

**ВПЛИВ ДІЄТИ ІЗ ЗБІЛЬШЕНИМ ВМІСТОМ *CHOLESTEROL* НА
МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЗАЧАТКІВ ЗУБІВ ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, ЩО
КОДУЮТЬ *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN – 2* ТА *OSTEOCALCIN* В
ТКАНИНАХ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ЕМБРІОНІВ МИШЕЙ**

Приватний вищий навчальний заклад «Київський медичний університет УАНМ» (м. Київ)

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук є фрагментом комплексної науково-дослідної теми кафедри терапевтичної стоматології спільно з кафедрою дитячої терапевтичної стоматології та профілактики стоматологічних захворювань Приватного вищого навчального закладу «Київського медичного університету УАНМ» «Використання біологічно-активних речовин і гомеопатичних препаратів у комплексному лікуванні карієсу та його ускладнень, захворювань пародонту та слизової оболонки порожнини рота» (державний реєстраційний номер РК № 0106UO13099).

Вступ. Повноцінне, раціональне і збалансоване харчування матері під час вагітності забезпечує нормальний перебіг процесів внутрішньоутробного розвитку плоду [3, 16, 17, 17, 29, 31] і є базисом для формування органів і тканин порожнини рота у малюка [20]. Кількісний та якісний склад надходження продуктів харчування до організму вагітної визначає процеси мінералізації та демінералізації, формує стійкість або схильність до карієсу потомства [28]. Відомо, що найбільші недоліки в харчуванні притаманні жінкам фертильного віку, які мають найбільший ризик виникнення захворювань аліментарного та аліментарнозалежного генезу [7]. Незбалансоване і нерациональне харчування вагітної жінки збільшує ризик виникнення карієсу зубів у майбутньої дитини [4, 6, 13, 15] шляхом формування низької карієсрезистентності тканин зуба у плода [14], незрілості та гіпоплазії емалі у малюка [10], і, як наслідок, призводить до карієсу тимчасових зубів у дітей [13, 21].

Аналіз структури харчування раціонів різних груп населення, які проводилися протягом 2006 – 2010 років, свідчать, що найбільші порушення в харчовому статусі – це дефіцит макро- та мікроелементів (заліза, кальцію, фтору, йоду, селену), вітамінів (особливо антиоксидантного ряду), харчових волокон, повноцінних тваринних білків і надмірне споживання тваринних жирів і вуглеводів [2]. Постійним компонентом жирових продуктів є холестерин. Холестерин (синоним *Cholesterol*¹) – органічна сполука, природний жирний (ліпофільний) спирт, що міститься в

клітинних мембранах усіх живих організмів за винятком безядерних (прокаріот) [5]. Джерелом харчового холестерину є продукти тваринного походження, зокрема м'ясо, молоко та продукти його переробки (у тому числі і сири), жовтки яєць, вершкове масло, яловичий жир, сметана, мозок тварин [0, 11]. Надмірне споживання з їжею підвищеної кількості холестерину, призводить до збільшення його рівня в крові [5].

Вплив чинників харчування матері на формування зубів у дітей достатньо добре вивчений, проте робіт з вивчення механізмів порушень закладки зубів і їх мінералізації практично не має. Особливий інтерес складають дослідження по вивченню експресії генів, білкові продукти яких мають ключове значення в зазначених процесах на усіх стадіях одонтогенезу. Серед вказаних генів велика увага приділяється кістковому морфогенетичному протеїну, який кодується геном *BMP – 2*, та остекальцину (ген – *Bglap*), що є визначальним чинником кальцифікації зачатку зуба [23, 30, 36].

Показано, що білок *BMP – 2*, що є ростовим чинником для клітин зачатку зуба [25], запускає диференціацію фолікулярних клітин в цементобласти / остеобласти [20], зумовлює проліферацію й дозрівання остеобластів. Вказаний ефект білку *BMP – 2* забезпечується активацією експресії цілого ряду генів (колаген I типу, остеоонектин, дентиновий сіалофосфопротеїн, нестин) в клітинах пульпи зуба [18]. В свою чергу, експресія гену *BMP – 2* знаходиться під контролем гормону росту (соматотропного гормону) ті інсуліноподібного фактору росту-1, що здатні підвищувати експресію гену *BMP – 2* в 4 – 5 разів в фибробластах пульпи зуба людини *in vitro* [27]. Також диференціювання клітин емалевого органа регулюється факторами росту, зокрема, трансформуючим фактором росту – α (ТФР- α) і епідермальним фактором росту (ЕФР) [9]. Білок *BMP – 2*, що активує рецептори остеобластів на поверхні клітин зародку зуба, стимулює проліферацію мезенхімальних клітин пульпи зуба із подальшою диференціацією в одонтобласти, що забезпечує утворення остеодинтину та тубулярного дентину [27]. Під час

¹В 1859 році Марселен Бертло довів, що холестерин належить до класу спиртів, після чого французи перейменували холестерин в «Cholesterol». В ряді мов (українській, російській, німецькій, угорській тощо) збереглася стара назва – холестерин.

розвитку зуба білок *BMP-2* спочатку експресується в епітеліальних клітинах (до 13 дня ембріонального розвитку мишей), а на більш пізніх стадіях розвитку зуба його експресія зсувається до мезенхімальних клітин зубного сосочку і запускає більш інтенсивний дентиногенез. Таким чином, білок *BMP-2* визначає «долю» дентальних мезенхімальних клітин при формуванні зуба [19].

Одонтобласти також виробляють кальцій зв'язуючі білки – остеокальцин і остеоонектин, які експресуються як в дентині, так і в кістці [9]. Білок остеокальцин відноситься до протеїнів, що містить три залишки γ -карбоксиглутаминової кислоти, яка зв'язує вільний кальцій та запобігає утворенню апатитів. Остеокальцин є вітамін-К-залежним матриксним протеїном, що може зв'язуватися з гідроксиапатитами. Він синтезується одонтобластами дентину і є визначальним фактором мінералізації сполучної тканини зуба [34].

Даних про вплив гіперхолестеринемії на експресію *BMP-2* і остеокальцину є достатньо багато [24]. Найбільш показові дані отримані опосередковано, через дослідження впливу статинів (відомих гіперхолестеринемічних агентів) на процеси кальцифікації та осифікації. В багатьох епідеміологічних дослідженнях встановлено, що статини збільшують мінеральну щільність кістки та зменшують ризик переломів кісток [35]. Статини можуть прямо стимулювати експресію *BMP-2* та диференціацію остеобластів, одночасно пригнічуючи активність остеокластів та апоптоз остеобластів [24]. На жаль, ці дані не дозволяють отримати пряму відповідь на питання про роль гіперхолестеринемії у розвитку зуба, проте зниження рівня холестерину під впливом статинів, може говорити про те, що підвищений рівень холестерину може негативно впливати на експресію *BMP-2* та мінеральну щільність кістки в цілому. *D. L. Franklin* [26] показано, що одонтобласти на ранніх стадіях розвитку містять холестерину значно менше, ніж повністю диференційовані клітини. Вміст та розподіл холестерину суттєво впливає на текучість клітинної мембрани одонтобласту, а низький вміст холестерину в низько диференційованих одонтобластах забезпечує відпочковування матричних везикул, необхідних для формування зуба [26]. Ще раніше [22] було отримано аналогічні дані: вміст холестерину є значно більшим в постійних зубів порівняно з зубами, що формуються.

Рівень остеокальцину в сироватці крові також залежить від концентрації холестерину – у людей з гіперхолестеринемією та підвищеним вмістом цукру в крові (метаболічний синдром) вміст остеокальцину знаходиться на нижчому рівні [33]. Гіперхолестеринемічні препарати (розувастатин) збільшують сироватковий рівень остеокальцину, щоправда цей ефект не залежить від зниження рівня холестерину [32].

Виходячи з наведених даних, **метою нашого дослідження** було вивчення структури зачатків зубів ембріонів мишей та експресії матричної РНК *BMP-2* і остеокальцину в тканинах нижньої щелепи

ембріонів мишей, народжених тваринами, які знаходилися протягом 30 днів до запліднення та протягом усієї вагітності на дієті із збільшеним вмістом *Cholesterol*.

Об'єкт і методи дослідження. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Для експерименту були використані білі безпородні миші масою 25 – 28г (40 тварин). Тварин поділили на 2 групи: контрольну і дослідну.

Експериментальну гіперхолестеринемію (2%) моделювали додаванням в харчовий раціон *Cholesterol* протягом 60 днів [8, 12]. Миші дослідної групи отримували раціон віварію із додаванням 2гр. *Cholesterol* (виробництва фірми *Merck, Germany*) на 100 гр. корму. Миші контрольної групи отримували раціон віварію. Через 30 днів самкам, які знаходилися в стадії проеструса (передтічка) і еструса (тічка) підсаджували самців у співвідношенні 4:1. Виявлення спермій у вагінальному мазку самки після підсадки вказувало на запліднення – перший день вагітності. Протягом усієї вагітності самки знаходилися в клітках і отримували раціон віварію (контрольна група) і раціон віварію із підвищеним вмістом *Cholesterol* (дослідна група). Вагітних мишей у кількості по 6 тварин із кожної групи виводили із експерименту інгаляційним передозуванням вуглекислого газу на 17-й день вагітності. Матеріалом для дослідження слугували нижні щелепи 17 денних ембріонів (17-Е) мишей.

Для морфологічних досліджень нижні щелепи ембріонів фіксувалися в 2% глютаральдегіді на кальцилатному буфері, після чого була проведена декальцинація з подальшою постфіксацією в 1% оксиді осмію та заливкою матеріалу в епоксидні смоли. Напівтонкі зрізи фарбували метиленовим синім, що дозволяло вирізняти мезенхімальні та епітеліальні тканини. Виготовляли морфологічні зрізи товщиною 10 – 15 мкм. Дослідження проводили на мікроскопі *Nicon Eclipse E200*, фотографували за допомогою *Nicon DS-F11*. Для описання використовували мікрофотографії збільшенням $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$, як найбільш показові.

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

проводили із застосуванням методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням наступних праймерів:

BMP2 Up: 5'-GTGGAGGAACTTCCAGAGATGA-3',

BMP2 Dw: 5'-CTGCAGATGTGAGAACTCGTC-3',

Osteocalcin Up:

5'-CAGGAGGGCAATAAGGTAGTGA-3', *Osteocalcin*

Dw: 5'-CAGGGTTAAGCTCACACTGCTC-3'.

ПЛР-ампліфікація проводилась у 20 мкл *SYBR Green PCR Master Mix*, що містив 25 рМ кожного праймеру. Програма ампліфікації починалася із попередньої активації *AmpliTaq Gold®* ДНК-полімерази протягом 10 хв. при 95°C та складалася з 50 циклів: денатурація – 95°C, 15 с, приєднання праймерів та елонгація – 60°C, 1 хв (або 61°C, 1 хв для оцінки експресії гена остеокальцину). Для контролю за специфічністю флуоресценції продуктів реакції проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 60 (61) до 94°C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з *SYBR Green*. Аналіз отриманих даних проводився за допомогою *7500 Fast Real-time PCR Software*.

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 досліджень та їх обговорення. Результати визначення експресії генів *BMP – 2* та остеокальцину в нижній щелепі ембріонів мишей свідчать про те, що досліджені гени експресуються на приблизно однаковому рівні – відносний рівень мРНК *BMP – 2* / мРНК актину становив $27,0 \pm 2,82$, а остеокальцину – $30,5 \pm 6,28$. В щелепах тварин дослідної групи рівень експресії *BMP – 2* мав тенденцію до збільшення і становив $30,9 \pm 5,81$ ($P = 0,53$). При цьому рівень експресії остеокальцину, навпаки, знижувався на 22,3% і становив $23,7 \pm 5,31$.

Аналіз отриманих даних дозволяє припустити, що гіперхолестеринова дієта певною мірою змінює експресію генів *BMP – 2* та остеокальцину, при чому ці зміни є різноспрямованими. Виходячи з функції *BMP – 2*, як ключового чинника диференціації одонтобластів [20], можна вважати, що збільшення його експресії буде прискорювати одонтогенез. При цьому, зниження експресії гену остеокальцину, що забезпечує мінералізацію в тканинах зачатку зуба, може призвести до недостатності насичення гідроксиапатитами твердих тканин зуба, що формується і як наслідок прорізування зубів із зниженим рівнем мінералізації.

Проведені нами морфологічні дослідження тканин зачатків зубів ембріонів мишей, які до і під час вагітності отримували раціон віварію із додаванням *Cholesterol*, показали порушення морфогенезу зубів.

В контрольній групі амелобласти утворювали рівномірний шар з чіткою поляризацією, на апікальній частині циліндричних клітин розрізнялись звужені ділянки – відростки Томса (*Tomes' process*), ключеві

структури, що відповідають за секрецію матриксу емалі, наявність яких свідчить про високу диференціацію амелобластів і відповідає секреторній стадії (*secretory stage*) розвитку цих клітин. Функціональна активність шару амелобластів відображалась наявністю чітко вираженої насичено-темної смужки між дентином та амелобластами, що морфологічно відповідає емалі зуба.

При збільшенні $\times 40$ в контрольній групі відслідковувалось формування рівномірного прошарку одонтобластів, які приймали циліндричну форму, розташувались паралельно і утворювали відростки в предентинному шарі. Дентин та предентин мали вигляд двох щільно з'єднаних, але рівномірно розмежованих полос, що відрізняються по забарвленню приблизно на один тон – предентин світліший, дентин – темніший. Коли шар предентину досягає товщини 40-80 мкм, він відтісняється на периферію новоутвореними шарами предентину, в якому волокна мають інший напрямок – вони розташовані паралельно поверхні зубного сосочка. У подальшому ці внутрішні шари дентину, багаті на тангенціальні волокна, утворюють припульпарний дентин у сформованому зубі, а радіальні волокна, що лежать у зовнішніх шарах дентину, який утворився першим, – плащовий дентин.

При збільшенні $\times 100$ в контрольній групі відслідковується рівномірний розподіл дентину та предентину смугами на світліший та темніший. Спостерігається вища диференціація клітин як одонтобластів, так і амелобластів. Амелобласти мають циліндричну форму із вираженими стоншеннями в апікальній частині, чіткість розташування та рівномірність розподілу шарів клітин дозволяють зробити висновок про високу диференціацію та послідовність функції всіх клітин.

В дослідній групі при збільшенні $\times 10$ визначається потовщення шару одонтобластів, амелобластів та клітин зовнішнього емалевого епітелію за рахунок збільшення кількості клітин, які в більшості своїй не виявляють ознак диференціації – на переважній протяжності зачатку зуба відмічається рання стадія дозрівання.

При збільшенні $\times 20$ на ділянці, що відповідає переходу із ранньої стадії дозрівання у пізню стадію дозрівання визначається розширення шару дентину та предентину, що може свідчити про підвищену активність розширеної зони одонтобластів. Класично предентин та дентин на препаратах візуально відмежовуються лінією і відрізняються за кольором на півтону, це пов'язано із різною мінералізацією даних видів твердих тканин. В даному дослідженні не спостерігається чіткої лінії переходу дентину в предентин, та розширення зони предентину по відношенню до дентину, що вказує на невідповідність швидкості процесів мінералізації дентину по відношенню до його утворенню.

Цікавим є те, що вже при збільшенні $\times 40$ в деяких зразках спостерігалось нерівномірне хвилеподібне утворення дентинового прошарку. При чому дане спостереження не являлося артефактом, так як при

збільшенні даної зони x100 чітко простежувався рівний шар зовнішнього емалевого епітелію, та відповідно до зигзагоподібного вгинання розташування клітин одонтобластів. З чим пов'язане зигзагоподібне утворення твердих тканин зуба достовірно не відомо, є припущення, що це відбулося внаслідок впливу дієти із надлишковим вмістом *Cholesterol*.

Дослідження патогістологічних змін в зачатках зубів нижньої щелепи 17 денних ембріонів мишей дозволили співставити генетичні зміни із патоморфологічними та встановити функціональне значення змін експресії вивчених генів.

Висновки. Таким чином, нами вперше отримані дані про вплив дієти із надлишковим (2%) вмістом *Cholesterol* на рівень експресії мРНК ключових регуляторів остеогенезу – BMP – 2 та остеокальцину. В експерименті на препаратах зачатків зубів 17 денних ембріонів мишей виявлено значні морфологічні зміни, які свідчать про виражену функціональну дисфункцію амелобластів та одонтобластів.

Перспективами подальшого дослідження є виявлення впливу *Cholesterol* при клінічному спостереженні дітей від народження до двох років.

Автор висловлює подяку

Андрію Олександровичу Рудовському, завідувачу експериментально-біологічної клініки Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України за підтримку лабораторних робіт;

Віктору Євгеновичу Досенку, доктору мед. наук, професору відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України за підтримку генетичних досліджень;

Лесі В. Тумановській, науковому співробітнику відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України за консультативну допомогу при описанні морфологічних препаратів;

Ігорю Івановичу Сидоренку канд. мед. наук, доценту кафедри патоморфології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця за консультативну допомогу при проведенні морфологічних досліджень.

Список літератури

1. Анохина Г. А. Питание беременных, рожениц и кормящих матерей / Г. А. Анохина. – Киев, 2002. – С. 3-14.
2. Григоренко О. М. Наукові підходи до формування раціонів харчування студентів / О. М. Григоренко // Зб. наук. пр. «Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі»: Вип. 2 (10). – Х.: ХДУХТ, 2009. – С. 210-218.
3. Доценко В. А. Питание при беременности / В. А. Доценко, Е. А. Островская. СПб., 2003. – 224 с.
4. Кирсанова Л. А. Сбалансированное питание: для беременных и кормящих / Л. А. Кирсанова. – М.: Центрполиграф, 2007. – 155 с.
5. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. -Г. Рем: пер. с нем. – 4-е изд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. – 469с.
6. Мальцева Н. А. Особенности первого триместра беременности у женщин с нарушением жирового обмена: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.00.01 «Акушерство и гинекология» / Н. А. Мальцева. – М., 2008. – 24 с.
7. Матасар І. Т. Гігієнічна оцінка стану харчування працездатного населення в сучасних екологічних умовах: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.02.01 – «Гігієна» / І. Т. Матасар. – К., 2001. – 40 с.
8. Моделирование атерогенной гиперлипидемии у кроликов / [Демидова М. А., Волкова О. В., Егорова Е. Н., Савчук И. А.] // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – №3. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.science-education.ru/97-4689>.
9. Пикалюк В. С. Онто-, філогенез органів і систем. / В. С. Пикалюк, А. Ю. Османов. – Сімферополь, 2011. – 312 с.
10. Справочник по детской стоматологии / под ред. А. С. Cameron, R. P. Widmer; перевод с англ. под ред. Т. Ф. Виноградовой, Н. В. Гинали, О. З. Топольницкого. – М.: МЕДпресс-информ, 2003. – С. 154-155.
11. Справочник по диетологии / под ред. В. А. Тутельяна, М. А. Самсонова. – М.: Медицина, 2002. – 544 с.
12. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
13. Стоматология детей и подростков / под ред. Р. Е. МакДональда, Д. Р. Эйвери; пер. с англ. под ред. Т. Ф. Виноградовой. – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 766 с.
14. Сунцов В. Г. Стоматологическая профилактика у детей / [Сунцов В. Г., Леонтьев В. К., Дистель В. А., Вагнер В. Д.] – Москва: Мед. книга; Н. Новгород: НГМА, 2001. – 344 с.
15. Терапевтическая стоматология детского возраста / [Хоменко Л. А., Чайковский Ю. Б., Савичук А. В. и др.]; под ред. Л. А. Хоменко – К.: Книга плюс, 2007. – С. 7-29.
16. Тутельян В. Я. Рациональное питание беременных и кормящих грудью / В. Я. Тутельян, В. А. Самсонова // Акушерство и гинекология. – 2002. -№2. – С. 71-75.
17. Хорошилов И. Е. Новые подходы в лечебное питание беременных и кормящих женщин / И. Е. Хорошилов. – СПб., 2003. – 55 с.
18. 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.
19. Bone Morphogenetic Protein 2 Mediates Dentin Sialophosphoprotein Expression and Odontoblast Differentiation via NF- κ B Signaling / [Chen S., Gluhak-Heinrich J., Martinez M., et al.] // Journ. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, №28 (July 11). – P. 19359-19370.
20. 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.

21. 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.] // *Community Dent. Oral Epidemiol.* – 2000. – Vol. 28, №4 (Aug). – P. 295-306.
22. Dental pulp lipids from *Bos taurus* during odontogenesis / [Antonucci A., Toto N., Di Valerio V., D'Onofrio P.] // *Arch Oral Biol.* – 1991. – Vol. 36, № 12. – P. 919-922.
23. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation / [Casagrande L., Demarco FF, Zhang Z., et al.] // *Journ. Dent. Res.* – 2010. – Vol. 89, №6 (Jun.). – P. 603-608.
24. Edwards Ch. J. Statins as modulators of bone formation / Edwards Ch. J., Spector T. D. // *Arthritis Res.* – 2002. – №4. – P. 151-153.
25. Epigenetic signals during odontoblast differentiation / [Lesot H., Lisi S., Peterkova R., et al.] // *Adv. Dent. Res.* – 2001. – № 15 (Aug). – P. 8-13.
26. Franklin D. L. Cholesterol in the distal portions of differentiating and fully differentiated rat odontoblasts observed by freeze-fracture / Franklin D. L., Arana-Chavez V. E., Katchburian E. // *Arch. Oral Biol.* – 1994. – Vol. 39, №9 (Sep). – P. 817- 819.
27. 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.
28. Healthy nutrition / [James W. P. T., Ferro-Luzzi A., Isakson B., Szostak W. B.] // *WHO Region. Public. Europ. Ser.* – 1998. – № 24. – 124 p.
29. Kandelman D. Prevention of Early Childhood Caries (ECC) / D. Kandelman, N. Ouatik // *Journ. De l'Ordre des dentistes du Quebec.* – 2006. – Apr. (Sup.). – P. 3-5.
30. Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification / A. Linde // *Anat. Rec.* – 1989. – Vol. 224, № 2 (Jun.). – P. 154-66.
31. Porangannel L. Establishing a dental home: A program for promoting comprehensive oral health starting from pregnancy through childhood / L. Porangannel, KC. Titley, GV. Kulkarni // *Oral health.* – 2006. – Vol. 96, № 1. – P. 3 – 4.
32. Rosuvastatin increased serum osteocalcin levels independent of its serum cholesterol-lowering effect in patients with type 2 diabetes and hypercholesterolemia / [Kanazawa I., Yamaguchi T., Yamauchi M., Sugimoto T.] // *Intern. Med.* – 2009. – Vol 48, № 21. – P. 1869-1873.
33. Serum osteocalcin concentrations in relation to glucose and lipid metabolism in Chinese individuals / [Zhou M., Ma X., Li H., et al.] // *Eur. Journ. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 161, №5 (Nov). – P. 723-729.
34. 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.
35. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins / [Mundy G., Garrett R., Harris S., et al.] // *Science.* – 1999. – № 286. – P. 1946-1949.
36. Wise G. E. Cellular and molecular basis of tooth eruption / G. E. Wise // *Orthod. Craniofac. Res.* – 2009. – Vol. 12, № 2 (May). – P. 67-73.

УДК 616.314-611.013.38:611.018

ВПЛИВ ДІЄТИ ІЗ ЗБІЛЬШЕНИМ ВМІСТОМ *CHOLESTEROL* НА МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЗАЧАТКІВ ЗУБІВ ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ КІСТКОВИЙ МОРФОГЕНЕТИЧНИЙ ПРОТЕЇН ТА ОСТЕОКАЛЬЦИН В ТКАНИНАХ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ЕМБРІОНІВ МИШЕЙ.

Якубова І. І.

Резюме. Результати визначення експресії генів *BMP2* та остеокальцину в нижній щелепі 17 денних ембріонів мишей свідчать про те, що досліджені гени експресуються на приблизно однаковому рівні. Дієта із підвищеним вмістом *Cholesterol* (2%) певною мірою змінює експресію генів *BMP2* та остеокальцину, при чому ці зміни є різноспрямованими. Виходячи з функції *BMP2*, як ключового чинника диференціації одонтобластів, можна вважати, що збільшення його експресії буде прискорювати одонтогенез. При цьому, зниження експресії гену остеокальцину, що забезпечує мінералізацію в тканинах зачатку зуба, може призвести до недостатності насичення гідроксиапатитами твердих тканин зуба, що формується і як наслідок прорізування зубів із зниженим рівнем мінералізації. Вперше отримані дані про вплив холестеринової дієти на рівень експресії мРНК ключових регуляторів остеогенезу – *BMP2* та остеокальцину. Також виявлено зміни у морфологічних препаратах зачатків зубів від впливом *Cholesterol*. В усіх зразках дослідної і контрольної груп спостерігалися структурні відмінності зачатків зубів. Так, низький рівень та нерівномірність диференціації та структуризації клітин, зниження продукції емалі амелобластами, структурні зміни в утворенні емалі – значно тонший та нерівномірний шар в порівнянні із контрольною групою, дезорганізація дентинового прошарку, дезорієнтованість одонтобластів по відношенню до амелобластів свідчать про негативний вплив *Cholesterol* на неонатальний розвиток зубів.

Ключові слова: експресія генів *BMP2*, остеокальцину, нижня щелепа ембріонів мишей, дієта із підвищеним вмістом *Cholesterol*, знижений рівень мінералізації.

УДК 616.314-611.013.38:611.018

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ *CHOLESTEROL* НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗАЧАТКОВ ЗУБОВ И ЭКСПЕРРЕССИЮ ГЕНОВ, КОТОРЫЕ КОДИРУЮТ КОСТНЫЙ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОТЕИН И ОСТЕОКАЛЬЦИН В ТКАНЯХ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ.

Якубова И. И.

Резюме. Результаты определения экспрессии генов *BMP2* и остеокальцина в нижней челюсти эмбрионов мышей свидетельствуют о том, что исследуемые гены экспрессируются на приблизительно одинаковом уровне. Гиперхолестериновая диета изменяет экспрессию генов *BMP2* и остеокальцина, при этом эти изменения являются разнонаправленными. Исходя из функции *BMP2*, как ключевого фактора дифференциации одонтобластов, можно считать, что увеличение его экспрессии будет ускорять одонтогенез. При этом, снижение экспрессии гена остеокальцина, который обеспечивает минерализацию в тканях зачатка зуба, может привести к недостаточности насыщения гидроксипатитами твердых тканей зуба, который формируется и как следствие прорезывания зубов со сниженным уровнем минерализации. Впервые получены данные про влияние холестериновой диеты на уровень экспрессии мРНК ключевых регуляторов остеогенеза – *BMP2* и остеокальцину. В эксперименте на 17-тидневных зародышах экспериментальных мышей выявлены изменения в морфологических препаратах зачатков зубов под воздействием *Cholesterol*. Во всех образцах опытной и контрольной групп наблюдались структурные различия зачатков зубов. Так, низкий уровень и неравномерность дифференциации и структурирования клеток, снижение продукции эмали амелобластами, структурные изменения в образовании эмали – значительно тоньше и неравномернее слои по сравнению с контрольной группой, дезорганизация дентиновой прослойки, дезориентированность одонтобластов в отношении амелобластов свидетельствуют о негативном влиянии *Cholesterol* на неонатальное развитие зубов.

Ключевые слова: экспрессия генов *BMP2*, остеокальцина, нижняя челюсть эмбрионов мышей, диета с повышенным содержанием *Cholesterol*, сниженный уровень минерализации.

UDC 616.314-611.013.38:611.018

Effect Of Diet With Increasing Cholesterol Of Morphological Changes Rudiments Of Teeth And Gene Expression That Encode Bone Morphogenetic Protein And Osteocalcin In Tissues Mandible Mouse Embryos Yakubova Inessa I.

Summary. Results of determination of gene expression *BMP2* and osteocalcin in the lower jaw 17 day mouse embryos suggests that investigated genes expressed at approximately the same level. A diet with a high content *Cholesterol* (2%) somewhat alters gene expression *BMP2* and osteocalcin, and these changes are multi-directional. Based on the features *BMP2* as a key factor differentiating odontoblast, we can assume that the increase in its expression will accelerate odontogenesis. Thus, reduced expression of osteocalcin gene that provides mineralization in the tissues of the tooth bud, can lead to a lack of saturation of hydroxyapatite dental hard tissue, formed as a result of teething with low mineralization level. First findings on the impact of diet on cholesterol levels of mRNA expression of key regulators of osteogenesis – *BMP2* and osteocalcin. In the experiment a 17-day-old embryonic mouse germs experimental revealed changes in morphological preparations germs of teeth from the influence of the *Cholesterol*. In all samples the experimental and control groups were observed structural differences germs of teeth. Thus, low and uneven differentiation and structuring cells, decreased production of enamel ameloblast, structural changes in enamel formation – much thinner and uneven layer compared with the control group, no layer of dentin, odontoblast has no orientation in relation to ameloblast indicate negative impact of *Cholesterol* in neonatal development of teeth.

Key words: bone morphogenetic protein, osteocalcin, mouse embryos, tissues mandible mouse embryos, tissues mandible, *Cholesterol*.

Стаття надійшла 28.09.2012 р.

Рецензент – проф. Каськова Л. Ф.