

**РОЛЬ УГЛЕВОДНО-БЕЛКОВЫХ БИОПОЛИМЕРОВ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ
В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБА ОТ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССОВ КАРИОЗНОГО И НЕКАРИОЗНОГО ГЕНЕЗА**

И.Ю. ИППОЛИТОВ, Е.А. ЛЕЩЕВА, Ю.А. ИППОЛИТОВ, Н.С. МОИСЕЕВА

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, Россия, 394036

Аннотация. В серии гистохимических исследований проверена гипотеза о наличии в тканях зуба человека «катионного белка» и набора его составляющих аминокислот, а также гиалуроновой кислоты. Учитывая гисто- и цитогенез структур зуба и ранее полученные результаты на материале эпидермиса многослойного плоского частично ороговевающего эпителия слизистой полости рта, выполнены исследования, в основе которых оригинальная техника приготовления тонких парафиновых срезов, а также шлифов целых зубов и модифицированная гистохимическая технология идентификации углеводно-белковых биополимеров в твердых тканях зуба. Гистохимические микропрепараты получены из удаленных зубов по ортодонтическим показаниям. Исследованы срезы и шлифы зубов в проходящем свете для решения вопросов, связанных с топохимией углеводно-белковых биополимеров и гиалуроновой кислоты относительно распределения в структурах эмали, дентина, предентина, клеточного и бесклеточного цемента. Таким образом, идентифицированные углеводно-белковые биополимеры и вещества белковой природы объективно заполняют межпризмные пространства эмали, присутствуют в дентинных канальцах и их стенках, локализируются в структурах цемента зуба, а также его мягких тканях, образуя физиологический барьер для микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, как при процессах деминерализации, так и механических воздействиях при жизнедеятельности и медицинских вмешательствах.

Ключевые слова: углеводно-белковые биополимеры, гиалуроновая кислота, резистентность твердых тканей зуба.

**THE ROLE OF CARBOHYDRATE-PROTEIN BIOPOLYMERS AND HYALURONIC ACID AT THE
RESISTANCE FORMATION OF HARD DENTAL TISSUES AGAINST PATHOLOGICAL
PROCESSES OF CARIOUS AND NON-CARIOUS GENESIS**

I.YU IPPOLITOV, E.A. LESHEVA, YU. A. IPPOLITOV, N.S. MOISEEVA

*GBOU VPO VGMA of N. N. Burdenko Ministry of Health of Russia,
Studencheskaya St., 10, Voronezh, Russia, 394036*

Abstract. At the series of histochemical studies hypothesis of existence of a "cationic protein" in human tooth structure and set of its amino acids components and hyaluronic acid has been checked. Taking into account histogenesis and cytogeny of tooth structure and the earlier results received from the epidermis and multilayer partly keratinous epithelium of the oral mucosa, special studies had been created, based on the original equipment preparation of paraffin sections, and thin sections of the whole teeth and modified histochemical identification technology of carbohydrate-protein biopolymers in hard dental tissues. Histological slides are prepared from extracted for orthodontic indications teeth. Sectioned and examined thin sections of teeth has investigated in transmitted light for issues related to topochemistry of carbohydrate-protein biopolymers and hyaluronic acid concerning the distribution in structures of enamel, dentin, predentin, cellular and acellular cement. Identified carbohydrate-protein biopolymers and substances of protein nature objectively fill inter prismatic enamel areas, dentin tubules and their walls, localized in the cement structure of tooth and its soft tissues forming a physiological barrier to microorganisms and their metabolic products as in the demineralizing processes as for the mechanical interventions during the vital activity and medical interventions.

Key words: carbohydrate-protein biopolymers, hyaluronic acid, resistance of hard dental tissues.

Понимание процессов, происходящих в твердых тканях зубов как в норме, так и при патологии, во многом зависит от знания составных компонентов и связи между органической матрицей и неорганическим веществом.

В связи с этим удивительно, что некоторые ученые не придают органической составляющей твердых тканей зуба большого значения ни в физиологических условиях, ни при патологии. Однако такой

Библиографическая ссылка:

Ипполитов И.Ю., Лещева Е.А., Ипполитов Ю.А., Моисеева Ю.А. Роль углеводно-белковых биополимеров и гиалуроновой кислоты в формировании резистентности твердых тканей зуба от патологических процессов кариозного и некариозного генеза // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-133. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5054.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

подход совершенно не соответствует современным тенденциям в изучении состояния твердых тканей зуба в условиях патологического процесса кариозного и некариозного происхождения [1, 3].

Значение органической составляющей эмали так и недооценено, несмотря на серьезные научные изыскания и факты, полученные за последние 50 лет [2].

Материалы и методы исследования. В серии гистохимических исследований проверена гипотеза о наличии в тканях зуба человека «катионного белка» и набора его составляющих аминокислот, а также гиалуроновой кислоты. Учитывая гисто- и цитогенез структур зуба и ранее полученные результаты на материале эпидермиса многослойного плоского частично ороговевающего эпителия слизистой полости рта [2], выполнены исследования, в основе которых лежит оригинальная техника приготовления тонких парафиновых срезов, а также шлифов целых зубов и модифицированная гистохимическая технология идентификации углеводно-белковых биополимеров в твердых тканях зуба. Морфологические и гистохимические исследования 60 парафиновых срезов до 9 мкм, приготовленных после декальцинации и резки на микротоме по Г.А.Меркулову, Р.П. Самусен [5], а также 60 шлифов человеческих зубов проводили с помощью обзорной микроскопии окрашенных препаратов: гематоксилином Караци-эозином по Г.А.Меркулову [5], нейтральные гликопротеины идентифицировали шик-реакцией с периодатным окислением [4, 5], суммарный белок выявляли реактивом сулема-бромфеноловый синий, рН 6,9 по D.Maziala, P.A. Brever, M. Alfert [2], катионный белок (КБ) оценивали с помощью бромфенолового синего, рН 8,4 по М.Г. Шубичу [2]. Контрольные реакции выполнены с использованием трипана и хлористого тионина для деполимеризации белков и блокады карбоксильных групп маркерных аминокислот КБ. Гиалуроновую кислоту выявляли реакцией с ферригидроксидолом, рН 1,8 по G. Muller [2], гистидин – окрашиванием бромфеноловым синим, рН 8,58 по Э.Г.Быкову [2].

Количественные исследования выполнены на установке «Микротелс - 4», где осуществляли оцифровку микротелевизионного изображения в пределах выбранных областей и расчет величин экстинкций по точкам.

Для решения задачи о репрезентативной выборке использовался метод аккумулярованных средних. Изучено 120 зубов человека в возрасте от 16 до 60 лет, удаленных по ортодонтическим показаниям, а также при хроническом генерализованном пародонтите тяжелой степени.

В 10 полях зрения проводили количественную оценку окраски микропрепарата шлифа зуба на основе впервые примененной программы Image J. Осуществлялась оценка только маркированных изображений, эквивалентных максимальной хромности органических веществ, представленная в PIXELS.

В соответствии с целью и задачами исследования результаты исследования были сгруппированы таким образом, чтобы можно было сопоставить различные качественные и количественные показатели. Статистический анализ материалов, полученных в результате выполнения работы, проводился с использованием математического пакета программ «STATISTICA 6.X», «BIOSTAT», которые являются интегрированной средой статистического анализа и обработки данных.

Результаты и их обсуждение. Белок выявляется во всех отделах зуба и связан со структурами канальцев в дентине и эмали, со структурами преддентина, идентифицируется также в клеточном и бесклеточном цементе в виде гомогенного окрашивания (рис. 1). Выбор мест измерения содержания КБ определялся интересами планируемых исследований, и в этом отношении регистрация его количества в структурах эмали и дентина имеет первостепенное значение. С другой стороны предпринята попытка, исходя из представлений о реакции тканей зуба, получить базовые результаты в качестве показателей клинического контроля.

Содержание КБ значительно в структурах эмали - $0,355 \pm 0,01$, $\sigma = 0,119$ (рис. 2), а в близлежащем дентине соответствующие значения составили величину $0,152 \pm 0,004$, $\sigma = 0,045$.

Зоной умеренного накопления КБ отличается область преддентина непосредственно на границе с пульповой камерой – $0,264 \pm 0,008$, $\sigma = 0,082$. Наиболее значительные концентрации КБ оказались в элементах бесклеточного цемента – $0,438 \pm 0,01$, $\sigma = 0,112$. В клеточном цементе эти значения несколько меньше – $0,359 \pm 0,01$, $\sigma = 0,112$. Результаты являются статистически достоверными, в том числе отличия содержания КБ в различных видах цемента достоверны при $p \geq 99$.

Необходимо принять во внимание, что сопоставление содержания КБ в различных срезах и шлифах зуба проводилась при измерениях на одном объекте, так что имеются все основания считать полученные результаты значимыми для понимания распределения КБ в различных отделах зуба, как выше, так и ниже его шейки, а также и в её пределах. С другой стороны, результаты микроденситометрии различных областей дентина могут быть основанием для гипотезы о путях формирования защитных сред зуба, патогенетическое значение которых для понимания возникновения и развития кариозного процесса очень важно.

Одновременно выполнены исследования по диагностике статистической модели, на основании данных дескриптивного анализа с применением диаграммы распределений на плоскости Пирсона.

Библиографическая ссылка:

Ипполитов И.Ю., Лещева Е.А., Ипполитов Ю.А., Моисеева Ю.А. Роль углеводно-белковых биополимеров и гиалуроновой кислоты в формировании резистентности твердых тканей зуба от патологических процессов кариозного и некариозного генеза // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-133. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5054.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

Статистическая модель для КБ эмали, дентина, клеточного и бесклеточного цемента описывается простым β -распределением, а предентина – t -распределением Стьюдента.

Кроме того, после проведения шик-реакции с периодатным окислением определен высокий уровень *нейтральных гликопротеинов* (НГП) в эмали прилежащей к дентину (рис. 3), тогда как в поверхностной эмали уровень НГП низок. Высоким уровнем реакции на НГП отличаются структуры дентинных канальцев, тогда как в межканальцевом пространстве лишь следы НГП. Высокая концентрация НГП определяется на границе с одонтобластами. В цементе, граничащем с дентином уровень НГП низок. При сопоставлении отделов зуба следует отметить тенденцию к накоплению НГП в коронковой части.

Высокими вариациями топохимии и содержания отличается *гиалуроновая кислота* (ГК) – полисахарид из группы гликозаминогликанов. В эмали определяются высокие реакции этого полисахарида в межпризматическом веществе, хотя имеет место неравномерность распределения красителя от эмали к дентину. Дентин содержит высокие концентрации ГК в околопульпарной зоне. Дентинные канальцы отличаются выраженными различиями в содержании ГК, при этом формируются территории с вариациями окрашивания от низкого до высокого (рис. 4). Высоким содержанием ГК отличается бесклеточный цемент. У верхушки корня клеточный цемент окрашивается слабо. Определяется тенденция противоположная той, что характерна для топохимии НГП, которые накапливаются в глубоких отделах дентина вблизи пульповой камеры.

Окрашивание толуидиновым синим, рассчитанное на выявление кислых гликопротеинов позволяет получить бета-метахромазию, указывающую на низкий уровень их содержания на границе между эмалью и дентином. В зоне дентина бета-метахромазия выявляет структуры в межканальцевых промежутках, похожие на тонкие ветвящиеся анастомозирующие образования. Высокая бета-метахромазия видна в околопульпарном дентине, менее она выражена в средней его части.

Бесклеточный цемент неравномерно окрашивается бета-метахроматически как во внутренних отделах, так и прилежащих к дентину.

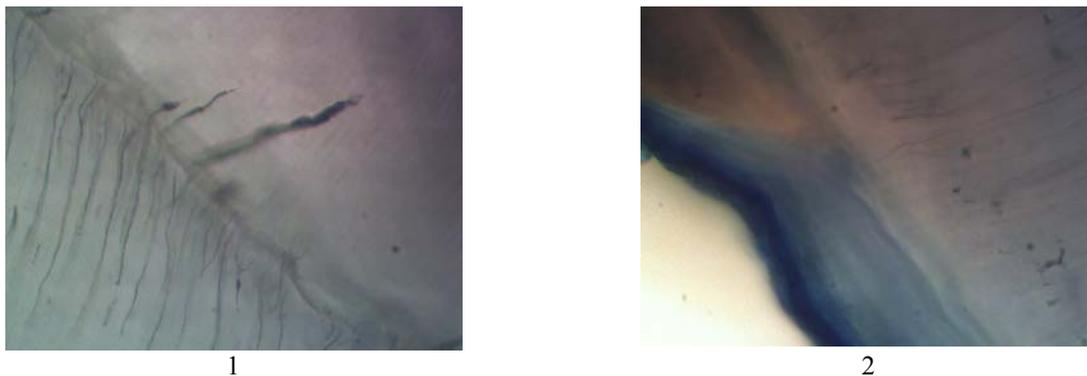


Рис. 1. Содержание и топохимия суммарного белка в дентинных канальцах, эмалевых пучках и межпризматических пространствах эмали. Увеличение $\times 400$ крат, в дентинных канальцах, межпризматических пространствах эмали (1), в бесклеточном цементе в зоне эмалево-цементного соединения. Увеличение $\times 100$ крат (2).

Шлиф зуба. Фиксация 10% раствором формалина. Окрашивание «сулема-бромфеноловый синий»

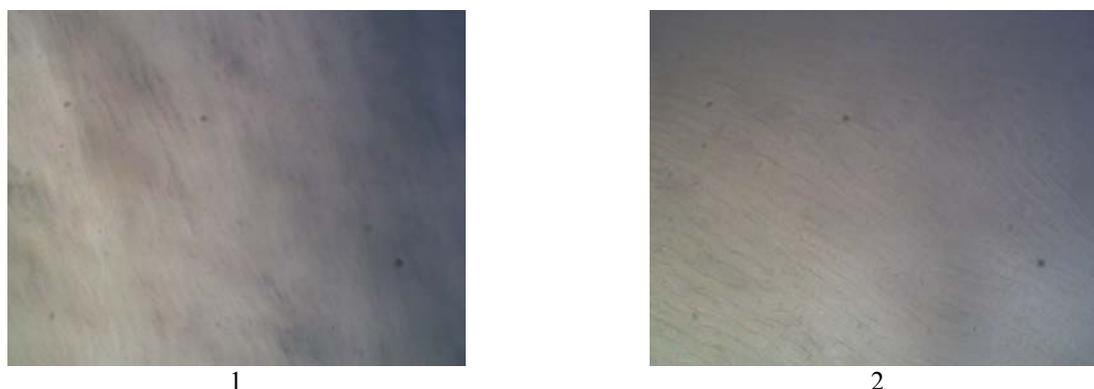


Рис. 2. Содержание и топохимия «катионного» белка (1), нейтральных гликопротеинов (2) в межпризматических пространствах эмали. Шлиф зуба, фиксация 10% раствором формалина. Увеличение $\times 400$ крат

Библиографическая ссылка:

Ипполитов И.Ю., Лещева Е.А., Ипполитов Ю.А., Моисеева Ю.А. Роль углеводно-белковых биополимеров и гиалуроновой кислоты в формировании резистентности твердых тканей зуба от патологических процессов кариозного и некариозного генеза // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-133. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5054.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).



Рис. 3. Содержание и топохимия нейтральных гликопротеинов в межпризмных пространствах эмали, эмалевых веретенах и дентине (1), эмалевых пучках и дентинных канальцах (2). Шлиф зуба, фиксация 10% раствором формалина. Окрашивание – шик-реакция с пероидатным окислением. Увеличение х400 крат

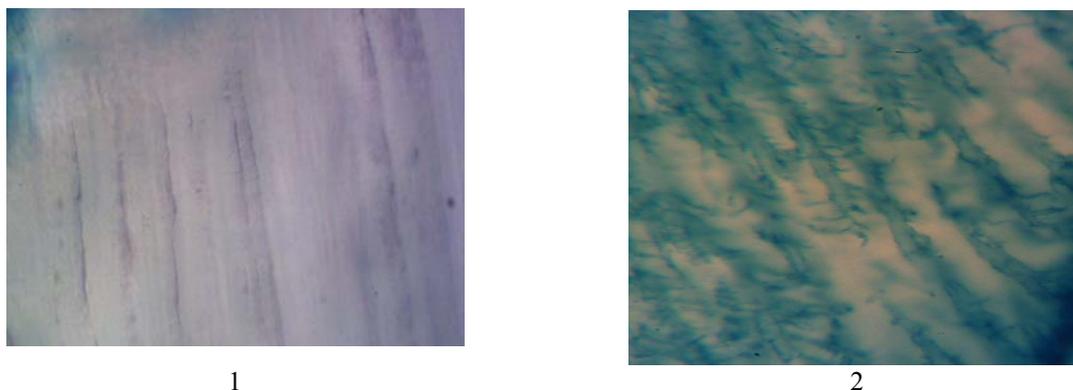


Рис. 4. Содержание и топохимия гиалуроновой кислоты в межпризмных пространствах эмали, шлиф зуба (1), в дентинных канальцах зуба и их анастомозирующих элементах, срез зуба (2), фиксация 10% раствором формалина. Окрашивание – реакция с ферригидроксизолем. Увеличение х400 крат

Выводы. Таким образом, идентифицированные углеводно-белковые биополимеры и вещества белковой природы объективно заполняют межпризмные пространства эмали, присутствуют в дентинных канальцах и их стенках, локализуются в структурах цемента зуба, а также его мягких тканях, образуя физиологический барьер для микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, как при процессах деминерализации, так и механических воздействиях при жизнедеятельности и медицинских вмешательствах.

Литература

1. Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. М.: Медицина, 2001. 304 с.
2. Ипполитов Ю.А. Разработка и оценка эффективности методов нормализации обменных процессов твердых тканей зуба в условиях развития кариозного процесса / автореф. дис. ... док. мед. наук. Воронеж, 2012. 46 с.
3. Ипполитов Ю.А. Морфологические образования белковой природы // Стоматология. 2010. № 3. С.4–7.
4. Ипполитов Ю.А. Функциональная морфология эмали человеческого зуба // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т. 17. № 2. С. 56–58.
5. Самусен Р.П., Дмитриенко С.В., Краюшкин А.И. Основы клинической морфологии зубов. М.: Мир и образование, 2002. 368 с.

References

1. Borovskiy EV, Leont'ev VK. *Biologiya polosti rta*. Moscow: Meditsina; 2001. Russian.
2. Ippolotov YuA. *Razrabotka i otsenka effektivnosti metodov normalizatsii obmennykh protsessov tverdykh tkaney zuba v uslochiyakh razvitiya karioznogo protsesssa* [dissertation]. Voronezh (Voronezh region); 2012. Russian.

Библиографическая ссылка:

Ипполитов И.Ю., Лещева Е.А., Ипполитов Ю.А., Моисеева Ю.А. Роль углеводно-белковых биополимеров и гиалуроновой кислоты в формировании резистентности твердых тканей зуба от патологических процессов кариозного и некариозного генеза // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-133. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5054.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

3. Ippolitov YuA. Morfologicheskie obrazovaniya belkovoy prirody. Stomatologiya. 2010;3:4-7. Russian.
4. Ippolitov YuA. Funktsional'naya morfologiya emali chelovecheskogo zuba. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2010;17(2):56-8. Russian.
5. Samusen RP, Dmitrienko SV, Krayushkin AI. Osnovy klinicheskoy morfologii zubov. Moscow: Mir i obrazovanie; 2002. Russian.

Библиографическая ссылка:

Ипполитов И.Ю., Лещева Е.А., Ипполитов Ю.А., Моисеева Ю.А. Роль углеводно-белковых биополимеров и гиалуроновой кислоты в формировании резистентности твердых тканей зуба от патологических процессов кариозного и некариозного генеза // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 2-133. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5054.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).