

І.І. Якубова<sup>1</sup>, В.Є. Досенко<sup>2</sup>, Л.В. Тумановська<sup>2</sup>

## Вплив дієти зі збільшеним вмістом пірофосфату (Е-450) на експресію генів, що кодують кістковий морфогенетичний протеїн та остеокальцин у тканинах нижньої щелепи ембріонів мишей, морфологічні зміни зачатків зубів у ембріонів мишей, хімічний склад і поверхневу структуру

<sup>1</sup>Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет УАНМ», м. Київ, Україна

<sup>2</sup>Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, м. Київ, Україна

**Резюме.** Завдяки повноцінному, збалансованому й раціональному харчуванню матері під час вагітності відбувається нормальний перебіг процесів внутрішньоутробного розвитку плоду та формування органів і тканин порожнини рота в малюка. На даний час проблемою для здоров'я людини, особливо вагітної жінки, є додавання у продукти харчування консервантів і харчових барвників. Харчова добавка, що зареєстрована під кодом Е-450, є сіллю пірофосфорної кислоти  $H_4P_2O_7$  і дозволена для використання як стабілізатор. Застосування фосфатів може призвести до порушення балансу в організмі між фосфором і кальцієм. Даних про вплив надмірної кількості пірофосфатів у дієті вагітної самки на експресію мРНК BMP2 й остеокальцину в літературних джерелах знайти не вдалося, що обумовило мету дослідження.

**Метою** дослідження було вивчення впливу на структуру зачатків зубів ембріонів мишей, що утримувались на дієті з підвищеним вмістом пірофосфату (харчової добавки Е-450), визначення хімічного складу та поверхневого шару емалі зубів дводенних мишей.

**Матеріал і методи дослідження.** Вплив харчової добавки вивчали на «Моделі перевантаження фосфатами». Для дослідів були використані білі безпородні миші масою 25–28 г (40 тварин). Самиці контрольної групи отримували раціон віварію; самиці дослідної групи отримували корм із підвищеним вмістом пірофосфату. Матеріалом для молекулярно-генетичних і морфологічних досліджень були нижні щелепи 17-денних ембріонів (Е-17) мишей, для дослідження методом рентген-дисперсійного спектрального аналізу слугували нижні щелепи дводенних мишей.

**Результати дослідження.** Результати визначення експресії генів BMP2 та остеокальцину в нижній щелепі ембріонів мишей свідчать про те, що досліджені гени експресуються на приблизно однаковому рівні. Пірофосфатна дієта не змінює експресію гену BMP2. При цьому пірофосфатна дієта вірогідно збільшує експресію генів остеокальцину. Зростання експресії гену остеокальцину, що забезпечує мінералізацію у тканинах зачатку зуба, з одного боку, може трактуватись як позитивна ознака, бо відкладання апатитів буде більш інтенсивним у тварин зі більшою кількістю білка остеокальцину. Але, з іншого боку, передчасна мінералізація в разі гіперекспресії остеокальцину може порушити ріст зуба та загалом процеси одонтогенезу. В експерименті на 17-тиденних зародках дослідних мишей виявлено зміни в морфологічних препаратах зачатків зубів від впливу харчової добавки Е-450. В усіх зразках дослідної й контрольної груп спостерігалися структурні відмінності зачатків зубів.

**Висновки.** Уперше отримані дані про вплив пірофосфатної дієти на рівень експресії мРНК ключових регуляторів одонтогенезу – BMP2 та остеокальцину. Вплив харчової добавки Е-450 у період фолікулярного розвитку зубів, що приводить до виявленого в експерименті раннього дентиногенезу, пригнічення ектодермальних структур зачатків зубів, у клініці призводить до розвитку системної гіпоплазії емалі, вогнищевої де мінералізації твердих тканин й у майбутньому до карієсу.

**Ключові слова:** експресія генів BMP2, остеокальцину, нижня щелепа ембріонів мишей, пірофосфатна дієта, харчова добавка Е-450, одонтобласти, емаль, дентин.

*Робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри дитячої терапевтичної стоматології та профілактики стоматологічних захворювань Приватного вищого навчального закладу «Київський медичний університет УАНМ» «Оцінка ризику виникнення, визначення особливостей патогенезу, клініки, лікування та профілактики стоматологічних захворювань у дітей з різними класами хвороб» (Державний реєстраційний номер 0112U008260).*

### Вступ

Завдяки повноцінному, збалансованому й раціональному харчуванню матері під час вагітності відбувається нормальний перебіг процесів внутрішньоутробного розвитку плоду та формування органів і тканин порожнини рота в малюка [8, 9]. На даний час проблемою для здоров'я людини, особливо вагітної жінки, є додавання в продукти

харчування консервантів і харчових барвників [2, 5]. Харчові добавки – це речовини, які додають у продукти з технологічних міркувань, щоб вони не зіпсувались, не змінили колір і консистенцію [6]. Перелік харчових добавок, дозволених для використання в харчових продуктах в Україні, регламентується Постановами кабінету Міністрів України [4]. Харчова добавка, що зареєстрована під кодом Е-450, є сіллю пірофосфорної кислоти  $H_4P_2O_7$  і дозволена для використання [4, 12] як стабілізатор [6], проте в деяких країнах вважається небезпечною [7]. Вона міститься у м'ясних продуктах, ковбасах, беконах, напівфабрикатах, вареннях, згущеному молоці, шоколадних і плавлених сирах, лимонаді, солодоцях тощо [6]. Е-450 належить до добавок, які викликають захворювання шлунково-кишкового тракту [7] і порушення кальцієво-фосфорного балансу в організмі [6].

Застосування фосфатів може призвести до порушення балансу в організмі між фосфором і кальцієм. Надмірне вживання фосфатів погіршує засвоєння кальцію в організмі [12], що може мати визначальне значення саме при мінералізації зачатка зуба. Вплив чинників харчування матері на формування зубів у дітей достатньо добре вивчений, проте робіт про вивчення механізмів порушень закладки зубів під впливом надлишкового вмісту пірофосфату (харчової добавки Е 450) немає.

Особливий інтерес викликають дослідження вивчення експресії генів, білкові продукти яких мають ключове значення в зазначених процесах на всіх стадіях одонтогенезу. Серед указаних генів велика увага приділяється кістковому морфогенетичному протеїну, що кодується геном *BMP2*, та остекальцину (ген – *Bglap*), що є визначальними факторами кальцифікації зачатку зуба [16, 20, 24].

Показано, що білок *BMP2*, що є ростовим фактором для клітин зачатку зуба [18], запускає диференціацію фолікулярних клітин в цементобласти/-остеобласти [15]. Указаний ефект білка *BMP2* забезпечується активацією експресії цілого ряду генів (колаген І типу, остеоонектин, дентиновий сіалофосфопротеїн, нестин) у клітинах пульпи зуба [10]. У свою чергу, експресія ген *BMP2* знаходиться під контролем гормону росту (соматотропного гормону) та інсуліноподібного фактору росту-1, що здатні підвищувати експресію гену *BMP2* в 4–5 разів у фібробластах пульпи зуба людини *in vitro* [19]. Також диференціювання клітин емалевого органа регулюється факторами росту, зокрема трансформуючим фактором росту –  $\alpha$  (ТФР- $\alpha$ ) й епідермальним фактором росту (ЕФР) [3]. Білок *BMP2*, що активує рецептори остеобластів на поверхні клітин зародка зуба, стимулює проліферацію мезенхімальних клітин пульпи зуба з подальшою диференціацією в одонтобласти, що забезпечує утворення остеодинтину та тубулярного дентину [19]. Під час розвитку зуба білок *BMP2* спочатку експресується в епітеліальних клітинах (до 13-го дня ембріонального розвитку мишей), а на більш пізніх стадіях розвитку зуба його експресія зсувається до мезенхімальних клітин зубного сосочка й запускає більш інтенсивний дентиногенез. Таким чином, білок *BMP2* визначає «долю» дентальних мезенхімальних клітин при формуванні зуба [11].

Одонтобласти також виробляють кальційзв'язуючі білки – остеокальцин та остеоонектин, які експресуються як у дентині, так і в кістці [3]. Білок остеокальцин відноситься до протеїнів, що містить три залишки  $\gamma$ -карбоксиглутамінової кислоти, яка зв'язує вільний кальцій і запобігає утворенню апатитів. Остеокальцин є вітамін-К-залежним матриксним протеїном, що може зв'язуватися з гідроксиапатитами. Він синтезується одонтобласти дентину і є визначальним фактором мінералізації сполучної тканини зуба [21].

**Даних про вплив надмірної кількості пірофосфатів у дієті вагітної самки на експресію мРНК *BMP2* й остеокальцину в літературних джерелах знайти не вдалося, що обумовило мету дослідження – визначити рівень мРНК вказаних факторів одонтогенезу в тканинах щелепи ембріонів (17-й день вагітності), що виношувалися самками, що знаходилися протягом 30-ти днів до запліднення та протягом усієї вагітності на харчовому раціоні з підвищеним вмістом добавки Е 450.**

Інтерпретація одержаних результатів стосовно людини можлива, тому що послідовність генів, які містять інформацію про біологічно активні білки, у людини й мишей подібна [1, 23].

**Метою дослідження було вивчення впливу на структуру зачатків зубів ембріонів мишей, що утримувались на дієті із підвищеним вмістом пірофосфату (харчової добавки Е-450), визначення хімічного складу й поверхневого шару емалі зубів дводенних мишей.**

### Матеріал і методи дослідження

Для розрахунку раціону мишей дослідної групи враховувались: фактичне харчування вагітних жінок, що було отримано анкетно-опитувальним методом [13], рекомендований добовий набір продуктів вагітної жінки<sup>1</sup>, кількість харчової добавки Е-450 у харчових продуктах, ГДК<sup>2</sup> харчової добавки Е-450 в окремих продуктах<sup>3</sup>.

Вплив харчової добавки вивчали на «Моделі перевантаження фосфатами» (на 100 г корму віварію додавалося 2 г харчової добавки Е450 (пірофосфат натрію) виробництва Ізраїль). Модифікації до базових моделей не застосовувалися [319].

Для досліду були використані білі безпородні миші масою 25–28 г (40 тварин). Тварин було поділено на дві групи – контрольну й дослідну. Самці контрольної групи отримували раціон віварію; самці дослідної групи отримували корм з підвищеним вмістом пірофосфату (1 % пірофосфату виробництва Ізраїль). Через 30 днів самицям, які знаходилися у стадії проеструса й еструса, підсаджували самців у співвідношенні 4:1. Виявлення спермій у вагінальному мазку самиці після підсадки вказувало на запліднення – перший день вагітності. Протягом усієї вагітності самиці отримували або звичайний раціон віварію (контрольна група), або 1 % пірофосфатну дієту (дослідна група). Вагітних мишей по шість тварин з кожної групи виводили із досліду інгаляційним передозуванням вуглекислого газу на 17-й день вагітності (Е-17); мишенят – на другий (D-2) і 28 (D-28) дні від народження. Експерименти проводили з дотриманням «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин».

Матеріалом для молекулярно-генетичних досліджень були нижні щелепи 17-денних ембріонів (Е-17) мишей у зв'язку з тим, що визначальними чинниками кальцифікації зачатку зуба на усіх стадіях одонтогенезу є білкові продукти генів: кісткового морфогенетичного протеїну, що кодується геном *BMP 2*, та остекальцину (ген *Bglap*) [16, 20, 24], і вони є впливовими на стадії «дзвоника» (*the bell stage*) із 16,5 до 18,5 дня вагітності мишей (Е16,5 – 18,5) [17].

Зі зразків нижньої щелепи виокремлювали РНК з використанням фенол-хлороформової екстракції із застосуванням реактивів *Sigma-Aldrich* (США). Концентрацію отриманої РНК визначали за допомогою спектрофотометра *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*, США). Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору реактивів *First Strand cDNA Synthesis Kit* (*Fermentas*, Литва), застосовуючи 200–300 мкг загальної РНК та оліго(*dT*)<sub>18</sub> праймер. Отримана внаслідок ЗТ одноланцюгова ДНК (кДНК) використовувалася для ПЛР-ампліфікації. Кількісну оцінку експресії генів *BMP-2* та *bone gamma carboxylglutamate protein* (*Bglap*,

<sup>1</sup>Приблизний добовий набір продуктів вагітної жінки складається із 200г м'яса або риби, 1 літра молока в будь-якому вигляді, 100–150г сиру, 20–30г сиру, 1 яйце, 600г овочів, 200–300 г фруктів [22].

<sup>2</sup>Для харчових добавок – межа.

<sup>3</sup>Межа допустимої концентрації харчової добавки Е-450 у продуктах, зокрема у хлібобулочних виробах – 10000 мг/кг, десертах – 3000 мг/кг, морозиво – 1000 мг/кг, борошно – 2500 мг/кг, сирі яйця – 10000 мг/кг, соуси – 5000 мг/кг, плавлені сири – 9000 мг/кг, у м'ясних і рибних продуктах – від 100 до 5000 мг/кг (0,3 % від маси фаршу) [13]. Допустиме вживання на добу 70 мг/кг ваги тіла на добу.



Рис. 1. Схематичне зображення послідовності стадій диференціації клітин амелобластів.

*osteocalcin*) здійснювали із застосуванням методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням таких праймерів:

*BMP2* Up: 5'-GTGGAGGAACCTCCAGAGATGA-3';  
*BMP2* Dw: 5'-CTGCAGATGTGAGAACTCGTC-3';  
*Osteocalcin* Up: 5'-CAGGAGGGCAATAAGGTAGTGA-3';  
*Osteocalcin* Dw: 5'-CAGGGTTAAGCTCACACTGCTC-3'.

ПЛР-ампліфікація відбувалась у 20 мкл *SYBR Green PCR Master Mix*, що містив 25 рМ кожного праймера. Програма ампліфікації розпочиналася з попередньої активації *AmpliQaq Gold*<sup>®</sup> ДНК-полімерази протягом 10 хв. при 95°C та складалась із 50-ти циклів: денатурація – 95°C, 15 с; приєднання праймерів та елонгація – 60°C, 1 хв. (або 61°C, 1 хв. для оцінки експресії гена *osteocalcin*). Для контролю специфічності флуоресценції продуктів реакції проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 60 (61) до 94°C з реєстрацією спадання інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК із *SYBR Green*.

Матеріалом для морфологічних досліджень були вибрані нижні щелепи 17-денних ембріонів (E-17) мишей, які фіксували у 2 %-му глютаральдегіді на какаділатному буфері. Після цього було здійснено декальцинацію з подальшою постфіксацією в 1 %-му оксиді осмію та заливкою матеріалу в епоксидні смоли. Напівтонкі зрізи фарбували метиленовим синім та основним фуксином, що дало змогу вирізняти мезенхімальні та епітеліальні тканини. Виготовляли морфологічні зрізи товщиною 1,0–1,5 мкм. Дослідження проводили під мікроскопом *Nicon Eclipse E200* (виробництво *Fryer Co., Huntley, IL, США*), фотографували за допомогою *Nicon DS-F11*. Для опису мікрофотографій зі збільшенням  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$  використовували схематичне зображення послідовних стадій диференціації клітин амелобластів (рис. 1).

Було проведено визначення якісного й кількісного хімічного (елементного) складу зразків поверхнього шару емалі зуба у дводенних мишенят, які утримувались на дієті з підвищеним вмістом пірофосфату натрію, за допомогою методу *EDS*. Розмір ділянок досліджуваної поверхні емалі – від  $50 \times 50$  до  $250 \times 250$  мкм, на яких отримували середні значення. Повний час виконання аналізу – 8 хв.; прискорююча напруга – 10 кВ; струм зонда 100 нА.

Матеріалом для дослідження методом рентген-дисперсійного спектрального аналізу слугували нижні щелепи дводенних мишей. Було досліджено 24 нижні щелепи. Видалені щелепи промивалися дистильованою

водою протягом трьох хвилин. Усі зразки зберігались у щільно закупорених пробірках (у 10 %-му розчині стрептоміцину) при температурі від +2 до +4°C.

Перед дослідженням зразки промивали дистильованою водою й пасивно висушували. Після цього зразки поміщали у вакуумний апарат «*Ion Sputter JFC-1600*» (виробництво «*Jeol*», Японія) до повного випаровування залишкової вологи з подальшим напиленням тонкого шару Pt (~25 нм). Результат отримували за допомогою рентген-дисперсійного спектрального аналізатора «*INCA Energy 450*» (виробництво «*OXFORD Instruments*», Японія) растрового електронного мікроскопа «*JSM-6490LV*» («*Jeol*», Японія).

Вивчали хімічний (елементний) склад поверхнього шару емалі зубів мишенят у контрольній і дослідній групах. Вихідний рівень мінералізації кожного зразка визначали за співвідношенням вмісту кальцію і фосфору в емалі.

Поверхню структуру та морфологію очищеної емалі оцінювали за допомогою растрового електронного мікроскопа «*JSM-6490LV*» («*Jeol*», Японія) із прискорювальною напругою 20 кВ.

Перегляд та фотографування поверхонь відбувалося під кутом, оптимальним для отримання чіткого зображення. Було одержано растрові електронні мікрофотографії зі збільшенням  $\times 30$ ,  $\times 100$ ,  $\times 500$ ,  $\times 1000$ ,  $\times 3000$ ,  $\times 5000$ ,  $\times 10000$ .

При дослідженні поверхні емалі зубів дводенних мишей було визначено оптимальні режими збільшення ( $\times 100$ ,  $\times 500$ ,  $\times 1000$ ,  $\times 3000$ ), аналізувались і порівнювались аналогічні зони контрольної та дослідної груп. Досліджено 47 зубів.

### Статистична обробка даних

Отримані цифрові дані обробляли статистично з використанням програми *Excel 2000* та *Origin 7.0*. Вірогідність відмінностей середніх величин ( $p < 0,05$ ) визначали за t-критерієм Ст'юдента.

### Результати та їх обговорення

У щелепах тварин дослідної групи рівень експресії *BMP-2* був однаковим у контрольній та дослідній групах ( $p = 0,71$ ;  $p > 0,05$ ). При цьому рівень експресії *osteocalcin* значно зростав при дієті з підвищеним вмістом пірофосфату натрію – у 1,8 разу ( $p = 0,047$ ;  $p < 0,05$ ) і становив  $51,2 \pm 6,20$  (рис. 2).

Проведений аналіз отриманих даних доводить, що дієта з підвищеним вмістом пірофосфату натрію не змінює експресії гена *BMP-2*. Згідно з функцією *BMP-2* як ключового чинника диференціації одонтобластів [14], можна припустити, що надлишок пірофосфату в раціоналі матері не буде впливати на одонтогенез її ембріонів. При цьому дієта з підвищеним вмістом пірофосфату натрію вірогідно збільшує експресію гена *osteocalcin*.

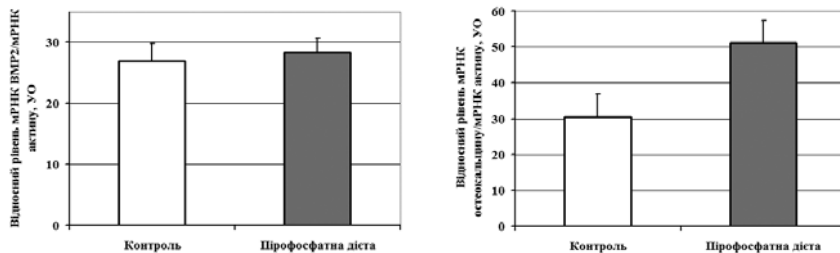
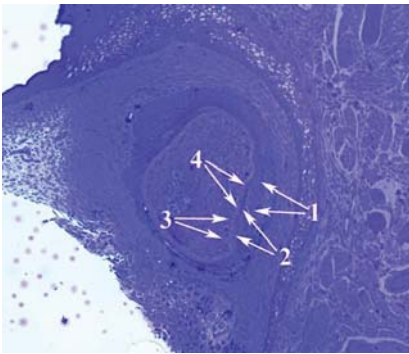
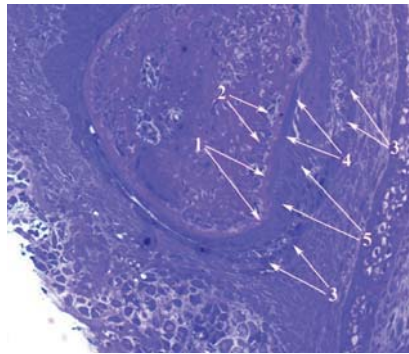


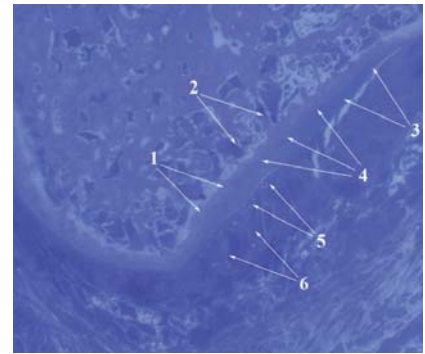
Рис. 2. Рівень експресії мРНК генів *BMP-2* (А) та *osteocalcin* (Б) щодо рівня експресії мРНК гена активу в тканинах нижньої щелепи ембріонів мишей у контрольній та дослідній (дієта з підвищеним вмістом пірофосфату натрію) групах.



**Рис. 3.** Мікрофотографія структури зачатків зубів 17-денного ембріона мишей дослідної групи, які отримували раціон віварію з підвищеним вмістом пірофосфату натрію (харчова добавка E450),  $\times 10$ , забарвлення метиленовим синім:  
1 – амелобласти,  
2 – емаль,  
3 – одонтобласти,  
4 – емаль.



**Рис. 4.** Мікрофотографія структури зачатків зубів 17-денного ембріона мишей дослідної групи, які отримували раціон віварію з підвищеним вмістом пірофосфату натрію (харчова добавка E450),  $\times 20$ , забарвлення метиленовим синім:  
1 – дентин,  
2 – одонтобласти,  
3 – зовнішній емалевий епітелій,  
4 – емаль,  
5 – амелобласти.



**Рис. 5.** Мікрофотографія структури зачатків зубів 17-денного ембріона мишей дослідної групи, які отримували раціон віварію з підвищеним вмістом пірофосфату натрію (харчова добавка E450),  $\times 40$ , забарвлення метиленовим синім:  
1 – дентин,  
2 – одонтобласти,  
3 – емаль,  
4 – емалево-дентинове з'єднання,  
5 – відростки Томса,  
6 – амелобласти.

Зростання експресії гена *osteocalcin*, що забезпечує мінералізацію у тканинах зачатка зуба, з одного боку, може трактуватись як позитивна ознака, адже відкладання апатитів буде інтенсивніше у тварин зі більшою кількістю білка *osteocalcin*. Але, з іншого боку, передчасна мінералізація у випадку гіперекспресії *osteocalcin* може порушити формування зуба та процеси одонтогенезу загалом.

Отримані дані трохи не збігаються з описаними в літературі [21], де автори вивчали експресію низки генів (із застосуванням ПЛР у реальному часі) у цементобластах миші за впливу неорганічного фосфату/пірофосфату. Було встановлено, що в дозі 5 мМоль пірофосфат збільшував експресію остеопонтину і *dentin matrix protein-1* і знижував експресію мРНК гена *bone sialoprotein (Bsp)*, *osteocalcin* і колагену I типу. Відмінність результатів легко пояснити короточасним строком дії пірофосфату (до 48 год.), дослідженням *in vitro* та впливом на ізолювані цементобласти. У наших дослідях вплив речовини тривав 50 діб за умови цілісного організму, а для експресії використовували тканини нижньої щелепи, а не культивовані клітини. Попри цю різницю, найбільш важливим є те, що пірофосфат здатний впливати на експресію генів, що мають значення для одонтогенезу.

Проведені морфологічні дослідження тканин зачатків зубів ембріонів вагітних мишей, що до й під час вагітності отримували раціон віварію з додаванням харчової добавки E-450, показали порушення морфогенезу зубів.

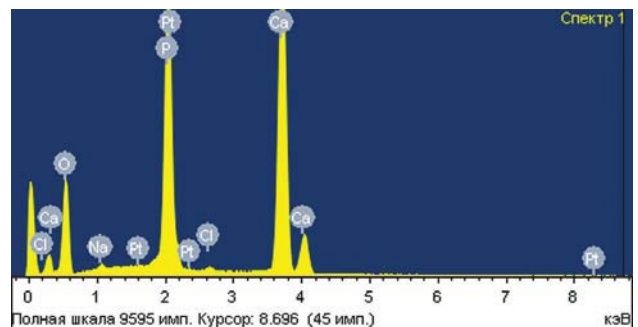
У дослідній групі емаль визначали у вигляді ледь помітної нерівномірної смужки на обмеженій ділянці (рис. 3), що було результатом значних структурних змін у прошарку амелобластів, а саме: у більшості випадків неполяризовані клітини, що не мали вираженої циліндричної форми, утворювали нерівномірно впорядкований прошарок.

Зовнішній емалевий епітелій (рис. 4) був представлений нерівномірними шарами хаотично розміщених клітин, що вирізнялись поляризацією та інтенсивністю зафарбовування.

Лінія утворення твердих тканин зуба мала нерівномірні вгинання, чого не спостерігалось на жодному з



**Рис. 6.** Ділянка емалі зуба дводенної миші (D-2), що отримана на Р.Е.М., де вимірювся хімічний (елементний) склад.



**Рис. 7.** Рентгенівський характеристичний спектр поверхневого шару емалі зуба дводенної миші (D-2), отриманий за допомогою енергодисперсійного рентгенівського спектрального аналізатора.

контрольних зразків. На апікальних частинах амелобластів лише на дуже обмеженій ділянці, визначалися стоншення – відростки Томса (*Tomes' process*) (рис. 5).

Гіпертрофовані ядра амелобластів охоплювали майже весь цитоплазматичний простір, що свідчить про нижчу диференціацію клітин і лише початок переходу із пресекреторної (*pre-secretory*) у секреторну (*secretory*) стадію диференціації клітин (див. рис. 5).

Розташовані нерівномірно амелобласти відрізнялися за стадіями дозрівання (в основному спостерігалася стадія раннього дозрівання – *early maturation stage*). Помічені хаотично розташовані неполяризовані скупчення клітин, навпроти яких емалі не зауважено (див. рис. 3– 4).

При збільшенні  $\times 40$  мала місце дезорієнтованість та дезорганізованість одонтобластів, а також їх повна відсутність на окремих ділянках органа. Дентин має вигляд нерівномірної світлої смуги без позірно помітного розподілу на предентин і власне дентин. Оскільки предентин і дентин у препараті не розрізнялись, очевидно, що в дослідній групі відбувалися зміни, викликані нерівномірним і місцями хаотичним розташуванням дентинових колагенових волокон, дисбалансом у насиченні дентинового прошарку органічними та неорганічними компонентами. На редукцію утворення дентину вказує також його тонкий шар; виявлено дезорганізацію шару одонтобластів (див. рис. 5).

Експериментальне дослідження, що стосувалося 17-денних ембріонів дослідних мишей групи № 2

засвідчило зміни в морфологічній структурі зачатків зубів, що виникли під впливом дієти із підвищеним вмістом пірофосфату натрію (харчова добавка E450). У всіх зразках зачатків зубів дослідної й контрольної груп спостерігалися суттєві відмінності, адже найбільш виражений вплив харчової добавки E450 припадає на період фолікулярного розвитку зубів, що призводить до раннього дентиногенезу, пригнічення ектодермальних структур зачатків зубів. У клінічних умовах це створює сприятливе підґрунтя для розвитку системної гіпоплазії емалі, а в перспективі – вогнищевої демінералізації твердих тканин та каріозного процесу.

У самиць контрольної групи кількість плодів у посліді дорівнювала в середньому  $7,10 \pm 1,55$  шт. У самиць дослідної групи № 2 –  $6,45 \pm 1,95$  шт. і мала тенденцію лише до зниження ( $p = 0,252$ ;  $p > 0,05$ ).

У контрольній групі виміри відбулись на 19 ділянках емалі, у дослідній групі – на 21-й ділянці. Розмір ділянок емалі спектроскопії коливався від  $50 \times 50$  до  $250 \times 250$  мкм (рис. 6).

Після чого за допомогою енергодисперсійного рентгенівського спектрального аналізатора з поверхні емалі отримували рентгенівські характеристичні спектри (рис. 7).

Під час вивчення хімічного складу емалі зубів дводенних мишей за методом EDS дослідної групи № 2, які отримували дієту з підвищеним вмістом пірофосфату натрію з'ясовано, що у 100 % зразків траплялись хімічні елементи кальцій, фосфор, натрій, хлор (табл. 1).

Таблиця 1

Хімічний (елементний) склад поверхневого шару емалі зубів дводенних мишей за методом EDS дослідної групи

Кількісний склад зразків	Хімічний елемент	Кількість досліджених зразків	Кількість зразків, що містять хімічний елемент		Концентрація хімічних елементів, %	
			Абс. к-сть	%		
Атомний	O	18	18	100	61,65	
	Na	18	18	100	1,11	
	Cl	18	18	100	0,29	
	Ca	18	18	100	20,71	
	P	18	18	100	16,02	
	Ca/P					1,29
	Fe	18	8	44,44	0,44	

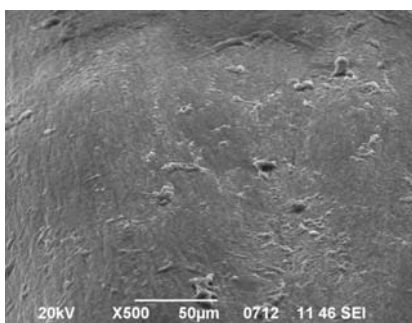


Рис. 8. Зображення рельєфу поверхні емалі нижніх різців 28-денних мишенят (D-28) дослідної групи, отримане методом растрової електронної мікроскопії ( $\times 500$ ).

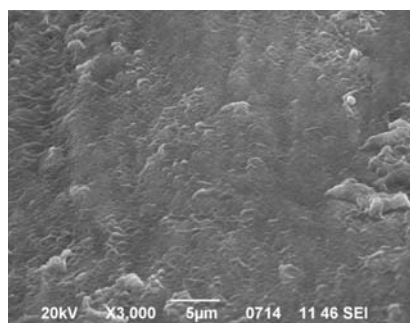


Рис. 9. Зображення рельєфу поверхні емалі нижніх різців 28-денних мишенят (D-28) дослідної групи № 2, отримане методом растрової електронної мікроскопії ( $\times 3000$ ).

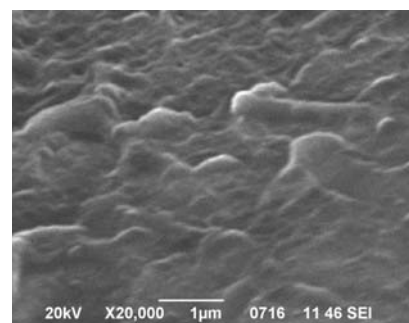


Рис. 10. Зображення рельєфу поверхні емалі нижніх різців 28-денних мишенят (D-28) дослідної групи № 2, отримане методом растрової електронної мікроскопії ( $\times 20000$ ).

В емалі мишей дослідної групи спостерігалась тенденція лише до зниження вмісту елементів кальцію, натрію, хлору; вміст елементу фосфор мав тенденцію до зростання, у порівнянні з контрольною групою. Хімічні елементи магній, сірка не траплялися взагалі, вміст заліза не змінився порівняно із контрольною групою. Вихідний рівень мінералізації за Ca/P коефіцієнтом дорівнював 1,29. Зважаючи, що при співвідношенні Ca/P нижче 1,33 спостерігаються незворотні зміни у структурі емалі [50], можна сподіватися прорізування зубів з недосконалою структурою.

Для виявлення клінічних змін в експериментальних тварин, які отримували корм з підвищеним вмістом пірофосфату натрію (харчової добавки E450), було проведено вивчення поверхневих шарів емалі зубів 28-денних мишей. Під час дослідження за допомогою Р.Е.М. при  $\times 500$  визначалась поверхня з наявністю різних за розміром і відстанню один від одного емалевих нашарувань (рис. 8).

Несистематичність розташування емалевих нерівностей може вказувати на порушений процес амелогенезу.

Збільшення  $\times 3000$  дало можливість виявити хвилеподібний вигляд емалі за рахунок нашарувань і нерівномірного утворення (рис. 9).

Збільшення  $\times 20000$  засвідчило напливистість поверхні, чергування емалевих валиків розміром від 0,5 до 5 мкм свідчить про несистематизованість активності амелогенезу в різних зонах зуба (рис. 10).

### Висновки

Таким чином, уперше отримані дані про вплив пірофосфатної дієти на рівень експресії мРНК ключових регуляторів остеогенезу – BMP-2 та остеокальцину. Подальші дослідження патогістологічних змін у зачатках

зубів мишей дозволять співставити генетичні зміни з патоморфологічними та встановити функціональне значення змін експресії вивчених генів.

В експерименті на 17-тиденних ембріонах дослідних мишей виявлено зміни в морфологічних препаратах зачатків зубів від впливом харчової добавки E-450. В усіх зразках дослідної й контрольної груп спостерігалися суттєві структурні відмінності зачатків зубів. Вплив харчової добавки E-450 в період фолікулярного розвитку зубів, що призводить до виявленого в експерименті раннього дентиногенезу, пригнічення ектодермальних структур зачатків зубів, у клініці призводить до розвитку системної гіоплазії емалі, вогнищевої демінералізації твердих тканин і й майбутньому до карієсу.

Таким чином, растрова електронна мікроскопія поверхневого шару емалі зубів 28-денних мишей дослідної групи № 2 під впливом дієти з підвищеним вмістом пірофосфату натрію виявила хвилеподібні нерівномірно розташовані напливи емалі, що свідчить про нерівномірність ділянок мінералізації у процесі розвитку зубів.

### Подяка

Автор висловлює подяку Андрію Олександровичу Рудовському, завідувачу експериментально-біологічної клініки Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за підтримку лабораторних робіт; Віталію Олександровичу Гінькову, канд. фіз.-мат. наук, молодшому науковому співробітнику Інституту металознавства імені Г.В. Курдюмова НАН України, м. Київ, за допомогу у проведенні досліджень; компанії «TOKYO BOEKI CIS LTD» за надання можливості проведення робіт на мікроскопі «JEOL JSM 6490LV»; представництву торгової марки «R.O.C.S.» в Україні ООО «ВДС Фарма» за підтримку при проведенні клінічних досліджень.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Боярский К.Ю. Молекулярные основы фолликулогенеза: в 2 ч. / К.Ю. Боярский // Пробл. репродукции. – 2006. – № 4. – Ч. 1. От первичных половых клеток до антральных фолликулов: обзор литературы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mediasphera.ru/journals/reproduction/detail/289/4377>
2. Оценка фактического питания и пищевых привычек населения // Руководство по проведению исследования и оценке питания. – М., 2003. – 48 с.
3. Пикалюк В.С. Онто-, філогенез органів і систем / В.С. Пикалюк, А.Ю. Османов. – Сімферополь, 2011. – 312 с.
4. Постанова Кабінету Міністрів України від 4 січня 1999 р. № 12, Київ «Про затвердження переліку харчових добавок, дозволених для використання в харчових продуктах» (Зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМ N 143 від 11.02.2004) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=12-99-%EF>.
5. Робертсон Э. Пищевые продукты и здоровье в Российской Федерации // Программа касающаяся политики в области питания, детского вскармливания и безопасности продуктов питания, ВОЗ, Дания. – Копенгаген. – 1998. – С. 2.
6. Сарафанова Л.А. Пищевые добавки: энциклопедия / Л.А. Сарафанова. – 2-е изд. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 808 с.
7. Серов Ю.А. Опасные пищевые Е-добавки: информ.-справ. пособие / Ю.А. Серов. – 2006. – 42 с.
8. Стоматология детей и подростков / под ред. Р.Е. МакДональда, Д.Р. Эйвери; пер. с англ. под ред. Т.Ф. Виноградовой. – М.: Мед.-информ. агентство, 2003. – 766 с.
9. Тутельян В.Я. Рациональное питание беременных и кормящих грудью / В.Я. Тутельян, В.А. Самсонова // Акушерство и гинекология. – 2002. – № 2. – С. 71–75.
10. About I. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair: in vivo and in vitro models / I. About, T.A. Mitsiadis // Adv. Dent. Res. – 2001. – № 15 (Aug.). – P. 59–62.
11. Bone Morphogenetic Protein 2 Mediates Dentin Sialophosphoprotein Expression and Odontoblast Differentiation via NF- $\kappa$ B Signaling / Chen S., Gluhak-Heinrich J., Martinez M. et al. // Journ. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, № 28 (July 11). – P. 19359–19370.

12. Commission regulation (EU) No 257/2010 of 25 March 2010 setting up a programme for the re-evaluation of approved food additives in accordance with Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council on food additives.
13. Dankost [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://dankost.dk/english/>.
14. Defining the roots of cementum formation / Popowicz T., Foster B.L., Swanson E.C. et al. // Cells Tissues Organs. – 2005. – Vol. 181, № 3–4. – P. 248–257.
15. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children / Milgrom P., Riedy C.A., Weinstein P. et al. // Com. Dent. Oral. Epidemiol. – 2000. – Vol. 28, № 4 (Aug.). – P. 295–306.
16. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation / Casagrande L., Demarco F.F., Zhang Z. et al. // Journ. Dent. Res. – 2010. – Vol. 89, № 6 (Jun.). – P. 603–608.
17. Eberg T. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (bmps) in the developing mouse tooth suggest poles in morphogenesis and cell differentiation / T. Eberg, J. Wozney, I. Thesleff // Developmental Dynamics. – 1997. – Vol. 210, № 4. – P. 383–396.
18. Epigenetic signals during odontoblast differentiation / Lesot H., Lisi S., Peterkova R. et al. // Adv. Dent. Res. – 2001. – № 15 (Aug.). – P. 8–13.
19. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation? / Li H., Bartold P.M., Zhang C.Z. et al. // Endocrinology. – 1998. – Vol. 139, № 9 (Sep.). – P. 3855–3862.
20. Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification / A. Linde // Anat. Rec. – 1989. – Vol. 224, № 2 (Jun.). – P. 154–166.
21. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro / Foster B.L., Nociti F.H. Jr., Swanson E.C. et al. // Calcif. Tissue Int. – 2006. – Vol. 78, № 2 (Feb.) – P. 103–112.
22. Site-specific Expression of mRNAs for Osteonectin, Osteocalcin, and Osteopontin Revealed by In Situ Hybridization in Rat Periodontal Ligament During Physiological Tooth Movement / Takano-Yamamoto T., Takemura T., Kitamura Y., Shintaro N. // The Journ. of Histochemistry and Cytochemistry. – 1994. – Vol. 42, № 7. – P. 885–896.
23. Thesleff I. Tooth organogenesis and regeneration / I. Thesleff, M. Tummers [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.stembook.org/node/551#fn1>.
24. Wise G. E. Cellular and molecular basis of tooth eruption / G.E. Wise // Orthod. Craniofac. Res. – 2009. – Vol. 12, № 2 (May). – P. 67–73.

**Влияние диеты с увеличенным содержанием пирофосфата (Е-450) на экспрессию генов, которые кодируют костный морфогенетический протеин и остеокальцин в тканях нижней челюсти эмбрионов мышей, морфологические изменения зачатков зубов у эмбрионов мышей, химический состав и поверхностную структуру.**

*И.И. Якубова, В.Е. Досенко, Л.В. Тумановская*

**Резюме.** Благодаря полноценному, сбалансированному и рациональному питанию матери во время беременности происходит нормальное протекание процессов внутриутробного развития плода и формирования органов и тканей полости рта у малыша. В данное время проблемой для здоровья человека, особенно беременной женщины, является добавление в продукты питания консервантов и пищевых красителей. Пищевая добавка, зарегистрированная под кодом Е-450, является солью пирофосфорной кислоты  $H_4P_2O_7$  и разрешена для использования как стабилизатор. Применение фосфатов может привести к нарушению баланса в организме между фосфором и кальцием. Данных про влияние избыточного количества пирофосфатов в диете беременной самки на экспрессию мРНК BMP2 и остеокальцина в литературных источниках найти не удалось, что и обусловило цель исследования.

**Целью** исследования было изучение влияния на структуру зачатков зубов эмбрионов мышей, которые содержались на диете с повышенным содержанием пирофосфата (пищевой добавки Е-450), определения химического состава и поверхностного слоя эмали зубов двухдневных мышей.

**Материал и методы исследования.** Влияние пищевой добавки изучали на «Модели перегрузки фосфатами». Для опыта были использованы белые беспородные мыши массой 25–28 г (40 животных). Самки контрольной группы получали рацион вивария; самки опытной группы получали корм с повышенным содержанием пирофосфата. Материалом для молекулярно-генетических и морфологических исследований были нижние челюсти 17-дневных эмбрионов (Е-17) мышей, для исследования методом рентген-дисперсионного спектрального анализа служили нижние челюсти двухдневных мышей.

**Результаты исследования.** Результаты определения экспрессии генов BMP2 и остеокальцина в нижней челюсти эмбрионов мышей свидетельствуют о том, что исследуемые гены экспрессируются на приблизительно одинаковом уровне. Пирофосфатная диета не изменяет экспрессию гена BMP2. При этом пирофосфатная диета достоверно увеличивает экспрессию генов остеокальцина. Увеличение экспрессии гена остеокальцина, который обеспечивает минерализацию в тканях зачатка зуба, с одной стороны, может трактоваться как позитивный признак, т. к. отложение апатитов будет более интенсивным у животных с большим количеством белка остеокальцина. Но, с другой стороны, преждевременная минерализация в случае гиперэкспрессии остеокальцина может нарушить рост зуба и в целом процессы одонтогенеза.

**Выводы.** Впервые получены данные про влияние пирофосфатной диеты на уровень экспрессии мРНК ключевых регуляторов остеогенеза – BMP2 и остеокальцина. Влияние пищевой добавки Е-450 в период фолликулярного развития зубов, что приводит к выявленному в эксперименте раннему дентиногенезу, угнетению эктодермальных структур зачатков зубов, в клинике приводит к развитию системной гипоплазии эмали, очаговой деминерализации твердых тканей и в будущем к кариесу.

**Ключевые слова:** экспрессия генов BMP2, остеокальцина, нижняя челюсть эмбрионов мышей, пирофосфатная диета, пищевая добавка Е-450, одонтобласты, эмаль, дентин.

**Effect of diet with increasing pyrophosphate (E-450) gene expression that encode bone morphogenetic protein and osteocalcin in tissues mandible mouse embryos, morphological changes of dental germs in mouse embryos, chemical composition and surface structure**

*I. Yakubova, V. Dosenko, L. Tumanovskaya*

**Summary.** Thanks to the full, balanced and rational mother's nutrition during pregnancy there is a normal course of fetal development processes and the formation of organs and tissues of the mouth of the baby. There is a problem for human health, especially for pregnant women is to add in food preservatives and food dyes. Food supplement, which is registered under the code E-450, is a salt of pyrophosphoric acid  $H_4P_2O_7$  and authorized for use as a stabilizer. The use of phosphates can lead to imbalance in the body between the phosphorus and calcium. Data about the effect of an excessive amount of pyrophosphate in the diet of pregnant females in the literature, we could not find the expression of BMP2 mRNA and osteocalcin, and that led to the goal of the study.

**The aim** of our study was to investigate the influence of the structure of the tooth primordial mouse embryos, which were kept on a diet with a high content of pyrophosphate (food additive E-450), determine the chemical composition and the surface layer of the enamel of the teeth of mice two days.

**Material and methods.** Effect of food supplements studied in «overload phosphates Models». 25–28 g (40 animals) – for the experiment out bred white mice weighing 25 were used. The females of the control group received diet vivarium; females of the experimental group were fed with a high content of pyrophosphate. The material for the molecular genetics and morphological studies were lower jaw 17-day-old embryos (E-17) mice to study the method of X-ray spectral analysis of variance were lower jaw two days of mice.

**Research results.** Results of the determination of gene expression BMP2 and osteocalcin in the mandible of embryos in mice suggest that expression of genes under study at approximately the same level. Pyrophosphate diet does not alter gene expression BMP2. At the same time pyrophosphate diet significantly increases the gene expression of osteocalcin. Increased gene expression of osteocalcin, which provides the mineralization of the tissues of the tooth bud, on the onehand, it can be interpreted as a positive sign, because apatite deposition will be more intense in animals with large amounts of protein osteocalcin. But on the other hand, premature mineralization in the case of over expression of osteocalcin, can disrupt the growth of the tooth and the whole process odontogeneza. First obtained information about the impact of diet on the pyrophosphate level of mRNC expression of bone formation – osteocalcin and BMP2. In the experiment a 17-day-old embryonic mouse germs experimental revealed changes in morphological preparations germs of teeth from the influence of the food additive E-450.

**Conclusions.** In all samples the experimental and control groups were observed structural differences germs of teeth. Influence of food additive E-450 during follicular development of teeth, leading to the detected in the experiment, early development dentin, inhibition of ectodermic structures rudiments of teeth in the clinic led to the development of systemic hypoplasia of enamel, camp fire where the mineralization of hard tissues, and in the future to caries.

**Key words:** bone morphogenetic protein, osteocalcin, mouse embryos, tissues mandible, pyrophosphate, food additive, ameloblast, odontoblast.

*И.И. Якубова – д-р мед. наук, профессор,*

*завідувач кафедри дитячої терапевтичної стоматології та профілактики стоматологічних захворювань, Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет УАНМ».*

*В.Е. Досенко – д-р мед. наук,*

*професор відділу загальної та молекулярної патофізіології, Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України.*

*Л.В. Тумановська – науковий співробітник,*

*відділ загальної та молекулярної патофізіології, Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України*

# R.O.C.S.®

REMINERALIZING ORAL CARE SYSTEMS

Здоровая улыбка  
Вашего ребенка!



### Зубные пасты R.O.C.S.® Kids – мощная защита от кариеса\*

Эффективность зубных паст R.O.C.S.® Kids против кариеса подтверждена в длительном эпидемиологическом исследовании по стандартам ВОЗ

- Формулы на основе пищевых и биосовместимых ингредиентов со фтором и без фтора
- Защищают от кариеса и воспаления десен
- Нормализуют состав микрофлоры полости рта
- Не содержат лаурилсульфат натрия

**РОДИТЕЛИ ДОЛЖНЫ ЧИСТИТЬ ЗУБЫ ДЕТЯМ ВПЛОТЬ ДО 10-ЛЕТНЕГО ВОЗРАСТА**

### Волшебные зубные щетки R.O.C.S.® Kids

- Разработаны при участии стоматологов, специально для детей в возрасте от 3 до 7 лет
- Экстрамягкая щетина
- Безопасная система чистки зубов
- Ручка из высококачественного и безопасного пластика PET
- Фигурка каждого из героев на ручке

**Уникальный гель для укрепления зубов R.O.C.S.® Medical Minerals для детей и подростков со вкусом клубники.** Прост в применении, безопасен при проглатывании, подходит детям с первого зуба!

- Профилактика кариеса\*
- Эффективен при кариесе в стадии белого пятна\*
- Осветляет\* и возвращает блеск эмали
- Позволяет существенно улучшить внешний вид зубов при флюорозе\*
- Снимает повышенную чувствительность зубов\*
- Позволяет восстановить внешний вид зубов после лечения брекет-системами\*
- Нормализует состав микрофлоры полости рта
- Необходим для защиты зубов тем, кому применение средств, содержащих фтор, нежелательно (например, при заболеваниях щитовидной железы, почечной недостаточности и почечнокаменной болезни)

\* Доказано клинически

Представительство ТМ «R.O.C.S.» в Украине:  
ООО «ВДС Фарма», Украина, 01021, г. Киев,  
ул. Институтская, д.15/5, оф 52,  
тел.: +38 044 253 23 20, e-mail: info@rocs.ru

www.rocs.ua



Товар сертифицирован. На правах рекламы



WVDS  
LABORATORIES