

УТВЕРЖДАЮ

Директор
федерального государственного
бюджетного учреждения
«Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
член-корреспондент РАН,
д.м.н., профессор
С.Г. Морозов



« 11 »

2017 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» о научно-практической значимости диссертации Островской Ирины Геннадьевны «Роль белков и пептидов в обеспечении резистентности тканей комплекса пульпа-периодонт при воздействии различных факторов», представленной в диссертационный совет Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа И.Г. Островской посвящена изучению растворимых белков и пептидов пульпы зуба с целью установления их потенциального участия в регенеративных процессах. Полученные данные могут быть использованы для создания новых клинических методов лечения, направленных на восстановление комплекса пульпа-периодонт.

В настоящее время проведенные протеомные исследования пульпы зуба человека и животных позволили определить различные группы белков и пептидов с разными биологическими свойствами, однако их функциональная активность при воздействии различных экзогенных и эндогенных факторов, способных в определенных условиях вызывать патологические процессы, не установлена. Продолжение исследования белкового спектра пульпы зуба

важно для установления причины и наблюдения за динамикой заболевания зубов на всех этапах развития и старения человека. Было показано, что все белки подвержены изменениям в зависимости от клеточных взаимодействий во время роста и развития организма. Выявлено изменение их молекулярной структуры при развитии ряда заболеваний, в ответ на лекарственную терапию или физическую активность, а также на любые другие изменения факторов окружающей среды (диета, температура, и т.д.).

Изученные белково-пептидные маркеры в пульпе зуба позволили разделить их на прогностические и предиктивные для ранней диагностики повреждения зуба.

Связь с планом научных исследований

Настоящая работа выполнена на кафедре биохимии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова».

Новизна исследования и полученных результатов

Впервые были получены результаты, отражающие сходную и специфичную реакцию дентино-пульпарного комплекса временных и постоянных зубов человека на воздействие факторов внешней и внутренней среды. Диссертантом И.Г. Островской было показано, что при воспалении в пульпе временных и постоянных зубов человека изменяется количественный и качественный состав белков и пептидов. Автором установлено, что пульпа постоянных зубов для обеспечения сохранения жизнеспособности клеток обладает большим количеством белков и пептидов, участвующих в иммунной реакции и фосфорно-кальциевом обмене, а клетки пульпы временных зубов запрограммированы на самоуничтожение, о чем свидетельствуют выявленные в ней высокие значения белков-маркеров апоптоза и остеокласт-активирующего фактора. На основании комплексного анализа изученных показателей автором было показано, что в пульпе постоянных зубов воспалительный процесс складывается из нескольких взаимосвязанных реакций – альтерации, экссудации, фиброза и некроза с

последующим распространением в тканях периодонта; в пульпе временных зубов при воспалении отсутствует стадия фиброза, которая соответствует состоянию ремиссии, и полученные показатели белков сходны с острой воспалительной реакцией. Было выявлено, что наибольшим потенциалом к восстановлению обладает пульпа постоянных зубов с легкой степенью гиперемии при развитии глубокого кариеса. Установлены принципиальные отличия метаболизма пульпы временных и постоянных зубов от тканей живого организма, которые выражаются в крайне низкой активности ферментов антиоксидантной защиты как в условиях нормы, так и при воспалении. Впервые установлена роль ряда белков и пептидов в пульпе временных зубов в период резорбции корня зуба при воспалении. Важнейшим достижением диссертационной работы является то, что состояние пульпы, изолированной от внешней среды, можно оценить по активности трансаминаз в десневой жидкости. По показателям десневой жидкости было установлено, что при лечении пульпита временных зубов наибольшим противовоспалительным эффектом обладает паста, содержащая оксид кальция и борнеол, которая позволила сохранить жизнеспособность корневой пульпы до завершения формирования корня зуба. Методики по применению показателей десневой жидкости для оценки состояния пульпы временного зуба при воспалении и в динамике лечения пульпита были защищены патентами.

На экспериментальной модели травмы тканей полости рта и приложения сил натяжения на зуб была оценена реакция клеток пульпы зуба по активности щелочной фосфатазы и белков, участвующих в фосфорно-кальциевом обмене. Автор изучал также по активности лизосомальных ферментов в пульпе резцов крыс концепцию влияния высокосахарозной диеты и селена. Выявлено, что субтоксические дозы сахарозы и селена в пульпе зуба у молодых крысят существенно влияют на ограниченный протеолиз. Описано влияние селективного ингибитора синтеза карнитина на функциональную активность показателей антиоксидантной системы и

белков, участвующих в энергетическом обмене на пульпу резцов крыс. И.Г. Островская показала, что энергообеспечение клеток пульпы происходит не только за счет распада глюкозы, но и окисления жирных кислот, а ингибирование синтеза карнитина сопровождается усилением свободнорадикального окисления. Получены новые данные о влиянии длительной и краткосрочной иммобилизации, действии экзогенного мелатонина и селективного ингибитора толл-подобного рецептора 4 на метаболизм пульпы резцов животных. Проведенные автором экспериментальные исследования установили выраженную реакцию клеток пульпы зуба на изменяющиеся условия внешней и внутренней среды.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации**

Автором были проведены экспериментальные исследования с использованием большого количества биологического материала - 980 образцов пульпы резцов крыс и 539 образцов пульпы зуба человека. В настоящей диссертационной работе были применены современные методы исследования. Для биохимического исследования в биоптатах пульпы зубов человека и резцов крыс, а также в элюатах десневой жидкости человека диссертантом было изучено 34 показателя, для определения которых им применялись методы спектрофотометрии, турбодиметрии, иммуноферментного анализа. В работе было проведено электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле. Экспериментальные исследования на животных выполнены с моделированием различных условий. В части эксперимента были проведены морфологические исследования пульпы резцов крыс.

Методы компьютерной обработки полученных материалов заключались в применении электронной сканирующей микроскопии, анализа гелей и денситометрирования дорожек, построения калибровочных графиков, статистических отчетов с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0, Microsoft Excel.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований. Методы получения данных и статистического анализа соответствуют поставленной цели и задачам исследования и не вызывают сомнений в достоверности полученных результатов, разработанных положений, выводов и практических рекомендаций. В исследовании использован большой объем отечественных и зарубежных литературных источников.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Научная новизна настоящего исследования состоит в формировании нового теоретико-методологического подхода по изучению реакции пульпы зуба на воздействие различных факторов. Диссертантом И.Г. Островской был разработан концептуальный подход и соответствующая методология комплексной оценки, которые носят инновационный характер в контексте совершенствования диагностики и лечения патологий пульпы зуба. Значимыми элементами научного вклада являются следующие результаты проведенного исследования:

- по своему белково-пептидному составу и обменным процессам пульпа постоянных зубов человека отличается от пульпы временных зубов, что определяет её резистентность при развитии патологии;
- пульпа резцов крыс при создании модельных условий может быть экстраполирована на человека, но с учетом имеющихся различий по количественному и качественному составу белков и пептидов;
- десневая жидкость может выступать в качестве диагностического объекта для оценки состояния пульпы зуба;
- пульпа зуба реагирует на воздействие биологических, химических и физических факторов изменением активности ферментов, количества белков и пептидов, что позволит применять существующие способы для оценки её потенциала.

Выполненная диссертация демонстрирует высокий уровень сформулированных научных положений, выводов и рекомендаций.

Предлагаемые И.Г. Островской рекомендации позволяют выделить приоритетные направления по модернизации диагностики пульпы зуба, определяя, таким образом, теоретическую и практическую значимость выполненной работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Для обеспечения эффективной реализации в практическое здравоохранение автором предложены значимые рекомендации по внедрению методов диагностики жизнеспособности пульпы зуба в условиях патологии, разработке модели диагностики с использованием десневой жидкости, которые используются в работе поликлиник стоматологического профиля. Результаты исследования могут найти применение в деятельности клинических центров стоматологии, использоваться в учебном процессе высших учебных заведений, в преподавании дисциплин при подготовке специалистов стоматологического профиля.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования И.Г. Островской внедрены в работу взрослого и детского терапевтического отделения Клинического центра стоматологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства Здравоохранения РФ, используются в учебном процессе кафедр биохимии, кариесологии и эндодонтии, детской стоматологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства Здравоохранения РФ.

Оценка содержания и оформления диссертации

Работа изложена на 238 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, двух глав с описанием материалов и методов исследования и результатов собственных исследований, а также главы

обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 475 источников, включающих 106 отечественных и 369 иностранных источников. Текст иллюстрирован 36 таблицами и 34 рисунками.

Во введении обосновывается актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи работы, ее научная новизна, выделены положения, выносимые на защиту, приводится теоретическая и практическая значимость проведенного исследования.

В обзоре литературы автор уделяет внимание роли пульпы зуба для обеспечения трофики и жизнеспособности зубных тканей. Приводятся известные на сегодняшний день данные о протеоме пульпы зуба, которые подтверждают наличие в этой ткани общих метаболических реакций, свойственных живому организму. Тем не менее, диссертант подчеркивает особые свойства пульпы зуба как в морфологическом, так и в метаболическом аспекте. Кроме того, в этом разделе уделено внимание исследованиям на клеточных культурах пульпы зуба, изучившим как изменяется экспрессия белков и структура генома в ответ на действие химических веществ. Описаны биологические функции ряда белков и пептидов, их взаимодействия и роль в обеспечении витальности пульпы зуба. Однако применение полученных данных для диагностики различных стадий воспаления пульпы зуба человека остается еще недостаточно изученными, а в медицинских протоколах по диагностике и лечению пульпы зуба нет четких рекомендаций по использованию белково-пептидных показателей. Проведенный анализ литературных данных убедительно показывает актуальность проблемы и необходимость проведения диссертационного исследования.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов проведенного исследования. Протоколы проведения экспериментальных исследований на образцах пульпы зуба человека и животных изложены достаточно полно и обстоятельно и соответствуют современному методическому уровню. Работа представлена большим объемом биохимических исследований, включающих спектрофотометрию, турбидиметрию, иммуноферментный анализ и электрофорез в ПААГ. В части исследования на срезах пульпы резцов животных были применены гистологические методы. Статистическая обработка цифрового материала проведена с использованием современных компьютерных технологий.

В третьей, самой обширной главе, автором изложены результаты собственных исследований и их обсуждение. Раздел 3.1. был посвящен изучению белкового состава пульпы временных и постоянных зубов человека в норме и при воспалении. Данный раздел состоит из 9 пунктов, где приведены подробные результаты с использованием табличного и иллюстративного материала. И.Г. Островской установлено, что пульпа временных и постоянных зубов человека представлена различным спектром белков и пептидов, что определяется возрастными различиями протекания воспалительной реакции и способностями пульпы к восстановлению. Необходимо отметить, что полученные автором результаты активности ферментов аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, щелочной фосфатазы, альфа-гликозидазы позволили установить различия в стадиях развития воспалительной реакции в пульпе временных и постоянных зубов. Эти различия связаны с тем, что в пульпе постоянных зубов заложены механизмы изоляции воспалительного очага от здорового участка, которые затем завершаются стадией некроза, а для пульпы временных зубов характерна только острая стадия, которая быстротечно переходит в ткани периодонта. Диссертантом представлены интересные данные по изучению активности моноаминоксидаз типа А и В, семикарбазид-чувствительной аминоксидазы

в пульпе постоянных зубов человека в острую стадию воспаления. При изучении И.Г. Островской содержания белков и пептидов с различными биологическими функциями в пульпе временных и постоянных зубов человека было установлено, что содержание белка первичного иммунного ответа - иммуноглобулина М - выше в пульпе постоянных зубов человека, а иммуноглобулин поздних стадий хронического воспаления - IgG превалировал в пульпе временных зубов человека. Также автор подчеркивает, что в пульпе постоянных зубов человека выше уровни других белков неспецифического иммунитета - интерлейкинов-1 β , -4 и лактоферрина. По мнению диссертанта, подобные отличия определяют характер ответа пульпы временных и постоянных зубов человека на повреждение. Завершающим этапом любой воспалительной реакции является апоптоз клеток и некроз тканей. Так, И.Г. Островская по показателям белков-маркеров апоптоза и резорбции минерализованных тканей показала, что наиболее значимые цифры были получены в образцах пульпы временных зубов человека при воспалении. Количество каспазы-9, аннексина V и фактора некроза опухоли-альфа в биоптатах пульпы зуба было сопоставлено с данными электроодонтодиагностики пульпы зуба и получена положительная высокодостоверная корреляция. Автором был рассчитан коэффициент с использованием показателей остеокласт-активирующего фактора, с помощью которого была дана оценка степени резорбции тканей зуба при воспалении. Между тем, изученный автором регенераторный потенциал пульпы временных и постоянных зубов человека по количеству факторов роста - β -трансформирующего, инсулиноподобного-1, основного фактора роста фибробластов- β - не выявил способности пульпы к восстановлению. Степень повреждения сосудов в пульпе зуба человека при воспалении автор оценивала по уровню гомоцистеина - аминокислоты, биосинтезирующейся из метионина путем удаления метильной группы. Полученные сведения о метаболических процессах в пульпе временных и постоянных зубов человека в норме и при воспалении позволили И.Г.

Островской создать новое теоретическое направление в области биохимии тканей полости рта, которое было ею экстраполировано в практическое здравоохранение для разработки подходов к диагностике и лечению патологий пульпы зуба человека. В разделе 3.3 диссертант представила результаты исследования белково-пептидных показателей десневой жидкости для оценки состояния пульпы зуба человека. В частности, показатели активности трансаминаз в десневой жидкости были сведены в коэффициент, получены цифровые значения в норме и при воспалении пульпы зуба. Изменение количества провоспалительных цитокинов и лактоферрина в десневой жидкости выявило различную эффективность лечебных паст, применяемых для лечения воспаления пульпы временного зуба, что позволило рекомендовать борнеол в стоматологическую практику как эффективное противовоспалительное средство. Таким образом, использование показателей десневой жидкости для оценки состояния пульпы зуба является принципиально новым предложением не только в области практического здравоохранения, но и для науки в целом.

В разделах 3.4 и 3.5 отражены результаты экспериментальных исследований на животных. Для возможной экстраполяции полученных данных на человека автор сопоставила активность ряда ферментов и количество некоторых белков в пульпе постоянных и временных зубов человека и резцов крыс. Диссертант установила, что пульпа крыс и человека имеет видовые отличия в экспрессии ряда белков и ферментов. И.Г. Островской на модельных опытах были представлены уникальные данные, подтверждающие реактивность пульпы на травму тканей полости рта, иммобилизацию, введение химических веществ. В частности, было установлено, что реакция со стороны клеток пульпы зуба выражается изменением активности со стороны щелочной фосфатазы и аминотрансфераз, которые можно использовать в качестве достоверного предиктора об имеющемся неблагополучии в системе пульпа-периодонт.

Основные итоги проводимых исследований представлены И.Г. Островской в разделах обсуждение результатов и заключение. В соответствии с представленными масштабными данными, автор обобщила имеющиеся сведения в единую схему, которая укладывается в общие представления о метаболических процессах, происходящих в пульпе зуба.

На основании проведенных исследований квалифицированно сформулировано 9 выводов и 2 практические рекомендации, которые соответствуют поставленным задачам, отражают результаты исследования, отличаются четкостью формулировок и обоснованностью.

Подтверждение опубликования результатов диссертации в научных изданиях:

Основные положения диссертации доложены на 18 международных и российских конгрессах и конференциях, изложены в 42 печатных работах, из них 17 - в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации:

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания по содержанию диссертационной работы

1. При описании количественных и качественных характеристик белковых маркеров в пульпе зуба крыс можно было провести сравнительный анализ с уже известными данными, полученными в печени, почках, мозге и других органах животных для представления об интенсивности протекающих метаболических процессов в пульпе зуба с другими тканями.

2. Высказанное в обсуждении гипотетическое предположение о роли пероксида водорода в пульпе зуба звучит интересно, но не получило развернутого представления в исследовании.

3. Имеются стилистические погрешности, а именно: п.3.1, п.п.3.1.1 (с.64) в тексте обсуждается молекулярная масса белков 400 кДа, тогда как в

таблице указана молекулярная масса 407 кДа; п.3.1.6. (с.80) непонятно, в каком случае аннексин V возрастает достоверно: на рис. 12 показано достоверное изменение в пульпе временных зубов при воспалении, а в тексте упоминается пульпа постоянных зубов.

Следует отметить, что высказанные замечания связаны со стилистическими погрешностями и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы Островской Ирины Геннадьевны.

Заключение

Диссертация Островской Ирины Геннадьевны «Роль белков и пептидов в обеспечении резистентности тканей комплекса пульпа-периодонт при воздействии различных факторов» является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием. В диссертационной работе разработаны основные положения о роли белков и пептидов в пульпе зуба при воздействии внешних и внутренних факторов, что можно квалифицировать как научное достижение и крупный вклад в развитие биомедицинской науки. Разработка данного научного направления имеет важное медико-социальное значение и способствует совершенствованию прогностических и предиктивных методов с использованием белков-маркеров для диагностики повреждения зуба.

Результаты диссертационной работы Островской Ирины Геннадьевны предлагают решение проблемы диагностики патологий пульпы зуба человека и контроля её лечения в динамике с применением белково-пептидных показателей десневой жидкости, а также обеспечивают теоретическими представлениями о метаболических процессах в пульпе зуба, что позволит выбрать качественный метод лечения патологий пульпы зуба.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Островской Ирины Геннадьевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденной Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г.

№ 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748), а автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на совместном заседании лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции и лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (протокол № 2 от 21 ноября 2017 г.).

Главный научный сотрудник лаборатории
Общей патологии кардио-респираторной системы
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский
институт общей патологии и патофизиологии»
доктор медицинских наук



А.М. Дудченко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Адрес: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; Тел: +7(499)151-17-56
Электронный адрес: niiopp@mail.ru
Адрес в сети Интернет: [http:// www.niiopp.ru](http://www.niiopp.ru)

Подпись д.м.н. А.М. Дудченко заверяю

Ученый секретарь ученого Совета
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский
институт общей патологии и патофизиологии»
кандидат медицинских наук



Л.Н. Скуратовская