell, Y. A quantitative study of lactate and malate dehydrogenase and aspartate transaminase activities in the human dental pulp [Text] / Y. Le Bell, M. Larmas // *Arch. of Oral Biology.* - 1978. - Vol. 23, Iss. 10. - P. 925-928.

276. Lee, C.C. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function [Text] / C.C. Lee, A.M. Avalos, H.L. Ploegh // *Nat. Rev. Immunol.* - 2012. - Vol. 12. - P.168-179.

277. Levander, O.A. Dietary selenium levels needed to maintain balance in North American adults consuming self-selected diets [Text] / O.A. Levander, V.C. Morris // *Am. J. Nutr.* - 1984. - Vol. 39. - P. 809-815.

278. Linde, A. Mineral induction by immobilized polyanionic proteins [Text] / A. Linde, A. Lussi, M.A. Crenshaw // *Calcif. Tissue Int.* - 1989. - Vol. 44, №4. - P.286-295.

279. Linde, L.A. Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Patterns of Human Dental Pulp [Text] / L.A. Linde, A.E. Ljunggren // *Dent. Res.* - 1970. - Vol. 49, № 6. - P.1469-1472.

280. Lipopolysaccharide promotes adhesion and migration of murine dental papilla-derived MDPC-23 cells via TLR4 [Text] / J.H. Park [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* - 2011. - Vol. 27. - P. 277–281.

281. Lipopolysaccharide-binding protein inhibits toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid in human odontoblast-like cells [Text] / F. Carrouel [et al.] // *Endod.* - 2013. - Vol. 39. - P.1008–1014.

282. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts [Text] / S.H. Durand [et al.] // *Immunol.* - 2006. - Vol. 176. - P. 2880-2887.

283. Lissoni, P. Is there a role for melatonin in supportive care? [Text] / P. Lissoni // *Supp. Care in Cancer.* – 2002. - Vol. 10, №2. - P.110-116.

284. Liu, H. Dental pulp stem cells [Text] / H. Liu, S. Gronthos, S. Shi // *Method. Enzymol.* - 2006. - Vol. 419. - P.99-113.

285. Liu, J. Melatonin Effects on Hard Tissues: Bone and Tooth. Review [Text] / J. Liu, F. Huang, H.-W. He // *Int. J. Mol. Sci.* - 2013. - Vol. 14. - P. 10063-10074.

286. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress [Text] / A. Cutando [et al.] // *Periodontology.* - 2007. - Vol. 78, №3. - P.576-583.

287. Localization of alkaline phosphatase in developing bovine dental pulp [Text] / H. Ishida [et al.] // *Bone Miner. Metab.* - 1988. - Vol. 6. - P.26-31.

288. Lopez-Castejon, G. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion [Text] / G. Lopez-Castejon, D. Brough // Cytokine Growth Factor Rev. - 2011. - Vol. 22. - P. 189-195.

289. Love, R.M. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria [Text] / R.M. Love, H.F. Jenkinson // Crit. Rev. Oral Biol. Med. - 2002. - Vol. 13. - P.171-183.

290. Low dose fructose ingestion during gestation and lactation affects carbohydrate etabolism in rat dams and their offspring [Text] / S. Rawana [et al.] // Nutrition - 1993. - Vol. 123. - P. 2158-2165.

291. Lozupone, E. Morphometric analysis of the deposition and mineralization of enamel and dentine from rat incisor during the recovery phase following a low-calcium regimen [Text] / E. Lozupone, A. Favia // Archs. Oral Biol. -1994. - Vol. 39. - P.409-416.

292. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF- κ B and MAPK pathways in human dental pulp stem cells [Text] / W. He [et al.] // Int. Endodontic J. - 2013. - Vol. 46, № 2. - P. 128–136.

293. Maioli, M. Osteogenesis from Dental Pulp Derived Stem Cells: A Novel Conditioned Medium Including Melatonin within a Mixture of Hyaluronic, Butyric, and Retinoic Acids [Text] / M. Maioli, V. Basoli, S. Santaniello // Stem Cells International. - 2016. - Vol. 2016. - P. 1-8.

294. Manhold, H. Stress oral disease and general illness [Text]/ H. Manhold // Psychosomatics. - 1979. - Vol.20, № 20. - P.83-87.

295. MAPK signaling is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells [Text] / T.M. Botero [et al.] // Dent Res. - 2010. - Vol. 89. - P. 264-269.

296. Marks, S.C. Tooth eruption: teories and facts [Text] / S.C. Marks, H.E. Schroeder // Anat. Rec. - 2001. - Vol. 245. - P.374-393.

297. Martin, V. Intra cellular signalling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin [Text] / V. Martin, F. Herrera, P. Carrera-Gonzalez // Cancer Research. - 2006. - Vol. 66, №2. - P.1081-1088.

298. Massler, M. Pulpal reactions to dental caries [Text] / M. Massler // Int. Dent J. - 1967. - Vol. 17. - P.441-460.

299. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth [Text] / P. Freitas [et al.] // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. - 2007. - Vol. 103, №5. - P. 95-102.
300. Matrix and TGF-beta-related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization [Text] / J. Liu [et al.] // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. - 2007. - Vol. 43, №3-4. - P.120-128.
301. Maurice, C.G. Experimental cavity preparations in the molar of the rat [Text] / C.G. Maurice, I. Schour // Dent Res. - 1955. - Vol. 34. - P.429-434.
302. Mckenna, M.J. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes [Text] / M.J. Mckenna, T.A. Hamilton, H.H. Sussman // Biochem. - 1979. - Vol. 181. - P.67-73.
303. McLester, J.S. Nutrition and diet in health and disease [Text] / J.S. McLester - 4th ed. - Phil.: WB Saunders, 1943. - P.128-129.
304. Mechanism of TNF- α -induced IL-1 α , IL-1 β and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones [Text] / N.A. Turner [et al.] // Cardiovasc. Res. - 2007. - Vol. 76. - P. 81-81.
305. Mechin, J.C. Action of cariogenic diet on fixation and retention of skeleton and teeth strontium in rats [Text] / J.C. Mechin, C. Toury // Rev. Mens Suisse Odontostomatol. - 1973. - Vol. 20, №1. - P.55-59.
306. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity [Text] / M. Czesnikiewicz-Guzik [et al.] // Physiol. and Pharmacol. - 2007. - Vol. 58, №3. - P.5-19.
307. Melatonin and Parkinson's disease [Text] / J.C. Mayo [et al.] // Endocrine. - 2005. - Vol. 27, №2. - P.169-178.
308. Melatonin and pregnancy in the human [Text] / H. Tamura [et al.] // Reprod. Toxicol. - 2008. - Vol. 25. - P. 291-303.
309. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury [Text] / J.-G. Li [et al.] // Am. J. Transl. Res. - 2015. - Vol. 7, №1. - P. 66-78.

310. Melatonin enhances vertical bone augmentation in rat calvaria secluded spaces [Text] / H. Shino [et al.] // *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* - 2016. - Vol. 21. - P. 122-126.
311. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders [Text] / V. Srinivasan [et al.] // *Behavioral and Brain Functions.* - 2006. - Vol. 2. - P.15-15.
312. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells [Text] / G. García-Santos [et al.] // *Pineal Research.* - 2006. - Vol. 41, №2. - P.130-135.
313. Melatonin influences proliferation and differentiation of rat dental papilla cells in vitro and dentine formation in vivo by altering mitochondrial activity [Text] / J. Liu [et al.] // *Pineal Res.* - 2013. - Vol. 54. - P. 170-178.
314. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [Text] / M.Z. Xia [et al.] // *Pineal Res.* - 2012. - Vol.53, №4. - P. 325-334.
315. Melatonin promotes hepatic differentiation of human dental pulp stem cells: clinical implications for the prevention of liver fibrosis [Text] / Y.A. Cho [et al.] // *J Pineal Res.* - 2015. - Vol. 58, №1. - P.127-135.
316. Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal [Text] / A. Cutando [et al.] // *Pineal Research.* - 2007. - Vol. 42, №4. - P.419-420.
317. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants [Text] / A. Cutando [et al.] // *Journal of Pineal Research.* - 2008. - Vol. 45, №2. - P.174-179.
318. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro [Text] / O. Nakade [et al.] // *Pineal Research.* - 1999. - Vol. 27, №2. - P.106-110.
319. Melatonin stimulates the growth of new bone around implants in the tibia of rabbits [Text] / J.L. Calvo-Guirado [et al.] // *Pineal Research.* - 2010. - Vol. 49, №4. - P.356-363.
320. Melatonin: potential functions in the oral cavity [Text] / A. Cutando [et al.] // *Periodontology.* - 2007. - Vol. 78, №6. - P.1094-1102.

321. Messelt, E.B. The lactate dehydrogenase of the frequently asphyxiated beaver (*Castor fiber*) [Text] / E.B. Messel, A.S. Blix // *Comp. Biochem. Physiol.* - 1976. - Vol. 53. - P.77-80.
322. Miller, L.S. Toll-like receptors in the skin [Text] / L.S. Miller, R.L. Modlin // *Semin. Immunopathol.* - 2007. - Vol. 29, №1. - P.15-26.
323. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis [Text] / P. Marchetti [et al.] // *Exp. Med.* - 1996. - Vol. 184. - P.1155-1160.
324. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes [Text] / D.K. Ferris [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1988. - Vol. 85. - P. 3850-3850.
325. Molecular biology of selenium and its role in human health [Text] / B.J. Lee [et al.] // *Mol. Cells.* - 1996. - Vol. 6. - P. 509-520.
326. Molteni, M. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation [Text] / M. Molteni, S. Gemma, C. Rossetti // *Mediators of Inflammation.* - 2016. - Vol. 2016. - P. 1-9.
327. Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts [Text] / T. Domon [et al.] // *Anat Rec.* - 1997. - Vol. 249, №4. - P.449-457.
328. Morphological analysis of dentine formation in young rat molars during the recovery phase with calcium alone or combined with xylitol following a low-calcium dietary regimen [Text] / L. Tjäderhane [et al.] // *Archs. Oral Biol.* - 1995. - Vol. 40. - P.707-711.
329. Moss, D.W. Alkaline phosphatase isoenzymes [Text] / D.W. Moss // *Clin Chem.* - 1982. - Vol. 28. - P.2007-2016.
330. Moss, D.W. Perspectives in alkaline phosphatase research [Text] / D.W. Moss // *Clin. Chem.* - 1992. - Vol. 38. - P.2486-2492.
331. Mozier, N.M. S-adenosyl-L-methionine: a methyltransferase a new enzyme in sulfur and selenium metabolism [Text] / N.M. Mozier, K.P. McConnell, J.W. Hoffman // *Biol. Chem.* - 1988. - Vol. 263. - P. 4527-4531.

332. Buchet, R. Multisystemic Functions of Alkaline Phosphatases [Text] / R. Buchet, J.L. Millán, D.Magne // *Phosphatase Modulators*. - 2013. - Vol.1053. - P.27-51.
333. Nakano, G. Purification and properties of an amine oxidase in bovine dental pulp and its comparison with serum amine oxidase [Text] / G. Nakano, M. Harada, T. Nagatsu // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1974. - Vol. 341. - P. 366-366.
334. Nathoo, S. The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration / S. Nathoo // *Am. Dent. Assoc.* - 1997. - Vol. 128. - P. 6-10.
335. Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study [Text] / R. Garimella [et al.] // *Bone*. - 2006. - Vol.38. - P.811-817.
336. Navia, J.M. The laboratory rat [Text] / J.M. Navia, A.J. Narkates // *Laboratory Rat: Biology and Diseases* / eds.: H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth. - New York: Academic Press, 1980. - Vol. 2. - P.59-74.
337. Nedrebo, T. Effect of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 β and IL-6 on interstitial fluid pressure in rat skin [Text] / T. Nedrebo, A. Berg, R.K. Reed // *Am. J. Physiol.* - 1999. - Vol. 277. - P. 1857-1862.
338. Nishikawa, S. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II expressing dendritic cells [Text] / S. Nishikawa, F. Sasaki // *Hist. Cyto.* - 1999. - Vol. 47. - P.303-311.
339. Nitric oxide in pulp cell growth, differentiation, and mineralization [Text] / R. Yasuhara [et al.] // *Dent. Res.* - 2007. - Vol. 86. - P.163-168.
340. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp [Text] / F. Di Nardo Di Maio [et al.] // *Dent. Res.* - 2004. - Vol. 83. - P.312-316.
341. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals [Text] / M. Arese [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. - 1999. - Vol. 10, №5. - P.1429-1444.
342. O'Sullivan, M. Immunolocalization of semicarbazide-sensitive amine oxidase in human dental pulp and its activity towards serotonin [Text] / M.

O'Sullivan, K.F. Tipton, W.E. McDevitt // *Oral Biology*. - 2002. - Vol. 47, Iss. 5. - P. 399-406.

343. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria [Text] / J.-C. Farges [et al.] // *Front. Physiol.* - 2013. - Vol. 4. - P. 326-326.

344. Odontoblast-mediated regulation of the progression of dentinal caries [Text] / M. Larmas [et al.] // *Proc Finn Dent Soc.* - 1992. - Vol. 88. - P.313-320.

345. Odontoblasts in the dental pulp immune response [Text] / J.-C. Farges [et al.] // *Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* - 2009. - Vol. 312. - P.425-436.

346. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors [Text] / Jh. Lee [et al.] // *Biomaterials*. - 2011. - Vol. 32. - P. 9696-9706.

347. Ohtsuka-Isoya, M. Effect of suprachiasmatic nucleus lesion on circadian dentin increment in rats [Text] / M. Ohtsuka-Isoya, H. Hayashi, H. Shinoda // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 2001. - Vol. 280. - P. 1364-1370.

348. Egan, C.A. On the pulpal nerve supply in primary human teeth: evidence for the innervation of primary dentine [Text] / C.A. Egan, M.P. Hector, M.A. Bishop // *Int. J. Paediatr. Dent.* - 1999. - Vol. 9. - P. 57-66.

349. Oropharyngeal dysphagia in polymyositis dermatomyositis [Text] / C. Ertekin [et al.] // *Clin Neurol Neurosurg.* - 2004. - Vol. 107. - P. 32-37.

350. Osteocalcin expression in pulp inflammation [Text] / A. Abd-Elmeguid [et al.] // *Endod.* - 2013. - Vol. 39, №7. - P. 865-872.

351. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [Text] / W.S. Simonet [et al.] // *Cell*. - 1997. - Vol. 89, №2. - P.309-319.

352. Oxidative mediated neurodegeneration in Alzheimer' diseases: melatonin and related antioxidant as neuroprotective agents [Text] / M.A. Pappalla [et al.] // *Current Med. Chem.* - 2003. - Vol. 3, №1. - P.233-243.

353. Pääkkönen, V. High-throughput gene and protein expression analysis in pulp biologic research: review [Text] / V. Pääkkönen, L. Tjäderhane // Endod. - 2010. - Vol.36. - P.179-189.

354. Paglia, B.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase [Text] / B.E. Paglia, W.N. Valentine // Lab. Clin. Med. - 1967. - Vol. 70. - P. 158-159.

355. Pathogenic strains of *Acanthamoeba* are recognized by TLR4 and initiated inflammatory responses in the cornea [Text] / H. Alizadeh [et al.] // PLoS One. - 2014. - Vol. 9. - P. 92375-92375.

356. Paynter, K.J. Morphogenesis of the rat first molar [Text] / K.J. Paynter, A.M. Hunt // Archs. Oral Biol. - 1964. - Vol. 9. - P.611-626.

357. Perspectives on the use of melatonin to reduce cytotoxic and genotoxic effects of methacrylate-based dental materials [Text] / J. Blasiak [et al.] // Pineal Research. - 2011. - Vol. 51, №2. - P.157-162.

358. Pharmacopoeia of the people's republic of China [Text]. - English edition. - 2000. - Vol.1. - P.7-8.

359. Piskin, B. Neural changes in ulcerative and hyperplastic pulpitis: a transmission electron microscopic study [Text] / B. Piskin, B.O. Aktener, H. Karakisi // Int. Endod J. - 1993. - Vol. 26, №4. - P.234-240.

360. Possible involvement of melatonin in tooth development: Expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs [Text] / S. Kumasaka [et al.] // Histochem. Cell Biol. - 2010. - Vol. 133. - P. 577-584.

361. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo [Text] / S. Gronthos [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - Vol. 97. - P. 13625 -13630.

362. Pramila, R. Regeneration potential of pulp-dentin complex: systematic review [Text] / R. Pramila, M. Muthu // Conserv. Dent. - 2012. - Vol. 15. - P.97-103.

363. Presence of Selenium-75 in Rat Saliva and Teeth after Intracardiac Injection of Radioactive Sodium Selenite [Text] / C.K. Claycomb [et al.] // Dent. Res. - 1961. - Vol. 40. - P. 504-510.

364. Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp [Text] / M. Goseki [et al.] // Dent Res. - 1990. - Vol. 69, №3. - P. 909-912.

365. Protection of human neutrophils by endogenous catalase: studies with cells from catalase-deficient individuals [Text] / D. Roos, R.S. Weening, S.R. Wyss [et al.] // Clin. Invest. - 1980. - Vol. 65. - P.1515-1522.

366. Protective effect of SIRT6 against LPS-induced human dental pulp cell apoptosis via regulating Ku70 deacetylation [Text] / Q. Feng [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Patho. - 2017. - Vol. 10, №1. - P.72-79.

367. Protective influence of melatonin against acute oesophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves [Text] / S.J. Konturek [et al.] // Physiology and Pharmacology. - 2007. - Vol. 58, №2. - P.361-377.

368. Protein measurement with the folin phenol reagent [Text] / O. Lowry [et al.] // Biol.Chem. - 1951. - Vol. 193. - P.265-270.

369. Protein cross-linkage induced by formaldehyde derived from semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination of methylamine [Text] / D. Gubisne-Haberle [et al.] // Pharmacol. Exp. Ther. - 2004. - Vol. 310. - P. 1125-1132.

370. Proteomic analysis of human tooth pulp: proteomics of human tooth [Text] / A. Eckhardt [et al.] // Endod. - 2014. - Vol. 40, №12. - P.1961-1966.

371. Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells [Text] / C. Morszeck [et al.] // Electrophoresis. - 2009. - Vol. 30. - P.1175-1184.

372. Proteomic characterization of mesenchymal stem cell-like populations derived from ovine periodontal ligament, dental pulp, and bone marrow: analysis of differentially expressed proteins [Text] / K.M. Mrozik [et al.] // Stem. Cells Dev. - 2010. - Vol. 19. - P.1485-1499.

373. Pulp calcifications in traumatized primary incisors - a morphological and inductive analysis study [Text] / A. Robertson [et al.] // *Eur. J. Oral Sci.* - 1997. - Vol. 105. - P.196-206.

374. Pulpal status of human primary teeth with physiological root resorption [Text] / J. Monteiro [et al.] // *Int. J. Paediatr. Dent.* - 2009. - Vol. 19. - P.16-25.

375. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, upregulating osteopontin and inhibiting alkaline phosphatase activity [Text] / W.N. Addison [et al.] // *Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282. - P.15872-15883.

376. Quantification of Lactate-Dehydrogenase and Cell Viability in Postmortem Human Dental Pulp [Text] / J. Caviedes-Bucheli [et al.] // *JOE.* - 2006. - Vol. 32, Iss. 3. - P. 183-185.

377. Radioprotective Effect of Sodium Selenite on Developing Teeth [Text] / E.G. Neves [et al.] // *Braz. Dent.* - 2013. - Vol. 24. - №. 4. - P. 123-129.

378. Raslan, N. Exposed human pulp caused by trauma and/or caries in primary dentition: a histological evaluation [Text] / N. Raslan, W.-E. Wetzel // *Dent. Traumatol.* - 2006. - Vol.22, №3. - P.145-153.

379. Reducing oxidative/nitrosative stress newly discovered gene for melatonin [Text] / R.J. Reiter [et al.] // *Critical Rev. in Biochem and Mol. Biol.* - 2009. - Vol. 44, №4. - P.175-200.

380. Refsum, H. Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism [Text] / H. Refsum, P.M. Ueland // *TIPS.* - 1990. - Vol. 1, №1. - P.411-416.

381. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth [Text] / K. Iohara [et al.] // *Regen Med.* - 2009. - Vol. 4. - P.377-385.

382. Regenerative capability of dental pulp cells after crown fracture [Text] / H. Shima [et al.] // *Dent Traumatol.* - 2013. - Vol. 29. - P.29-33.

383. Reiter, R.J. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias [Text] / R.J. Reiter, D.X. Tan, M.A. Pappolla // *Annals of the New York Academy of Sciences.* - 2004. - Vol. 1035. - P.179-196.

384. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease [Text] / A. Cutando [et al.] // *Periodontology*. - 2006. - Vol. 77, №9. - P.1533-1538.
385. Resolution of inflammation in obesity-induced liver disease [Text] / B. Rius [et al.] // *Front. Immunol.* - 2012. - Vol. 3. - P. 257.
386. Rohaya, M.A.W. The Activity of Aspartate Aminotransferase During Canine Retraction (Bodily Tooth Movement) in Orthodontic Treatment [Text] / M.A.W. Rohaya, Z.A. Shahrul Hisham, K. Khazlina // *Med. Sci. (Faisalabad)*. - 2008. - Vol. 8, №6. - P.553-558.
387. Role of ALK5/Smad2/3 and MEK1/ERK Signaling in Transforming Growth Factor Beta 1–modulated Growth, Collagen Turnover, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla of Human Tooth [Text] / H.-H. Chang [et al.] // *Journal of Endodontics*. - 2015. - Vol. 41, Iss. 8. - P. 1272-1280.
388. Role of toll-like receptor 4 in melatonin-induced cardioprotection [Text] / F. Nduhirabandi [et al.] // *Pineal Res.* - 2016. - Vol. 60, №1. - P. 39-47.
389. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts [Text] / K. Hirao [et al.] // *Dent. Res.* - 2009. - Vol. 88. - P. 762-767.
390. Rowe, A.H. The assessment of pulpal vitality [Text] / A. H. Rowe, T. R. Pitt Ford // *Int. Endod. J.* - 1990. - Vol. 23, № 2. - P. 77–83.
391. S100 and cytokine expression in caries [Text] / J.L. Mclachlan [et al.] // *Infect Immun.* - 2004. - Vol. 72. - P. 4102-4108.
392. Sahoo, M. Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections [Text] / M. Sahoo, I. Ceballos-Olvera, L. del Barrio // *Scientific World*. - 2011. - Vol. 11. - P. 2037–2050.
393. Sakurai, K. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study [Text] / K. Sakurai, T. Okiji, H. Suda // *Dent Res.* - Vol. 78. - P.1596-1608.

394. Sari, S. The effect of physiological root resorption on the histological structure of primary tooth pulp [Text] / S. Sari, S. Aras, O. Gunhan // *Ped Dent.* - 1999. - Vol. 23 - P. 221-225.
395. Sasaki, T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption [Text] / T. Sasaki // *Mic Res Tech.* - 2003. - Vol. 61. - P.483-495.
396. Sasaki, T. Immunocytochemical localization of cathepsins B and G in odontoclasts of human deciduous teeth [Text] / T. Sasaki, E. Ueno-Matsuda // *Dent Res.* - 1992. - Vol. 71, №12. - P.1881-1884.
397. Sasaki, T. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid [Text] / T. Sasaki, H. Kawamata-Kido // *Arch. Oral Bio.* - 1995. - Vol. 140. - P.209-219.
398. Schumann, G. Vorläufige Referenzbereiche für 14 Proteine im Serum (für Erwachsene) nach Standardisierung immunochemischer Methoden unter Bezug auf das international Referenzmaterial CRM 470 [Text] / G. Schumann, F. Dati // *Laboratoriumsmedizin.* - 1995. - Bd. 19. - S.401-403.
399. Schumann, R.R. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule [Text] / R.R. Schumann // *Biochem. Soc. Trans.* - 2011. - Vol. 39. - P. 989-993.
400. Scutellarin attenuates hypertension-induced expression of brain Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B [Text] / X. Chen [et al.] // *Mediators Inflamm.* - 2013. - P. 432623-432623.
401. Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation [Text] / T. Gaur [et al.] // *Cell Physiol.* - 2006. - Vol. 208. - P.87-96.
402. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase [Text] / J.T. Rotruck [et al.] // *Scienc.* - 1973. - Vol. 179. - P.588-590.
403. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): from cell to circulation [Text] / F. Boomsma [et al.] // *Med. Sci. Monit.* - 2005. - Vol.11, №4. - P.122-126.

404. Semicarbazide-sensitive amine oxidases in pig dental pulp [Text] / M. O'Sullivan [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2003. - Vol. 1647. - P. 333-336.
405. Sengupta, P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions [Text] / P. Sengupta // *Drug Chem Toxicol.* - 2012. - Vol. 36. - P.353-368.
406. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's [Text] / P. Sengupta // *Int. J. Prev. Med.* - 2013 - Vol. 4, №6. - P.624-630.
407. Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars [Text] / Y.F. Mei [et al.] // *Cell Tissue Res.* - 2007. - Vol. 328. - P.117-127.
408. Serhan, C.N. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators [Text] / C.N. Serhan, N. Chiang, T.E. Van Dyke // *Nat. Rev. Immunol.* - 2008. - Vol. 8. - P.349-361.
409. Serhan, C.N. Resolvins and protectins in inflammation resolution [Text] / C.N. Serhan, N.A. Petasis // *Chem. Rev.* - 2011. - Vol. 111. - P. 5922-5943.
410. Serum insulin-like growth factors I and II concentrations and growth hormone and insulin responses to arginine infusion in children with protein-energy malnutrition before and after nutritional rehabilitation [Text] / A.T. Soliman [et al.] // *Paediatr. Res.* - 1986. - Vol. 20, №11. - P.1122-1130.
411. Shearer, T.R. Developmental and postdevelopmental uptake of dietary organic and inorganic selenium into the molar teeth of rats [Text] / T.R. Shearer // *Nutrition.* - 1975. - Vol. 105, №3. - P. 338-347.
412. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis [Text] / K. Iohara [et al.] // *Stem. Cells.* - 2006. - Vol. 24. - P. 2493-2503.

413. Simon, P.A. Bio mimetic dental implants - new ways to enhance osteointegration [Text] / P.A. Simon, Z. Watson // Canadian Dent. Association. - 2002. - Vol. 68, №5. - P.286-288.
414. Simsek, S. A flow cytometric analysis of the biodefensive response of deciduous tooth pulp to carious stimuli during physiological root resorption [Text] / S. Simsek, L. Duruturk // Arc. Oral Biol. - 2005. - Vol. 50. - P.461-468.
415. Siquara-da-Rocha, M.C.B. Metabolic activity of deciduous porcine dental pulp in different phases of root development [Text] / M.C.B. Siquara-da-Rocha, J. Nicolau // Dent. Res. - 1980. - Vol. 59. - P.762-765.
416. Sloan, A.J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair [Text] / A.J. Sloan, A.J. Smith // Oral Dis. - 2007. - Vol. 13. - P. 151-157.
417. Smith, A.J. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? [Text] / A.J. Smith, H. Lesot // Crit. Rev. Oral Biol. Med. - 2001. - Vol. 12. - P.425-437.
418. Smith, T.M. Experimental determination of the periodicity of incremental features in enamel [Text] / T.M. Smith //Anatomy. - 2006. - Vol. 208. - P. 99-113.
419. Smulson, M.H. Histopathology and diseases of the dental pulp. In: Weine FS, editor. Endodontic therapy [Text] / M.H. Smulson, S.M. Sieraski. - 5th ed. - St. Louis, Missouri: Mosby, 1996. - P. 84-165.
420. Soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index [Text] / E. Terpos [et al.] // Blood. - 2003. - Vol. 102. - P.1064-1069.
421. Southam, J.C. Neurohistology of Human Dental Pulp Polyps [Text] / J.C. Southam, J.J. Hodson // Arch. Oral Biol. - 1973. - Vol.18, №10. - P. 1255-1260.
422. Stem cell-based dental tissue engineering [Text] / P. Zivkovic [et al.] // Scientific World Journal. - 2010. - Vol. 10. – P.901-916.

423. Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide [Text] / D.S. Chapple [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2004. - Vol. 48. - P. 2190-2198.

424. Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children [Text] / O. Tulunoglu, A. Alacam, M. Bastug [et al.] // *Clin. Pediatr. Dent.* - 1998. - Vol. 22. - P. 341-349.

425. TAILS N-terminomic and proteomic datasets of healthy human dental pulp [Text] / U. Eckhard [et al.] // *Data Brief.* - 2015. - Vol. 5. - P.542-548.

426. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules [Text] / N. Matsunaga [et al.] // *Mol Pharmacol.* - 2011. - Vol. 79, №1. - P.34-41.

427. Takahashi, K. Pulpal vascular changes in inflammation [Text] / K. Takahashi // *Proc. Finn Dent. Soc.* - 1992. - Vol. 88 (Suppl.1). - P. 381-385.

428. Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation [Text] / O. Takeuchi, S. Akira // *Cell.* - 2010. - Vol. 140, № 6. - P. 805-820.

429. Thambyrajah, J. Homocysteine and atherosclerosis-mechanisms for injury [Text] / J. Thambyrajah, J.N. Townsend // *Eur. Heart. J.* - 2000. - Vol. 21. - P.967-974.

430. The annexin A5-mediated pathogenic mechanism in the antiphospholipid syndrome: role in pregnancy losses and thrombosis [Text] / J.H. Rand [et al.] // *Lupus.* - 2010. - Vol.19, №4. - P.460-469.

431. The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity [Text] / R. Nowak [et al.] // *Clin. Endocrinology.* - 1987. - Vol. 27, №4. - P.445-452.

432. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells [Text] / J. Wang [et al.] // *Biomaterials.* - 2011. - Vol. 32. - P. 7822-7830.

433. The Effects of High Levels of Glucose and Insulin on Type I Collagen Synthesis in Mature Human Odontoblasts and Pulp Tissue in Vitro [Text] / L. Välikangas [et al.] // *Adv Dent Res.* - 2001. - Vol. 15. - P.72-75.

434. The grown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption [Text] / P. Romagnoli [et al.] // *Dent Res.* - 1990. - Vol. 69. – P. 1857-1862.

435. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry [Text] / M. Goldberg [et al.] // *Dent. Clin. North Am.* - 2006. - Vol. 50. - P. 277-298.

436. The influence of antidepressant pirlindole and its dehydro-derivative on the activity of monoamine oxidase A and GABAA receptor binding [Text] / A.E. Medvedev [et al.] // *Neural Transm. Suppl.* - 1998. - Vol. 52. - P.337-342.

437. The human dental pulp proteome and N-terminome: Levering the unexplored potential of semitryptic peptides enriched by TAILS to identify missing proteins in the human proteome project in underexplored tissues [Text]/ U. Eckhard [et al.]// *Proteome Res.* - 2015. - Vol. 14. - P. 3568–3582.

438. The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat [Text] / B.J. Oldfield [et al.] // *Neuroscience.* - 2002. - Vol. 110. - P.515-526.

439. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation [Text] / J. Fang, T. Seki, H. Maeda // *Adv. Drug Delivery Rev.* - 2009. - Vol. 61. - P. 290-302.

440. The resolution of inflammation [Text] / C.D. Buckley [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* - 2013. - Vol. 13. - P.59-66.

441. The role of asporin in mineralization of human dental pulp stem cells [Text] / Eh. Lee [et al.] // *Cell Physiol.* - 2011. - Vol. 226. - P.1676-1682.

442. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth [Text] / S. Yildirim [et al.] // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* - 2008. - Vol. 105, №1. -. P. 113-120.

443. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer [Text] / S.C. Miller [et al.] // *Int. J. Experimental Pathol.* - 2006. - Vol. 87, №2. - P.81-87.

444. The role of selenium in Keshan disease [Text] / G. Yang [et al.] // *Adv. Nutr. Res.* - 1984. - Vol. 6. - P.203-231.

445. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process [Text] / M. Balcerzak [et al.] // *Acta Biochimica Polonica.* - 2003. - Vol. 50, №4. - P.1019-1038.

446. The stargazin-related protein gamma 7 interacts with the mRNA-binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 and regulates the stability of specific mRNAs, including CaV2.2 [Text] / L. Ferron [et al.] // *Neurosci.* - 2008. - Vol. 28. - P.10604-10617.

447. Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model [Text] / T. Sha [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* - 2007. - Vol. 571, №2-3. - P.231-239.

448. Thesleff, I. The role of growth factors in tooth development [Text] / I. Thesleff, M. Mikkola // *Int. Rev. Cytol.* - 2002. - Vol. 217. - P. 93-135.

449. Thomassen, P.R. Uptake of Radioactive Beryllium, Vanadium, Selenium, Cerium, and Yttrium in the Tissues and Teeth of Rats [Text] / P.R. Thomassen, H.M. Leicester // *Dent. Res.* - 1964. - Vol. 43. - P. 346-346.

450. Thornalley, P.J. Clinical significance of glycation [Text] / P.J. Thornalley // *Clin. Lab.* - 1999. - Vol. 45. - P.263-273.

451. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions [Text] / S.J. Shin [et al.] // *Endod.* - 2002. - Vol. 28. - P.313-315.

452. Tjaderhane, L. Effects of sucrose and xylitol on dentin formation and caries in rat molars [Text] / L. Tjaderhane, T. Backman, M. Larmas // *Eur. J. Oral Sci.* - 1995. - Vol. 103. - P. 166-171.

453. Tjäderhane, L. Reduction in dentine apposition in rat molars by a high-sucrose diet [Text] / L. Tjäderhane, E.-L. Hietala, M. Larmas // *Archs. Oral Biol.* - 1994. - Vol. 39. - P.491-495.

454. Tjaderhane, L. The effects of high sucrose diet on dentin minerals measured by electron probe microanalyzer (EPMA) in growing rat molars [Text] / L. Tjaderhane // Quintessence Publishing Tokyo. - 1996. - P. 293-297.
455. TNF-alpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions [Text] / M. Wong [et al.] // Clin. Immunol. - 2008. -Vol. 126. - P. 121-136.
456. Toen, T. Purification of Alkaline Phosphatase from Rat Dental Pulp [Text] / T. Toen, S. Hashimoto // Japan. J. of Oral Biology. - 1999. - Vol. 41, № 3. - P. 219-234.
457. Toll-Like Receptor 4 Regulates Chronic Stress-Induced Visceral Pain in Mice [Text] / M. Tramullas [et al.] // Biol. Psychiatry. - 2014. - Vol. 76, №4. - P.340-348.
458. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering [Text] / Vt. Sakai [et al.] //Adv. Dent. Res. - 2011. - Vol. 23. - P.325-332.
459. Topçu, K. Catalase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in young people [Text] / K. Topçu, D. Kırıcı, M.S. Evcil // Niger J Clin Pract. - 2016. - Vol. 19. - P.600-602.
460. Tziafas, D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair [Text] / D. Tziafas // Int. J. Dev. Biol. - 1995. - Vol. 39. - P.281-290.
461. Uddin, M. Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation [Text] / M. Uddin, B.D. Levy // Prog. Lipid Res. - 2011. - Vol. 50. - P.75-88.
462. Ueland, P.M. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status [Text] / P.M. Ueland // Clin.Chem. - 1995. - Vol. 41. - P.340-342.
463. Underwood, E.J. Trace elements in human and animal nutrition [Text] / E.J. Underwood. - NY.: Academic Press, 1977. - P.302-340.
464. Use of selenium concentration in whole blood, serum, toenails or urine as a surrogate measure of selenium intake [Text] / M.P. Lonnecker [et al.] // Epidemiology. - 1996. - Vol. 7. - P. 384-390.

465. Vakkuri, O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva [Text] / O. Vakkuri // *Acta Physiologica Scandinavica*. - 1985. - Vol. 124, №3. - P.409-412.

466. Vakkuri, O. Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine [Text] / O. Vakkuri, J. Leppaluoto, A. Kauppila // *Life Sciences*. - 1985. - Vol. 37, №5. - P.489-495.

467. Van Amerongen, J.P. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp [Text] / J.P. Van Amerongen, I.G. Lemmens, G.J.M. Tomino // *Arch Oral Biol*. - 1983. - Vol. 28. - P.339-345.

468. Velliyagounder, K. Role of Human Lactoferrin in Oral Diseases [Text] / K. Velliyagounder // *J. Oral Hyg. Health*. - 2014. - Vol. 2. - P. 108.

469. Whitaker, S.B. Identification and semi-quantification of estrogen and progesterone receptors in peripheral giant cell lesions of the jaws [Text] / S.B. Whitaker, J.E. Bouquot // *J Periodontol*. - 1994. - Vol. 65. - P. 280-283.

470. Whyte, M.P. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia/ M.P. Whyte // *Ann. of the NY Acad. of Sci*. - 2010. - Vol. 1192. - P.190-200.

471. Wroblewski, F. Lactic dehydrogenase activity in blood [Text] / F. Wroblewski, J.S. La Due // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. - 1955. - Vol. 90. - P.210-213.

472. Wroblewski, F. Serum glutamic oxalacetic transaminase in cardiac and hepatic disease [Text] / F. Wroblewski, J.S. La Due // *Proc. Soc. Exp. Biol*. - 1956. - Vol. 91. - P. 569-569.

473. Wurfel, M.M. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein [Text] / M.M. Wurfel, E. Hailman, S.D. Wright // *Exp. Med*. - 1995. - Vol. 181. - P.1743-1754.

474. WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) negatively regulates TLR4-mediated TNF- α and IL-6 production by proteasomal degradation of TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) [Text] / X.W. Lin [et al.] // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8. - P. 67633.

475. Young, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests [Text] / D.S. Young. – 3rd ed. - NY.: AACC Press, 1997. - P.123-123.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Табличный материал

№ таблицы	Название	№ стр
1	Дизайн I серии эксперимента	47
2	Дизайн II серии эксперимента	48
3	Дизайн III серии эксперимента	48
4	Дизайн IV серии эксперимента	49
5	Дизайн V серии эксперимента	50
6	Дизайн VI серии эксперимента	51
7	Дизайн VII серии эксперимента	52
8	Дизайн VIII серии эксперимента	53
9	Количество образцов пульпы постоянных зубов, полученных для исследования	54
10	Количество образцов пульпы временных зубов, полученных для исследования	55
11	Компоненты лечебных паст	56
12	Биохимические показатели, определяемые в образцах	60-62
13	Содержание белка (усл. ед.) в белковых фракциях экстракта пульпы временных и постоянных зубов (интенсивность поглощения)	65
14	Активность ферментов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека	66
15	Содержание растворимых белков и пептидов в интактной пульпе временных и постоянных зубов человека	67
16	Активность ряда ферментов в пульпе постоянных зубов человека при воспалении	70
17	Активность ряда ферментов в пульпе временных зубов при хроническом пульпите	71
18	Содержание иммуноглобулинов в пульпе постоянных зубов при воспалении	75
19	Содержание иммуноглобулинов в пульпе временных зубов при хроническом пульпите	76
20	Активность ряда ферментов в пульпе временных зубов при хроническом пульпите в стадии резорбции корня зуба	91
21	Содержание ряда белков и пептидов в воспалённой пульпе временных зубов при хроническом пульпите в стадии резорбции корня зуба	92
22	Показатели десневой жидкости и ЭОД в пульпе временных зубов в норме и при воспалении	95

23	Активность ферментов в интактной пульпе зубов человека и крысы	101
24	Содержание белков и пептидов в интактной пульпе зубов крыс и человека	103
25	Активность щелочной фосфатазы (ммоль/мин·г ткани) в пульпе резцов крыс после повреждения слизистой оболочки щеки в динамике заживления дефекта	105
26	Активность щелочной фосфатазы (ммоль/мин·г ткани) в пульпе резцов крыс после удаления моляров	107
27	Содержание белков и пептидов, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене, в пульпе резцов крыс после воздействия силового модуля	111
28	Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после однократной иммобилизации	112
29	Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после многократной иммобилизации	112
30	Активность ферментов и содержание ТБК-АП в пульпе резцов крыс при введении ингибитора синтеза карнитина	115
31	Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после длительного введения экзогенного мелатонина	116
32	Активность ферментов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после однократного введения ингибитора TLR4	117
33	Содержание цитокинов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после длительного введения экзогенного мелатонина	119
34	Содержание цитокинов в пульпе верхних и нижних резцов крыс после однократного введения ингибитора TLR4	119
35	Активность ферментов и содержание белка в пульпе резцов крыс, получающих различные диеты в течение 30 дней	121
36	Активность ферментов и содержание белка в пульпе резцов крыс, получающих различные диеты в течение 60 дней	122

Иллюстративный материал

№ рисунка	Название	№ стр
1	Строение зуба	16
2	Распределение изоферментов ЛДГ в пульпе зубов человека (стрелкой показано направление к аноду); А) Пульпа постоянных зубов; Б) Пульпа временных зубов	27
3	Структурная формула ингибитора TLR-4	45
4	Экспериментальная модель: фиксация пружины у опытных животных	53
5	Содержание гомоцистеина (мкмоль/г ткани) в интактной пульпе временных (ВЗ) и постоянных зубов (ПЗ) человека	68
6	Проявление эффектов ингибиторов 1 mM хлоргилина (1–4) и 10 mM семикарбазида (3) на дезаминирование 5-гидрокситриптамина (4), а также низкой (10 μ M; 1) и высокой (50 μ M; 2, 3) концентрации фенилэтиламина гидрохлорида в гомогенатах пульпы (1–3, 4).	72
7	Активность моноаминоксидаз (нмоль/мин·мг ткани) в интактной пульпе постоянных зубов человека	73
8	Активность моноаминоксидаз (нмоль/мин·мг ткани) в пульпе постоянных зубов человека в норме (N) и при остром воспалении (P). За 100% принимали активность MAO A, MAO B и SSAO в интактной пульпе.	74
9	Количество интерлейкина-1 β (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении. Примечание: НП и НВ - интактная пульпа постоянных и временных зубов; ХП и ХВ –хронический пульпит постоянных и временных зубов	77
10	Количество интерлейкина-4 (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	77
11	Количество лактоферрина (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	78
12	Количество каспазы-9 (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	79
13	Распределение наблюдаемых данных ЭОД с	80

	количеством каспазы-9 в пульпе постоянных и временных зубов человека	
14	Количество аннексина V (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	81
15	Распределение наблюдаемых данных ЭОД с количеством аннексина V в пульпе постоянных и временных зубов человека	81
16	Количество ФНО- α (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	82
17	Распределение наблюдаемых данных ЭОД пульпы зуба с количеством ФНО- α в пульпе постоянных и временных зубов человека	83
18	Количество остеокальцина (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	84
19	Количество костного изофермента щелочной фосфатазы (нг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	84
20	Количество sRANKL (пмоль/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	85
21	Количество остеопротегерина (OPG) (пмоль/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	86
22	Соотношение sRANKL/OPG в пульпе временных и постоянных зубов человека в норме и при хроническом воспалении	86
23	Количество основного фактора роста фибробластов- β (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	88
24	Количество трансформирующего фактора роста-1 β (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	88
25	Количество инсулиноподобного фактора роста-1 (пг/мг ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	89
26	Количество гомоцистеина (мкмоль/г ткани) в пульпе временных и постоянных зубов человека при хроническом воспалении	90
27	Количество гомоцистеина (мкмоль/мг ткани) в пульпе временных зубов при хроническом воспалении в	93

	стадии резорбции корня	
28	График линейной зависимости активности АСТ и АЛТ в элюатах ДЖ пациентов с пульпитом от значений АСТ/АЛТ	96
29	Химическая структура борнеола и камфоры	97
30	Содержание ИЛ-1 β и лактоферрина (ЛФ) в элюатах десневой жидкости до и после лечения пульпита оксидом кальция	98
31	Содержание ИЛ-1 β и лактоферрина (ЛФ) в элюатах десневой жидкости до и после лечения пульпита оксидом кальция и эвгенолом	99
32	Содержание ИЛ-1 β и лактоферрина (ЛФ) в элюатах десневой жидкости до и после лечения пульпита оксидом кальция и борнеолом	99
33	Пульпа резцов опытных крыс, после воздействия ортодонтического силового модуля. Микрофотография. Окр.: гематоксилином и эозином; ув.: х600.	109
34	Пульпа интактных резцов крыс. Микрофотография. Окр.: гематоксилином и эозином; ув.: х600.	109

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2558985

СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ВОСПАЛЕНИЯ ПУЛЬПЫ
ВРЕМЕННОГО ЗУБА

Патентообладатель(ли): *государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014126448

Приоритет изобретения 30 июня 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 09 июля 2015 г.

Срок действия патента истекает 30 июня 2034 г.

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2554809

СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛЕНИЯ ПУЛЬПЫ
ЗУБА

Патентообладатель(ли): *государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014126447

Приоритет изобретения **30 июня 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **01 июня 2015 г.**

Срок действия патента истекает **30 июня 2034 г.**

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



Методики проводимых биохимических исследований

1. Количественное определение общего белка

Предлагаемый метод основан на колориметрическом определении окрашенных продуктов реакции, образующихся при взаимодействии медных производных белка и реактивом Фолина.

Методика определения: к 0,1 мл гомогената приливают 0,9 мл дистиллированной воды и 0,2 мл 50% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и добавляют 2 мл рабочего реактива, приготовленного в день определения из 50 частей 2% раствора углекислого натрия в 0,1М растворе NaOH и 1 части 0,5% раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, растворённого в 1% растворе трёхзамещённого лимоннокислого натрия. Содержимое перемешивают, и через 10 минут вносится 0,2 мл реактива Фолина, разведённого в 2 раза. После перемешивания содержимое пробирки оставляют при комнатной температуре на 30 минут для развития окраски. Затем измеряется оптическая плотность на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине волны 750 нм против контрольной пробы, содержащей все вышеперечисленные компоненты. Расчёт количества белка проводится по калибровочной кривой, построенной с использованием лиофилизированного сывороточного альбумина в 0,9% растворе NaCl. Содержание белка в пробе для построения калибровочной кривой 25, 50, 75 мкг/г ткани.

2. Методика определения кислых протеиназ

В гомогенатах пульпы зубов крыс определялась активность кислых протеиназ по гидролизу 2% денатурированного гемоглобина по методу Ансон (1938) в модификации Т.П. Вавиловой (1991).

В опытные и контрольные пробы наливали по 0,5 мл 2% раствора денатурированного гемоглобина pH 3,8. В опытную пробу добавляли 0,25 мл 1:50 гомогената и инкубировали в водяной бане при температуре 37° в течение 1 часа. По окончании инкубации в опытные и контрольные пробы

приливали по 1,25 мл 5% раствора ТХУ, а в контроль еще и 0,25 мл гомогената. Пробы тщательно перемешивали и оставляли на 20 минут при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 8000 об/15 минут. Супернатант из опытных и контрольных проб сливали и добавляли к нему в каждую пробу по 2 мл 0,5 н.раствора NaOH и 1,0 мл разведенного вдвое реактива Фолина. Пробы тщательно перемешивали и через 30 минут измеряли интенсивность окрашивания опытных проб против контрольных на спектрофотометре при длине волны 550 нм. Расчет активности производили по формуле:

$$A = \frac{E_0 \times 0,16 \times V}{E_{ст} \times t \times a \times p} = \text{мкмоль/мин} \cdot \text{г}$$

где E_0 – экстинция опыта; 0,16 - мкмоль тирозина в стандартной пробе; $E_{ст}$ – экстинция стандартной пробы; t – время инкубации; a - объем гомогената, добавленного в пробу; p – навеска ткани (г) взятая для исследования; V – конечный объем всего экстракта ткани (мл).

3. Определение активности слабощелочных трипсиноподобных протеиназ

Активность слабощелочных протеиназ определяли по гидролизу этилового эфира-N₂-бензоил-L-аргинина солянокислого (БАЭЭ-HCl) (Вавилова Т.П. и др., 1988).

БАЭЭ-эстеразную активность определяли при температуре 25°C, добавляя 0,1-0,2 мл супернатанта образца к смеси, состоящей из 1,9 мл 1/15 М фосфатного буфера рН 8,0 содержащего 2×10^{-3} М ЭДТА, 0,1 мл супернатанта образца и 1 мл $1,5 \times 10^{-3}$ раствора БАЭЭ · HCl на фосфатном буфере. Измерение оптической плотности регистрировали на спектрофотометре «Вектан» - 35 против контрольной пробы, содержащей 2 мл буфера и 1 мл БАЭЭ при длине волны 253 нм. БАЭЭ –эстеразную активность вычисляли по формуле:

$$A = \frac{\Delta E_{253} \times 2,73}{0,1} = \text{мкмоль/мин} \cdot \Gamma$$

где E_{253} – прирост оптической плотности за 1 минуту при 253 нм; 2,73 – перерасчетный коэффициент для вычисления количества БАЭЭ, гидролизованного в пробе при данных условиях (в мкмоль); а – объем гомогената, добавленного в пробу.

4. Определение активности общей супероксиддисмутазы

Инкубационная смесь состояла из 850 мкл 50 мМ карбонатно-фосфатного буфера (рН= 10,2), содержащего 80 Е/мл ЭДТА, 0,05 ммоль/л ксантина, 0,025 ммоль/л НСТ, и 25 мкл разведенного образца. Реакцию начинали добавлением 125 мкл раствора ксантиноксидазы (80 Е/л) при температуре 37°C в термостатируемой кювете фотометра LabSystems. Изменение оптической плотности регистрировали против воздуха при 505 нм через 30 секунд (A_1), затем через 3 минуты (A_2). Для определения активности СОД строили калибровочную кривую. Для этого стандартный раствор СОД разбавляли дистиллированной водой в соответствии со таблицей

Таблица

	Кол-во исходного раствора	Кол-во воды	Активность СОД, Е/мл
S6	неразбавленный стандарт	0	4
S5	5 мл S6	5 мл	2
S4	5 мл S5	5 мл	1
S3	5 мл S4	5 мл	0,5
S2	3 мл S3	6 мл	0,167
S1	0	5 мл	0

В кюветы вносили 850 мкл смешанного субстрата, добавляли по 25 мкл растворов стандартов и образцов, и тщательно перемешивали. Затем в каждую кювету приливали по 125 мкл раствора ксантиноксидазы. Через 30 секунд измеряли начальное поглощение пробы при 505 нм, а еще через

3 минуты – окончательное. Для расчета использовали изменение поглощения пробы за 1 минуту: $\Delta A = (A_2 - A_1) : 3$, где A_1 – начальное поглощение, A_2 – поглощение, измеренное через 3 минуты. Затем для стандартов и образца рассчитывали процент ингибирования ($\%_{\text{инг}}$):

$$\%_{\text{инг}} = \frac{\Delta A_{\text{пробы}}}{\Delta A_{S1}} \cdot 100\%$$

По результатам расчетов строили калибровочную кривую, откладывая на оси абсцисс процент ингибирования, на оси ординат – десятичного логарифма активности СОД в стандартах. По калибровочной кривой определяли активность СОД в образце.

Процент ингибирования образцом реакции окисления НСТ должен был составлять 30 - 60% (линейность метода). Для получения окончательного результата активность СОД в пробе умножали на коэффициент разведения. Активность СОД рассчитывали в единицах на 1 г ткани (мкмоль/мин·г ткани).

5. Определение активности глутатионпероксидазы

Для определения активности глутатионпероксидазы (ГПО) использовались стандартные наборы реактивов RANSEL фирмы “Randox” (Великобритания). Активность этого фермента в супернатанте пульпы зуба определяли по методу Paglia, Valentine (1983). В основе этого метода лежит регистрация окисления НАДФН в реакции, катализируемой глутатионредуктазой. При участии ГПО происходит окисление глутатиона перекисью кумина. Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой в присутствии восстановленного НАДФ. Фотометрически регистрируемое уменьшение оптической плотности при 340 нм, обусловленное окислением НАДФН, прямо пропорционально активности ГПО.

Реакцию проводили в термостатируемых кюветах фотометра при температуре 37°C. В реакционную смесь, состоящую из 1000 мкл 50 мМ фосфатного буфера рН 7,2, содержащего 4,4 ммоль/л ЭДТА, 4 ммоль/л

глутатиона, 0,34 ммоль/л НАДФН, глутатионредуктазы (0,5 Е/л), добавляли по 20 мкл образца. В тщательно перемешанные пробы добавляли по 40 мкл эмульсии пероксида кумина и измеряли поглощение проб при 340 нм ровно через 1 минуту. Затем измерение повторяли еще через 1 и 2 минуты. Самопроизвольное окисление глутатиона учитывали с помощью контрольной пробы, содержащей дистиллированную воду вместо образца. Из поглощения пробы вычитали поглощение контроля, рассчитывали изменение поглощения через 1 и 2 минуты, среднее значение изменения поглощения ($\Delta A_{340}/\text{мин}$) и вычисляли активность ГПО в образце по формуле:

$$\text{ГПО} = 8412 \cdot \Delta A_{340}/\text{мин} = \text{ммоль/мин} \cdot \text{г ткани}$$

6. Определение ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов

В пробирки наливали по 1 мл раствора ортофосфорной кислоты и 0,4 мл реагента. В первую пробирку добавляли 0,1 мл дистиллированной воды (холостая проба), а в остальные – 0,1 мл образцов. Пробирки накрывали колпачками (неплотно) и помещали в водяную баню ($t=100^\circ\text{C}$) на 45 мин. По окончании кипячения пробирки охлаждали в холодной воде до комнатной температуры. К охлажденным пробам добавляли по 1,5 мл бутанола и перемешивали содержимое пробирок, интенсивно встряхивая их до образования однородной суспензии розового оттенка. Затем пробирки центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об./мин. Сразу после центрифугирования отбирали по 1 мл супернатанта в чистые кюветы (пробирки) и измеряли оптическую плотность опытной пробы против холостой при двух длинах волн: 535 нм и 570 нм.

Содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ в супернатанте пульпы рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A_{535} - A_{570}}{0,156} \times 15 = \text{мкмоль/мин} \cdot \text{г ткани},$$

где A_{535} и A_{570} – оптическая плотность пробы при длине волны 535 нм и 570 нм, соответственно; 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса малонового альдегида с тиобарбитуровой кислотой; 15 – коэффициент разведения гомогената. Содержание ТБК-активных продуктов рассчитывали в единицах на 1 г ткани.

7. Определение активности лактатдегидрогеназы

Метод определения активности лактатдегидрогеназы основан на ее способности катализировать восстановление пирувата до лактата с одновременным окислением НАДН до НАД⁺. Уменьшение оптической плотности раствора прямо пропорционально активности ЛДГ в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм. Реакцию проводили в термостатируемых кюветах фотометра при температуре 37°C. В инкубационную смесь, состоящую из 1000 мкл 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,4, содержащего 1,5 ммоль/л пирувата, добавляли по 10 мкл образца. В пробы добавляли по 250 мкл буфера, содержащего 0,8 ммоль/л НАДН, тщательно их перемешивали и измеряли поглощение проб при 340 нм ровно через 1 минуту. Затем повторяли измерения 3 раза с интервалом в 1 минуту. Вычисляли среднее значение изменения оптической плотности за 1 минуту ($\Delta A/\text{мин}$). Активность ЛДГ рассчитывали в единицах на 1 г ткани по формуле:

$$\text{ЛДГ} = 20000 \cdot \Delta A_{340}/\text{мин} = \text{мкмоль/ мин} \cdot \text{г ткани}$$

8. Определение активности малатдегидрогеназы

Активность МДГ определяли спектрофотометрически по изменению поглощения при 340 нм при образовании НАДН. Реакцию проводили в термостатируемых кюветах фотометра, начиная ее добавлением раствора НАД⁺ и регистрируя изменение поглощения в течение 3 минут после начала реакции. В контрольную кювету вместо раствора кофермента добавляли равный объем буфера. Реакционная смесь для определения активности МДГ

включала следующие компоненты: 2,7 мл 0,088 М глицинового буфера (рН=10,0), 0,1 мл 0,085 М раствора малата натрия в буфере, 0,1 мл 0,025 М раствора НАД⁺ в буфере и 0,1 мл супернатанта пульпы.

Определение общей активности МДГ производили по формуле:

$$E = \frac{\Delta A_{340} \times V}{t \times 6,22} = \text{ммоль/мин} \cdot \text{г ткани}$$

где ΔA_{340} – изменение поглощения при 340 нм, V – объем кюветы, t – время реакции, 6,22 – коэффициент молярной экстинкции НАД.

За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое катализирует образование 1 ммоль НАДН в 1 мин. Активность МДГ рассчитывали в единицах на 1 г ткани.

9. Определение активности щелочной фосфатазы

Активность ЩФ в исследуемых образцах определяли путем измерения скорости гидролиза *n*-нитрофенилфосфата с освобождением *n*-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Скорость освобождения *n*-нитрофенола прямо пропорциональна активности ЩФ в пробе и измеряется спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Перед проведением анализа реагенты прогревали до температуры измерения (37°C). В пробирку наливали 1 мл рабочего раствора, содержащего буфер и *n*-нитрофенилфосфата, и 25 мкл исследуемого образца. Содержимое пробирки перемешивали и включали секундомер. Измеряли оптическую плотность пробы против дистиллированной воды при длине волны 405 нм ровно через 60 секунд. Измерение повторяли 3 раза с интервалом 1 мин. Изменение оптической плотности рассчитывали за каждую минуту, а затем вычисляли среднее изменение оптической плотности в минуту (Δ о.п./мин). Активность ЩФ в экстрактах пульпы зубов крыс рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{ЩФ}} (\text{МЕ/л}) = \frac{\Delta \text{о.п./мин} \times 1,025 \times 1000}{18,75 \times 0,025 \times 1,0} = \Delta \text{о.п./мин} \times 2187,$$

где $\Delta o.p./\text{мин}$ – среднее изменение опт.плотн. в минуту; 1,025 – общий объем раствора в кювете; 1000 – коэффициент перевода мл в л; 18,75 – коэффициент миллимолярного поглощения *n*-нитрофенола; 0,025 – объем образца в мл; 1,0 – длина оптического пути.

Активность ЩФ рассчитывали в единицах на 1 г ткани (ммоль/ мин·г ткани).

10. Определение активности α -гликозидазы

В качестве субстрата для α -гликозидазы используется мальтотриозид, связанный с хромогеном *o*-хлор-*n*-нитрофенолом (ХНФ). Под действием α -гликозидазы субстрат гидролизуется с выделением окрашенного ХНФ, мальтотриозы и глюкозы. Реакция протекает быстро, и скорость гидролиза субстрата прямо пропорциональна активности α -гликозидазы в пробе. Степень поглощения окрашенного раствора измеряли спектрофотометрически при 405 нм.



В пробирку наливали 1 мл предварительно нагретого до 37°C рабочего реагента, добавляли 25 мкл образца и тщательно перемешивали. Через 1 минуту измеряли оптическую плотность пробы против дистиллированной воды при длине волны 405 нм. Измерение повторяли 3 раза с интервалом в 1 минуту, после чего рассчитывали изменение оптической плотности за каждую минуту и вычисляли среднее значение. Активность α -гликозидазы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta o.p./\text{мин} \times 1,025}{12,9 \times 0,025 \times 1,0} = \Delta o.p./\text{мин} \times 3178,$$

где $\Delta o.p./\text{мин}$ – среднее изменение оптической плотности в минуту; 1,025 – общий объем раствора в кювете; 12,9 – коэффициент миллимолярного поглощения *o*-хлор-*n*-нитрофенола; 0,025 – объем супернатанта в мл; 1,0 –

длина оптического пути. Активность α -гликозидазы рассчитывали в единицах на 1 г ткани (ммоль/мин·г ткани).

11. Определение активности аланинаминотрансферазы

Активность АЛТ определяли по скорости образования пирувата, которую измеряют с помощью сопряженной реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой (ЛДГ). В ходе этой реакции происходит восстановление пировиноградной кислоты до D-лактата с одновременным окислением НАДН, что можно регистрировать спектрофотометрически по уменьшению величины поглощения при 340 нм.

Снижение оптической плотности пробы при длине волны 340 нм, обусловленное окислением НАДН, прямо пропорционально активности АЛТ в ней.

ПФ

L-Аланин + α -кетоглутарат <-----> L-глутамат + Пируват

АЛТ

Пируват + НАДН + H^+ <-----> D-Лактат + НАД⁺

ЛДГ

Реагенты прогревали до температуры измерения (37°C). В пробирку наливали 1 мл рабочего реагента и 100 мкл исследуемого супернатанта. Перемешивали содержимое пробирки и измеряли оптическую плотность пробы против дистиллированной воды при длине волны 340 нм ровно через 60 секунд. Повторяли измерение 3 раза с интервалом 1 мин. Рассчитывали изменение оптической плотности за каждую минуту, а затем вычисляли среднее изменение оптической плотности в минуту ($\Delta E/\text{мин}$). Активность АЛТ рассчитывали по формуле:

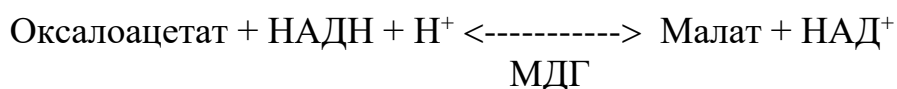
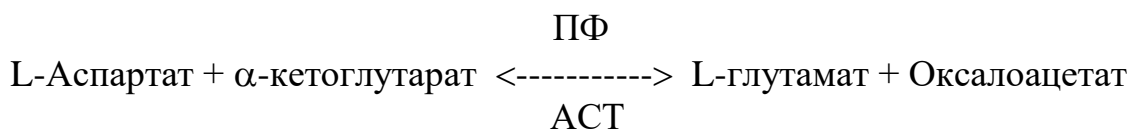
$$A = \frac{\Delta E/\text{мин} \times 1,100}{6,22 \times 0,100 \times 1,0} = \Delta E/\text{мин} \times 1768,$$

где $\Delta E/\text{мин}$ – среднее изменение оптической плотности в минуту; 1,100 – общий объем раствора в кювете в мл; 6,22 – коэффициент миллимолярного поглощения НАДН; 0,100 – объем супернатанта в мл; 1,0 – длина оптического пути. Активность АЛТ рассчитывали в единицах на 1 г ткани (ммоль/ мин·г ткани).

12. Определение активности аспаратаминотрансферазы

Активность АСТ определяли по скорости образования оксалоацетата, которую измеряют с помощью сопряженной реакции, катализируемой малатдегидрогеназой (МДГ). В ходе этой реакции происходит восстановление оксалоацетата до малата с одновременным окислением НАДН, что сопровождается снижением оптической плотности при 340 нм.

Снижение оптической плотности пробы при длине волны 340 нм, обусловленное окислением НАДН, прямо пропорционально активности АСТ в ней.



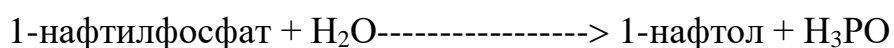
Перед проведением анализа реагенты прогревали до температуры измерения (37°C). В пробирку наливали 1 мл реагента и 100 мкл исследуемого образца. Перемешивали содержимое пробирки и измеряли оптическую плотность против дистиллированной воды при длине волны 340 нм ровно через 1 мин. Повторяли измерение 3 раза с интервалом 1 мин. Рассчитывали изменение оптической плотности за каждую минуту, а затем вычисляли среднее изменение оптической плотности в минуту ($\Delta E/\text{мин}$). Активность АСТ рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta E/\text{мин} \times 1,1}{6,22 \times 0,1 \times 1,0},$$

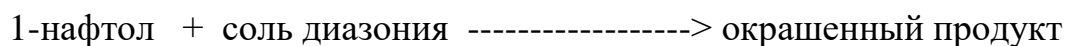
где $\Delta E/\text{мин}$ – среднее изменение оптической плотности в минуту; 1,1 – общий объем раствора в кювете в мл; 6,22 – коэффициент миллимолярного поглощения НАДН; 0,1 – объем супернатанта в мл; 1,0 – длина оптического пути. Активность АСТ рассчитывали в единицах на 1 г ткани (ммоль/ мин·г ткани).

13. Определение активности кислой фосфатазы

Активность КФ в исследуемых образцах определяли по скорости гидролиза 1-нафтилфосфата, с образованием 1-нафтола. В присутствии соли диазония 1-нафтол преобразуется в окрашенный продукт, количество которого измерялось спектрофотометрически при длине волны 405 нм.



кислая фосфатаза



Перед проведением анализа реагенты прогревали до температуры измерения (37°C). Для определения общей активности КФ в пробирку наливали 1 мл реагента А и 25 мкл исследуемого образца. Содержимое пробирки перемешивали, инкубировали в течение 5 мин. Измерение оптической плотности пробы против дистиллированной воды проводили при длине волны 405 нм и включали секундомер. Измерение повторяли ровно через 3 мин. Изменение оптической плотности рассчитывали за минуту ($\Delta \text{о.п./мин}$). Активность КФ в рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{КФ}} (\text{Е/л}) = \Delta \text{о.п./мин} \times 248$$

где $\Delta \text{о.п./мин}$ – среднее изменение оптической плотности в минуту; 248 – коэффициент миллимолярного поглощения окрашенного продукта. Активность КФ рассчитывали в единицах на 1 г ткани (ммоль/ мин·г ткани).

14. Количественное определение интерлейкинов

Принцип метода основан на ферментной визуализации иммунологической реакции антиген-антитело. На поверхности лунок полистирольного микропланшета сорбированы антитела к ИЛ человека и

мышь. В лунку, предназначенную для бланка, добавляли 100 мкл стандартного буфера для разведения (контроль аутоокисления хромогена). В соответствующие лунки вносили по 100 мкл неразбавленных образцов и стандартов, содержащих определенные концентрации рекомбинантного ИЛ человека и мыши. Затем во все ячейки, кроме бланка, добавляли по 50 мкл биотинилированных вторых антител, перемешивали, накрывали стрипы пленкой, препятствующей испарению образцов, и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. После инкубации несвязавшиеся биотинилированные антитела удаляли промывкой. Во все лунки, кроме бланка, добавляли по 100 мкл раствора стрептавидин-пероксидазы и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем промывкой удаляли непрореагировавшую стрептавидин-пероксидазу и во все лунки добавляли по 100 мкл раствора стабилизирующего тетраметилбензидина. Реакцию образования окрашенного продукта, протекающую в течение 30 минут в темноте, останавливали добавлением 100 мкл 1N раствора серной кислоты. Интенсивность окраски образцов измеряли спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Величину оптической плотности бланка вычитали из значений оптической плотности других образцов. Концентрацию ИЛ рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной по результатам измерения оптической плотности растворов, получаемых последовательным разведением стандарта. Чувствительность данного метода составляет < 2,0 пг/мл. Содержание ИЛ выражали в пг/мг ткани.

15. Количественное определение аннексина V

Перед началом определения готовили серию стандартных растворов, содержащих 50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,2; 1,6; 0,8 нг/мл аннексина V, необходимых для построения калибровочной кривой, а образцы предварительно разбавляли стандартным буфером для разбавления в соотношении 1:1. В лунки микропланшета с иммобилизованными на них

моноклональными антителами к аннексину V вносили по 100 мкл образцов и стандартов. В лунку, предназначенную для бланка (холостой пробы), вносили 100 мкл буфера для разбавления. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора биотинилированных моноклональных антител к аннексину V. Микропланшет закрывали пленкой, препятствующей испарению образцов, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании (100 об/мин). По окончании инкубации из лунок удаляли жидкость и четырежды промывали 0,30 мл промывочного буфера для удаления не прореагировавших антител. После удаления остатков жидкости во все лунки одновременно вносили по 200 мкл раствора стрептавидин-пероксидазного конъюгата, микропланшет закрывали пленкой и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании (100 об/мин). По окончании инкубации из лунок удаляли жидкость и снова четырежды промывали 0,30 мл промывочного буфера для удаления не связавшегося конъюгата. Затем во все лунки одновременно вносили по 100 мкл раствора субстратов (тетраметилбензидин и пероксид водорода) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре в темноте до появления голубого окрашивания. Для остановки реакции и окончательного окрашивания во все лунки вносили по 100 мкл стоп-раствора (1М раствор H_3PO_4), тщательно перемешивали на шейкере, после чего измеряли абсорбцию раствора, приобретшего желтый цвет, при длине волны 450 нм.

По результатам измерения оптической плотности в лунках со стандартными растворами аннексина V строили калибровочную кривую зависимости поглощения раствора при 450 нм от содержания аннексина V. Используя полученный график, определяли концентрацию исследуемого белка в образцах в пг/мг ткани.

16. Количественное определение фактора некроза опухоли – α

Перед началом определения готовили серию стандартных растворов, содержащих 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 пг/мл ФНО- α , необходимых для построения калибровочной кривой. В лунки микропланшета с

иммобилизованными на них моноклональными антителами к ФНО- α вносили по 50 мкл инкубационного буфера и по 100 мкл образцов и стандартов. В лунку, предназначенную для бланка (холостой пробы), вносили 100 мкл буфера для разбавления. Микропланшет закрывали пленкой, препятствующей испарению образцов, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. По окончании инкубации из лунок удаляли жидкость, четырежды промывали 0,30 мл промывочного буфера и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора биотинилированных моноклональных антител к ФНО- α . Микропланшет закрывали пленкой, осторожно встряхивали и снова инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем из лунок удаляли жидкость и четырежды промывали 0,30 мл промывочного буфера для удаления не прореагировавших антител. После удаления остатков жидкости во все лунки одновременно вносили по 100 мкл разбавленного раствора стрептавидин-пероксидазного конъюгата, микропланшет закрывали пленкой и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации из лунок снова удаляли жидкость и четырежды промывали 0,30 мл промывочного буфера для удаления не связавшегося конъюгата. Затем во все лунки одновременно вносили по 100 мкл растворов тетраметилбензидина и пероксида водорода, и инкубировали 30 минут при комнатной температуре в темноте до появления голубого окрашивания. Для остановки реакции и окончательного окрашивания во все лунки вносили по 100 мкл стоп-раствора (0,5М раствор H_2SO_4), после чего измеряли поглощение раствора, приобретшего желтый цвет, при длине волны 450 нм.

По результатам измерения оптической плотности в лунках со стандартными растворами ФНО- α строили калибровочную кривую зависимости поглощения раствора при 450 нм от содержания ФНО- α . Используя полученный график, определяли концентрацию исследуемого белка в образцах.

17. Количественное определение остеопротегерина

Перед началом для построения калибровочной кривой определения готовили серию стандартных растворов, содержащих 0, 0.37, 1.1, 3.3, 10, 30 пкмоль/л остеопротегерина. В соответствующие лунки вносили по 100 мкл рабочего буфера и по 50 мкл неразбавленных образцов и стандартов, содержащих определенные концентрации остеопротегерина. Затем во все ячейки, кроме бланка, добавляли по 50 мкл биотинилированных антител, перемешивали, накрывали стрипы пленкой, препятствующей испарению образцов, и инкубировали 24 часа при $t=4^{\circ}\text{C}$. После снятия плёнки полностью удаляли содержимое ячеек и промывали их 5 раз 300 мкл разбавленного промывающего буфера. Остатки буфера промокали фильтровальной бумагой и добавляли по 200 мкл ферментного конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Затем инкубировали содержимое под плёнкой 60 минут при комнатной температуре. Далее полностью удаляли содержимое ячеек и промывали их 5 раз 300 мкл промывающего буфера. После удаления остатков буфера, в ячейки вносили по 200 мкл ферментного субстрата, содержащего тетраметилбензидин. Смесь инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. По окончании инкубации добавляли по 50 мкл стоп-раствора. И немедленно измеряли интенсивность окраски образцов на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Величину оптической плотности бланка вычитали из значений оптической плотности других образцов. Концентрацию остеопротегерина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной по результатам измерения оптической плотности растворов, получаемых последовательным разведением стандарта. Чувствительность данного метода составляет $< 0,14$ пкмоль/л. Содержание остеопротегерина выражали в пмоль/мг ткани.

18. Определение количества растворимого лиганда рецептора активации фактора нуклеации каппа-B (*sRANKL*)

Перед началом для построения калибровочной кривой определения готовили серию стандартных растворов, содержащих 0, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0, 6,0 пкмоль/л *sRANKL*. В соответствующие лунки вносили по 100 мкл неразбавленных образцов и стандартов, содержащих определенные концентрации *sRANKL* и добавляли по 100 мкл детектирующих антител в каждую ячейку, за исключением контроля. Содержимое тщательно перемешивали, накрывали стрипы пленкой, препятствующей испарению образцов, и инкубировали 24 часа при $t=4^{\circ}\text{C}$. После снятия плёнки полностью удаляли содержимое ячеек и промывали их 5 раз 300 мкл разбавленного промывающего буфера. Остатки буфера промокали фильтровальной бумагой и добавляли по 200 мкл ферментного конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Затем инкубировали содержимое под плёнкой 60 минут при комнатной температуре. Далее полностью удаляли содержимое ячеек и промывали их 5 раз 300 мкл промывающего буфера. После удаления остатков буфера, в ячейки вносили по 200 мкл ферментного субстрата, содержащего тетраметилбензидин. Смесь инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. По окончании инкубации добавляли по 50 мкл стоп-раствора. И немедленно измеряли интенсивность окраски образцов на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Величину оптической плотности бланка вычитали из значений оптической плотности других образцов. Концентрацию *sRANKL* рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной по результатам измерения оптической плотности растворов, получаемых последовательным разведением стандарта. Чувствительность данного метода составляет $< 0,08$ пкмоль/л. Содержание *sRANKL* выражали в пмоль/мг ткани.

19. Определение количества иммуноглобулинов

В пробирки наливали буфер в следующих количествах: для определения IgA и IgM по 0,8 мл, IgG – 1,2 мл. Затем добавляли растворы антител к IgA, IgM или IgG: для определения IgA и IgM по 0,2 мл, IgG – 0,3 мл. После этого в первую кювету добавляли 10 мкл стандартного раствора (стандартная проба), во вторую – 10 мкл образца (опытная проба), а третью 10 мкл дистиллированной воды (холостая проба). Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 5 минут. По истечении срока инкубации измеряли оптическую плотность опытной ($A_{оп}$) и калибровочной ($A_{ст}$) проб против холостой пробы при длине волны 340 нм. Содержание иммуноглобулинов рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{A_{оп}}{A_{ст}} \times C_{ст},$$

где C – концентрация иммуноглобулинов в анализируемой пробе; $A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы; $A_{ст}$ – оптическая плотность стандартной пробы; $C_{ст}$ – концентрация иммуноглобулинов в стандартном растворе. Концентрацию иммуноглобулинов выражали в мг/%.

20. Определение активности моноаминоксидаз

Образцы были помещены в 50 mM фосфатного буфера (pH 7.4). Маркировка тираминазы проводилась добавлением [3H] парагилина гидрохлорида (DuPont Nen Research Products, USA), необратимо связывающий ингибитор, по методике Андерсона и Типтона с незначительными модификациями. Эти модификации включали использование 2 μ M [3H] парагилина, ингибитор протеиназ (смесь 0,1мM фенолметилсульфонила (PMSF) и 0,001% бацитрацина), и инкубировали при 37°C в течение 10 ч. Активность аминоксидаз была оценена с использованием 100 μ M [14C] 5-гидрокситриптамина, сульфата креатинина, 10 или 50 μ M [14C] фенилэтиланина гидрохлорида (Amersham,

Великобритания). Во всех случаях накопление продукта реакции было линейно в течение 45 - 120 минут при 37°C. Концентрации белка были определены методом Брэдфорд с человеческим сывороточным альбумином как стандарт. Активность моноаминоксидаз выражали в нмоль/мин·г ткани.

21. Определение количества лактоферрина

Основан на твёрдофазном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител к лактоферрину. В соответствующие лунки вносили по 100 мкл контрольного образца и калибровочных проб и 100 мкл исследуемых образцов в рабочем разведении в дублях. Инкубировали 30 минут при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Промывали лунки рабочим промывочным раствором 300 мкл, 5 раз. В лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Инкубировать 30 мин, 37°C. Промывали лунки рабочим промывочным раствором 300 мкл, 5 раз. Затем вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина. Инкубировали в темноте 15 мин, 18–25°C. Далее вносили в лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхивали планшет на шейкере в течение 10–15 сек; содержимое лунок окрашивалось в желтый цвет. Измеряли оптическую плотность при 450 нм / референсная длина волны 620–650 нм. Чувствительность данного метода не превышала 20 нг/мл и нг/мг ткани.

22. Определение количества каспазы-9

Перед началом определения готовили серию стандартных растворов, содержащих 100; 50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6 нг/мл каспазы-9, необходимых для построения калибровочной кривой. В данном исследовании образцы слюны не разбавляли. В лунки микропланшета с иммобилизованными на них моноклональными антителами к каспазе-9 вносили по 50 мкл образцов и стандартов. В лунку, предназначенную для бланка (холостой пробы), вносили 100 мкл буфера для разбавления. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора биотинилированных моноклональных антител к каспазе-9. Микропланшет закрывали пленкой, препятствующей испарению образцов, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при

встряхивании (100 об/мин). По окончании инкубации из лунок удаляли жидкость и 3 раза промывали 400 мкл промывочного буфера для удаления не прореагировавших антител. Затем во все лунки одновременно вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидина и инкубировали 10 минут при комнатной температуре в темноте до появления тёмно-голубого окрашивания. Для остановки реакции и окончательного окрашивания во все лунки вносили по 100 мкл стоп-раствора (1М раствор H_3PO_4), тщательно перемешивали на шейкере, после чего измеряли абсорбцию раствора, приобретшего желтый цвет. По результатам измерения оптической плотности в лунках со стандартными растворами каспазы-9 строили калибровочную кривую зависимости поглощения раствора при 450 нм от содержания каспазы-9. Используя полученный график, определяли концентрацию исследуемого белка в нг/мг ткани.

23. Определение количества основного фактора роста фибробластов-β

В соответствующие лунки вносили по 50 мкл контрольного образца и калибровочных проб в разведении 500, 250, 125, 62.5, 31.2 и 15.6 пг/мл и 50 мкл исследуемых образцов. Инкубировали 45 минут при температуре 37°C. Промывали лунки рабочим промывочным раствором 400 мкл 4 раза. Вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата стрептавидин-пероксидазы. Инкубировали 30 минут при температуре 37°C. Снова промывали лунки рабочим промывочным раствором 400 мкл 4 раза. Следующим этапом вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина и инкубировали в темноте 30 мин при температуре 18-25°C. Далее вносили в лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхивали планшет на шейкере в течение 10–15 сек, стоп-реакцию выдерживали в течение 2-х часов; при этом содержимое лунок окрашивалось в желтый цвет. Измеряли оптическую плотность при 450 нм и выражали в пг/мг ткани.

24. Определение количества инсулиноподобного фактора роста-1

В соответствующие лунки вносили по 20 мкл контрольного образца и калибровочных проб в разведении 10, 50, 140, 300 и 600 нг/мл и 20 мкл

исследуемых образцов. Инкубировали ячейки на орбитальном шейкере при 500-600 об/мин в течение 2 часов при комн.Т (~25°C). Промывали лунки рабочим промывочным раствором 350 мкл 5 раз. В лунки вносили 100 мкл ферментного конъюгата анти-ИФР-1 антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Инкубировали на орбитальном шейкере при 500-600 об/мин в течение 30 минут при комн.Т (~25°C). Снова промывали лунки рабочим промывочным раствором 350 мкл 5 раз. Следующим этапом вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина и инкубировали в темноте 10 мин при температуре 18-25°C. Далее вносили в лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхивали планшет на шейкере в течение 10–15 сек, стоп-реакцию выдерживали в течение 30 минут. Считали оптическую плотность при длине волны 450 нм и выражали в нг/мг ткани.

25. Определение количества костного изофермента щелочной фосфатазы

В соответствующие лунки вносили по 20 мкл контрольного образца и калибровочных проб в разведении 0, 1, 2, 5, 20, 80 нг/мл и 20 мкл исследуемых образцов. Инкубировали 120 минут при температуре 18-25°C. Промывали лунки рабочим промывочным раствором 300 мкл 4 раза. Вносили в лунки по 100 мкл кроличьих анти-СІСР антител и инкубировали 40-45 минут при температуре 18-25°C. После удаляли жидкость из лунок переворачиванием стрипов. Далее вносили 300 мкл промывочного буфера в каждую лунку и удаляли жидкость из лунок переворачиванием стрипов. Процедуру повторяли ещё два раза и после последнего цикла переворачивали стрипы и постукивали по фильтровальной бумаге до полного высыхания. В лунки вносили 100 мкл ферментного конъюгата. Инкубировали 45 минут при температуре 18-25°C. Снова промывали лунки рабочим промывочным раствором 300 мкл 3 раза. Следующим этапом вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора, содержащего р-нитрофенилфосфат и инкубировали в темноте 30 мин при температуре 18-25°C. Далее вносили в лунки по 50 мкл стоп-реагента и встряхивали планшет на шейкере в течение 10–15 сек, стоп-

реакцию выдерживали в течение 15 минут. Считали оптическую плотность при длине волны 405 нм и выражали в нг/мг ткани.

26. Определение количества трансформирующего фактора роста – 1 β

Добавляли 100 мкл образцов, стандартов и контролей в ячейки планшета, где он связывался с антителами, адсорбированными в ячейках. После инкубации в течение 1 часа, реакцию нейтрализовали добавлением 1N раствора NaOH. После двухразовой промывки ячеек 400 мкл буферного раствора, добавляли 50 мкл ферментного конъюгатата пероксидазы хрена и инкубировали в течение 4-х часов при температуре 18-25° при встряхивании. Далее удаляли содержимое ячеек декантированием и промывали 3 раза 400 мкл буферным раствором с последующей аспирацией планшета на фильтровальной бумаге. В ячейки добавляли 100 мкл раствора тетраметилбензидина и инкубировали 15 минут в темноте при непрерывном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением в ячейки 100 мкл 1M раствора фосфорной кислоты и выдерживали 60 минут. Интенсивность окраски, измеряли по длине волны 450 нм, прямо пропорционально концентрации TGF- β 1, присутствующего в образцах и полученный результат выражали в нг/мг ткани.

27. Определение количества остеокальцина

В соответствующие лунки вносили по 20 мкл стандартов, контролей и образцов в разведении 50, 25, 12,5, 6,3 нг/мл и добавляли 150 мкл раствора антител. Заклеивали стрипы пленкой и инкубировали 120 минут при комнатной температуре (18-22°C) без встряхивания. Промывали лунки рабочим промывочным раствором 400 мкл 5 раз, высушивали, перевернув стрипы на фильтровальную бумагу. Вносили 100 мкл раствора тетраметилбензидина в каждую ячейку и инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре (18-22°C) без встряхивания, заклеив стрипы пленкой. Далее вносили в лунки по 100 мкл стоп-реагента и встряхивали планшет на шейкере в течение 10–15 сек, стоп-реакцию выдерживали в

течение 120 минут. Считали оптическую плотность при длине волны 450 - 650 нм и выражали в нг/мг ткани.

28. Определение количества гомоцистеина

За 1 час до проведения анализа приготавливался раствор (SPS), необходимый для предварительной обработки образцов, для получения которого смешивались следующие реагенты: 4,5 мл фосфатного буфера и 0,09% раствора NaN_3 , 0,25 мл раствора аденозин-дितिотреитола и лимонной кислоты и 0,25 мл раствора телячьей S- аденозил- L гомоцистеин- гидролазы и трис-буфер с глицеролом-метилпарабенном. Далее к 25 мкл калибраторов, образцов и контролей добавляли 500 мкл приготовленного раствора, закрывали плёнкой и инкубировали 30 минут при 37°C. В пробирки добавляли 500 мкл 0,15% раствора мертиолят-фосфатного буфера, встряхивали на шейкере и смесь инкубировали 15 минут при 18-25°C, а затем приливали реагент, состоящего из: раствора аденозиндезаминазы, фосфатного буфера, бычьего сывороточного альбумина (БСА), красителя фенолового красного и 0,09% раствора NaN_3 , встряхивали и инкубировали 15 минут при 18-25°C. В соответствующие лунки, покрытые SAH-антителами, вносили по 25 мкл разведённых калибраторов, контролей и образцов. В каждую лунку добавляли 200 мкл моноклональных мышинных анти-S- аденозил-L-гомоцистеин-антител, БСА, 0,01% раствора мертиолята, закрывали плёнкой и инкубировали 30 минут при 18-25°C. Затем стрипы 3 раза промывали 400 мкл промывочного раствора (фосфатный буфер, твин 20, 0,01% раствор мертиолята и БСА) и вновь добавляли в каждую лунку 100 мкл ферментного конъюгата с кроличьими и антимышиными антителами, БСА, пероксидазой хрена, 0,01% раствора мертиолята, инкубировали 20 минут при 18-25°C. Стрипы промывали 400 мкл промывочного раствора 3 раза, добавляли 100 мкл тетраметилбензидина, инкубировали 10 минут при 18-25°C. Добавляли 100 мкл стоп-раствора (0,8 М H_2SO_4), встряхивали на шейкере, рассчитывали оптическую плотность при 450 нм в течение 15 минут и выражали в мкмоль/г ткани.

29. Методика проведения электрофореза в ПААГ

Для разделения белков в первом направлении (изоэлектрофокусирование) применяли 4% полиакриламидный гель, содержащий 2% амфолинов (смесь амфолинов рН 5,0-7,0 и рН 3,5-10,0 в соотношении 1:4), 2% тритона X-100 и 9 М мочевины. Образцы гомогенатов пульпы (50 мкл) наносили с анодного конца геля. Электрический режим фракционирования: 200 В – 20 минут, 400 В – 20 минут, 600 В – 5,5 часов. После окончания фракционирования гели первого направления выдерживали в лизис-буфере №2 (0,125 М трис-НСl буфер, рН 6,8; 2% додецилсульфата, 5% - меркаптоэтанола, 10% глицерина) в течение 20 минут при комнатной температуре и использовали для фракционирования белков во втором направлении, которое проводили по системе Лемли (1970) в пластинах геля (160x160x1мм), приготовленных с линейным градиентом концентрации акриламида 9-25%. По окончании электрофореза гели окрашивали хромогенным субстратом 0,1% раствором Coomassie BB G-250 в смеси 10% раствора уксусной кислоты и 20% раствора этанола. Избыток красителя неоднократно отмывали 7% раствором уксусной кислоты. Сканирование гелей проводили на денситометре. Анализ гелей и денситометрирование дорожек проводили с использованием программы «One-Dscan ver.1.3».