

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



На правах рукописи

Путнева Александра Сергеевна

**Патогенетическая роль D-гиповитаминоза в нарушении иммунитета
полости рта и развитии кариеса**

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Цыбиков Намжил Нанзатович

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| ГЛАВА 1. Основные аспекты возникновения кариеса и роль недостатка витамина D в патогенезе его развития (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)..... | 11 |
| 1.1. Распространенность кариеса высокой степени интенсивности и его патогенез..... | 11 |
| 1.2. Иммуитет полости рта и иммунорегулирующие пептиды смешанной слюны..... | 17 |
| 1.3. Биологическая роль витамина D и его вклад в формировании тканей зуба и иммунитета полости рта..... | 31 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 39 |
| 2.1. Дизайн исследования и характеристика обследуемых лиц...39 | 39 |
| 2.2. Метод анкетирования..... | 44 |
| 2.3. Методы стоматологического обследования и забор слюны..44 | 44 |
| 2.4. Лабораторные методы исследования..... | 45 |
| 2.4.1. Метод определения метаболита витамина D в крови.....45 | 45 |
| 2.4.2. Методы исследования ротовой жидкости.....45 | 45 |
| 2.5. Статистические методы обработки данных..... | 46 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | 48 |
| 3.1. Содержание метаболита витамина D – 25(OH)D в крови у пациентов с кариесом различной степени интенсивности патологического процесса..... | 49 |
| 3.2. Закономерности изменений содержания молекул мукозального иммунитета у лиц с кариесом различной степени интенсивности и уровнем витамина D..... | 53 |
| 3.3. Корреляционные взаимоотношения между изученными лабораторными и клиническими показателями | 66 |
| ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 73 |
| ВЫВОДЫ..... | 91 |

| | |
|---|----|
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ..... | 93 |
| ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ | 94 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 95 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Несмотря на достижения в области профилактики и лечения, кариес зубов остается самым распространенным стоматологическим заболеванием в мире [98]. В различных регионах России он встречается у 60% - 98% населения [47, 55].

Уже сам по себе кариес зубов – это болезненный процесс, который может привести к необратимому повреждению тканей зуба. Но помимо влияния на способность принимать пищу, кариес связан с неинфекционными заболеваниями, такими как сердечно-сосудистые [59, 65, 115, 149], заболевания желудочно-кишечного тракта и диабет, поскольку нормальное состояние полости рта – неотъемлемая часть общего состояния здоровья [59, 115].

Кариес зубов является динамическим процессом, который возникает, когда деминерализация твердых тканей зуба, вызванная продуктами метаболизма углеводов – кислотами, продуцируемыми микробиомой зубного налета, подавляет реминерализацию, обусловленную защитными факторами в ротовой полости. В конечном итоге за деминерализацией следует протеолитическое разрушение органических веществ тканей зуба и образуется полость [94]

Широкое распространение заболевания связано не только с изменением характера питания современного человека [40, 153], но и другими факторами риска, и на сегодняшний день остается потребность в выявлении этих патогенетических факторов, которые могли бы быть устранены за счет эффективных вмешательств. Особо актуальным это является для лиц молодого возраста, поскольку, в большинстве своем, еще не имея приобретенных хронических заболеваний, они служат индикаторной группой, характеризующей ситуацию здоровья полости рта всей популяции [40].

Предполагается, что недостаток витамина D может быть одним из факторов риска развития кариеса зубов [93].

Степень разработанности темы исследования.

В ряде научных работ отмечено, что кариес зубов чаще развивается на фоне недостатка 25(ОН) витамина D (обычно количественно определяемый метаболит витамина D в крови) [79]. Имеются исследования, демонстрирующие наличие обратной корреляционной связи между 25-гидроксивитамином D (25(ОН)D) в сыворотке крови и кариесом в детском возрасте [115, 163], хотя другие – отрицают факт взаимосвязи между содержанием 25(ОН)D и кариесом [66, 170].

Были предложены механизмы, с помощью которых витамин D повышает кариесорезистентность. Один из них заключается в том, что витамин D стимулирует усвоение кальция [2, 170] и фосфатов [96], поэтому имеет отношение к кристаллической структуре и минерализации гидроксиапатита. Активная форма витамина D (кальцитриол) – один из основных регуляторов фосфорно-кальциевого гомеостаза, необходимого для всасывания кальция и фосфатов в кишечнике и их реабсорбции в почках. Во время нормального или положительного баланса кальция в организме 1,25-дигидрокси-холекальциферол (1,25(ОН)₂D₃) обеспечивает минерализацию костей и твердых тканей зубов [2, 26]. Имеются данные и о собственно антикариозной активности витамина D [4, 18]. Кальцитриол вызывает геномные эффекты в одонтобластах (образование дентина) и амелобластах (образование эмали) посредством передачи сигналов через рецепторы [137]. На сегодняшний день установлено, что существует около 900 генов, непосредственно или косвенно реагирующих на воздействие кальцитриола [69], поэтому, помимо принадлежащей ему ключевой роли в минеральном обмене, 1,25(ОН)₂D осуществляет широкий ряд биологических функций, касающихся и иммуномодуляции [118, 120]. Подтверждением значимости витамина D в регуляции иммунитета являются результаты множества экспериментальных исследований и клинических наблюдений, которые показывают связь между уровнем витамина D и восприимчивостью к инфекциям [29]. Кроме того, в лимфоцитах, моноцитах, макрофагах обнаружены рецепторы к активной форме витамина D [100]. Поскольку этиологическим фактором возникновения кариеса зубов является повышенная нагрузка кариесогенной

микрофлорой, которая зависит, в том числе, и от состояния иммунитета полости рта, то логично, что другой из механизмов повышения кариесрезистентности витамином D будет заключаться в усилении защитных реакций. Однако сообщения об изменениях в активности мукозального иммунитета и в составе белков слюны на фоне недостатка 25(OH) витамина D весьма малочисленны [6, 54]. Так, например, в литературе указывается, что витамин D через VDR рецепторы выполняет важные функции в регулировании гомеостаза в кишечнике, в обеспечении плотных контактов между клетками, задержке инвазии патогенов, колонизации бактерий, секреции противомикробных пептидов и тем самым в защите слизистых. Есть сведения, что микроорганизмы модулируют сигнальный путь VDR [147]. Между тем, проведенные популяционные исследования установили, что распространенность недостаточности витамина D на сегодняшний день достигает эпидемического уровня [1].

Таким образом, проведение исследования по изучению нарушений в мукозальном иммунитете полости рта на фоне недостатка 25(OH) витамина D и расширение имеющихся представлений о патогенезе кариеса, и значит, о возможных профилактических мероприятиях, является актуальным.

Цель исследования: выявить патогенетическую роль дефицита 25(OH) витамина D в изменениях мукозального иммунитета и развитии кариеса.

Задачи исследования:

1. Оценить содержание метаболита витамина D – 25(OH)D в крови у пациентов с кариесом различной интенсивности патологического процесса.
2. Определить уровень защитных белков слюны (секреторного IgA, кателицидина LL-37, α -дефензины 1-3, LBP) у лиц с кариесом средней и высокой степени интенсивности на фоне различного содержания 25(OH) витамина D в организме
3. Провести исследование в ротовой жидкости растворимых форм некоторых костимулирующих и коингибирующих молекул (B7.2, CTLA-4, PD-1, Tim-3, LAG-3) у лиц с кариесом различной степени интенсивности при нормальном содержании 25(OH) витамина D и на фоне недостатка/дефицита витамина D.

4. Изучить содержание белков, участвующих в процессах реализации иммунного ответа полости рта (Free Active TGF-b1, IGFBP-4, ICAM-1, MMP-9, MMP-2) у лиц с кариесом в зависимости от степени его интенсивности и от статуса 25(OH) витамина D в организме.

5. На основе регрессионного анализа и выявленных корреляционных взаимоотношений между изученными лабораторными и клиническими показателями установить основные патогенетические механизмы развития кариеса высокой степени интенсивности при дефиците и недостатке витамина D.

Научная новизна.

Впервые описаны закономерности изменений содержания защитных белков, растворимых форм костимулирующих и коингибирующих молекул, компонентов иммунной системы и MMP-9, MMP-2 в смешанной слюне при кариесе в зависимости от степени интенсивности и на фоне различного статуса 25(OH) витамина D в организме. Впервые выявлены существенные сдвиги в содержании растворимых форм костимулирующих и коингибирующих молекул в слюне у лиц с кариесом на фоне недостатка витамина D, характеризующиеся однотипной направленностью при средней и высокой степени интенсивности кариеса, а именно снижением уровня костимулирующей молекулы B7.2 и коингибирующих молекул PD-1, Tim-3, LAG-3.

Впервые показаны разнонаправленные изменения факторов иммунитета в ротовой жидкости при кариесе на фоне различного статуса витамина D: при нормальных значениях витамина D изменения характеризуются повышением уровня противомикробных пептидов, костимулирующей молекулы B 7.2., а при недостатке витамина D – уменьшением содержания данных соединений и существенными сдвигами в изучаемых показателях – снижением уровня секреторного IgA, кателицидина LL-37, α -дефензинов 1-3, LBP, Free Active TGF-b1, значительным повышением концентраций IGFBP-4, ICAM-1, MMP-9, MMP-2 в смешанной слюне. Впервые показано, что при высокой степени интенсивности кариеса глубина сдвигов в иммунологических показателях ротовой жидкости увеличивается.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты работы свидетельствуют об отличиях в реакциях мукозального иммунитета при кариесе у лиц с различным статусом витамина D в организме. Недостаток витамина D сопровождается более выраженными изменениями содержания иммунологических показателей в смешанной слюне, что особенно проявляется при высокой степени интенсивности кариозного процесса. Это указывает на участие D-гиповитаминоза в изменении ответа мукозального иммунитета и снижении кариесорезистентности. Полученные результаты расширяют как представления о патогенезе кариеса, так и могут послужить основой для разработки мер профилактики и комплексной терапии кариеса.

Назначение витамина D, вероятно, приведет к нивелированию обнаруженных нарушений в местном иммунитете, что может позволить включить его в комплексную терапию пациентов с кариесом.

Результаты работы могут быть использованы в лекционных и практических занятиях для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских академий.

Методология и методы исследования. В основу методологии диссертационного исследования положены принципы доказательной медицины. Работа выполнена в дизайне одномоментного исследования в параллельных группах, методологической базой которого явилось использование методик общенаучного познания с приемами формальной логики, а также применение актуальных клинических, современных лабораторных технологий исследования, результаты которых обрабатывались обоснованными статистическими программами. Для лабораторных исследований использовались сыворотка крови и ротовая жидкость. Объект исследования – пациент с кариесом различной степени интенсивности. Предмет исследования – патогенетические взаимосвязи между дефицитом витамина D и изменениями показателей мукозального иммунитета при кариесе. Выводы сформулированы с позиций доказательной медицины.

Личный вклад автора в выполнение диссертационного исследования. Тема диссертационного исследования утверждена научно-методической комиссией, план работ одобрен этическим комитетом ЧГМА (протокол №105 от 02.12.2020 г.). Автором самостоятельно произведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по основным направлениям исследования. Совместно с научным руководителем составлен план исследования, поставлены цель, задачи, определены клинические и лабораторные методы исследования. Аспирантом самостоятельно выполнены: клиническое обследование пациентов, расчет индексов, анкетирование, а также забор и транспортировка в лабораторию проб ротовой жидкости и крови, проведение статистической обработки результатов исследования. Автором самостоятельно проведена систематизация данных, их анализ, обобщены полученные результаты, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Распространенность дефицита и недостаточности 25(ОН) витамина D существенно выше среди молодых лиц со средней и высокой интенсивностью кариозного процесса, чем у лиц с низкими значениями КПУ.

2. Кариес зубов сопровождается изменениями в содержании иммунологических показателей ротовой жидкости, зависящими от степени тяжести кариозного процесса. На фоне дефицита/недостатка 25(ОН) витамина D изменения иммунологических показателей более выражены, некоторые из них разнонаправлены с таковыми при нормальном уровне витамина D.

3. Изменения мукозального иммунитета патогенетически связаны с недостатком витамина D, о чем свидетельствуют выявленные корреляционные связи между значениями индекса КПУ, 25(ОН) витамина D и содержанием белков в смешанной слюне, участвующих в процессах иммунного ответа полости рта.

Степень достоверности и апробация результатов.

Результаты работы представлены в материалах XXVII международной научно-практической конференции «Наука России: Цели и задачи» (г. Екатеринбург, 2021), научно-практической конференции с международным

участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Чита, 2020), XX межрегиональной научно-практической конференции «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2021), научно-практической конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Чита, 2021).

Достоверность результатов работы обусловлена системной проработкой проблемы, достаточным объемом исследуемой выборки, использованием современных лабораторных и инструментальных методов обследования пациентов, а также применением адекватных поставленным задачам методов статистического анализа.

Внедрение результатов в практику.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры терапевтической стоматологии с курсом пропедевтики стоматологических заболеваний, кафедры патологической физиологии и кафедры химии и биохимии ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России.

Апробация результатов.

По теме опубликовано 8 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, и находящихся в списке журналов, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus, PubMed, WoS.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста. Состоит из списка условных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственных исследований, главы обсуждения, выводов, списка литературы, включающего 174 источника (57 отечественных, 117 иностранных). Работа иллюстрирована 15 таблицами, 9 рисунками.

ГЛАВА 1. Основные аспекты возникновения кариеса и роль недостатка витамина D в патогенезе его развития (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Кариес зубов - важная проблема общественного здравоохранения во всем мире. В современном подходе к лечению кариеса от понятия «сверление и пломбирование» перешли к индивидуальной оценке риска развития кариеса [174], и эта правильная оценка, как теперь считают, так же важна, как и точный диагноз кариозных поражений [133]. Такая концепция лечения кариеса, ориентированная на конкретного пациента, широко принята во всем мире.

В достаточно свежих научных публикациях присутствуют сведения, что недостаток витамина D может приводить к развитию кариеса высокой степени интенсивности. Так, по данным Schroth R.J. и соавт. (2016) низкие уровни 25-гидроксивитамина D [25(OH)D] в сыворотке крови связаны с повышенной распространенностью кариеса [164]. Было обнаружено, что у детей с множественным кариесом уровень витамина D значительно ниже, чем у детей без кариеса [164]. Более того, исследования показали, что пренатальный прием витамина D коррелировал со снижением частоты кариеса у младенцев и поддерживал развитие здоровых зубных рядов [164].

Однако не все механизмы развития кариеса при недостатке витамина D понятны и требуют дальнейшего изучения. Для того чтобы аргументировать актуальность настоящего исследования, обобщить информацию о факторах, приводящих к развитию кариеса, раскрыть роль дефицита витамина D в этом процессе, был сделан анализ литературы по перечисленным вопросам.

1.1 Распространенность кариеса высокой степени интенсивности и его патогенез

Сегодня уже бесспорно признано, что кариес зубов - процесс многофакторный [51]. Спектр микроорганизмов ротовой полости [68], особенности питания, резистентность эмали, количество и состав ротовой жидкости, общее состояние организма, экзогенные воздействия на организм и

другие факторы влияют на возникновение очага деминерализации эмали, течение процесса и возможность его стабилизации [68]. Но, несмотря на выявление факторов риска и главных звеньев патогенеза, заболевание, поражающее людей всех возрастов, остается широко распространенным, в том числе и среди лиц молодого возраста, особенно лиц с ограниченной доступностью к медицинской помощи и плохими социально-экономическими условиями.

Проведенное в 2008 г. обследование 432 студентов Москвы в возрасте 18–19 лет показало у них высокий средний индекс КПУ (10,4), распространенность кариеса зубов составила 100% и 98,3% у женщин и мужчин соответственно [30]. Аналогичные данные были получены в исследованиях Е.Ю. Леонтьевой (2012) и С.Н. Драчева (2016) [23, 89].

При всей бесспорности этиологического фактора возникновения кариеса зубов - кариесогенной микрофлоры [110], основные звенья его патогенеза могут быть интерпретированы по-разному [68]. Леонтьев В.К. и другие авторы считают основным звеном патогенеза кариеса зубов результативное нарушение динамического равновесия процессов де- и реминерализации в полости рта, которое может возникнуть из-за воздействия разрешающего фактора - приема пищи, богатой легкометаболизируемыми углеводами, ведущего в свою очередь к преодолению концентрации кислот кариесорезистентности зубов, уровень которой строго индивидуален и зависит от многих экзо- и эндогенных факторов [22].

Эти факторы можно разделить на:

1. *Общие* – состояние организма, недостаток витаминов и дисбаланс макро и микроэлементов, обусловленные либо неполноценным питанием, либо проживанием в определенной биогеохимической провинции, либо наличием соматической болезни.

2. *Местные* – патогенная микрофлора в составе зубного налета, прием в пищу продуктов с преобладанием в составе рафинированных углеводов, изменение состава слюны.

Причем эти факторы во многом взаимосвязаны.

В соответствии с результатами работ о морфологических и биохимических изменениях при кариозном процессе, а также данными о взаимодействии твердых тканей зуба с компонентами смешанной слюны *схема патогенеза кариеса эмали зубов представляется следующим образом.*

Бактерии зубного налета, в результате ферментативных процессов лизируют пелликулу, гидролизуют принимаемые в пищу поли- и дисахариды до моносахаридов, а последние подвергают брожению с образованием органических кислот (молочная, уксусная, пропионовая и т.д.). Кислоты диффундируют внутрь тканей зуба, вызывают деминерализацию и образование микродефектов подповерхностных слоев эмали [24, 25]. Кариозный процесс на этапе деминерализации может быть обратимым, если органическая компонента эмали сохранена. Длительное существование очага деминерализации приводит к растворению поверхностного, более устойчивого, слоя эмали [24]. Стабилизация данного процесса клинически может проявляться образованием пигментированного пятна, существующего годами [25]. Кариозное разрушение не происходит внезапно, а обычно по истечении достаточно длительного времени (нескольких лет), поскольку между периодами образования кислот после принятия пищи компоненты буферной бикарбонатной системы, присутствующие в слюне, диффундируют в налет и нейтрализуют короткоцепочечные кислоты. Это тормозит разрушение кристаллов апатитов, вплоть до следующего периода образования кислот в процессах брожения.

Преобладание одного из процессов – растворения апатитов (деминерализация) или преципитация кальция обратно в апатит зависит от двух основных факторов:

- *от концентрации протонов (рН)*
- *от концентрации ионов кальция в среде, окружающей зуб.*

Патогенетические факторы кариеса зубов

Для возникновения кариеса зубов необходим этиологический фактор - кариесогенная микрофлора полости рта.

Кариесогенные бактерии

Существует от 700 до 1000 видов микробов, населяющих ротовую полость. Некоторые из них провоцируют возникновение и развитие заболеваний полости рта, в том числе и кариеса [74, 121, 131, 132]. Зубной налет, по существу, является микробной колонией и представляет собой автономное образование, состоящее из неспецифической микрофлоры полости рта [122]. Он содержит депо полисахаридов (левана, дектрана), покрытых пленкой, специально-вырабатываемой микробами, защищающей колонию от действия факторов полости рта.

В процессе формирования зубного налёта и последующей деминерализации эмали участвуют в основном кислотообразующие стрептококки, для которых характерно анаэробное брожение и лактобактерии.

Streptococcus mutans считается основным этиологическим агентом кариеса зубов, поскольку является одним из первых колонизаторов поверхности зубов, который способствует связыванию других микроорганизмов полости рта с образованием зубного налета. Один из основных механизмов вирулентности *S. Mutans* это его ацидогенность, что приводит изменению pH окружающей среды ниже того значения, при котором происходит деминерализация зубов (pH меньше 5,5) [67]. Оптимум для *S. Mutans* также является кислая среда и поэтому он прекрасно существует в окружающей среде с низким pH, которую он создает, тем самым превосходя другие оральные организмы, чтобы доминировать в экологической нише [67].

Другими одонтопатогенами человека являются *Streptococcus Sobrinus* и лактобациллы [70, 114, 124, 125]. *Streptococcus Sobrinus* имеет большое значение в развитии кариеса на гладких поверхностях и, возможно, связан с развитием распространенного прогрессирующего кариеса (rampant caries). Доказано, что среди детей, инфицированных *Streptococcus mutans* к 3 годам жизни, 52% страдают кариесом зубов, в то время как у детей, не инфицированных *Streptococcus mutans*, кариес наблюдался только в 3% случаев в этом возрасте [15].

В исследованиях М. Arino (2015) было показано, что количество *mutans streptococci* (SM) и *Lactobacilli* (LB), является значимым для возникновения как первичного, так и вторичного кариозного поражения. Пациенты с уровнем SM выше 1×10^6 КОЕ / мл были классифицированы как пациенты с высоким риском первичного кариозного поражения с отношением шансов 3,08 (95% ДИ, 1,55–5,79; $p = 0,0018$), и что пациенты с уровнем LB выше 1×10^4 КОЕ / мл и уровнем SM выше 1×10^6 КОЕ / мл были отнесены к категории пациентов с высоким риском вторичного кариозного поражения с отношением шансов 3,69 (95% ДИ, 2,29–5,91; $p < 0,001$) [117].

Но даже при наличии кариесогенной микрофлоры развитие кариеса зубов может произойти лишь при наличии определенных условий и факторов (звенья патогенеза) [24].

Кариесорезистентность

Кариесорезистентность, которая также обусловлена особенностями генотипа, зависит от большого количества факторов – начиная с молекулярного уровня и заканчивая популяционным.

1. На молекулярном уровне резистентность зубов к кислотным воздействиям зависит от типа гидроксиапатита эмали, от наличия включений в составе гидроксиапатита - F, Mg, Co, Mn и др., от наличия вакансий и замещений в структуре кристаллов, от строения и соотношения групп протеиновых молекул в белковой матрице эмали, от степени ее минерализации, от взаимодействия протеиновой и минеральной компоненты эмали. От всех этих факторов, а также от ряда других, в значительной мере, зависит как способность эмали к деминерализации, так и обратный процесс - ее способность к восстановлению - реминерализации. **Постэруптивный** процесс минерализации эмали зуба связан с поступлением минералов в поверхностные слои эмали зуба из естественных источников (ротовой жидкости, пелликулы).

Устойчивость гидроксиапатита к кислотному растворению зависит от нескольких факторов, и в том числе – от числа атомов кальция в нем. В гидроксиапатитах кальций может быть заменен барием, магнием, серой, хромом, кадмием (что снижает кислотоустойчивость апатита) или цинком и оловом (что повышает кислотоустойчивость), фосфатная группа может быть заменена группой, содержащей карбонат, мышьяк или кремний (кислотоустойчивость при этом снижается), гидроксильная группа может быть замещена фторидом (с повышением кислотоустойчивости), ионами хлора, бора, иода (со снижением кислотоустойчивости).

Оптимальными считаются апатиты, в которых большое количество атомов кальция.

Быстрому развитию кариеса также способствует низкое содержание фтора и высокое содержание карбонатов в эмали.

2. На уровне ткани (субстанции) – эмали зубов, резистентность к действию кислотных факторов зависит от регулярности её структуры, от наличия и числа дефектов в ней, от формирования эмалевых волокон и их пучков, особенно при их выходе на поверхность эмали, от мозаичности заряда ткани, препятствующего или способствующего абсорбции микрофлоры на ее поверхности и др.

3. На уровне зуба резистентность к кариесу зависит от строения поверхности эмали, пелликулы, взаимодействия последней с поверхностью зуба, от глубины и формы фиссур зубов.

4. На системном уровне (зубочелюстная система) резистентность к кариесу зубов зависит от типа строения черепа, лицевого скелета, челюстей, прикуса, от тесноты расположения зубов и др.

5. На организменном уровне резистентность к кариесу зависит от характеристик ротовой жидкости (смешанной слюны). А именно от её объема, который определяется функционированием слюнных желез, ее pH, вязкости, от степени перенасыщенности слюны солями кальция и фосфата, от концентрации и силы воздействия иммунологических и противомикробных факторов в ней (их действие будет рассмотрено ниже). Слюна – важный элемент

кариесорезистентности организма на протяжении всей жизни. Она участвует в процессах минерализации и очищения поверхности зубов и полости рта в целом, благодаря своим омывающим, иммунологическим, антимикробным и минерализующим свойствам. Причем особая роль в современной концепции патогенеза кариеса отводится нарушениям функционирования защитных антимикробных механизмов [45].

6. На групповом и популяционном уровне резистентность зубов к кариесу зависит от процесса проявления редукции зубочелюстной системы человека, от неблагоприятных воздействий отдельных факторов цивилизации (диета, приготовление пищи, внедрение углеводов и т.д.), гигиены полости рта и др.

Особенности питания, безусловно, влияют на развитие кариеса. Такая широкая распространенность кариеса зубов у людей связана с появлением сахара как пищевого продукта [24].

Определенное значение имеют и другие особенности употребляемой пищи: количество белка, микроэлементов и витаминов [25].

Резюмируя информацию о факторах развития кариеса, можно констатировать, что немаловажную роль в патогенезе играют нарушения иммунитета полости рта и сдвиги в составе смешанной слюны, в связи с чем следующая часть обзора посвящена защитным механизмам ротовой полости и роли белков ротовой жидкости.

1.2. Иммуитет полости рта и иммунорегулирующие пептиды смешанной слюны

Первый этап иммунной защиты полости рта проявляется в действии гуморальных факторов ротовой жидкости.

В смешанной слюне обнаружено более 1000 белков, одни из них содержатся в больших концентрациях, другие – в меньших, большинство из них полифункциональны, а многие выполняют защитную функцию.

И.Ю.Карпук (2014) выделяет пять типов совместного действия защитных белков в смешанной слюне. Первый вариант взаимодействия может отвечать за

агглютинацию микроорганизмов. Этим механизмом обладают те белки слюны, которые связывают бактерии с поверхностями полости рта, либо друг с другом. Второй тип взаимодействия отвечает за лизис микробной стенки, прежде всего бактерий. Третий и четвертый типы взаимодействия могут отвечать за противогрибковые [99] и противовирусные [99] свойства слюны. Пятый, иммунный тип взаимодействия вероятен и подразумевает, что многие белки ротовой жидкости обладают иммуномодулирующими/ иммуностимулирующими свойствами и таким образом участвуют в регулировании активности местного иммунитета [16].

Важными защитными факторами в ротовой жидкости служат антимикробные пептиды (hostdefense peptides) [16]. Они продуцируются эпителием слизистой оболочки или фагоцитирующими клетками и попадают в ротовую жидкость в составе десневой жидкости или слюны. Показано, что эпителий десны продуцирует антимикробные пептиды как постоянно, так и при антигенной активации. К антимикробным катионным пептидам относят **дефензины, кателицидины** и пептиды с высокой пропорцией специфических аминокислот – гистатины. Механизм их действия схож и вызывает лизис мембраны микроба [27, 142].

Все эти пептиды проявляют широкую антибактериальную и противогрибковую активность [141], имеют противовирусные свойства [141]. Активность β -дефензинов выше по отношению к аэробным микроорганизмам. **Кателицидин** не только проявляет мощную бактерицидную активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий, вирусов, но также является хемоаттрактантом для клеток иммунной защиты [16].

Гистатины - катионные пептиды, богатые гистидином и выделяющиеся слюнными железами. [16]. Являясь положительно заряженными, гистатины адсорбируются на мембранах бактерий, имеющих отрицательный заряд. Это сопровождается последовательной агрегацией гистатинов и их интеграцией в липидный бислой [16], что в свою очередь приводит к формированию ионных каналов в мембране, пор, и в результате к гибели клетки бактерии. Гистатины

также связывают и образуют комплексы со свободными ионами Cu^{2+} и Ni^{2+} , снижая тем самым их концентрацию. Это ведет к снижению активности микробных металлозависимых ферментов, замедлению метаболизма и роста микробов [16]. Гистатины проявляют высокую противогрибковую активность (в частности, против *Candida albicans*) [16], которая инициируется связыванием гистатина с определенными HSP70-подобными белками (Ssa1p, Ssa2p) грибка *Candida albicans*, что приводит к экзоцитозу гистатина с последующей гибелью клетки [56]. Гистатины также встраиваются в пелликулу зубов и таким образом участвуют в бактериальной колонизации поверхности зубов. С другой стороны, гистатин-1 значительно ингибирует абсорбцию высокомолекулярных гликопротеинов к поверхности зубов, и тем самым подавляет адгезию кариесогенных бактерий (например, *Streptococcus mutans* [16]) к поверхности зуба.

Дефензины – низкомолекулярные пептиды, богатые цистеином, подразделяют на α - и β - группы. Первые, продуцируемые нейтрофилами, имеют слабую активность в отношении микрофлоры полости рта. Наиболее существенные концентрации α -дефензинов присутствуют в гранулах лейкоцитов. β -дефензины секретируются клетками эпителия и являются основными антимикробными белками ротовой полости [16, 27].

К семейству β -дефензинов относят β -дефензины 1, 2 и 3, калпротектин (калгранулин). β -дефензины 1 и 3 секретируются постоянно, но их уровень возрастает при воспалительных процессах, при контакте патогенных бактерий с эпителием слизистой оболочки полости рта, β -дефензин 2 является индуцибельным белком и секретируется при воздействии микрофлоры (как симбионтной, так и патогенной), цитокинов – медиаторов воспаления, в том числе моноцитарного IL 1. β -дефензины 1 и 2 при отсутствии воспаления секретируются в большем количестве в области десневого края, ближе к зоне отложения зубного налета. β -дефензин 3 первично секретируется клетками базального слоя слизистой оболочки, усиливая клеточный барьер [16, 27].

Как α -дефензины, так и β -дефензины проявляют антибактериальную активность, основанную на характере катионных пептидов [72]. Их первое взаимодействие с бактерией связано с наличием положительного заряда их молекул. Поэтому их противомикробное действие аналогично механизму гистатинов [16]. Противогрибковый эффект β -дефензинов тоже схож с гистатин-3-зависимым противогрибковым механизмом.

Дефензины имеют свойства активаторов и модуляторов иммунитета, их механизмы воздействия заключаются в индукции некоторых цитокинов и, кроме того, эти пептиды служат хемоаттрактантами для дендритных клеток и Т-лимфоцитов [141].

Кателицидины - эти пептиды, выявлены в лимфоцитах и моноцитах, а также в эпителиальных клетках. Кателицидин (LL-37) – антимикробный белок, секретирующийся клетками эпителия, нейтрофилами, моноцитами, Т-лимфоцитами [114, 140]. Кателицидин LL-37 может быть далее гидролизован с образованием меньших фрагментов (RK-31, KS-30), которые обладают еще большей антимикробной активностью [72].

В смешанной слюне содержатся и другие катионные белки, такие как Лактоферрин и Адреномедуллин. Основными источниками лактоферрина являются слюнные железы, нейтрофилы [16] и клетки эпителия слизистой. Адреномедуллин, вероятно, выделяется в слюну эпителиальными клетками слизистой полости рта [16].

Лактоферрин активен против бактерий, грибов и вирусов [16]. Кроме активности катионных пептидов, лактоферрин, связывая ионы железа, лишает микроорганизмы этого элемента, необходимого для их метаболизма, оказывая тем самым бактериостатическое действие [72]. Лактоферрин лиганден по отношению к бактериальным белкам и таким образом ингибирует эпителиальную адгезию определенных бактерий. Лактоферрин также может нейтрализовать вирусы прямым связыванием [72]. Иммуномодуляторные свойства лактоферрина представляются вполне вероятными [72].

Адреномедуллин – это полипотентный гормоноподобный катионный белок, состоящий из 52 аминокислот [140]. Установлено, что данные белки проявляет выраженное антибактериальное действие против *Streptococcus mutans* [16]. Антибактериальный эффект адреномедуллинов сопоставим с активностью β -дефензина [16]. Кроме проявления катионных механизмов, описанных выше, он способен предотвращать бактериальный рост (*S. aureus*) путем создания ненормальной перегородки во время деления клетки [141], ингибирует рост некоторых других бактерий по неизвестному механизму [141]. Частичный протеолиз адреномедуллина приводит к образованию белков с еще большей противомикробной активностью [141].

Важную роль среди защитных факторов слюны играют различного происхождения ферменты: амилаза, лизоцим, миелопероксидаза, протеазы, нуклеазы и др. (антимикробные механизмы некоторых из них рассмотрены ниже).

В наибольшем количестве в слюне содержится амилаза, основная функция которой - эндогликозидазная активность. Но, кроме этого, фермент принимает участие в образовании приобретенной пелликулы на поверхности зубов. Амилаза связывается с бактериями, а именно с некоторыми бактериальными пилиями [142], которые являются важными факторами бактериальной адгезии. Энзим осуществляет бактериальную адгезию на поверхности зубов [142], что может одновременно приводить как к полезной поверхностной иммунной защите организма, так и к вредной адгезии кариесогенных или периодонтопатогенных бактерий на поверхности зубов. В противоположность этому связывание бактерий может также приводить к предотвращению адгезии бактерий к поверхности зубов путем насыщения и занятия бактериальных факторов адгезии, за чем следует поступление бактерий в желудок [142]. Было также продемонстрировано, что амилаза проявляет прямой ингибиторный эффект в отношении роста некоторых бактерий [16]. Кроме того, амилаза взаимодействует с бактериальными ЛПС и бактериальными токсинами, может проявлять вирусингибиторные свойства [135].

Лизоцим еще один фермент (145 кДа) смешанной слюны, вырабатывается слюнными железами, а также нейтрофилами [72]. Лизоцим проявляет

мурамидазную активность посредством гидролиза β -1,4-гликозидных связей между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетил-D-гликозаминами пептидогликанов бактериальной мембраны. Гидролиз гликопротеиновых структур лизоцимом слюны также может помогать катионным белкам слюны преодолевать слои мембран бактерий. Есть мнение, что катионные белки могут осуществлять разрушение внешней части мембраны грамотрицательных бактерий, и это способствует лизоциму достигать гликопротеинового слоя мембраны микроба. Важно, что уничтожение бактерий лизоцимом во многих случаях не зависит от его энзимной активности [99]. Неэнзимное антимикробное свойство лизоцима активно против как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [99], а также грибов [99]. Кроме вышеперечисленного, лизоцим обнаруживает противовирусные свойства. Помимо этого, лизоцим связывает бактериальные липополисахариды и бактериальные токсины, часто ответственные за воспалительные реакции, разрушающие ткани. Предполагается, что лизоцим может влиять на функции гранулоцитов и лимфоцитов [99].

В слюне обнаружены энзимы пероксидазы - лактопероксидаза и миелопероксидаза [123]. Лактопероксидаза продуцируется слюнными железами, а миелопероксидаза – нейтрофилами в ротовой полости [16]. Оба энзима катализируют окисление ионов тиоцианатов (SCN-) пероксидом водорода, что ведет к образованию намного более активного в отношении бактерицидных фунгицидных свойств соединения, а именно гипотиоцианата (OSCN-) [15].

Другие защитные белки слюны - шаперокины HSP70/HSPA, действие которых заключается в связывании бактерий и их агглютинации [142]. Результаты исследований показали, что HSP70/ HSPA связывают и грамположительные (*Streptococcus mutans* и *mitis*), и грамотрицательные (*Escherichia coli*) бактерии [142]. Так как HSP70/HSPA способны образовывать димеры и олигомеры, агглютинирующая функция HSP70/ HSPA может быть весьма эффективной [16]. Важно, что HSP70/HSPA связывают гидроксиапатиты, и таким образом, вероятно, могут играть роль в формировании приобретенной пелликулы, за которым

следует адгезия бактерий на поверхности зубов [16]. Способность принимать участие в формировании приобретенной пелликулы и связывать бактерии соотносится со способностью HSP70/ HSPA опосредованно приводить к развитию кариеса [142].

Прочие защитные белки врожденного иммунитета. Кальпротейн – это димер кальгранулина-А и кальгранулина-В со свойствами связывания ионов металлов [16]. Кальпротейн ингибирует микробный рост, действуя как скавенджер дивалентных катионов. Основными источниками слюнного кальпротеина являются эпителиальные клетки полости рта и нейтрофилы [16, 141]. Существуют три бактерио- и ЛПС-связывающих белка, а именно индуцируемый пролактином протеин, липокалин и подчелюстной андрогенрегулируемый протеин. Эти белки связывают бактерии, бактериальные липополисахариды (ЛПС) и токсины [142].

Муцины (MUC) - высокомолекулярные и высокогликозилированные протеины, выполняющие множество функций. Для них свойственен 1 тип защиты - агглютинация микроорганизмов и «защита поверхностями». Существуют два основных подтипа муцинов, а именно – мембраноассоциированные и секретлируемые [16]. В полости рта мембраноассоциированные муцины (например, MUC-1) в первую очередь выделяются эпителиальными клетками слизистой. Эти белки могут оставаться на поверхности клетки после секреции и участвуют в защите поверхности эпителия [16]. В ротовой полости присутствует большее количество муцинов секретлируемого типа, среди которых наиболее важные это MUC5b и MUC7 подтипы [16]. Эти муцины, вырабатываются в основном подъязычной слюнной железой, а также малыми слюнными железами [16]. Помимо принятия участия в образовании приобретенной пелликулы (особенно муцины MUC5b), слюнные муцины покрывают все поверхности полости рта [16]. Муцин MUC5b формирует вязкую матрицу слюны [16]. Слюнные муцины имеют высокий аффинитет к микробам и захватывают и агглютинируют и бактерии и грибы [16]. Данные гликопротеины являются важными компонентами врожденного иммунитета, защищая слизистые оболочки

от вредных физических, химических и биологических воздействий. Имеются данные, что муцины слюны, защищающие зубную эмаль, могут предотвратить кариес [16].

Агглютинин слюны (SAG, gp-340) это протеин, включающий большое количество цистеина [16]. В слюне SAG действует как скавенджер-рецептор, узнающий паттерны, и, являясь таковым, связывает большое количество патогенов полости рта, включая бактерии и вирусы. Подобным образом SAG связывает белки слюны, включая IgA и муцин MUC5b [16]. SAG также присутствует в приобретенной пелликуле и на поверхности слизистой [16]. Так, он может обеспечивать бактериальную или вирусную адгезию на поверхностях в полости рта [16], что может приводить либо к патогенной инвазии, либо «защите организма поверхностями». Однако большинство SAG обнаруживаются в слюне в растворенном состоянии, таким образом, эффекты на поверхностях менее значимы [16]. Помимо эффективных антибактериальных и противовирусных свойств, SAG имеет свойства иммунного активатора/модулятора [16].

Статерины. Статерины относятся к фосфопротеинам, в их составе много тирозина, глутамина и пролина. Эти белки ингибируют преципитацию солей кальция в слюне, которая перенасыщена ими [16]. Статерин связывает гидроксиапатиты, проявляя роль в образовании приобретенной пелликулы и зубного налета. С другой стороны, статерин полностью ингибирует абсорбцию высокомолекулярных гликопротеинов к поверхности зубов, и таким образом может ингибировать адгезию данных сложных белков, связывающих кариесогенных бактерий, включая *S. mutans* [16].

Белки, богатые пролином (PRP), образуют основную фракцию белков слюны. Это тоже высокофосфорилированные протеины [99], их основным источником в слюне являются слюнные железы [99]. Кислотные PRP проявляют способность в связывании гидроксида кальция, и таким образом принимают участие в формировании приобретенной пелликулы на поверхности зубов [16]. Основные PRP присутствуют в приобретенной пелликуле [16]. Кислотные PRP связывают бактерии, основные PRP связывают грибы (например *C. albicans*) и

вирусы, в то время как гликозилированные PRP связывают бактерии и вирусы [99].

Бактерицидный протеин, увеличивающий проницаемость мембран (BPI) - это катионный белок массой 55 кДа. Главными источниками слюнных BPI являются нейтрофилы [72] и эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта [72]. BPI проявляет бактерицидные и токсинейтрализующие, и опсонизирующие свойства. BPI демонстрирует высокий аффинитет к липидам-А бактериальных ЛПС-структур. Антибактериальное и токсинейтрализующее свойства BPI - это заслуга ЛПС-связывающего N-терминального домена, в то время как опсонизирующие свойства принадлежат C-терминальному домену [72]. Наиболее важным представителем BPI-подобных белков в слюне является паротидный секреторный протеин (PSP) [16]. PSP выделяется слюнными железами, а также кератиноцитами слизистой полости рта [16, 99]. Этот белок связывает бактериальные ЛПС и осуществляют агглютинацию бактерий [16]. Слюнные белки PLUNC (протеины субсемейства продуктов небнолегочно-назального эпителиального клона) главным образом выделяются большими и малыми слюнными железами [72]. Существуют восемь функциональных PLUNC-белков, которые могут быть разделены в две подгруппы: короткого типа (SPLUNC) и длинного типа (LPLUNC) [72]. Короткие состоят только из одного домена, соответствующего ЛПС-связывающему N-терминальному домену BPI, в то время как белки длинного типа содержат два домена, напоминая целую молекулу BPI [72]. Белки PLUNC маловероятно проявляют непосредственную киллерную активность (скорее она является бактериостатической, подобно PSP) [72]. Белки PLUNC также вероятно осуществляют агглюцинацию бактерий и изменение продукции цитокинов [72].

В смешанной слюне присутствуют цистатины [16] - цистеиновые протеазные ингибиторы, блокирующие действие эндогенных, бактериальных [16] и протозойных гидролаз [123], и также связывают бактерии и бактериальные ЛПС и токсины. Цистатины имеют прямые иммуномодуляторные свойства [16].

Гуморальную основу неспецифических реакций иммунитета в полости рта составляют цитокины (наиболее значимы интерферон и хемокины), выделяемые фагоцитами, натуральными киллерами, тучными клетками; антимикробные белки и антибактериальные ферменты (описанные выше); факторы свертывания плазмы (протеазы), регулирующие различные функции лейкоцитов; система комплемента (исходно неактивные белки плазмы; при последовательной их активации в мембране чужеродной клетки формируется канал, нарушающий целостность клеточной стенки, а также образуются факторы воспаления и стимуляции фагоцитоза). Эта система может быть активирована посредством трех путей: комплексом антиген-антитело (классический путь), углеводными компонентами микробной клетки (лектиновый путь), через связывание компонента С3 с поверхностью микроорганизмов (альтернативный путь).

Защитным протеином слюны является белок острой фазы **LBP (липополисахарид-связывающий белок)**, который секретируется нейтрофилами и эпителиальными клетками слизистой оболочки, в том числе и ротовой полости [87]. Липополисахарид-связывающий белок с высокой степенью афинности связывается с липополисахаридами мембран бактерий (липотейхоевой кислотой, липопептидами и пептидогликанами) [126], тем самым **LBP** способен предотвращать адгезию бактерий на поверхности клеток макроорганизма. Кроме того, связывание с белком бактерий облегчает дальнейшее соединение их с CD14 моноклеарными макрофагами, с последующим TLR4/MD2-опосредованным эндоцитозом образованного протеинового комплекса [121]. Известно, что данный белок, участвует в уменьшении выработки провоспалительных цитокинов макрофагами [126].

Гуморальными факторами специфического иммунитета в полости рта, как и во всем организме, являются антитела, продуцируемые плазматическими клетками (дифференцировавшимися из В-лимфоцитов) и цитокины, активирующие образование плазматических клеток.

Иммуноглобулины в полости рта могут присутствовать как в свободном виде, так и связанном с компонентами мембран лейкоцитов и эпителиальных

клеток [61, 112, 116]. Основным иммуноглобулином слюны является **секреторный иммуноглобулин А (sIgA)**, преимущественно подкласса IgA2 (более устойчивого к действию бактериальных протеаз). IgA играет наиболее важную роль в местной иммунной защите слизистых оболочек. Он ингибирует способность вирусов и бактерий к адгезии на поверхности эпителиального пласта, препятствуя их проникновению в организм. SIgA также секретируется плазмочитами подслизистого слоя миндалин и клетками lamina propria [112, 116]. SIgA имеет ряд функциональных преимуществ перед другими классами иммуноглобулинов: его молекула имеет секреторный участок, позволяющий проходить через слизистую; он наиболее устойчив к действию протеаз, обладает выраженным противовоспалительным эффектом, проявляющимся в ингибировании активации системы комплемента и провоспалительных клеток, что снижает возможность повреждения тканевого барьера [16]. Имеются данные, что у людей с дефицитом IgA чаще развивается кариес [62].

Для индукции антигенспецифических антител sIgA антигены должны быть представлены непосредственно на поверхности слизистой оболочки, особенно ее составляющей лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (MALT) [16].

В смешанной слюне зарегистрировано высокое содержание аутоантител класса **AsIg** и **sIgG** к цитокинам. Аутоантитела, по мнению некоторых авторов, участвуют в поддержании баланса про- и противовоспалительных цитокинов в полости рта и равным образом на других слизистых организма [7].

Следующим этапом защиты полости рта от проникновения чужеродных агентов являются тканевый (преграда в виде эпителиальных клеток) и клеточный (фагоциты подслизистого слоя - в основном, нейтрофилы) барьеры. Клетки эпителия активно вовлекаются в распознавание патогенов и защитную реакцию, в том числе за счет секреции антимикробных белков и некоторых цитокинов [158].

Разрушение тканевого барьера и внедрение условно-патогенных и патогенных микроорганизмов распознается системой **врожденного иммунитета** с помощью генетически детерминированных рецепторов (например, Toll-

подобных - TLR). Такие рецепторы находятся на различных фагоцитарных клетках – нейтрофилах, макрофагах, дендритных; при активации этих рецепторов макрофаги и дендритные клетки превращаются в антиген-презентирующие [93].

В полости рта на этом этапе наиболее важную роль играет так называемая лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) [93, 116]. Она богата различными иммунокомпетентными клетками, координирующими функции как неспецифического, так и специфического иммунитета. Скопления лимфоидной ткани присутствуют главным образом в собственной пластинке и подслизистом слое, значительное количество содержится в миндалинах лимфоидно-глоточного кольца. Основу лимфоидной ткани составляет ретикулоэндотелиальная сеть, содержащая моноциты, макрофаги, лимфоциты, плазматические клетки, гистиоциты, тучные клетки. Лимфоциты мигрируют в нее после образования в центральных лимфоидных органах. Основными клеточными факторами эпителия слизистой оболочки полости рта при развитии хронических воспалительных заболеваний являются Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки [99].

В последнее время обнаружена существенная роль антигенпрезентирующих дендритных клеток (образуются из моноцитов, представлены в основном клетками Лангерганса) в регуляции иммунного гомеостаза слизистой оболочки ротовой полости. Дендритные клетки захватывают антиген и мигрируют в лимфоузлы, где происходит презентация антигена и активация Т-хелперов (преимущественно Th1). Наибольшее количество клеток Лангерганса выявлено в зонах с неороговевающим эпителием (мягкое небо, губы, вентральная поверхность языка), т.е. в зонах с наиболее уязвимым тканевым барьером, наименьшее – в участках с ороговевающим эпителием твердого неба и десны. Контакт с патогенными бактериями (*Porphyromonas Gingivalis*) приводит к созреванию и активации дендритных клеток и последующей активации специфического иммунного ответа, секреции факторов воспаления и хемотаксиса, «привлечения» в зону поражения натуральных киллеров, Т-лимфоцитов, нейтрофилов. Показано, что в эпителии десны клетки Лангерганса чувствительны

к увеличению бактериального налета. Например, они могут мигрировать к поверхностному слою десны на ранней стадии развития гингивита, выполняя защитную функцию [77, 116].

Иммунная система слизистой оболочки состоит из координированных индуктивных и эффекторных тканей. В качестве индуктивных сайтов MALT снабжены всеми иммунокомпетентными клетками, необходимыми для инициирования антиген-специфических гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных ответов.

Адекватное развитие, поддержание и завершение иммунного ответа, и соответственно исход патологического процесса обеспечивается молекулярными взаимодействиями между различными типами клеток [34, 35]. Важное значение в этом процессе имеют костимуляторные и коингибиторные сигнальные молекулы, называемые еще иммунологическими контрольными «точками» (ИКТ). Существует несколько путей костимуляции и коингибирования Т-клеток. Костимулирование обеспечивается семейством молекул В.7, в том числе белком **В7.2 (CD86)** который связывается с CD28, локализованным на мембране Т-клеток, что приводит к индукции их пролиферации, повышению продукции интерлейкина 2 и усилению экспрессии антиапоптотических молекул [34]. Сигналы, передаваемые молекулами этого семейства, могут и ингибировать иммунный ответ, приводя к его прекращению или индукции антигенной толерантности [35].

Коингибирующий сигнал, вызывающий ограничение клеточного иммунного ответа, индуцируется рецепторами, включающими в себя молекулы семейства **CTLA-4 (Tim-3, Lag-3 и TIGIT)**. Эти молекулы начинают экспрессироваться на мембране Т-клеток после их активации и, связываясь с тем же протеином В7.2 (CD86), тормозят образование эффекторных Т-клеток. Вторым компонентом ИКТ является коингибирующий рецептор **PD-1**, функция которого несколько отличается от таковой CTLA-4. Оба рецептора подавляют пролиферацию Т-клеток, их выживаемость, синтез цитокинов, но CTLA-4 угнетает клеточный иммунный ответ в ранней фазе и прежде всего в лимфоидных тканях, а PD-1 – в поздней фазе и в периферических тканях [113]. Коингибирующие рецепторы

играют ключевую роль в поддержании иммунного гомеостаза и в предотвращении развития аутоиммунных процессов, при этом обеспечивая эффективные иммунные реакции для уничтожения патогенных микроорганизмов [113].

Структуры мягких тканей находятся в тесном взаимодействии с тканями зуба: дентином, цементом и эмалью. Все эти ткани подвергаются интенсивному механическому и химическому воздействию, а также плотной микробиологической колонизации.

Кариес зубов возникает, когда микроорганизмы полости рта начинают разрушать минерализованные ткани эмали и дентина, затем проникают в мягкую соединительную ткань в пульпе зуба. Тем не менее, пульпа тоже хорошо приспособлена для обнаружения и защиты от бактерий и их продуктов, а также задействует различные сложные защитные механизмы. По периферии пульпы располагаются в несколько слоев одонтобласты, выстилающие пульповую камеру по направлению к дентину. Эти высокоспециализированные клетки не только образуют минерализованную ткань, но и выполняют защитные функции: распознают патогены на ранней стадии кариеса, выделяют антибактериальные соединения и нейтрализуют бактериальные токсины, инициируют иммунный ответ и предупреждают других ключевых игроков защиты хозяина. По мере того, как бактерии приближаются к пульпе, дополнительные типы клеток пульпы, включая фибробласты, стволовые и иммунные клетки, а также сосудистые и нейронные сети, вносят свой вклад в различные механизмы защиты [106]. На функцию одонтобластов оказывает значительное действие цитокин **TGF- β 1**, который действует как мощный иммунодепрессант и индуктор формирования межклеточного матрикса, играет важную роль в репаративном процессе дентина, регулируя пролиферацию, дифференцировку клеток [82, 90, 151]. TGF-beta выделяют многие типы клеток, включая макрофаги, эпителиоциты и В-клетки.

Таким образом, иммунная система ротовой полости активно осуществляет функцию перманентного скрининга внешних факторов и активно защищает ткани зуба от воздействия микроорганизмов, вызывающих кариес. При этом пептидные

молекулы слюны играют весьма важную роль, как в физико-химической, так и в иммунной защите тканей зуба от кариесогенных воздействий. Причем некоторые из этих полипептидов проявляют прямое антимикробное действие и агглютинацию, другие необходимы для тонкого регулирования иммунных и метаболических реакций [16, 116, 158].

1.3 Биологическая роль витамина D и его вклад в формировании тканей зуба и иммунитета полости рта

Общее название «витамин D» объединяет группу липофильных соединений, несколько отличающихся по химическому строению, происхождению и биологической активности [2, 4].

Активация. Витамин D подвергается гидроксилированию с образованием метаболитов, обладающих различной биологической активностью. Первый этап гидроксилирования в положении С-25 витамина осуществляется в гепатоцитах в купферовских клетках печени посредством фермента семейства цитохрома P450 25-гидроксилазы. Данную реакцию могут катализировать многие члены семейства цитохрома P450, но наиболее активны митохондриальная CYP27A1 и микросомальная CYP2R1 [161].

Промежуточный метаболит – 25(OH)D транспортируется протеином DBP по крови в почки. В клетках почечных канальцев трансмембранный гликопротеин мегалин с молекулярной массой 600 кДа действует как рецептор для кальцидиола и приводит к поглощению комплекса DBP/25(OH)D₃ путем эндоцитоза [161, 163]. В проксимальных извитых и прямых канальцах почек под действием 1 α -гидроксилазы (митохондриальная CYP27B1) осуществляется еще реакция гидроксилирования и образование 1,25(OH)₂D₃ (кальцитриола) – активной формы витамина D [4].

То есть витамин D преобразуется в кальцидиол (25(OH)D) прежде всего в печени и превращается в кальцитриол в почках [161]. Однако его химические превращения также могут осуществляться и в других тканях, что способствует биологическому действию данного витамина по аутокринным и паракринным

путям [163]. Так, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ образуется в иммунных клетках, нейронах, остеоцитах, эндотелиоцитах, паратиреоцитах, тиреоцитах, энтероцитах, клетках кожи, легких, поджелудочной, молочной, предстательной желез, яичек, яичников, плаценты [163].

Роль в организме. На данный момент выделяют два вида эффектов кальцитриола. Основную функцию гормон выполняет в кишечнике, почках и костной ткани, оказывая так называемый «классический» эффект, который заключается в поддержании гомеостаза Ca^{2+} и фосфатов в организме, в осуществлении процессов минерализации и ремоделирования костной ткани [2]. Под «неклассическими» эффектами подразумевают влияние $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на иммунную, нервную, сердечно-сосудистую, дыхательную, репродуктивную системы, на такие процессы, как пролиферация, апоптоз, дифференцировка клеток и другие [5, 163, 173].

Классический механизм действия.

Биологическое действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ опосредовано через рецепторы витамина D (VDR). VDR принадлежит к суперсемейству ядерных рецепторов [4]. Было установлено, что почти все клеточные ткани в живом организме имеют VDR. Существует около 900 генов, непосредственно или косвенно реагирующих на воздействие кальцитриола, в том числе и ген самого VDR [40, 163].

Взаимодействие витамина D с комплексом VDR-RXR активирует классический геномный путь реализации тканевого ответа [162, 173], но также известен второй негеномный способ быстрого реагирования клеток на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ с помощью альтернативного мембранного рецептора VD – $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -MARRS (семейство дисульфидизомераз 3 (PDIA3)), регулирующего активность аденилатциклазы, фосфолипазы C и протеинкиназы C [13, 162, 173].

Действие в кишечнике

Основным действием кальцитриола и VDR является всасывание кальция в кишечнике [42].

Действие в почках

Установлено, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ регулирует реабсорбцию кальция и фосфатов почками. [42].

Действие в костной ткани

Структурная организация межклеточного матрикса костей зависит от достаточного поступления кальция из сыворотки и, следовательно, косвенно от его кишечной абсорбции и почечной реабсорбции, но, с другой стороны, кальций может выводиться из костной ткани для поддержания его нормального уровня в плазме крови [41]. Кальцитриол непосредственно участвует в метаболизме костной ткани, прямо воздействуя через рецепторы VDR на ее клеточные элементы (хондроциты, остеобласты, остециты и остеокласты) [40].

Считается, что основной мишенью среди клеток костной системы для данного гормона являются остеобласты. С одной стороны, активация VDR остеобластов приводит к экспрессии генов-мишеней, которые обеспечивают дифференцировку и функциональную активность вышеуказанных клеток. С другой стороны, образование лиганд-рецепторного комплекса на клеточных мембранах способно вызывать негеномные, быстрые эффекты в остеобластах [164]. Во время нормального или положительного баланса кальция в организме $1,25$ -дигидрокси-холекальциферол ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) обеспечивает минерализацию костей и твердых тканей зубов [2].

Имеются данные о собственно антикариозной активности витамина D [4, 18]. Экспериментально доказано, что дефицит $25(\text{OH})\text{D}_3$ не только затрудняет депонирование кальция твердыми тканями зуба, но и вызывает увеличение объема органического матрикса дентина, вследствие нарушения его минерализации, задержку развития и формирования эмали с последующими гипопластическими изменениям в ней [18]. Опубликованы результаты исследований, установивших связь между плотностью альвеолярной костной ткани, остеопорозом и потерей зубов. Отчеты демонстрируют значимую связь между состоянием пародонта и потреблением витамина D [4].

В минерализации эмали после прорезывания зубов главную роль играет слюна. В ней присутствуют все необходимые вещества для этого процесса: ионы

кальция, фосфаты, аминокислоты, цитокины, а также витамин D, который регулируют данные реакции [14, 21].

Минерализующая функция слюны осуществляется благодаря наличию в ее составе ионов кальция и фосфатов, которые в смешанной слюне соединяются с муцином, образуя мицеллы [14, 137]. Уровень кальция слюны, один из основных показателей минерализующей функции слюны, зависит от кислотности ротовой жидкости, буферной емкости, мицеллярного строения слюны. В норме содержание кальция в слюне составляет 0,75—3,0 ммоль/л. Кальций в слюне находится в двух формах: ионизированной и связанной. Первая форма составляет 50%. Концентрация кальция в слюне зависит от скорости секреции слюны: с ее увеличением концентрация иона увеличивается. Фосфор слюны представлен неорганическими соединениями (95%), и лишь небольшая часть (5%) — в виде органических фракций. Основной формой неорганического фосфата в физиологических условиях (рН 6,8—7,5) является гидрофосфат HPO_4^{2-} . Содержание фосфатов в слюне в 2—3 раза выше, чем в плазме крови. В минерализации большое значение имеет перенасыщенность слюны ионами кальция и фосфатов. Перенасыщенность создает препятствие растворению зубов, облегчает внедрение ионов из слюны в эмаль, способствует регуляции рН.

Достаточное количество кальция и фосфатов, которое переходит из слюны в эмаль зуба, из кровеносных капилляров пульпы в дентин и цемент и извлекается из капилляров костной ткани, обеспечивает витамин D [14, 137].

Действие витамина D на иммунциты врожденной иммунной системы. Дендритные клетки (ДК). Установлено, что кальцитриол может изменять функцию и морфологию дендритных клеток, делая их иммунологически толерогенными [173]. Это сопровождается снижением экспрессии антигенпрезентирующих (HLA-ABC и -DR) и костимулирующих молекул (CD80, CD86), уменьшением секреции IL-12, IL-23 и ускорением синтеза толерогенного IL-10 с последующим угнетением активации аллогенных Т-клеток и усилением дифференцировки Treg. Наряду с таким влиянием на дифференцировку ДК, витамин D уменьшает и общее число ДК, скорее всего, путем содействия их

спонтанному апоптозу, а также снижает экспрессию МНС класса I и II молекул на поверхности клеток [49]. Угнетению ответа толерогенных ДК на антиген способствует и VD-индуцируемое подавление продукции IL-23 [49].

В ДК во время дифференцировки постоянно увеличивается экспрессия CYP27B1, но в то же время регистрируется уменьшение экспрессии VDR, что свидетельствует о снижении ответа на $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ в уже зрелых дендроцитах [120].

Моноциты и макрофаги. Установлено, что в моноцитах VD, связываясь с VDR, подавляет экспрессию Toll-подобных рецепторов, а именно — TLR-белков 2 и 4 [49], снижая этим способность моноцитов распознавать патогены. Уменьшение количества TLR ведет также к ослаблению транслокации в ядро фактора NF- κ B/RelA, необходимого для транскрипции провоспалительных медиаторов [173].

Также выявлено, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ оказывает двойное действие на макрофаги в зависимости от статуса их активации. При бактериальной инфекции на начальной стадии кальцитриол усиливает дифференцировку моноцитов в макрофаги, индуцирует выработку IL-8, IL- 1β , последний усиливает синтез антимикробных пептидов кателицидина и β -дефензина [120]. Известно, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ стимулирует экспрессию NOD2 / CARD15 – белков, связывающих бактериальный мурамил-дипептид (MDP) грамотрицательных и грамположительных бактерий [172]. Антимикробная активность кальцитриола также опосредована через PI3K и NADPH оксидазу, необходимых для усиления генерации активных форм кислорода и повышения аутофагии микроорганизмов в моноцитах [163].

На более поздней фазе инфекции, когда макрофаги активированы в достаточной или избыточной степени, действие $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ направлено на то, чтобы ослабить провоспалительный ответ за счет уменьшения продукции IL- 1β , IL-6, фактора некроза опухоли (TNF α), ядерного фактор-каппа-B-лиганд (RANKL), оксида азота и циклооксигеназы-2 (COX-2) и увеличения выработки IL-10, который является «противовоспалительным цитокином» [120, 172].

Кроме того известно, что, связываясь с VDR, витамин D способствует экспрессии генов *camp* и *defB2*, запускающих трансляцию кателицидина и β -дефензинов в других клетках [49].

Действие на приобретенный иммунитет. CD4⁺ Т-клетки - подтипы Th1, Th2, Th17 и Treg. Имеются данные о том, что, способствуя врожденному иммунному ответу, 1,25(OH)₂D₃ подавляет адаптивный иммунитет. Во-первых, кальцитриол угнетает созревание DC, ингибируя их способность представлять антиген, секретировать IL-12, IL-23, IL-6 и, таким образом, активировать Т-клетки. В свою очередь, снижение активности Th1 влечет за собой уменьшение продукции «провоспалительных цитокинов» (IFN- γ , IL-2, TNF α), а ингибирование Th17 приводит к падению количества IL-17, IL-22/23, участвующих в развитии аутоиммунных процессов. Во-вторых, 1,25(OH)₂D₃ повышает функциональную активность регуляторных Т-клеток (Treg) (клеток, которые важны для подавления воспалительных процессов посредством экспрессии IL-10, коингибирующих молекул, включая PD-1 и CTLA-4) [49, 120, 121, 162, 168].

Однако в некоторых работах описывают противоположные эффекты витамина D, а именно способность ингибировать синтез и высвобождение «противовоспалительных» цитокинов (IL-4 и IL-10) и индуцировать секрецию IL-1, TNF- α , IFN- γ , вызывающих, в свою очередь, экспрессию на поверхности эндотелия адгезивных молекул, обеспечивающих роллинг и прикрепление нейтрофилов, лимфоцитов, стимулирующих образование острофазных белков, эйкозаноидов [164]. Возможно, это связано с дозозависимой активностью витамина D, а также с различной степенью дифференцировки иммунных клеток, подлежащих его воздействию [49].

Изменение активности иммунноцитов преимущественно опосредовано связыванием VDR/RXR с факторами транскрипции соответствующих генов, таких как: NFAT, Runx1, Foxp3, ROR γ t. Вместе с тем, активная форма витамина D способствует развитию Th2-иммунного ответа, угнетая экспрессию Th1 ассоциированных цитокинов, костимулирующих молекул (CD40, CD80, CD86) и увеличивая экспрессию Th2-цитокинов, в том числе IL-4 [120].

CD8⁺ Т-клетки. CD8⁺ Т-клетки экспрессируют более высокий уровень VDR, чем CD4⁺ Т-клетки. Кальцитриол ингибирует CD8⁺ активированную секрецию IFN γ и TNF α [120]. Также отмечена связь между витамином D и подтипом CD8⁺ Т-клеток – CD8 $\alpha\alpha$, не являющихся цитотоксическими и, возможно, участвующих в подавлении воспаления. В животных моделях, нокаутированных по гену VDR, уменьшается экспрессия хемокинового рецептора CCR9 в Т-клетках, что препятствует их возвращению («хоумингу») в ткани, вследствие чего количество CD8 $\alpha\alpha$ клеток снижается [49].

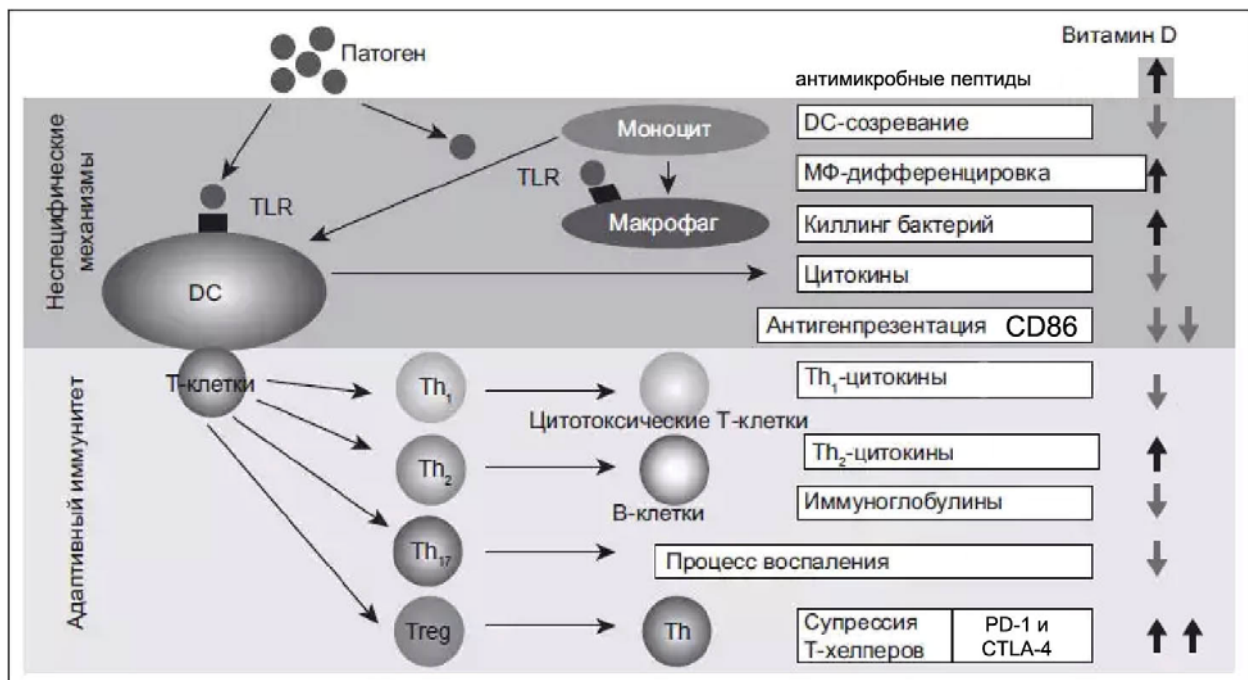


Рисунок 1. Влияние витамина D на неспецифические механизмы защиты и иммунную систему организма [100].

В клетки. На В-лимфоциты 1,25(OH) $_2$ D оказывает как прямое, так и опосредованное влияние за счет регуляции функции других иммунных клеток. В экспериментах *in vitro* при воздействии 1,25(OH) $_2$ D отмечено угнетение пролиферации, дифференцировки В-клеток, образования В-клеток памяти, а также секреции IgG и IgM. Центральное место в спектре иммуномодулирующей активности кальцитриола занимает его влияние на сигнальные пути рецептора глюкокортикоидов, транскрипционных факторов NF- κ B, NFAT, SMAD. При этом 1,25(OH) $_2$ D $_3$ стимулирует развитие плазматических клеток из терминально

дифференцированных В-клеток и усиливает их миграцию к месту воспаления посредством индукции CCR10 [120].

Существуют убедительные доказательства того, что иммунные клетки превращают 25(OH)D в 1,25(OH)₂D, и скорость реакции зависят от циркулирующих уровней 25(OH)D как минимум 30 нг/мл [173]. Как только 1,25(OH)₂D продуцируется, он действует аутокринным и паракринным образом, модулируя врожденную и адаптивную иммунные системы. Есть некоторые свидетельства того, что витамин D сам по себе может модулировать иммунную функцию негеномным образом, стабилизируя мембраны клеток [100]. На сегодняшний день большая часть данных свидетельствует о том, что поддержание здорового статуса витамина D важно для регулирования иммунной функции организма. Кроме того, в исследовании Saputo S. и соавт. (2017) показано, что аналоги витамина D индуцируют лизис *Streptococcus mutans* в культуре. Предыдущие исследования показали, что некоторые производные витамина D обладают литической активностью в отношении других бактерий, хотя механизм их действия не установлен. С помощью комбинаторного подхода было показано, что производное витамина D доксеркальциферол действует синергетически с бацитрацином, лекарством полипептидного типа, которое, как известно, препятствует синтезу клеточной стенки, что позволяет предположить, что доксеркальциферол может действовать в связанном с бацитрацином пути [42].

Таким образом, основной массив доказательной базы, взятый из различных исследований, свидетельствуют о том, что активная форма витамина D не только играет важную роль в поддержании метаболизма кальция и фосфата в тканях зуба, но и в иммунном ответе (рис.1), активность которого важна для кариесорезистентности. Следует надеяться, что благодаря дальнейшему изучению и пониманию тонкостей влияния витамина D на иммунные реакции в полости рта, можно будет обоснованно использовать препараты витамина D в профилактике и комплексной терапии кариеса, что будет не только способствовать укреплению эмали зуба, но и опосредованно снижать агрессивность микробов-резидентов, в частности кариесогенных бактерий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования и характеристика обследуемых групп

Исследование включало в себя несколько этапов.

В первом этапе исследования, проведенного в 2018-2020 г. участвовали 969 студентов 2-3 курса ЧГМА, ЗаБГУ, медицинского колледжа (г.Чита), Военной медицинской академии и других ВУЗов (Санкт-Петербург). Возраст участников составлял от 18 до 23 лет. С помощью анкетирования у всех выясняли информацию о социально-демографических факторах, о поведении в отношении здоровья полости рта (регулярность посещения стоматолога, частота чистки зубов), характер питания, прием витаминов и др. При стоматологическом осмотре оценивали степень интенсивности кариеса зубов, рассчитывая индекс КПУз (К-кариес; П-пломба; У-удаленный). Индекс значимого кариеса (SiC) был рассчитан как средний индекс КПУ в группе участников с наивысшим индексом КПУ. Точка отсечения КПУ составляла 8,9, и все студенты с индексом КПУ ≥ 9 были помещены в группу SiC.

От всех обследуемых было получено добровольное информированное согласие на проводимое исследование. Протокол исследования одобрен локальной комиссией ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России (протокол №. 105 от 02.12.2020). В работе соблюдены этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 – поправки).

Исследования, проведенные на данном этапе, показали, что распространенность кариеса (КПУ > 0) у обследуемых молодых людей составила 95,9%, средний индекс КПУ – 5,29. Низкая интенсивность кариеса (КПУ) от 1 до 3 регистрировалась у 28,89% обследуемых. КПУ от 9 до 14 выявлен в 20,43% (198/969) случаях.

В ходе статистического анализа мы разделили студентов на 3 группы в зависимости от индекса КПУ

Абсолютное и относительное количество лиц с различной интенсивностью кариозного процесса

| | КПУ 0-3 | КПУ 4-8 | КПУ9-14 |
|----------------|---------|---------|---------|
| Кол-во человек | 280 | 491 | 198 |
| % | 28,89 | 50,67 | 20,43 |

Все опрошиваемые указали, что чистят зубы 2 раза в день. Зубной пастой линейки SPLAT пользуются 34,9% (338/969), Colgate – 34,1% (330/969) опрошенных. Профессиональную чистку зубов делают регулярно 23,0% (223/969), никогда – 44,5% (431/969). В момент анкетирования или в течение последнего полугодия года витамин D принимали 36,2% (351/969) опрошенных, около трети из них в составе поливитаминов или БАДов. Зависимости, рассчитанные между определяемыми показателями на данном этапе с помощью бинарной логистической регрессии, показали, что кариесогенными детерминантами выступили регулярность употребления молочных продуктов и частота нахождения на солнце.

В следующий этап не были включены лица, принимающие препараты витамина D на момент исследования, лица с гингивитом и не пожелавшие участвовать в дальнейшей работе.

Таким образом, во втором этапе исследования приняли участие 598 человек (200 с индексом КПУ от 0 до 3; 200 человек с индексом КПУ от 4 до 8, и 198 человек с КПУ ≥ 9), у которых в сыворотке крови было определено содержание метаболита витамина D – 25(OH)D. Далее, учитывая клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике, лечению и профилактике дефицита витамина D у взрослых [41], выделены лица с нормальным содержанием витамина D (30-100 нг/мл), недостатком (уровень 25(OH)D 20-29 нг/мл) и дефицитом (количество 25(OH)D <20 нг/мл). На основании полученных данных был сделан вывод об отличительных особенностях содержания метаболита витамина D – 25(OH)D в крови у пациентов с кариесом различной интенсивности патологического процесса.

На третьем этапе работы из осмотренных и проанкетированных лиц в исследование были включены 105 человек. Из них 42 человека с кариесом и нормальным уровнем витамина D, разделенных на 2 группы в зависимости от интенсивности кариозного процесса.

1 группа – 21 учащийся со средней интенсивностью кариозного процесса (индекс КПУ 4-8).

2 группа - 21 пациент с высокой интенсивностью кариозного процесса (индекс КПУ- 9 и более).

Также были сформированы 2 группы по 21 человеку в каждой с кариесом и уровнем 25(ОН)D ниже нормы (<30 нг/мл).

3 группа - лица со средней интенсивностью кариозного процесса (индекс КПУ 4-8).

4 группа - лица с высокой интенсивностью кариозного процесса (индекс КПУ 9 и выше 9).

Контрольную группу составили 21 студент с индексом КПУ от 0 до 3 и нормальным уровнем 25(ОН)D в крови.

Группы сопоставимы по возрасту, полу, социальному статусу.

Критериями исключения из исследования явились: гингивит, соматические острые и хронические заболевания.

Характеристика групп представлена в таблице 2.

Стоматологическое обследование выявило, что кариозным процессом поражались преимущественно моляры (60,1%), реже - премоляры (39,9%). Анализ компонентов, составляющих индекс КПУ(з), свидетельствует о том, что относительно не велика доля удаленных зубов и число пораженных кариесом зубов (табл. 1). Индексная оценка КПУ(з) во 2-ой и 4-ой группах расценена нами как высокая (рекомендации ВОЗ). Оценки индекса гигиены Грина-Вермильона ОНI-S показала практически одинаковую (хорошую) гигиену полости рта во всех группах. Значения вязкости слюны в группах также не имели достоверных различий.

Индексы гигиены, КПУ, его компоненты, вязкость слюны и некоторые особенности питания в обследуемых группах

| Показатель | Исследуемые группы | | | | | Тестовая статистика |
|--|------------------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|
| | Контрольная группа (n=21) | Группы с нормальным уровнем 25(OH)D | | Группы с низким уровнем 25(OH)D | | |
| | | 1 группа (n=21) | 2 группа (n=21) | 3 группа (n=21) | 4 группа (n=21) | |
| Возраст, лет | 19,0 (19,0; 19,5) | 19,0 (19,0; 19,5) | 19,0 (19,0; 19,5) | 19,0 (19,5; 20,0) | 20,0 (19,4; 20,0) | H=1,06 p=0,59 |
| КПУ | 1,0 (1,0; 1,7) | 5,0* (4,5; 6,5) | 9,5* (9,0; 11,0) | 5,0* (4,6; 6,7) | 9,5* (9,1; 11,5) | H=51,49 P<0,001 |
| К | 0,0 (0,0; 0,0) | 1,5* (1,0; 2,5) | 2,0* (1,0; 4,0) | 2,0* (1,0; 3,5) | 2,5* (1,0; 3,5) | H=48,25 P<0,001 |
| П | 1,0 (1,0; 1,7) | 4,0* (3,0; 5,1) | 7,0* (5,5; 8,0) | 4,0* (4,0; 5,2) | 7,5* (7,0; 8,3) | H=47,26 P<0,001 |
| У | 0,0 (0,0; 0,0) | 0,0 (0,0; 0,0) | 0,0 (0,0; 0,1) | 0,0 (0,0; 0,2) | 0,0 (0,0; 0,4) | H=7,91 P=0,02 |
| Индекс гигиены | 0,7 (0,5; 1,3) | 0,8 (0,5; 1,2) | 0,8 (0,4; 1,3) | 0,9 (0,6; 1,2) | 0,9 (0,6; 1,1) | H=1,03 p=0,37 |
| Вязкость слюны (отн.ед) | 1,30 (0,99; 1,52) | 1,35 (0,98; 1,55) | 1,40 (1,01; 1,56) | 1,46 (1,03; 1,50) | 1,45 (1,04; 1,49) | H=1,03 p=0,41 |
| Частота употребления сладостей (в неделю) | 5,0 (4,5; 5,8) | 7,0* (6,1; 7,5) | 8,0* (5,6; 9,5) | 5,5 (4,6; 5,7) | 6,0 (4,7; 7,5) | H=8,78 P=0,012 |
| Частота употребления молочных продуктов (в неделю) | 5,0 (4,2; 7,0) | 4,0 (3,0; 7,5) | 2,5* (1,5; 7,0) | 3,0* (1,5; 6,0) | 3,0* (2,0; 4,0) | H=51,49 P<0,001 |

Примечание: * статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни

Как видно из таблицы 2, употребление продуктов с высоким содержанием легкоусвояемых углеводов было выше в группе с кариесом и нормальным уровнем 25(OH)D. При этом в контрольной и в группе с недостатком витамина D этот показатель был одинаковым. Употребление молочных продуктов, являющихся источником кальция, который участвует в процессах минерализации тканей зуба, максимально было в группе контроля.

Частота нахождения на солнце

| Показатель | Исследуемые группы | | | Тестовая статистика |
|---|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | Контрольная группа (n=21) | Группы с уровнем 25(OH)D > 30 нг/мл | Группы с низким уровнем 25(OH)D | |
| | | 1 и 2 группы (n=42) | 3 и 4 группы (n=42) | |
| Практически не загорают | 14,3% (3/21) | 2,4% (1/42) | 66,7% (28/42) | $\chi^2=46,20$ df=4 p<0,001 |
| Активно загорают летом | 71,4 % (15/21) | 88,0% (37/42) | 33,3 % (14/42) | |
| Загорают не только летом, но и выезжают на море в другие сезоны | 14,3% (3/21) | 9,5% (4/42) | 0% (0/42) | |

Примечание: значения различий по Краскелу-Уоллису

Как видно из таблицы 3, уровень 25(OH)D в крови был выше у тех лиц, кто указал в анкете, что активно загорает, причем не только летом, но и в другие сезоны.

При этом между значениями 25(OH)D и активностью загара зафиксирована прямая корреляционная связь средней силы ($r=0,51$; $p=0,002$), что выглядит логично, поскольку витамин D₃ вырабатывается в мальпигиевом и базальном слоях эпидермиса кожи под действием ультрафиолетового света из 7-дегидрохолестерина, который в свою очередь образуется при дегидрировании холестерина [69].

Образование витамина D₃ в коже не является ферментативным процессом. Холекальциферол образуется из 7-дегидрохолестерина (7-DHC) посредством двухэтапного процесса, в котором кольцо В разрушается ультрафиолетовым излучением (спектр 280–320 UVB) от солнца, образуя пре-D₃, который изомеризуется до D₃. Интенсивность ультрафиолета и уровень пигментации кожи способствуют скорости образования D₃. Меланин в коже блокирует ультрафиолетовое излучение от 7-DHC, ограничивая тем самым выработку D₃, как и одежда и солнцезащитный крем. Интенсивность ультрафиолета варьируется

в зависимости от сезона и широты, поэтому, чем дальше человек живет от экватора, тем меньше времени года можно рассчитывать на солнечное воздействие, способствующее образованию холекальциферола.

Во всех указанных группах был проведен сбор слюны, в которой оценивался уровень пептидов, участвующих в иммунном ответе полости рта и регуляции данного процесса, а также вязкость слюны.

2.2. Метод анкетирования

Анкетирование является ведущей методикой социологического опроса. К очевидным преимуществам метода относится возможность привлечения значительного количества респондентов, положительное соотношение «объем информации – промежуток времени». В нашем случае медико-социальное анкетирование было направлено на выявление следующих показателей: особенности питания (для оценки диетических факторов выясняли режим и кратность приема сахаросодержащих напитков и еды), прием витаминов, время нахождения на солнце, стоматологическая грамотность. Для этого нами была разработана анкета, составленная с учётом «Рекомендации для составления опросников» (Белянин В.П., 2009).

2.3. Методы стоматологического обследования и забор слюны

Исследование стоматологического статуса проводилось традиционными методами и инструментами по регламенту, описанному в национальном руководстве по терапевтической стоматологии [20] и включало сбор жалоб, комплексный осмотр челюстно-лицевой области и индексную оценку гигиены полости рта ОНI-S по Green-Vermilion.

В зубной формуле были отмечены пломбированные, требующие лечения и отсутствующие зубы. Распространенность кариеса зубов определяли следующим образом: процентное отношение лиц, имеющих хотя бы один из признаков кариеса зубов (кариозные, пломбированные, удаленные в результате осложнений кариеса зубы), к общему числу обследованных лиц. Интенсивность кариеса зубов определяли индивидуально с помощью индекса КПУ зубов, представленного суммой кариозных, пломбированных и удаленных по поводу осложнений кариеса

у одного пациента. Отдельно рассчитывали каждый компонент индекса: «К» — кариозный зуб, «П» — пломбированный, «У» — удалённый.

Для определения степени тяжести кариозного процесса использовано понятие интенсивность кариеса (индекс КПУ).

Забор смешанной слюны

Забор ротовой жидкости проводили натощак с 8 до 9 часов и осуществляли путем сплёвывания в стеклянную, стерильную пробирку в течение 5 минут, без предварительной её стимуляции. Объем ротовой жидкости составлял в среднем 7 мл. Затем образцы очищали центрифугированием при $10000 \times g$ в течение 5 мин от клеток, замораживали и хранили при температуре -30° по С.

В день анализа образцы оттаивали и дополнительно очищали от муцина путем центрифугирования при $3000 \times g$ в течение 5 мин.

2.4. Лабораторные методы исследования

2.4.1. Метод определения метаболита витамина D в крови

Содержание метаболита витамина D – 25(OH) витамина D проводилось методом хемилюминесцентного иммунного анализа (Access 2).

2.4.2. Методы исследования ротовой жидкости

У всех лиц, принявших участие в третьем этапе исследования, в ротовой жидкости определяли концентрацию растворимых мембранных белков (мембранного белка суперсемейства иммуноглобулинов, продукта гена CD86 (B7.2 (CD86), свободной фракции трансформирующего ростового фактора бета-1 (Free Active TGF-b1), коингибирующих рецепторов (цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4) и белка запрограммированной смерти клеток 1 (PD-1), белка Т клеточного иммуноглобулина и муцинового домена-3 (Tim-3), белка гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3)), белка 4, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-4), молекулу межклеточной адгезии 1 (ICAM-1)) и ферментов матричных металлопротеиназ (ММР) MMP-2, MMP-9 используя наборы для мультиплексного анализа Human

Immune Checkpoint Panel 1 и Human Vascular Inflammation Panel 1 фирмы Biolegend (США).

Анализ ротовой жидкости проводили без разведения, все этапы исследования выполнялись согласно инструкции наборов (https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/75000050_4_HU_Immune_Checkpoint_Panel_1_Manual_R01.pdf и <https://www.biolegend.com/en-us/legendplex>).

Результаты оценивали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex. Данный анализ обеспечивает более высокую чувствительность обнаружения и более широкий динамический диапазон, чем традиционные методы ИФА (ELISA). Панели одобрены для использования в надосадочной жидкости клеточной культуры, образцах сыворотки и плазмы, гомогенате ткани и др. биологических объектах. В доступной нам литературе, мы не обнаружили данных по исследованию перечисленных молекул в слюне.

Кроме того, в ротовой жидкости оценивали количество антимикробного пептида – кателицидина LL-37, альфа-дефензина 1-3, секреторного иммуноглобулина А, липополисахарид-связывающего белка (LBP) методом ИФА с использованием наборов реактивов для ИФА Hycult Biotechnology (Дания), ИФА-БЕСТ (Россия) и Cloud-Clone Corp. (USA) соответственно.

Вязкость ротовой жидкости определяли по методу Николаевой Л.А. и соавт. 2019. (https://yandex.ru/patents/doc/RU2726920C1_20200716)

2.5. Статистические методы обработки данных

Анализ полученных результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics для Macintosh версии 23.0 (IBM Corp., Армонк, Нью-Йорк, США).

Перед началом анализа вариационные ряды тестировались на нормальность при помощи критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального, полученные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q₁; Q₃]. Сравнение количественных признаков выполняли с применением критерия Краскела-Уоллиса (H). При наличии статистически значимых различий с учетом поправки Бонферрони, проводилось

попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни (U). Для определения корреляционных связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (ρ). Силу связи между исследуемыми параметрами определяли по шкале Чеддока. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных исследования проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Для определения силы связи между фактором риска и исходом использовался критерий Крамера (V).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ротовая жидкость представляет собой уникальную биологическую среду, имеющую большие потенциалы для использования её и в фундаментальных исследованиях, и в диагностике, и прогнозе течения стоматологических заболеваний. Состав смешанной слюны у пациентов с высокой интенсивностью кариеса зубов изучен, что позволяет выявить факторы риска активации патологического процесса [11, 12], однако информация о метаболических и иммунологических показателях ротовой жидкости пациентов, имеющих множественный кариес на фоне различной степени выраженности дефицита витамина D недостаточная. Имеются исследования, в которых выявлено, что интенсивный кариес чаще развивается на фоне недостатка витамина D в организме [115, 163]. Интересным является на наш взгляд исследование Л.П.Кисельниковой и соавт. (2014), в котором представлены результаты определения 25(ОН) витамина D с помощью метода ИФА в смешанной слюне подростков [14]. У подростков с кариесом было выявлено снижение в ротовой жидкости промежуточного метаболита витамина D: если в контрольной группе, по данным авторов, уровень 25(ОН) витамина D оказался в пределах $56,3 \pm 5,4$ нмоль/л, то в группах с кариесом он был статистически значимо ниже и составлял $15,2 \pm 2,2$ нмоль/л [14]. Авторы, прежде всего, объясняют недостатком витамина нарушения обмена кальция и фосфатов, которые также были зафиксированы у обследуемой группы. Однако исследователи указывают и на повышение активности микрофлоры у лиц с кариесом, что невозможно объяснить только нарушением минерального обмена.

Между тем, результаты работ ряда исследователей, указывают на то, что кальцитриол не только регулирует обмен ионов кальция, но и обладает иммуномодулирующим и другими эффектами [5, 42, 163]. Несмотря на возможность синтеза холекальциферола в организме, проблема дефицита витамина D оказалась актуальной для многих стран [31]. Учитывая, все выше изложенное, на одном из этапов работы нами была сделана оценка

распространенности недостатка и дефицита 25(OH) витамина D у молодых лиц с кариесом, а на другом – проведено изучение в ротовой жидкости уровня молекул, участвующих в мукозальном иммунитете, у лиц на фоне разного статуса 25(OH) витамина D в организме.

3.1. Содержание метаболита витамина D – 25(OH)D в крови у пациентов с кариесом различной степени интенсивности патологического процесса

Субклинический дефицит витамина D выявлен у 50-60 % жителей планеты [10]. Для оценки статуса витамина D в организме различными методами можно определить концентрацию его метаболитов, которых известно около 50, но оценка только некоторые из них имеет диагностическое значение.

Группа соединений, объединенных названием – витамин D, безусловно, принадлежит к данному классу биологически активных веществ, поскольку: 1) оказывает регулирующее влияние на биохимические и физиологические процессы 2) имеют низкую суточную потребность, 3) не синтезируются в организме человека (в данном случае исключением является холекальциферол, но для его синтеза необходим строго определенный спектр ультрафиолетовых лучей).

Количественное определение холекальциферола, его метаболита – 25(OH)D₃, эргокальциферола и 25(OH)D₂ позволяет отразить вклад каждой из данных фракций в общий пул витамина D. Определение уровня 25(OH)D₃ и 25(OH)D₂ может быть важным при мониторинге терапии препаратами витамина D, а также для обследования пациентов, не отвечающих на терапию.

Наиболее точным индикатором уровня витамина D в организме считается общий 25(OH) витамин D. Это обусловлено тем, что 25(OH)D имеет достаточно длительный периодом полураспада (примерно 3 недели), в отличие от витамина D (около 24 часов) и кальцитриола (4 часа). Уровень общего 25(OH)D отражает скорость накопления как эндогенного, так и поступление экзогенного витамина D. Кроме того, синтез 25(OH)D в печени преимущественно регулируется субстратом,

то есть витамином D, в то время как образование кальцитриола в значительной степени регулируется паратгормоном. Поэтому при дефиците витамина D содержание 1,25(OH)₂D может быть повышенным, нормальным или пониженным, в связи с чем исследование 1,25(OH)₂D нецелесообразно применять с целью скрининга для общей оценки статуса витамина D в организме.

Однако этот тест может быть полезен в обследованиях пациентов с хроническими болезнями почек, и кроме того его используют для диагностики наследственных нарушений обмена витамина D.

В связи с вышеизложенным в своей работе мы определяли содержание общего 25(OH) витамина D в крови обследуемых лиц.

Ну, и кроме того, существующие убедительные доказательства того, что иммунные клетки превращают 25(OH)D в кальцитриол, так как в них присутствует фермент 25(OH) витамин D 1 α -гидроксилаза, некоторые свидетельства того, что 25(OH) витамин D сам по себе может модулировать иммунную функцию негеномным образом, послужили причиной выбора данного лабораторного теста.

Анализируя содержание 25(OH) витамина D в крови молодых лиц, участвующих во втором этапе нашей работы (598 человек), мы выявили, что 33,9% (203/598) имели уровень в пределах нормальных значений, у 52,3% обследуемых (313/598) значение витамина D находилось в пределах 20-29 нг/мл, то есть наблюдался недостаток данного соединения, и у 13,7% обследуемых (82/598) – регистрировался дефицит.

Полученные нами данные несколько расходятся с данными приведенными в работе Суплотова Л.А и соавт. (2021), согласно которым, уровень недостаточности 25(OH)D был зарегистрирован у 27,87% обследуемых, дефицит – у 56,40%. Авторы установили, что суммарно у 84,27% обследованных установлен показатель низкого статуса витамина D, а оптимальный уровень диагностирован у 15,73%.

Наиболее выраженный дефицит витамина D установлен у молодых людей в возрастной подгруппе 18–25 лет и с учетом статистического «взвешивания» в целом по РФ 89,92% молодых людей данного возраста испытывают недостаточность или дефицит витамина D [10].

Вероятно, регистрируемые различия связаны с тем, что данное исследование проводилось в период с марта по май, а проводимое нами – в осенние и зимние месяцы (сентябрь – декабрь), когда еще был достаточный уровень витамина D, накопленного в период летней инсоляции.

Как видно из таблицы 4, у лиц с низким индексом КПУ в 65% случаев содержание 25(OH)D было выше 30 нг/мл, то есть в пределах нормы, недостаток метаболита витамина D наблюдался в 28% случаев, а дефицит – в 7%. У лиц со средним уровнем КПУ преобладал недостаток 25(OH)D – в 73% случаев.

Таблица 4

Распространенность недостатка и дефицита витамина D среди лиц с различной интенсивностью кариозного процесса

| Показатели / обследуемые группы | Лица с низким индексом КПУ (0-3) (n=200) | Лица со средним уровнем КПУ (4-8) (n=200) | Лица с высоким уровнем КПУ (≥ 9) (n=198) | |
|----------------------------------|--|---|---|---------------------------|
| Норма 25(OH)D (30-100 нг/мл) | 130 человек 65% | 35 человек 17,5% | 38 человек 19,2% | $\chi^2=41,23$ P=0,002 |
| Недостаток 25(OH)D (20-29 нг/мл) | 56 человек 28% | 146 человек 73% | 111 человек 56,1% | $\chi^2=39,01$ P=0,004 |
| Дефицит 25(OH)D (<20 нг/мл) | 14 человек 7% | 19 человека 9,5% | 49 человека 24,7% | $\chi^2=32,18$ P=0,02 |

Среди лиц с высоким индексом КПУ недостаточность витамина D (56,1%) и дефицит (23,7%) были довольно распространены. Только 19,2% всей когорты исследования имели нормальный уровень сывороточного 25(OH) витамина D.

Анализ уровня 25(ОН)D в крови у лиц с различной интенсивностью кариозного процесса показал, что в группе с индексом КПУ от 4 до 8 концентрации данного метаболита витамина D были на 41,1% ($p < 0,001$) меньше, а в группе с высоким уровнем КПУ – на 51,3% ($p < 0,001$), чем в группе с КПУ от 0 до 3 (табл. 5).

Таблица 5

Уровень 25(ОН)D в сыворотке крови у лиц с различной интенсивностью кариозного процесса

| Показатели / обследуемые | Лица с низким индексом КПУ (0-3) (n=200) | Лица со средним уровнем КПУ (4-8) (n=200) | Лица с высоким уровнем КПУ (≥ 9) (n=198) | Тестовая статистика df=2 |
|------------------------------|--|---|---|--------------------------|
| индекс КПУ (Me (25-й; 75-й)) | 1,5 (0,9; 2,2) | 5,0 (4,0; 7,5) | 10,2 (9,5; 11,5) | H=50,83 $p < 0,001$ |
| 25(ОН)D (Me (25-й; 75-й)) | 45,43 (37,86; 49,90) | 26,75* (19,60; 39,45) | 22,11* (17,99; 31,21) | H=51,69 $p < 0,001$ |

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой лиц с низким индексом КПУ с помощью критерия Манна-Уитни;

Таким образом, можно сделать вывод, что лица с более высоким индексом КПУ имели более низкие средние сывороточные уровни 25(ОН) витамина D. Распространенность дефицита и недостаточности витамина D очень велики среди лиц с высокой интенсивностью кариозного процесса [39].

3.2. Закономерности изменений содержания молекул, участвующих в мукозальном иммунитете у лиц с кариесом различной степени интенсивности в зависимости от статуса 25(ОН) витамина D

Уровень 25(ОН) витамина D в сыворотке крови обследуемых лиц сформированных групп представлен на рисунке 2.

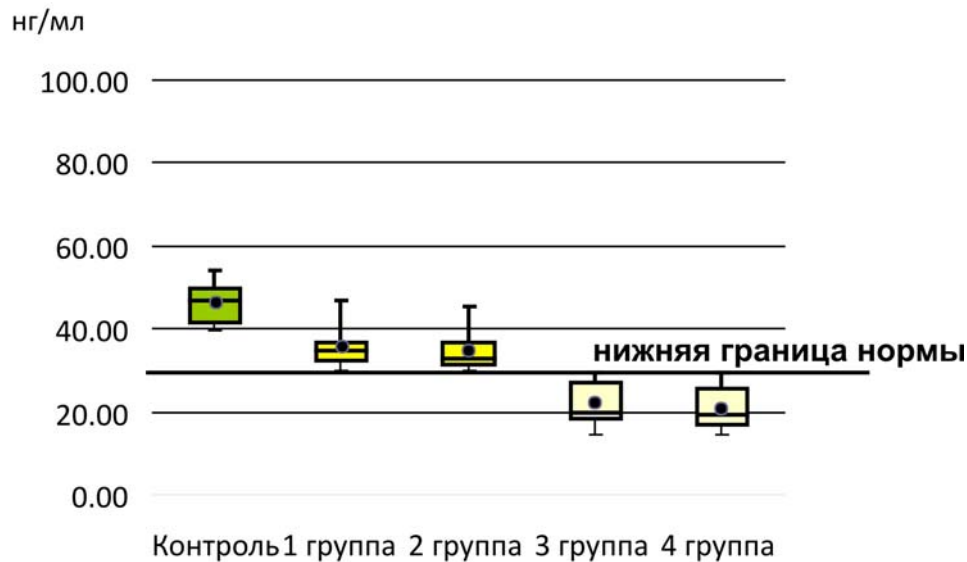


Рис. 2. Содержание 25(ОН)D в сыворотке крови обследуемых лиц

- Медиана
- 25-75%
- ┌ Диапазон значений

Хочется еще раз отметить, что плейотропное действие метаболитов витамина D на различные ткани и системы организма обуславливает значительную роль его недостатка в развитии патологических состояний. Тем не менее, стоит согласиться с мнением Е.А. Пигаровой (2017) в том, что, необходимые для достижения «не классических» эффектов (например, на иммунитет) значения концентрации 25(ОН) витамина D могут не совпадать с уровнем, достаточным для достижения «костных» эффектов, в связи с чем, в случаях доказанного вклада недостаточного уровня витамина D, их следует определить в рамках разработки соответствующих терапевтических мероприятий [44].

На предыдущем этапе работы в группах с различной интенсивностью кариозного процесса мы выделили лиц с недостатком и дефицитом 25(OH) витамина D. Однако существенных различий в группах при уровне метаболита витамина 20-29 нг/мл и менее 20 нг/мл между определяемыми лабораторными параметрами в смешанной слюне мы не обнаружили, поэтому в дальнейшей работе объединили всех лиц с уровнем менее 30 нг/мл в одну группу – низкий уровень 25(OH)D.

Изучение показателей врожденного иммунитета в смешанной слюне у лиц с кариесом при нормальном сывороточном уровне 25(OH)D показало следующее (табл 6). В группе со средней интенсивностью кариозного процесса значения кателицидина LL-37 и липополисахарид-связывающего белка превышали их содержание в группе с КПУ от 0 до 3 на 14,1% ($p < 0,001$) и 42,7% ($p = 0,041$) соответственно.

Таблица 6

Показатели врожденного иммунитета в ротовой жидкости у лиц с **нормальным** уровнем 25(OH)D и разной интенсивностью кариозного процесса)
(Ме (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 1 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 2 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=2 |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| Секреторный IgA (г/л) | 53,40 (50,50; 61,89) | 51,32 (39,34; 59,12) | 48,12* (41,14; 51,12) | H=14,06 p<0,001 |
| Кателицидин LL-37 (нг/мл) | 36,17 (18,45; 48,12) | 49,34* (45,12; 57,11) | 41,26 (31,78; 51,99) | H=13,15 p=0,001 |
| α -дефензины 1-3, нг/мл | 684,2 (583,9; 798,9) | 798,8 (674,5; 899,4) | 807,2* (684,2; 1023) | H=7,33 p=0,026 |
| LBP (нг/мл) | 66,01 (54,17; 79,02) | 94,17* (54,32; 98,51) | 21,97* (18,59; 48,12) p ₁ <0,001 | H=29,74 p<0,001 |

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой.

В группе лиц с высокой интенсивностью кариеса (во 2 и 4 группах) выше контроля на 18,0% ($p=0,009$) были концентрации α -дефензинов 1-3. Содержание LBP, напротив, снижалось относительно контроля на 66,7% ($p<0,001$), и было ниже значений 1 группы на 76,7% ($p<0,001$). Кроме того, во второй группе было зарегистрировано уменьшение на 9,3% ($p<0,001$) уровня секреторного IgA по сравнению с группой относительно здоровых лиц.

У лиц с недостатком/дефицитом 25(OH) витамина D при средней интенсивности кариеса концентрации LBP демонстрировали тенденцию к снижению. В этой группе меньше контроля были уровни противомикробных пептидов: кателицидина LL-37 – на 41,9% ($p=0,005$) и α -дефензинов 1-3 на 36,8% ($p<0,001$).

Таблица 7.

Показатели врожденного иммунитета в ротовой жидкости у лиц с **низким** уровнем 25(OH)D и разной интенсивностью кариозного процесса)
(Me (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 3 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 4 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, df=4 |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---|--|---------------------------------|
| Секреторный IgA (г/л) | 53,40 (50,50; 61,89) | 59,41 (54,43; 66,31) | 14,38* (9,58; 18,45) $p_1<0,001$ $p_3<0,001$ | H=60,44 P<0,001 |
| Кателицидин LL-37 (нг/мл) | 36,17 (18,45; 48,12) | 21,00* (17,21; 23,12) $P_2<0,001$ | 19,10* (14,88; 26,12) $p_3<0,001$ | H=56,97 P<0,001 |
| α -дефензины 1-3, (нг/мл) | 684,2 (583,9; 798,9) | 432,1* (379,0; 569,1) $P_2<0,001$ | 423,2* (378,9; 567,2) $p_3<0,001$ | H=48,09 P<0,001 |
| LBP (нг/мл) | 66,01 (54,17; 79,02) | 55,19 (34,56; 65,98) $P_2=0,006$ | 16,43* (13,87; 18,98) $p_1<0,001$ $p_3=0,005$ | H=54,20 P<0,001 |

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни

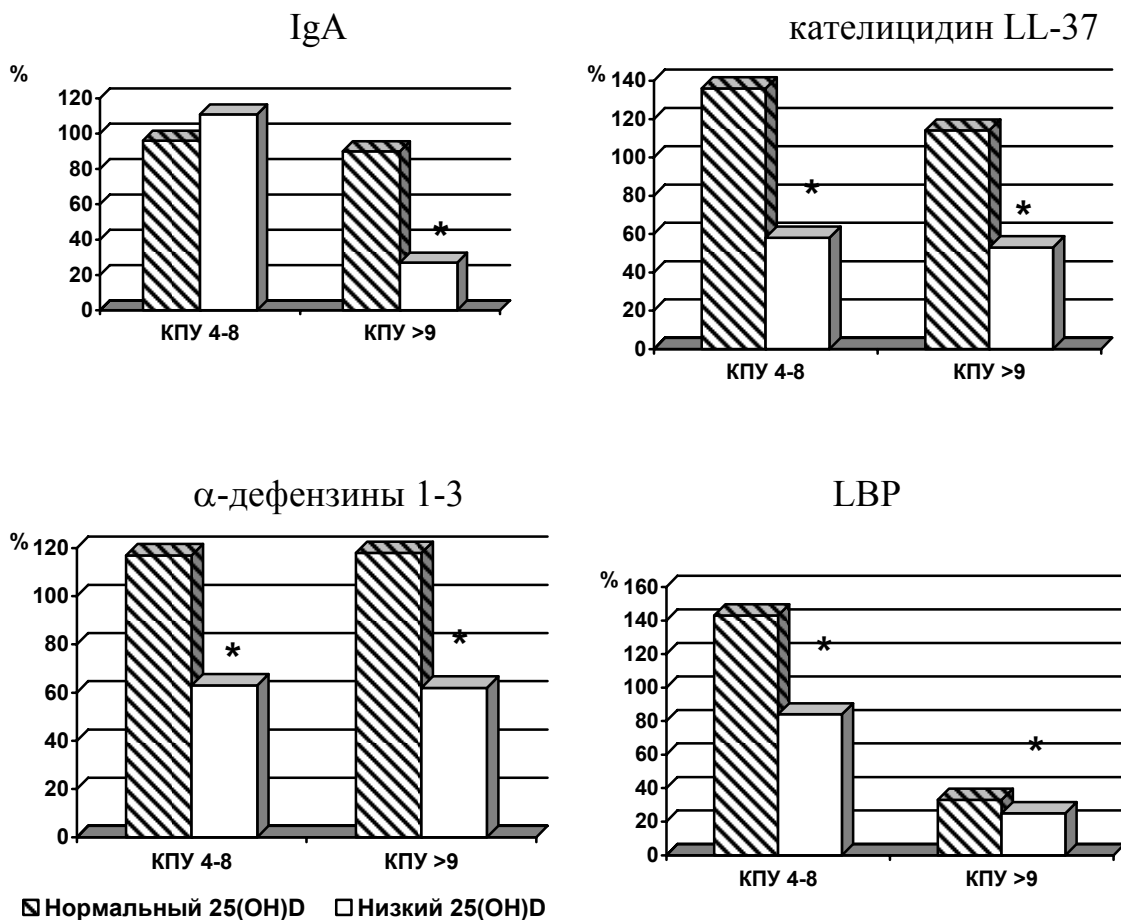
p_1 – достоверность различий между третьей и четвертой группой

p_2 – достоверность различий между 3 и 1-ой группой

p_3 – достоверность различий между 4 и 2-ой группой

При высоких значениях КПУ относительно контроля были снижены не только эти показатели (кателицидин LL-37 – на 47,2% ($p<0,001$), α -дефензины 1-3 – на 38,1% ($p<0,001$)), но и уровни секреторного IgA – на 73,1% ($p<0,001$) и LBP – на 75,1% ($p<0,001$). Причем в данной группе цифры sIgA и LBP были ниже, чем в третьей группе на 75,8% ($p<0,001$) и на 70,2% ($p<0,001$) соответственно.

Сравнительный анализ показателей врожденного иммунитета в ротовой жидкости при одинаковой интенсивности кариозного процесса, но при разных фоновых значениях сывороточного 25(OH) витамина D выявил следующие особенности.



* - значимые различия между группами с разным статусом 25(OH) витамина D

Рисунок 3. Относительное содержание показателей врожденного иммунитета в ротовой жидкости у лиц со средней и высокой интенсивностью кариозного процесса на фоне различного уровня 25(OH) витамина D (100%- контроль).

В группе со средней интенсивностью кариеса при уровне 25ОН витамина D >30 нг/мл значения кателицидина и LBP увеличивались относительно группы сравнения, а при недостатке/дефиците витамина – снижались. В связи с этим уровень пептидов в 3-ей группе был существенно ниже, чем в 1-ой: для кателицидина LL-37 - на 57,4% ($p < 0,001$), для LBP – на 41,4% ($p = 0,006$). Те же различия были характерны и для концентрации α -дефензинов 1-3, которая при недостатке/дефиците 25(ОН) витамина D была ниже на 45,9% ($p < 0,001$).

В группах с высокой интенсивностью кариеса, но разным статусом 25(ОН) витамина D различия наблюдались между значениями всех протеинов. На фоне низкого уровня 25(ОН) витамина D (в 4 группе) были снижены концентрации секреторного IgA на 70,1% ($p < 0,001$), кателицидина LL-37 – на 53,7% ($p < 0,001$), α -дефензинов – на 47,6% ($p < 0,001$), LBP – на 25,2% ($p = 0,005$) относительно второй группы (рис. 3).

Таким образом, у лиц с кариесом, в слюне при высокой интенсивности патологического процесса содержание секреторного IgA снижается и более существенно при недостатке 25(ОН)D; содержание кателицидина LL-37 на фоне нормального уровня 25(ОН)D в организме увеличивается, а при недостатке активной формы витамина D – существенно снижается; уровень α -дефензинов 1-3 на фоне нормальных значений 25(ОН)D и высокой интенсивности кариеса увеличивается, а при недостатке/дефиците 25(ОН) витамине и кариесе - падает; количество LBP увеличивается при кариесе средней степени интенсивности и нормальном значении 25(ОН)D, а при высоких цифрах индекса КПУ, вне зависимости от уровня сывороточного 25(ОН) витамина D, концентрация этого белка снижается.

Анализ содержания в ротовой жидкости молекул, являющихся контрольными точками иммунитета, показал следующие особенности. Как видно из таблицы 8, в группе лиц с нормальным уровнем 25(ОН)D и средним значением индекса КПУ возросло количество костимулирующих молекул В7.2 на 15,0% ($p = 0,019$) относительно контроля. В группе с высокой интенсивностью кариеса данный показатель не отличался от группы сравнения, как и другие параметры,

приведенные в этой таблице. Однако, концентрация растворимой формы коингибирующей молекулы LAG-3 была ниже чем в первой группе на 12,6% ($p=0,011$).

Таблица 8

Уровни растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул в смешанной слюне у лиц с разной интенсивностью кариозного процесса и **нормальным** уровнем 25(OH)D (Me (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 1 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 2 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=2 |
|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| B7.2 (CD86) (пг/мл) | 26,28 (19,44; 29,31) | 30,23* (27,45; 34,12) | 27,45 (17,23; 30,23) | H=6,16 p=0,046 |
| CTLA-4 (пг/мл) | 24,19 (13,01; 35,60) | 29,47 (19,85; 35,16) | 27,12 (15,90; 34,12) | H=0,20 p=0,917 |
| LAG-3 (пг/мл) | 56,90 (51,58; 76,97) | 62,13 (56,39; 80,15) | 54,32 (51,23; 58,21) $p_1=0,011$ | H=6,57 p=0,037 |
| Tim-3 (пг/мл) | 111,95 (101,2; 123,29) | 103,62 (91,26; 132,12) | 102,31 (80,92; 109,23) | H=4,95 p=0,084 |
| PD-1 (пг/мл) | 16,54 (14,25; 32,14) | 19,56 (11,24; 45,12) | 17,32 (9,11; 24,56) | H=0,66 P=0,65 |

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни;

p_1 – достоверность различий между первой и второй группой.

В группах с недостатком и дефицитом 25(OH) витамина D регистрировалось снижение относительно группы сравнения уровня как костимулирующих, так и коингибирующих молекул (таблица 9). В группе со средней интенсивностью кариеса (3 группа) уровень B 7.2 уменьшился на 34,6% ($p<0,001$), LAG-3 – на 55,8% ($p<0,001$), Tim-3 – на 36,5% ($p<0,001$), PD-1 – на 47,5% ($p=0,036$).

В группе с высокой интенсивностью кариеса (4 группа) эти же показатели были еще ниже. Уровень В7.2 отличался от контрольных значений на 48,0% ($p < 0,001$), LAG-3 – на 56,1% ($p < 0,001$), Tim-3 – на 44,4% ($p < 0,001$), PD-1 – на 78,2% ($p < 0,001$). При этом значения В 7.2, Tim-3 и PD-1 – были ниже, чем у лиц 3 группы на 21,2% ($p = 0,004$), 12,0% ($p = 0,036$) и 58,5% ($p = 0,029$) соответственно.

Таблица 9

Уровни растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул в смешанной слюне у лиц с разной интенсивностью кариозного процесса и **низким** уровнем 25(OH)D (Me (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 3 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 4 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=4 |
|------------------------|-------------------------------------|--|---|---------------------------------|
| В7.2 (CD86) (пг/мл) | 26,28 (19,44; 29,31) | 17,20* (14,89; 19,10) $p_2 < 0,001$ | 13,55* (10,55; 15,65) $p_1 = 0,004$ $p_3 < 0,001$ | H=52,64 P<0,001 |
| CTLA-4 (пг/мл) | 24,19 (13,01; 35,60) | 33,44 (29,12; 39,34) | 35,41 (29,44; 38,16) | H=6,76 P=0,067 |
| LAG-3 (пг/мл) | 56,90 (51,58; 76,97) | 25,16* (20,18; 26,51) $p_2 < 0,001$ | 24,99* (20,94; 27,1) $p_3 < 0,001$ | H=73,51 P<0,001 |
| Tim-3 (пг/мл) | 111,95 (101,2; 123,29) | 71,12 * (67,92; 83,47) $p_2 < 0,001$ | 62,29 * (49,85; 80,92) $p_1 = 0,036$ $p_3 < 0,001$ | H=56,17 P<0,001 |
| PD-1 (пг/мл) | 16,54 (14,25; 32,14) | 8,69* (4,12; 21,45) $p_2 = 0,045$ | 3,61* (1,70; 14,29) $p_1 = 0,029$ $p_3 = 0,003$ | H=19,96 P<0,001 |

Примечание:

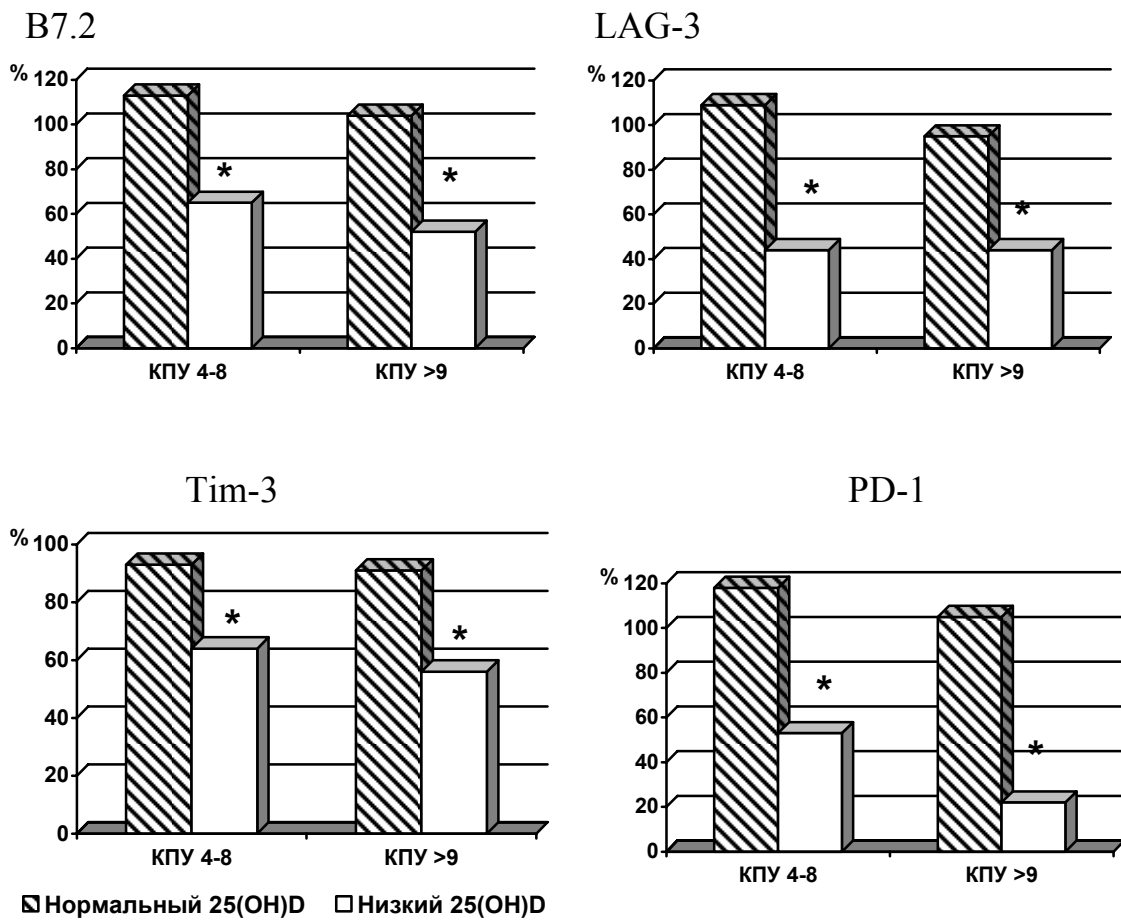
* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни

p_1 – достоверность различий между третьей и четвертой группой

p_2 – достоверность различий между 3 и 1-ой группой

p_3 – достоверность различий между 4 и 2-ой группой

Самое главное, концентрации этих же молекул были ниже, чем у лиц с той же интенсивностью кариеса, но нормальным уровнем 25(OH) витамина D (рис. 4). В третьей группе ниже чем в первой были значения B7.2 на 43,1 (p<0,001), LAG-3 – на 59,5% (p<0,001), Tim-3 – на 31,4% (p<0,001), PD-1 – на 55,6% (p=0,045). В четвертой группе ниже чем во второй были цифры B7.2 на 50,6% (p<0,001), LAG-3 – на 53,9% (p<0,001), Tim-3 – на 39,1% (p<0,001), PD-1 – на 79,2% (p=0,003).



* - значимые различия между группами с разным статусом 25(OH) витамина D

Рисунок 4. Относительное содержание растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул в ротовой жидкости у лиц со средней и высокой интенсивностью кариозного процесса на фоне различного уровня 25(OH) витамина D (100%- контроль).

Таким образом, при кариесе на фоне нормального уровня 25(OH)D не происходит существенных изменений в содержании коингибирующих молекул. Лишь при средней интенсивности КПУ наблюдается рост костимулирующей молекулы В 7.2.

На фоне дефицита и недостатка 25(OH)D регистрируются уменьшения количества как В7.2, так и LAG-3, Tim-3 и PD-1. Эти изменения усугубляются с повышением степени интенсивности кариеса.

В группах, при одинаковой интенсивностью кариеса, но на фоне низкого содержания 25(OH)D в организме уровень растворимых форм как В7.2, так и LAG-3, Tim-3 и PD-1 существенно снижен (рис. 4).

Анализ других белков, оказывающих влияние на иммунный ответ, показал, что при кариесе на фоне нормального уровня 25(OH)D (табл. 10) снизилось количество Free Active TGF-b1 и увеличилось содержание ICAM-1, белка, регулирующего контакты между клетками иммунной системы.

Таблица 10

Уровни растворимых белков - регуляторов иммунного ответа, присутствующих в смешанной слюне у лиц с разной интенсивностью кариозного процесса и **нормальным** уровнем 25(OH)D (Me (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 1 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 2 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=2 |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Free Active TGF-b1 (пг/мл) | 45,28 (23,00; 59,40) | 31,66* (21,43; 36,78) | 21,65* (12,43; 43,12) | H=8,08 p=0,018 |
| ICAM-1 (пг/мл) | 1,39 (1,36; 1,47) | 2,09* (1,54; 3,48) | 2,99* (1,98; 4,98) | H=15,86 p<0,018 |
| IGFBP-4 (пг/мл) | 1,17 (1,09; 1,87) | 1,32 (1,12; 1,96) | 1,46 (1,02; 2,10) | H=0,50 P=0,777 |

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой.

В первой группе цифры Free Active TGF-b1 снизились на 30,1% ($p=0,040$), во второй – на 52,2% ($p<0,001$). Значения ICAM-1 в первой группе увеличились на 50,4% ($p=0,004$), во второй – на 115,1% ($p<0,001$).

На фоне недостатка/дефицита 25(OH)D изменения имели аналогичную направленность, но были более существенны (табл. 11). При средней интенсивности кариеса (3 группа) значения Free Active TGF-b1 были ниже контроля на 58,7% ($p=0,005$), а при высокой интенсивности кариеса (4 группа) ниже – на 64,0% ($p<0,001$).

Концентрации ICAM-1 в 3 группе возросли относительно группы сравнения на 287,7% ($p<0,001$), а в четвертой – на 307,2% ($p<0,001$). Кроме того, в этих группах увеличилось содержание белка IGFBP-4, моделирующего активность факторов роста: в третьей группе его уровни превышали контроль на 153,2% ($p<0,001$), в четвертой – на 174,0% ($p<0,001$).

Таблица 11

Уровни растворимых белков - регуляторов иммунного ответа, присутствующих в смешанной слюне у лиц с разной интенсивностью кариозного процесса и **низким** уровнем 25(OH)D (Ме (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 3 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 4 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=4 |
|-------------------------------|--|--|--|---------------------------------|
| Free Active TGF-b1 (пг/мл) | 45,28 (23,00; 59,40) | 18,69* (17,01; 39,18) | 16,32* (11,56; 30,12) | H=18,67 P=0,018 |
| ICAM-1 (пг/мл) | 1,39 (1,36; 1,47) | 5,39 * (3,01; 7,19) $p_2<0,001$ | 5,66 * (3,59; 9,12)* $p_3=0,016$ | H=36,84 P<0,001 |
| IGFBP-4 (пг/мл) | 1,26 (1,09; 1,87) | 3,19* (1,97; 4,21) $p_2<0,001$ | 3,46 * (2,16; 5,39) $p_3<0,001$ | H=22,78 P<0,001 |

Примечание:

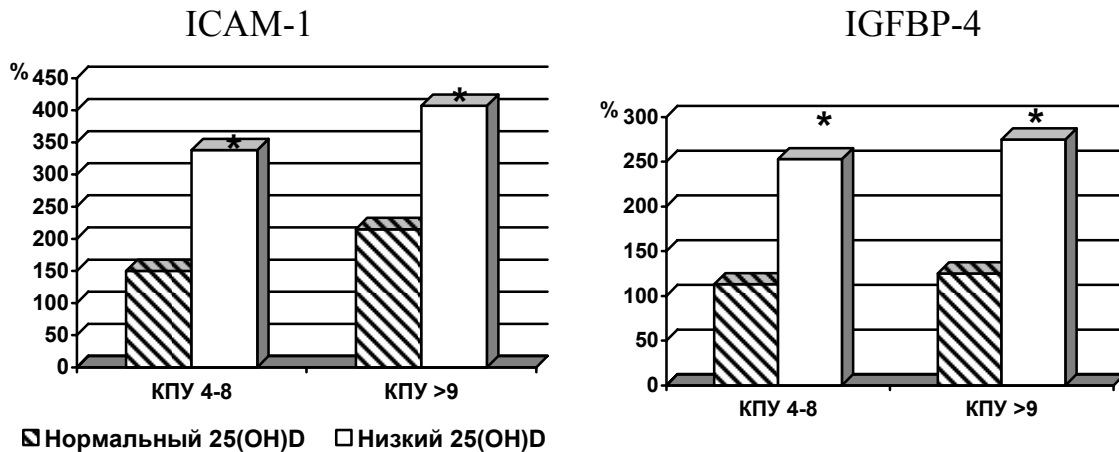
* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни

p_1 – достоверность различий между третьей и четвертой группой

p_2 – достоверность различий между 3 и 1-ой группой

p_3 – достоверность различий между 4 и 2-ой группой

В группах с недостатком/дефицитом 25(ОН) витамином D цифры ICAM-1 и IGFBP-4 были практически в 2 раза выше, чем в группах с нормальным уровнем витамина и той же интенсивностью кариеса (рис. 5).



* - значимые различия между группами с разным статусом 25(ОН) витамина D

Рисунок 5. Относительное содержание растворимых белков, участвующих в регуляции иммунитета, у лиц со средней и высокой интенсивностью кариозного процесса на фоне различного уровня 25(ОН) витамина D (100%- контроль).

Таким образом, при кариесе значения Free Active TGF-b1 в смешанной слюне снижались, однако достоверной разницы между клиническими группами как в зависимости от активности кариеса, так и от уровня витамина D не регистрировалось. Концентрации ICAM-1 и белка IGFBP-4 в смешанной слюне при кариесе увеличились, и гораздо существеннее при низком уровне 25(ОН) витамина D.

Оценка уровня металлопротеиназ в смешанной слюне показала, что в группах с кариесом и нормальным уровнем 25(ОН) витамина D регистрируется увеличение значений MMP-9 относительно контроля: в первой группе – на 29,2% ($p < 0,001$), во второй – на 36,1% ($p < 0,001$). Разницы в зависимости от интенсивности кариеса в данных группах не наблюдалось (табл. 12).

Уровни металлопротеиназ в смешанной слюне у лиц с разной интенсивностью кариозного процесса и **нормальным** уровнем 25(OH)D (Ме (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 1 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 2 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=2 |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| ММР-9 | 35,50 (29,16; 38,15) | 45,87* (38,66; 52,10) | 48,32* (44,70; 53,19) | H=17,14 p<0,001 |
| ММР-2 | 0,52 (0,43; 0,58) | 0,54 (0,43; 0,63) | 0,54 (0,43; 0,69) | H=1,18 P=0,56 |

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой.

Уровни металлопротеиназ в смешанной слюне у лиц с разной интенсивностью кариозного процесса и **низким** уровнем 25(OH)D (Ме (25-й; 75-й))

| Показатели/ Группы | Контроль КПУ от 0 до 3 (n=21) | 3 группа КПУ от 4 до 8 (n=21) | 4 группа КПУ от 9 до 14 (n=21) | Тестовая статистика, Df=4 |
|-----------------------|-------------------------------------|--|--|---------------------------------|
| ММР-9 | 35,50 (29,16; 38,15) | 107,11* (87,31; 121,19) p ₂ <0,001 | 102,59* (79,02; 122,50) p ₃ <0,001 | H=76,96 p<0,001 |
| ММР-2 | 0,52 (0,43; 0,58) | 0,66 (0,49; 0,72) | 0,69* (0,55; 0,74) p ₃ =0,049 | H=11,48 P=0,022 |

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни

p₁ – достоверность различий между третьей и четвертой группой

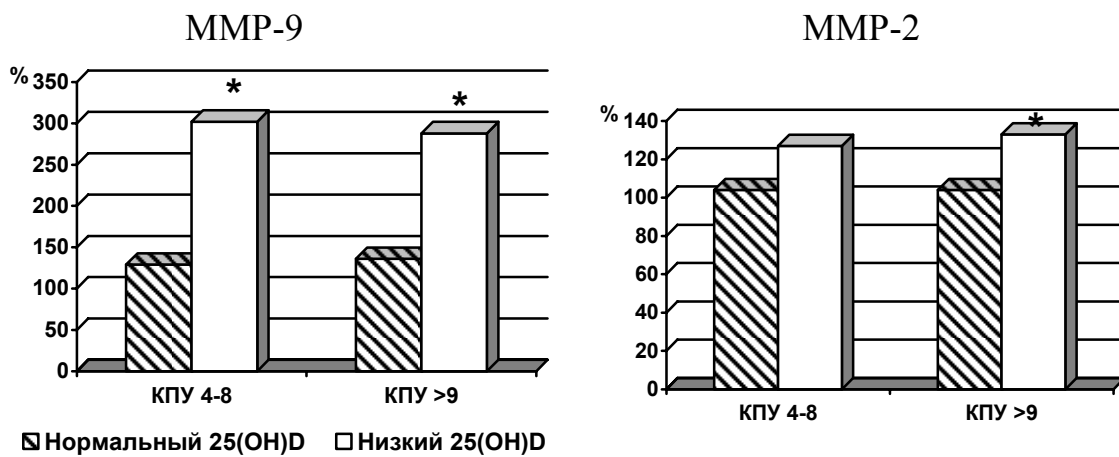
p₂ – достоверность различий между 3 и 1-ой группой

p₃ – достоверность различий между 4 и 2-ой группой.

В группах пациентов с кариесом и недостатком/дефицитом 25(OH) витамина D уровни ММР-9 были увеличены гораздо существеннее (табл. 13) по

сравнению с группой с КПУ от 0 до 3: в третьей группе – на 201,7% ($p < 0,001$), в четвертой – на 191,5% ($p < 0,001$). Кроме того, в четвертой группе была повышена концентрация ММП-2 на 33,5% ($p < 0,001$) относительно контроля, а также на 27,0% ($p = 0,049$) относительно значений во второй группе.

Сравнительный анализ в группах с одинаковым индексом КПУ, но различным статусом 25(ОН) витамина D, показал, что недостаток/дефицит 25(ОН) витамина D сопровождается повышением концентрации ММП-9, которое не зависит от интенсивности кариеса, а также ростом уровня ММП-2, наблюдаемым в группе с высоким индексом КПУ.



* - значимые различия между группами с разным статусом 25(ОН) витамина D

Рисунок 6. Относительное содержание матриксных металлопротеиназ в ротовой жидкости, у лиц со средней и высокой интенсивностью кариозного процесса на фоне различного уровня 25(ОН) витамина D (100%- контроль).

Безусловно, являясь локализованным, деструктивным и прогрессирующим процессом, вызванным микроорганизмами, кариес может привести к некрозу пульпы и потере зуба. Процесс воздействует на пульпу опосредованно и через

метаболиты микробов, и через продукты распада компонентов дентина. К одному из основных механизмов, защищающим ткани зуба от кариеса, можно отнести воспалительные и иммунные реакции. Нами продемонстрировано, что при кариесе (особенно, отягощенном недостатком/дефицитом 25(OH)D) наблюдаются значительные изменения в содержании растворимых пептидных соединений, участвующих в механизмах защиты зуба от кариозных патогенов и деструктивных процессов [11, 39, 50].

3.3. Корреляционные взаимоотношения между изученными лабораторными и клиническими показателями

В ходе анализа полученных данных нами были выявлены существенные различия между некоторыми биохимическими показателями смешанной слюны в группах с различным статусом витамина D в организме. Для того, чтобы доказать взаимосвязь недостатка витамина D с имеющимися изменениями в иммунитете полости рта, на следующем этапе был проведен корреляционный анализ.

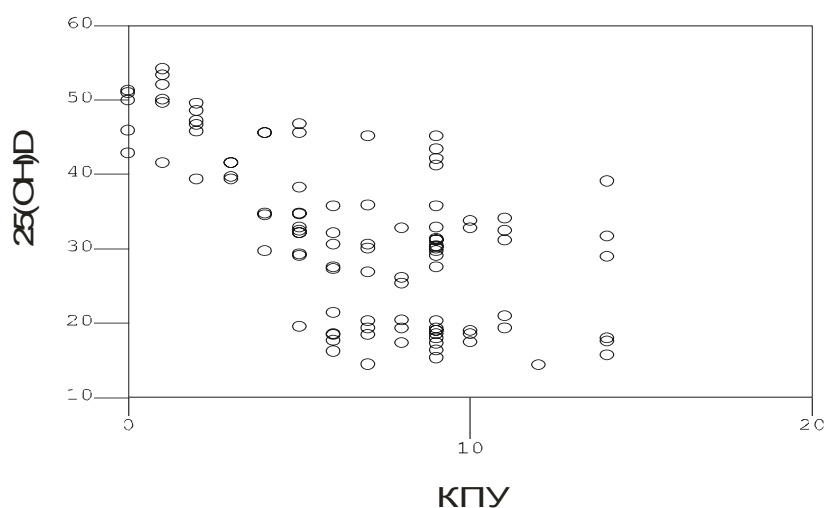


Рисунок 7. Зависимость интенсивности кариеса от содержания 25(ОН) витамина D в организме (коэффициент корреляции Спирмена $R = -0,597$, $p < 0,001$)

В ходе анализа было установлено наличие заметной отрицательной связи ($r = -0,60$; $p < 0,001$) между индексом КПУ и содержанием 25(ОН) витамина D в организме (рис. 7).

Взаимосвязи индекса КПУ с показателями ротовой жидкости характеризуются наличием отдельных заметных отрицательных связей с уровнем защитных белков: с IgA и LBP (табл. 14).

Оценка степени корреляции исследуемых параметров с индексом КПУ

| Параметр | N | Коэффициент корреляции по Спирмену | Сила и направленность связи | Статистическая значимость |
|----------------------------|-----|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 25(OH)D3 | 105 | -0,60 | Заметная обратная | <0,001 |
| IgA | 105 | -0,53 | Заметная обратная | <0,001 |
| Кателицидин LL-37 | 105 | -0,21 | Слабая обратная | 0,05 |
| α -дефензины 1-3 | 105 | -0,13 | Слабая обратная | 0,18 |
| LBP | 105 | -0,56 | Заметная обратная | <0,001 |
| B7.2 (CD86) | 105 | -0,31 | Умеренная обратная | 0,01 |
| CTLA-4 | 105 | 0,07 | Слабая прямая | 0,48 |
| LAG-3 | 105 | -0,23 | Слабая обратная | 0,051 |
| Tim-3 | 105 | -0,22 | Слабая обратная | 0,05 |
| PD-1 | 105 | -0,33 | Умеренная обратная | 0,01 |
| Free Active TGF- β 1 | 105 | -0,40 | Умеренная обратная | 0,001 |
| IGFBP-4 | 105 | 0,24 | Слабая прямая | 0,05 |
| ICAM-1 | 105 | 0,42 | Умеренная прямая | 0,001 |
| MMP-9 | 105 | 0,52 | Заметная прямая | <0,001 |
| MMP-2 | 105 | 0,27 | Слабая прямая | 0,27 |

Умеренная обратная связь наблюдалась между индексом КПУ и уровнем костимулирующие молекулы B7.2 (CD86) ($r=-0,31$; $p=0,01$), а также между индексом КПУ и коингибирующие молекулы PD-1 ($r=0,33$; $p=0,01$). Между индексом КПУ и фактором роста Free Active TGF- β 1 выявлено наличие умеренной обратной связи ($r=-0,40$; $p=0,001$).

Прямые связи между индексом КПУ демонстрировали значения белка ICAM-1 ($r=0,42$; $p=0,001$) и значения фермента MMP-9 ($r=0,52$; $p<0,001$).

Между значениями 25(OH) витамина D в крови и содержанием защитных белков в слюне регистрировались прямые связи (табл. 15): заметные – с уровнем

белка кателицидина LL-37 ($r=0,63$; $p<0,001$) и уровнем α -дефензинов 1-3 ($r=0,54$; $p<0,001$), умеренные – с уровнем белка LBP ($r=0,41$; $p=0,001$). Преимущественно заметные прямые связи наблюдались между содержанием 25(OH) витамина D и уровнем костимулирующих и коинкибирующих молекул.

Таблица 15

Оценка степени корреляции исследуемых параметров с уровнем 25(OH) витамина D

| Параметр | N | Коэффициент корреляции по Спирмену | Сила и направленность связи | Статистическая значимость |
|----------------------------|-----|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| IgA | 105 | 0,21 | Слабая прямая | 0,05 |
| Кателицидин LL-37 | 105 | 0,63 | Заметная прямая | <0,001 |
| α -дефензины 1-3 | 105 | 0,54 | Заметная прямая | <0,001 |
| LBP | 105 | 0,41 | Умеренная прямая | 0,001 |
| B7.2 (CD86) | 105 | 0,56 | Заметная прямая | <0,001 |
| CTLA-4 | 105 | -0,07 | Слабая обратная | 0,49 |
| LAG-3 | 105 | 0,70 | Заметная прямая | <0,001 |
| Tim-3 | 105 | 0,62 | Заметная прямая | <0,001 |
| PD-1 | 105 | 0,58 | Заметная прямая | 0,001 |
| Free Active TGF- β 1 | 105 | 0,41 | Умеренная прямая | 0,001 |
| IGFBP-4 | 105 | -0,39 | Умеренная обратная | 0,01 |
| ICAM-1 | 105 | -0,61 | Заметная обратная | <0,001 |
| MMP-9 | 105 | -0,64 | Заметная обратная | <0,001 |
| MMP-2 | 105 | -0,40 | Умеренная обратная | 0,01 |

Умеренная прямая связь ($r=0,41$; $p=0,001$) зарегистрирована между значениями 25(OH) витамина D и уровнем фактора роста Free Active TGF-1 β , а между метаболитом витамина и белком, связывающим факторы роста, IGFBP-4 обнаружено наличие умеренной обратной связи ($r=-0,39$; $p=0,01$).

Заметные обратные связи с концентрацией 25(OH) витамина D имели уровни белка ICAM-1 ($r=-0,61$; $p<0,001$) и уровни фермента MMP-9 ($r=-0,64$; $p<0,001$). Со значениями фермента MMP-2 концентрации 25(OH) витамина D демонстрировали умеренную обратную связь ($r=-0,40$; $p=0,01$)

Таким образом, в ходе корреляционного анализа нами выявлено множество корреляционных связей между значениями метаболита витамина D в крови и содержанием белков в смешанной слюне, свидетельствующих о роли недостатка витамина D в изменениях мукозального иммунитета. На основании логистического регрессионного анализа было определено, что комплексная оценка уровня 25(OH) витамина D, секреторного IgA, LBP, MMP-9 позволит увеличить эффективность прогнозирования процесса интенсификации кариеса.

Неопровержимый факт, что молекулы, являющиеся контрольными точками иммунитета, играют важную роль в его регуляции, и отсутствие работ по оценке растворимых форм этих молекул в ротовой жидкости, послужили причиной проведения корреляционного анализ между содержанием изученных костимулирующих и коингибирующих молекул и другими параметрами мукозального иммунитета.

Нами было установлено, что в слюне количество большинства коингибирующих молекул находится в прямой зависимости (рис. 8). Так уровень PD-1 имел заметную связь со значениями CTLA-4 ($r=0,62$; $p=0,001$) и заметную с концентрацией Tim-3 ($r=0,72$; $p<0,001$). При этом значения Tim-3 демонстрировали весьма высокую связь с концентрацией LAG-3 ($r=0,97$; $p<0,001$). Все эти молекулы, относящиеся к коингибирующим, принадлежат к одному семейству и экспрессируются на мембранах Т-лимфоцитов, поэтому наличие прямых взаимосвязей между ними выглядит весьма логично.

Между тем значения В 7-2 имели весьма высокую прямую взаимосвязь с уровнем CTLA-4 ($r=0,95$; $p<0,001$), но обратную заметную с концентрацией LAG-3 ($r=-0,58$; $p<0,001$). В тоже время значения костимулирующей молекулы находились в прямой заметной взаимосвязи с уровнем MMP-9 ($r=0,56$; $p<0,001$) и

в обратной заметной взаимосвязи с антимикробными пептидами (кателицидином LL-37 и α -дефензинами 1-3) ($r=-0,51$; $p<0,001$).

С уровнем MMP-9 также обратно коррелировали значения LAG-3 ($r=-0,71$; $p<0,001$). А значения антимикробных пептидов находились в прямой зависимости с уровнем PD-1 ($r=0,53$; $p=0,001$).

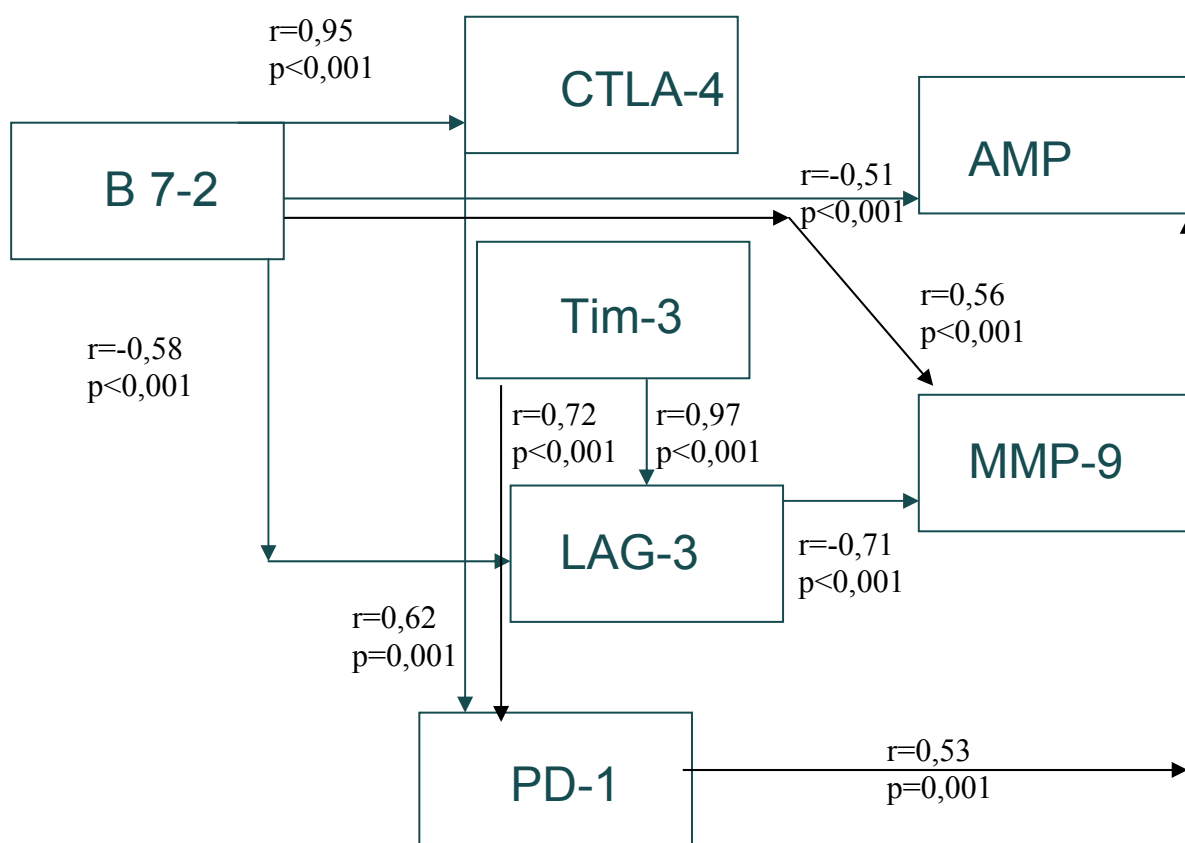


Рисунок 8. Корреляционные взаимосвязи между показателями мукозального иммунитета.

Наличие взаимосвязей между молекулами, являющимися «контрольными точками иммунитета» и антимикробными белками демонстрирует еще раз, что антиинфекционное действие катионных пептидов не ограничивается только их прямым взаимодействием с микробами, дефензины также являются связующим звеном между врожденным (неспецифическим) и адаптивным (специфическим)

иммунитетом. Антимикробные катионные пептиды являются сильными хемоаттрактантами для моноцитов, Т-лимфоцитов и незрелых дендритных клеток, хотя рецептор, через который они действуют, не идентифицирован [27].

Выявленные взаимосвязи между значениями матричных металлопротеаз и уровнем растворимых коингибирующих и костимулирующих молекул, на наш взгляд, могут указывать на основное происхождение ферментов в ротовой жидкости при кариесе, а именно на их выделение иммунными клетками: нейтрофилами, макрофагами и моноцитами, или ли же – на существенную роль ММР в иммунологических реакциях.

Установленные корреляционные взаимосвязи, безусловно, помогут объяснить роль нарушений мукозального иммунитета в развитии множественного кариеса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кариес зубов – это самое распространенное заболевание среди жителей практически всех стран [12, 38, 80, 134], в связи с чем, для улучшения сложившейся ситуации, должны быть реализованы соответствующие стратегии. Не умоляя значения этиологии данного патологического процесса – воздействие кариесогенной микрофлоры, преобладающее большинство стоматологов в механизмах развития заболевания решающую роль отводят таким местным патогенетическим факторам, как плохая гигиена полости рта, злоупотребление легкоусвояемыми углеводами [22, 125]. Однако ряд исследователей ставят под сомнение ведущую роль перечисленных выше причин при кариесе, так как точно такая гигиена и пищевое поведение может быть у кариесрезистентных лиц [85]. Поэтому выявление новых значимых патогенетических факторов в развитие кариеса и их устранение представляется весьма актуальным.

Одним из механизмов, лежащих в основе патогенеза кариеса, некоторые ученые называют изменения состава слюны [110]. Смешанная слюна включает в себя секрет слюнных желез, детрит полости рта, десневую жидкость, зубной ликвор, слущенный эпителий и лейкоциты, а при патологических состояниях – громадное количество нейтрофилов, вырабатывающих целый ряд медиаторов воспаления и факторов повреждения тканей [16]. Поэтому происхождение молекул в слюне самое разнообразное. Смешанная слюна имеет большое значение в процессе формирования приобретенной пиликулы на поверхности зубов. Кроме защиты поверхности зубов, ротовая жидкость играет важную роль в иммунной защите полости рта [16].

Безусловно, изучение состава смешанной слюны при разного рода патологических состояниях и прежде всего в полости рта весьма актуально в настоящее время [3, 7, 19, 161]. Это связано с тем, что забор слюны неинвазивен, а ее состав наиболее полно отражает биохимические изменения в тканях ротовой полости [57].

В настоящее время накоплены результаты, показывающие изменение содержания некоторых защитных белков слюны при кариесе, хотя они порой противоречивы.

Например, одним из существенно меняющихся показателей местного иммунитета рта при кариесе зубов можно назвать секреторный иммуноглобулин А (sIgA) смешанной слюны [64].

Так, согласно результатам исследований, Naeri-Araghi H. и соавт (2018), изучавших уровень sIgA при кариесе у взрослых лиц, увеличение количества разрушенных зубов приводит к статистически значимому росту количества sIgA в смешанной слюне. Авторы делают вывод, что повышение уровня sIgA слюны является ответом иммунной системы на микроорганизмы или даже попыткой контролировать их уровень [92].

В исследованиях Gornowicz A. и соавт. (2014) показано, что у подростков с высокой степенью интенсивности кариеса (КПУ > 11) были повышенные уровни sIgA, гистатина-5 и лактопероксидазы по сравнению с подростками с более низкой степенью кариеса. Увеличение было статистически значимым ($p < 0,05$) [149].

Однако есть исследования, демонстрирующие противоположные результаты. Castro R.J et al. (2016) показали более высокую концентрацию общего белка и уровень sIgA в слюне у взрослых без кариеса по сравнению со взрослыми с высокой активностью кариеса [64, 73].

Vitorino R и др. выявили сильную корреляцию между фосфопептидами слюны и отсутствием кариеса зубов с помощью ВЭЖХ – МС [110].

Попытки других исследователей проанализировать состав белков слюны с помощью метода гель-электрофореза, ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией и иммуноблоттингом привели к идентификации нескольких протеинов, связанных с восприимчивостью к кариесу [110].

Wang K. и соавт. (2018) провели исследование слюны, собранной у лиц разного возраста и с разной интенсивностью кариеса. Белки слюны анализировали с использованием iTRAQ-сопряженной ЖХ-МС/МС с

последующей статистической обработкой результатов. Среди множества оцененных белков 18 были обнаружены в низких концентрациях у всех пациентов с кариесом, не зависимо от возраста. В их числе были гистатин-1, член 1 семейства В, содержащий ВРІ-фолд, липокалин-1 и белок S100-A9. Функциональный анализ показал, что эти белки, в основном, участвуют в связывании ионов кальция, специфическом связывании белковых доменов, клеточном ответе на окислительный стресс, кератинизации, активности эндопептидазы серинового типа, антимикробном гуморальном ответе и регуляции иммунного ответа [110].

По данным А.В. Проходной и соавт. (2015), развитие кариеса зубов при беременности сопровождается повышением во 2-м триместре уровня АМП в слюне с последующим снижением α -дефензина 1–3 и кателицидина LL37 в ротовой жидкости. С повышением интенсивности и активности течения кариеса зубов наблюдается повышение лактоферрина и снижение содержания кателицидина LL37 в ротовой жидкости [45].

Исследования, проведенные Jurczak А. и соавт. (2015) показали увеличение концентрации гистатина-5 и β -дефензина-2 в группе детей с кариесом по сравнению с контрольной группой и наличие корреляции с прогрессированием заболевания [60].

С-реактивный белок тоже назван как компонент слюны, увеличение которого связано с иммунным ответом во время прогрессирования кариеса [110].

Nireeksha А. et al (2017) установили, что повышенный уровень белков, богатых пролином, снижают частоту кариеса, нейтрализуя выработку кислоты стрептококками [128].

По мнению других исследователей, в многофакторном этиопатогенетическом процессе кариеса зубов важную роль играют белки слюны, включая протеины с антиоксидантными функциями и муцин-гликопротеины [128].

Таким образом, при кариесе наблюдаются множественные изменения белкового состава слюны, в том числе белков, участвующих в иммунитете

полости рта, что может свидетельствовать и об участии этих изменений в патогенезе данного стоматологического заболевания.

Однако причины, приводящие к таким изменениям, на наш взгляд, могут быть различными, кроме того, эти изменения могут быть следствием определенных патологических процессов.

Анализ литературы показал, что оптимизирующее влияние на функционирование как врожденного, так и адаптивного иммунитета оказывает активная форма витамина D - кальцитриол, который также является одним из основных регуляторов фосфорно-кальциевого обмена, чем обеспечивает минерализацию тканей зуба. Холекальциферол синтезируется в организме человека под действием солнечных лучей, но как показывают исследования, проведенные за последние годы, распространенность дефицита и недостатка витамина D в популяции *Homo sapiens* достигает эпидемического уровня [88]. Причина данной ситуации, очевидно, заключается в том, что современный человек проводит большую часть жизни в помещении, избегает активного солнца, использует солнцезащитные крема, зачастую нерационально питается [88]. Дефицит витамина D, в свою очередь, может являться фактором, приводящим к развитию кариеса зубов и/или отягощать течение данного патологического процесса. Учитывая вышеизложенное, нами было запланировано настоящее исследование, состоящее из нескольких этапов.

На одном из них нами было установлено, что в группах обследуемых, как со средней степенью интенсивностью кариозного процесса (индекс КПУ от 4 до 8), так и с высокой степенью интенсивности кариеса (КПУ от 9 до 14) концентрация 25(OH)D в крови была почти на 40% ниже, чем в контрольной группе (КПУ от 0 до 3). В ходе корреляционного анализа было установлено наличие заметной отрицательной связи ($r=0,60$; $p<0,001$) между индексом КПУ и содержанием 25(OH) витамина D в организме.

На этапе проведенного анализа некоторых компонентов иммунной защиты полости рта были выявлены следующие особенности.

При нормальном сывороточном уровне 25(OH)D в смешанной слюне у лиц с кариесом высокой степени интенсивности уровень sIgA был снижен на 9,9% ($p=0,04$) относительно группы сравнения. А при дефиците витамина и кариесе той же степени интенсивности снижен гораздо существеннее – на 73,1% ($p<0,001$) и оказался статистически значимо ниже, чем в других группах.

Нами показано, что изменения уровней АМП кателицидинов и дефензинов выглядели разнонаправлено: при кариесе и нормальном уровне витамина D их значения увеличивались относительно группы сравнения, а при кариесе и дефиците витамина D – статистически значимо снижались.

Исходя из имеющихся данных, мы заключаем, что на фоне нормальных значений витамина D в организме у пациентов с кариесом в ротовой жидкости повышается уровень противомикробных пептидов, возможно, как ответ на действие бактерий, вызывающих кариес. Уменьшение же концентраций АМП в группах с дефицитом витамина D, вероятно, свидетельствует о функциональной недостаточности эффекторных клеток врожденного иммунитета, основными из которых являются воспалительные макрофаги, именно они продуцируют катионные пептиды. Полученные результаты, на наш взгляд, выглядят вполне логично, поскольку известно, что кальцитриол активирует трансляцию кателицидина и β -дефензинов.

Проведенный нами анализ зависимости изучаемых показателей от уровня 25(OH)D, установил наличие прямых заметных связей со значениями кателицидина LL-37 и умеренных – с концентрациями α -дефензинов 1-3.

Выявленные нами изменения со стороны значений еще одного обязательного участника врожденного иммунитета – липополисахарид-связывающего белка выглядели следующим образом: на фоне нормальных значений 25(OH)D при средней интенсивности кариеса уровень данного белка был максимальным и превышал контроль на 36,4% ($p=0,041$). В группе с высоким индексом КПУ значение этого же показателя было ниже контроля на 66,7% ($p<0,001$), а также меньше, чем в первой группе на 76,7% ($p<0,001$). У лиц с низким количеством 25(OH)D и средней интенсивностью кариеса не наблюдалось

роста LBP, и его уровень статистически значимо не отличался от контроля. В группе с низким содержанием витамина и высоким индексом КПУ значения LBP были ниже, чем в контроле на 75,1% ($p < 0,001$), но не отличались от таковых в группе лиц с нормальным содержанием 25(OH)D и той же интенсивностью кариеса.

Учитывая роль данного белка, мы предполагаем, что недостаточная секреция этого соединения у лиц с низким уровнем витамина D может привести к усугублению патологического процесса.

Слизистая оболочка ротовой полости имеет свою собственную иммуноиндуктивную ткань - так называемые MALT. Эта ткань обладает уникальными функциональными характеристиками, включая отбор образцов антигена М-клетками и последующую обработку и представление антиген-презентирующими клетками, что приводит к иницированию антиген-специфических иммунных ответов слизистой оболочки. Th1, Th2, Th17 и цитотоксические Т-клетки, а также В-клетки обеспечивают первую линию защиты от внедряющихся микроорганизмов и их антигенов [56].

В эпителии ротовой полости, кроме лимфоидных клеток, локализованы разнообразные лейкоциты: нейтрофильные гранулоциты, дендритные клетки, макрофаги, натуральные киллеры, тканевые базофилы. Все они способны распознавать паттерны микроорганизмов, индуцировать разные типы адаптивного ответа. Все клетки тесно взаимодействуют между собой, участвуют в иммунной защите непосредственно и через растворимые факторы, которые попадают и в ротовую жидкость.

Поскольку, важное значение, в оптимальном формировании клеточного иммунитета имеют **костимуляторные и коингибиторные сигнальные молекулы**, нами были проанализированы изменения содержания растворимых форм некоторых из них при кариесе на фоне различного статуса витамина D в организме.

При кариесе средней степени интенсивности и нормальным уровнем 25(OH)D количество растворимой формы лиганда костимулирующей молекул

B7.2 возросло относительно контроля. Увеличение молекул B7.2 на наш взгляд в данном случае благоприятно, поскольку согласно современным представлениям для индукции иммунного ответа необходим сигнал, заключающийся в связывании костимулирующих молекул и их лигандов, экспрессированных на APC и T-лимфоцитах. Этот сигнал обеспечивает выживание активированных лимфоцитов, и без него T-лимфоциты, распознающие антиген, переходят в состоянии анергии [53].

В группе с высокой интенсивностью кариеса достоверное увеличение B7.2 не наблюдалось.

В группах с недостатком и дефицитом 25(OH) витамина D регистрировалось снижение относительно группы сравнения уровня как костимулирующих, так и коингибирующих молекул.

Содержание LAG-3 уменьшилось не зависимо от интенсивности кариеса практически в два раза. А уровни Tim-3 и PD-1 снижались по мере степени интенсивности кариеса. При средней степени интенсивности Tim-3 снизился на 36,5% ($p < 0,001$), при высокой степени интенсивности – на 44,4% ($p < 0,001$); PD-1 соответственно был ниже контроля на 47,5% ($p = 0,036$) и 78,2% ($p < 0,001$).

Ингибирующие функции Tim-3, Lag-3 не идентичны, они имеют нюансированные функции, даже когда они экспрессируются вместе на популяции «истощенных» или «дисфункциональных» T-клетках [113].

Белок запрограммированной смерти PD-1 является коингибирующим рецептором, который экспрессируется активированными T-клетками, В-клетками и клетками Natural Killer и участвует в поддержании иммунной толерантности. При связывании с лигандами PD-L1 и PD-L2, которые экспрессируются клетками кроветворной линии и антигенпрезентирующими клетками, PD-1 ингибирует функцию, выживание и активацию T-клеток. Таким образом, PD-1 отвечает за предотвращение аутореактивных ответов T-клеток. По данным литературы, растворимая форма PD-1 повышена при некоторых аутоиммунных заболеваниях, таких как сахарный диабет, системная красная волчанка и ревматоидный артрит (RA). Экспрессия PD-1 увеличивается в истощенных T-клетках, которые

выявляются у пациентов с хроническими инфекциями и аутоиммунными заболеваниями [53].

Корреляционный анализ, проведенный нами, показал наличие умеренной прямой связи между 25(ОН) витамином D и В7-2 и наличие значительной прямой связи между активной формой витамина D и коингибирующими молекулами.

Интересен следующий механизм кариеса, который подлежит обязательному анализу. Поскольку кариес зубов вызван микроорганизмами, то изменения в уровне регулирующих иммунитет молекул может зависеть от тактики атакующего микроорганизма.

При бактериальном воздействии из дентина высвобождается трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- β 1), который вызывает накопление в слое одонтобластов незрелых дендритных клеток, положительных на HLA-DR, фактор XIIIa, CD68 и TbRII.

Цитокин TGF- β 1 оказывает также существенное влияние на функцию одонтобластов, действует как мощный иммунодепрессант и индуктор формирования межклеточного матрикса, играет важную роль в репаративном процессе дентина, регулируя пролиферацию, дифференцировку клеток [90, 150].

Как установлено нами, уровень Free Active TGF- β 1 во всех группах с кариесом были ниже контрольных: в первой группе – на 30,1% ($p=0,040$), во второй – на 52,2% ($p=0,009$), в третьей – на 58,7% ($p<0,001$), и в четвертой – на 63,9% ($p<0,001$).

Следует подчеркнуть, что под регуляторным воздействием факторов роста происходит процесс образования репаративного дентина, формирование клеточных взаимодействий в комплексе дентин-пульпа. Известно, что в пульпе зуба имеется несколько изоформ трансформирующего фактора роста (TGF), которые экспрессируются одонтобластами, макрофагами, Т- и В-лимфоцитами пульпы зуба на поверхности плазматической мембраны клеток, либо связываются с межклеточным матриксом [151]. Физиологическая функция TGF- β в зрелых одонтобластах может быть связана с образованием вторичного дентина, а также с деградацией матрикса при повреждении зубов. Одонтобласты под влиянием TGF-

$\beta 1$ синтезируют коллаген III типа. Также вероятно, что TGF- $\beta 1$ принимает участие и в антимикробной защите зуба, хотя этот механизм до конца не понятен. Нами обнаружена умеренная прямая связь между уровнем свободной фракцией TGF- $\beta 1$ и содержанием 25(OH) витамина D, поэтому полученные в нашей работе данные дают основания говорить о том, дефицит витамина D вызывает уменьшение TGF- $\beta 1$.

Еще одним фактором роста, присутствующим в костном матриксе, и являющимся наиболее распространенным назван инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) [77]. Инсулиноподобный фактор роста, его рецепторы, связывающие белки (IGFBPs), играют критическую роль в нормальном развитии, росте тканей, обмене веществ и гомеостазе [77, 107], некоторые из молекулярных механизмов его участия в остеогенной дифференцировке изучены, но о функции шести белков, связывающих IGF (IGFBP 1–6), доступно гораздо меньше информации. Установлено, что IGFBP-4 является важным ключевым членом семейства IGFBP, белком, который модулирует действие инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), проявляет свои основные функции посредством ингибирования IGF- индуцированного роста клеток и, таким образом, регулирует метаболические процессы [77]. Его экспрессия зарегистрирована в клетках пульпы [58].

На сегодняшний день не обнаружен специфический рецептор IGFBP-4, однако имеются данные о возможности наличия у IGFBP-4 IGF-независимых функций. К примеру, IGFBP-4 вызывает заметное ингибирование церамид-индуцированного апоптоза в культуре клеток рака молочной железы человека, в которых отсутствует нормально функционирующий IGF-IR [77]. Кроме этого, IGFBP проявляет другие IGF-независимые эффекты: модуляция активности разнообразных факторов роста, транслокация в ядро и регуляция транскрипции белков, связывание с биомолекулами во внеклеточном пространстве, на поверхности клетки и внутриклеточно. IGFBP модулируют важные биологические процессы, включая пролиферацию клеток, выживание, миграцию, старение, аутофагию и ангиогенез [77]. Таким образом, биологическая роль

IGFBP разнообразна и определяется особенностями клеточной экспрессии, и другими факторами.

Согласно нашим данным, у лиц с кариесом на фоне недостатка/дефицита 25(ОН) витамина D увеличилось содержание белка IGFBP-4 относительно группы сравнения на 135,7% ($p < 0,001$).

Имеются сведения, что гормон паращитовидной железы (ПТГ), кальцитриол, IGF-I, IGF-II и TGF $1-\beta$ являются основными регуляторами секреции IGFBP-4 *in vitro*, однако о регуляции его *in vivo* у человека известно мало.

Результаты исследований Bereket A. и соавт. (2010 г.) показывают, что в отличие от исследований *in vivo*, уровни циркулирующего IGFBP-4 не подвержены влиянию вторичного гиперпаратиреоза при витаминно-дефицитном рахите, поскольку уровни IGFBP-4 не изменились после нормализации ПТГ при лечении витамином D [76].

В то же время, по данным Al-Daghri N.M. и соавт. (2018 г.) витамин D увеличивает количество циркулирующих IGF-I и IGFBP-3, при этом исследователями обнаружена обратная корреляция между 25 (ОН) D и IGF-I / IGFBP-3 в когортах субъектов с избыточным весом [103].

В своем исследовании мы выявили наличие умеренной обратной связи между 25(ОН) витамином D и белком IGFBP-4, что подтверждает причастность D гиповитаминоза к росту значений данного белка в слюне у лиц с кариесом.

В ходе своей работы мы обнаружили в слюне пациентов с кариесом увеличение еще одного белка – ICAM-1.

Экспрессия ICAM-1 обнаружена на многих типах клеток, включая эндотелиоциты, гранулоциты, макрофаги, фибробласты и др. В организме ICAM-1 тоже существуют в мембрано-связанной и растворимой форме. Последняя (sICAM-1) – обнаруживается в крови и других биологических жидкостях.

Как установлено нами, при кариесе на фоне нормальных значений витамина D в организме рост уровня ICAM-1 происходил на 68,8 % ($p < 0,001$).

На фоне недостатка/дефицита витамина D уровень растворимой формы ICAM-1 возрос на 243,8% ($p < 0,001$) относительно группы сравнения и на 103,7% ($p < 0,001$) относительно групп лиц с нормальным содержанием 25(OH) витамина D.

ICAM – протеин, регулирующий контакты между клетками иммунной системы, а также эндотелием сосудов [37], обеспечивающий прочную адгезию лейкоцитов к сосудистой стенке и способствующей проникновению этих клеток в слой интимы. Однако, есть данные, что растворимая форма (sICAM-1), образуемая вследствие сброса с клеточной мембраны, способствует «отслойке» лейкоцитов от сосудистой стенки. Кроме эндотелиальных клеток, ICAM-1 экспрессируют лимфоциты, моноциты, клетки эпителия [37].

Воспалительный процесс увеличивает экспрессию ICAM-1 [37]. Существуют работы, показывающие, что уровень sICAM-1 в крови коррелирует с тяжестью периодонтита [151]. В исследованиях, посвященных оценке содержания sICAM-1 в крови при различных инфекционных патологиях в большинстве случаях наблюдалось увеличение концентрации молекул по сравнению со здоровыми лицами. Huang G.T. и соавт. (2001) продемонстрировали, что экспрессия белка ICAM-1 на клеточной поверхности увеличивается в эпителиальных клетках десен, зараженных *A. Actinomycetemcomitan* или *F. nucleatum*, тогда как при заражении клеток *P. Gingivalis* секреция белка подвляется [108]. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями. Экспрессия данной молекул усиливается под воздействием свободных радикалов, компонентов комплемента, оксида азота, липополисахаридов, провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1, 6 и 8, фактора некроза опухоли- α , интерферона- γ и пр.), лейкотриенов, гистамина, тромбина и многих других медиаторов [61]. В тоже время Claire L. и соавторы продемонстрировали данные о том, что метаболиты витамина D ослабляют индуцированную RV экспрессию ICAM-1 [151].

Таким образом, учитывая литературные данные, увеличение уровня sICAM-1 при кариесе, а особенно на фоне дефицита витамина D вполне объяснимо.

На наш взгляд, такое значительное повышение уровня ICAM-1 не совсем благоприятно, поскольку есть данные, что повышенная экспрессия ICAM-1 на клетках приводит к нарушенному TGF- β -опосредованному фосфорилированию SMAD2 и подавлению секреции IL-2 [119]. Кроме того, имеются данные, что экспрессия ICAM-1 способствует инвазии некоторых бактерий в эпителиальные клетки [158]

На одном из этапов нашего исследования был сделан анализ содержания MMP-9 и MMP-2 в слюне у лиц с кариесом на фоне различного содержания 25(OH) витамина D в организме. Наш интерес к изучению MMP был вызван существующими исследованиями, демонстрирующими широкий спектр молекул, которые они могут гидролизовать, и биохимических реакций, которые они потенциально могут регулировать. Огромная сложность функций MMP в «протеазной сети» имеет решающее значение для многих физиологических и патологических процессов, включая иммунитет, воспаление, резорбцию костной ткани. Установлено, что MMP собираются в каскады активации и, помимо своих классических субстратов внеклеточного матрикса, расщепляют некоторые сигнальные молекулы, такие как цитокины, хемокины и факторы роста, которые среди прочих, регулируют их биологические функции и/или биодоступность при стоматологических заболеваниях [139].

Матриксные металлопротеиназы (MMP) представляют собой группу из более чем 25 секретируемых и связанных с мембранами ферментов, ответственных за протеолиз белков межклеточного матрикса. Ферменты были выделены из дентина, одонтобластов, пульпы и периапикальной ткани, они важны для формирования дентинового матрикса, а также вторичного и третичного дентина. Ферменты семейства MMP проявляют двойную роль в патогенезе воспаления, стимулируя защитные врожденные и/или адаптивные иммунные функции, и в тоже время разрушение тканей [94].

Многие металлопротеиназы секретируются иммунными клетками, такими как полиморфноядерные лейкоциты и моноциты/макрофаги [94, 139]. После стимуляции, в том числе после бактериального воздействия активированные

лейкоциты выделяют ММР-9 в виде латентной формы, которая локально активируется путем частичного протеолиза другими протеазами (эластазой, ММР-1) и миелопероксидазой. Помимо нейтрофилов, ММР-9 секретируется макрофагами, эпителиальными клетками и одонтобластами. ММР-2 прежде всего экспрессируется в фибробластах, а также синтезируется остеобластами, одонтобластами, нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [94, 139].

Сделанная нами оценка уровня металлопротеиназ в смешанной слюне показала, что в группах с кариесом и нормальным уровнем 25(ОН) витамина D регистрируется увеличение концентраций ММР-9 относительно контроля. Полученные результаты в этом случае выглядят вполне логично, поскольку литературные данные свидетельствуют о том, что в прогрессировании кариеса зубов участвуют ММР, способные вызывать деградацию белков дентина, который менее минерализован, чем эмаль, и содержит 19-20% органического компонента, главным образом представленного коллагеном I типа [139]. ММР, присутствующие в дентине [36], продуцируются одонтобластами и в норме вовлекаются в формирование дентина (отвечая за высвобождение факторов роста дентина) [94]. После минерализации коллагенового матрикса они остаются в неактивной форме в кальцифицированном матриксе [86]. По мнению Catherine Chaussain, каскад событий, вовлекаемых ММР в кариозный процесс, может быть следующим: деминерализация происходит под действием органических кислот, которые секретируются кариесогенными микроорганизмами. ММР, в норме находясь в латентной форме как в слюне, так и в дентине, при низком значении рН, активируются, и деминерализованный матрикс, в свою очередь, подвергается их протеолитическому действию, что усугубляет кариозный процесс [155]. С другой стороны, имеются исследования, указывающие на то, что и металлопротеиназы, секретируемые нейтрофилами, тоже вносят свой вклад в деградацию дентина [94, 102].

ММР-2 активируется с помощью аутокатализа, который имеет концентрационно-зависимый характер, по мнению некоторых исследователей, она способна гидролизовать нативный коллаген I типа [94].

При кариесе на фоне нормальных значений 25(OH) витамина D нами было выявлено увеличение в слюне MMP-9. В группах пациентов с кариесом и недостатком/дефицитом 25(OH) витамина D уровни MMP-9 были увеличены гораздо существеннее по сравнению с контрольной группой – практически на 200% ($p < 0,001$). Кроме того, в группе с высокой интенсивностью кариеса на фоне дефицита витамина была повышена концентрация MMP-2 как относительно контроля, так и относительно значений в группе лиц с той же интенсивностью кариеса, но нормальным уровнем витамина D, что, на наш взгляд, является неблагоприятным и будет способствовать усугублению кариозного процесса.

Сравнительный анализ содержания MMP-9 в группах с одинаковым индексом КПУ, но различным статусом 25(OH) витамина D, показал, что недостаток/дефицит 25(OH) витамина D сопровождается повышением концентрации MMP-9 (практически в два раза) относительно групп с нормальным содержанием витамина, и это повышение не зависит от интенсивности кариеса. Вероятно, интенсивность процесса деминерализации увеличивается по мере выраженности дефицита витамина D.

Проведенный корреляционный анализ выявил наличие заметной обратной связи между уровнем MMP-9 и содержанием 25(OH) витамина D в крови ($r = -0,64$; $p < 0,001$). Между содержанием MMP-2 и уровнем 25(OH) витамина D регистрировалась умеренная обратная связь ($r = -0,40$; $p = 0,01$). Похожие взаимосвязи между концентрациями MMP-9 в плазме и 25(OH) D обнаружены в исследовании Wasse H и соавт. (2011) [159]. Известно, что некоторые цитокины, например, $TNF\alpha$, стимулируют избыточную продукцию MMP-9. Витамин D подавляет активацию фактора транскрипции NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), вызванную $TNF-\alpha$, что устраняет пагубное действие $TNF-\alpha$ за счет подавления продукции MMP-9 [127].

Таким образом, на причастность недостатка/дефицита 25(OH) витамина D к нарушению иммунитета полости рта, к снижению карисорезистентности указывают наблюдаемые существенные количественные изменения растворимых белков в смешанной слюне и множественные корреляционные связи между

значениями метаболита витамина, индексом КПУ и изучаемыми лабораторными показателями. Учитывая данные литературы и полученные результаты, мы предлагаем схему, в которой отражено влияние D гиповитаминоза на развитие кариеса (рис 9), собственные данные отображены в округлых формах.

Недостаток витамина D приводит не только к снижению скорости трансляции катионных белков (кателицидина LL-37, α -дефензинов) и LBP, но и к снижению уровня sIgA. Уменьшение количества последнего может быть связано со снижением чувствительности В клеток к активационным сигналам или появлению аутоантител к sIgA [168] на фоне дефицита витамина D. Уменьшение растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул в смешанной слюне может свидетельствовать о снижении функциональной активности клеток иммунного ответа – они не воспринимают не стимулирующие, не ингибирующие стимулы, что приводит к нарушению их дифференцировки, созревания, развитию анергии. Все вышеуказанные события приведут к росту числа патогенной микрофлоры.

С другой стороны, поскольку одним из механизмов ускользания микрофлоры от иммунного ответа является его модуляция в сторону менее эффективного или вообще его торможение путем синтеза цитокиноподобных веществ, можно объяснить факт уменьшения числа растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул в смешанной слюне увеличением числа патогенов [53].

При этом, Т-лимфоциты переходят или в состояние senescent (окончательно зрелые и даже “стареющие” лимфоциты) или exhausted (утомленные, истощенные лимфоциты) [62]. Т-клетки в состоянии senescent теряют способность экспрессировать рецептор для костимуляции [117]. Если же в лимфоцитах развивается состояние exhausted, то они теряют способность синтезировать интерлейкин-2, фактор некроза опухолей α , интерферон γ [135].

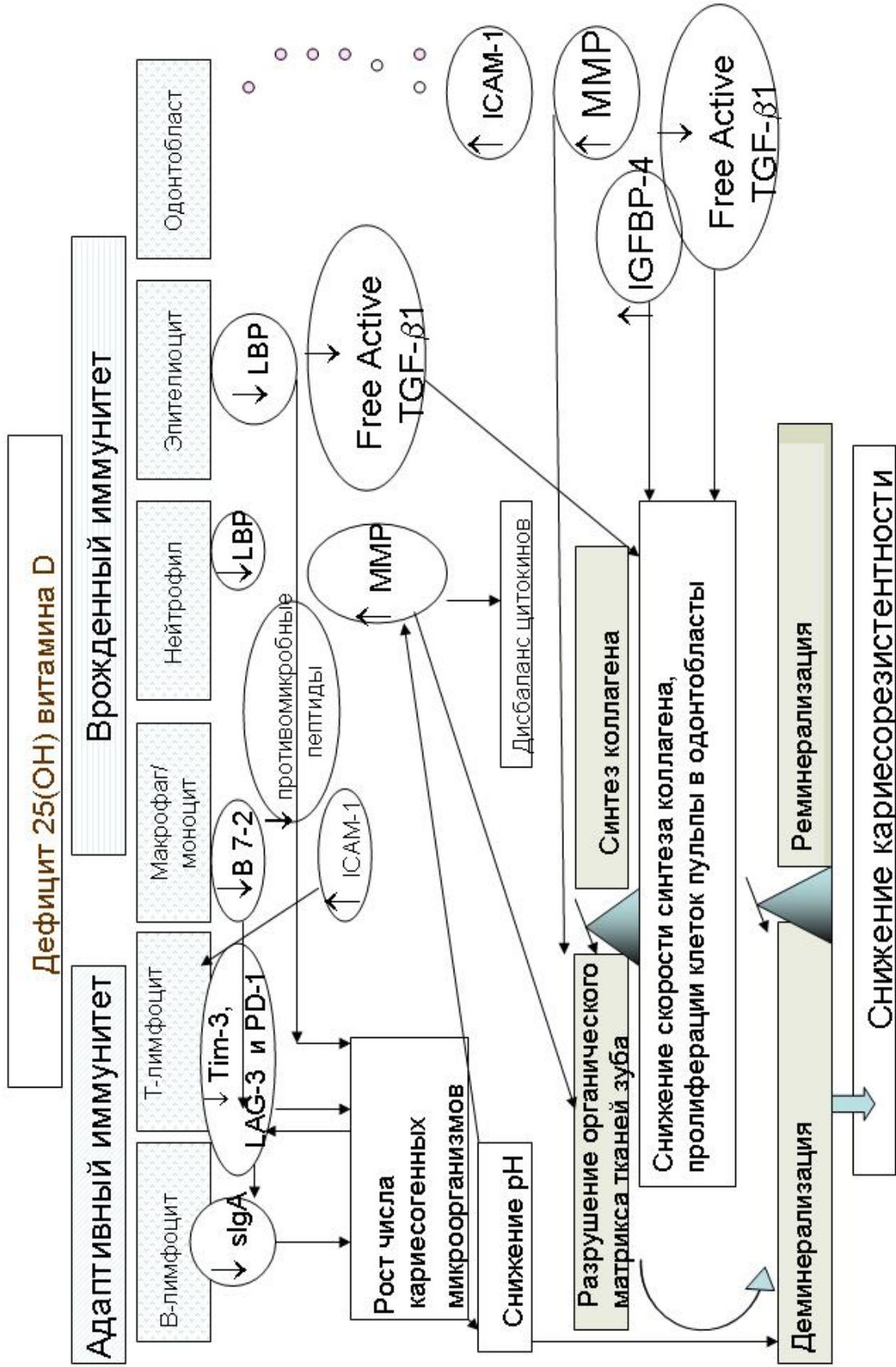


Рис. 9. Схема событий в ротовой полости, приводящих к снижению кариесрезистентности на фоне недостатка/дефицита 25(OH) витамина D в организме

Данные процессы с одной стороны не позволяют уничтожить патогенную микрофлору, однако, с другой – дают возможность удерживать под контролем патогены. Однако, состояние иммунной системы будет прогрессивно ухудшаться, что приведет к усугублению кариозного процесса. И наконец, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ индуцирует регуляторные Т-клетки (Treg) (клетки, которые важны для подавления воспалительных процессов посредством экспрессии, коингибирующих молекул, включая PD-1 и CTLA-4) [49, 120, 163], а дефицит $25(\text{OH})$ витамина D приводит к уменьшению количества коингибирующих молекул.

Уменьшение количества TGF- β 1, который стимулирует миграцию защитных и одонтобластоподобных клеток в зону повреждения, снизит кариесорезистентность. При попадании в зону воспаления TGF- β 1 превращается в активную молекулу и стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки мезенхимальных клеток пульпы в одонтобласты, а при уменьшении его синтеза наблюдается некроз и апоптоз клеток пульпы [151].

Наблюдаемые значительные увеличения уровней ICAM-1 и IGFBP-4 на фоне дефицита витамина D, вероятно, связаны с усилением экспрессии данных белков.

Белок IGFBP-4 подавляет действие факторов роста пульпы, в свою очередь это вызовет ингибирование роста клеток и подавление метаболических процессов.

Повышение уровня растворимой формы ICAM-1 может быть результатом активного протеолитического сброса этих молекул с клеточной мембраны, либо же в условиях дефицита витамина D усиленной экспрессией ICAM-1 в ответ на повышенное бактериальное воздействие. Поскольку молекулы адгезии принимают непосредственное участие в иммунном ответе изменение их концентрации на фоне дефицита витамина D, безусловно, будет иметь свои последствия.

При дефиците витамина D регистрируется увеличение уровня MMP-9 и MMP-2, что, скорее всего, вызовет более активный протеолиз белков дентина и также приведет к интенсификации кариозного процесса.

Безусловно, настоящая схема представлений о последовательности событий в ротовой полости, ведущих к развитию кариеса при дефиците витамина D, является неполной, не отражает влияние кальцитриола на содержание кальция в слюне, которое не было изучено в настоящей работе.

Однако, проведенное нами исследование уже дает основание для постановки вопроса об определении статуса витамина D в организме и в случае его недостатка – обязательном включении препаратов витамина D в комплексную терапию кариеса высокой степени интенсивности. Причем, проведенное пилотное исследование по оценке влияния препарата витамина D на некоторые иммунологические показатели ротовой жидкости (каталепидина LL-37, sIgA, LBP) показало, что курсовой прием нативного раствора витамина D приводит к нивелированию изменений, возникающих на фоне кариеса [11].

ВЫВОДЫ

1. У лиц со средней степенью интенсивности кариеса (КПУ от 4 до 8) недостаток и дефицит 25(ОН) витамина D выявляется в 73% и 9,5% случаев, у лиц с высокой степенью интенсивности патологического процесса (КПУ от 9 до 14) – в 56,1% и 24,7% случаев соответственно; при низкой интенсивности кариеса (КПУ от 0 до 3) уровень 25(ОН) витамина D в 65% случаев находится в пределах нормы и лишь 35% случаях наблюдается его недостаток либо дефицит.

2. У лиц с кариесом и нормальным уровнем витамина D отмечается увеличение содержания защитных белков – кателицидина, дефензинов и рост количества LBP в слюне при средней интенсивности кариеса, а при высокой степени интенсивности патологического процесса – снижение концентрации LBP наряду с уменьшением содержания секреторного иммуноглобулина А относительно группы сравнения. На фоне низкого уровня 25(ОН) витамина D регистрируется: при средней интенсивности кариеса снижение кателицидина и дефензинов, а при высокой степени интенсивности – существенное снижение концентрации всех защитных белков ротовой жидкости.

3. При кариесе средней степени интенсивности на фоне нормального уровня 25(ОН) витамина D увеличивается уровень растворимых форм костимулирующих (B.7.2) молекул. Недостаток витамина D в организме сопровождается уменьшением уровня костимулирующих (B.7.2) и коингибирующих молекул (LAG-3, Tim-3, PD-1) в ротовой жидкости, которое в наибольшей степени проявляется при высокой степени интенсивности кариозного процесса.

4. На фоне нормального уровня витамина D кариозный процесс сопровождается уменьшением в ротовой жидкости количества Free Active TGF-b1 и увеличением концентраций ICAM-1 и MMP-9. При недостатке 25(ОН) витамина D эти изменения усугубляются при одновременном росте уровня IGFBP-4, не зависящем от степени интенсивности кариеса, и повышение содержания MMP-2 при кариесе высокой степени интенсивности.

5. Значение индекса КПУ у пациентов, страдающих кариесом зубов, связано с уровнем 25(ОН) витамина D в сыворотке крови ($r=-0,6$), количеством защитных

белков sIgA ($r=-0,53$) и LBP ($r=-0,56$), с концентрациями костимулирующей молекулы B7.2 (CD86) ($r=-0,31$) и коингибирующей молекулы PD-1 ($r=0,33$), фактора роста Free Active TGF- β 1 ($r=-0,40$), белка ICAM-1 ($r=0,42$) и фермента MMP-9 ($r=0,52$) слюны. Значения 25(OH) витамина D в крови связаны с содержанием защитных белков в слюне: кателицидина LL-37 ($r=0,63$), α -дефензинов 1-3 ($r=0,54$), LBP ($r=0,41$). Значения 25(OH) витамина D в крови прямо связаны с количеством костимулирующих и коингибирующих молекул, Free Active TGF-1 β , IGFBP-4 ($r=-0,39$), ICAM-1 ($r=-0,61$) и MMP-9 ($r=-0,64$).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в проведении дополнительных исследований по изучению изменений, происходящих в ротовой полости с клеточным звеном иммунитета, на фоне дефицита витамина D; в дальнейшем развитии результатов исследования, которое состоит в необходимости разработки персонализированных подходов к лечению кариеса высокой степени интенсивности, созданию биохимических критериев для прогнозирования риска развития и интенсивности течения кариеса, разработке возможных методов профилактики заболевания, а также обоснование ранней коррекции нарушений мукозального иммунитета полости рта.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АМП – антимикробные пептиды

ДК – дендритные клетки

КПУ – индекс интенсивности кариозного процесса (постоянный прикус)

ЛПС – липополисахарид

B7.2 (CD86) – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов B7, продукт гена *CD86*

CD – (cluster of differentiation) кластер дифференциации

CTLA-4 – (cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) цитотоксический T-лимфоцит-ассоциированный белок 4

Free Active TGF- β 1 – (free active transforming growth factor) свободная фракция трансформирующего ростового фактора бета-1

ICAM-1 – (inter-cellular adhesion molecule) молекула межклеточной адгезии 1

IGFBP-4 – (insulin-like growth factor binding protein) белок 4, связывающий инсулиноподобный фактор роста

IL – (interleukin) интерлейкин

Lag-3 – (lymphocyteactivation gene 3) белок гена активации лимфоцитов-3

LBP – (lipopolysaccharide binding protein) липополисахарид связывающий белок

LPS – (lipopolysaccharide) липополисахарид

MMP – (matrix metalloproteinases) матриксные металлопротеиназы

NF- κ B – (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ядерный фактор каппа

NK-клетки – (natural killer cells) натуральные киллеры

PD-1 – (programmed cell death 1) белок запрограммированной смерти клеток 1

SAG – слюнной агглютинин

SiC - (significant caries index) индекс значимого кариеса

Tim-3 (T-cell immunoglobulin mucin-3) белок T клеточного иммуноглобулина и муцинового домена-3

VDR – (vitamin D receptor) рецептор витамина D

Список литературы

1. Абатуров А.Е. Витамин-D-зависимая продукция антимикробных пептидов / А.Е. Абатуров, Н.Ю. Завгородняя // Здоровье ребенка. – 2012. – Т. 36, № 1. – С. 105-111.
2. Ахполова В.О. Обмен кальция и его гормональная регуляция / В.О. Ахполова, В.Б. Брин // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2017. – № 2. – С. 38-47.
3. Бельская Л.В. Возможности применения слюны для диагностики онкологических заболеваний / Л.В. Бельская. – DOI 10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336 // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 6. – С. 333-336.
4. Витамин D и его роль в развитии стоматологических заболеваний (обзорная статья) / И.В. Фирсова, Е.А. Мокрова, Б.В. Заводовский, Ю.А. Македонова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=15773> (дата обращения: 29.03.2019).
5. Влияние витамина D на репродуктивное здоровье женщины / М.О. Баклейчева, И.В. Ковалева, О.Н. Беспалова [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2018. – Т. 67, № 3. – С. 4-19.
6. Влияние дефицита витамина D на состояние зубочелюстной системы: обзорная статья / Е.Ю. Дьячкова, Д.О. Трифонова, М.О. Ибадулаева [и др.]. – DOI 10.17816/I0WD6734-19 // Остеопороз и остеопатии. – 2021. – Т. 24, № 1. – С. 19-25.
7. Выявление иммуноглобулинов, антител против белков теплового шока и цитокина IL-8 в слюне больных хроническими заболеваниями пародонта / Н.Н. Цыбиков, Ю.И. Пинелис, М.С. Малежик, Л.П. Малежик // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 4-5. – С. 421-424.
8. Давыдов Б.Н. Распространенность и интенсивность стоматологических заболеваний у студентов-иностранцев в период их обучения в России / Б.Н.

Давыдов, О.А. Гаврилова, М.А. Шеваякова // *Стоматология*. – 2011. – № 1. – С. 22-24.

9. *Детская терапевтическая стоматология: национальное руководство* / под редакцией В.К. Леонтьева, Л.П. Кисельниковой. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 896 с. – ISBN 978-5-9704-1703-4.

10. Дефицит витамина D в России: первые результаты регистрового неинтервенционного исследования частоты дефицита и недостаточности витамина D в различных географических регионах страны. / Суплотова Л.А., Авдеева В.А., Пигарова Е.А. [и др.] - DOI: 10.14341/probl12736n // *Проблемы Эндокринологии*. – 2021. – Т.67, №2. – С.84-92

11. Динамика некоторых иммунных и биохимических показателей ротовой жидкости у лиц с кариесом на фоне приема препарата витамина D. / А.С. Путнева, Т.М. Караваева, М.В. Максименя [и др.]. – DOI : 10.17116/stomat20209906113 // *Стоматология*. – 2020. – Т. 99, № 6. – С. 13-18.

12. Екимов Е.В. Кластерный анализ клинических и лабораторных показателей гомеостаза полости рта при лечении начального кариеса зубов у детей с различной степенью активности кариозного процесса / Е.В. Екимов, Г.И. Скрипкина, Ю.Г. Романова // *Стоматология детского возраста и профилактика*. – 2018. – Т.17, № 2. – С. 65-67.

13. Значение дефицита витамина D в развитии заболеваний человека / С.В. Реушева, Е.А. Паничева, С.Ю. Пастухова, М.Ю. Реушев // *Успехи современного естествознания*. – 2013. – № 11. – С. 27-31.

14. Изучение особенностей фосфорнокальциевого обмена в патогенезе кариеса у детей подросткового возраста / Л.П. Кисельникова, И.А. Алексеева, И.Г. Данилова [и др.] // *Российский медицинский журнал*. – 2014. – № 2. – С. 27-30.

15. Кариес зубов у детей дошкольного возраста / М.Н. Митропанова, О.А. Павловская, А.И. Косс, З.А. Фукс // *Dental Forum*. – 2013. – № 4. – С. 2-4.

16. Карпук И.Ю. Роль белков слюны в мукозальном иммунитете // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. – 2014. – № 4. – С. 79-93.

17. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии / А.С. Шадрина, Я.З. Плиева, Д.Н. Кушлинский [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2017. – Т. 45, № 4. – С. 266-279.
18. Кобиясова И.В. Комплексный подход к профилактике и лечению кариеса зубов у подростков в пубертатный период тема : специальность 14.00.21 «Стоматология» : диссертация на соискание ученой степени кандидат медицинских наук / Кобиясова Ирина Владимировна. – Санкт-Петербург, 2004. – 136 с.
19. Кочурова Е.В. Диагностические возможности слюны / Е.В. Кочурова, С.В. Козлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 1. – С. 13-15.
20. Кочурова Е.В. Изменение иммунобиологических показателей в полости рта у онкологических больных на этапе стоматологической реабилитации / Е.В. Кочурова, С.В. Козлов, В.Н. Николенко // Российский стоматологический журнал. – 2014. – № 4. – С. 33-35.
21. Леонтьев В.К. Об этиологии кариеса зубов / Институт стоматологии. – 2019. – Т.82, № 1. – С. 34-35.
22. Леонтьев В.К. Кариес зубов – болезнь цивилизации // Биосфера. – 2010. – № 3. – С. 392-396.
23. Леонтьева Е.Ю. Распространенность стоматологических заболеваний у студентов Ростовского медицинского университета и потребность в их лечении // Медицинский вестник Юга России. – 2012. – № 3. – С. 44-47.
24. Леус П.А. Методы и подходы к обоснованию и практической реализации индивидуальной профилактики кариеса зубов у взрослых // Форум стоматологии. – 2008. – Т. 25, № 1. – С. 34-51.
25. Леус П.А. Совершенствование классификаций кариеса зубов и их значение в практике врача-стоматолога // Современная стоматология. – Минск. – 2019. – № 2. – С. 4-12.

26. Лихорад Е.В. Заболеваемость кариесом зубов, уровень витамина D и особенности питания у детей с нарушением белкового обмена / Е.В. Лихорад, Н.А. Жерносек // Современная стоматология. – 2017. – № 4. – С. 75-77.
27. В.И. Мамчур. Дефензины – эндогенные пептиды с антиинфекционными и противоопухолевыми свойствами (обзор литературы) / В.И. Мамчур, А.Э. Левых // Таврический медико-биологический вестник. — 2012. — Т. 15, № 2, ч. 3 (58). — С. 315-321.
28. Майлян Э.А. Регуляция витамином D метаболизма костной ткани / Э.А. Майлян, Н.А. Резниченко, Д.Э. Майлян // Медицинский вестник Юга России. – 2017. – № 1. – С. 12-20.
29. Майлян Э.А. Роль витамина D в регуляции противоинфекционного иммунитета / Э.А. Майлян, Н.А. Резниченко, Д.Э. Майлян // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 75-82.
30. Макеева И.М. Распространенность и интенсивность стоматологических заболеваний у студенческой молодежи Москвы и потребность в их лечении / И.М. Макеева, В.Ю. Дорошина, А.С. Проценко // Стоматология. – 2009. – № 6. – С. 4-8.
31. Малявская С.И. Обеспеченность витамином D населения различных возрастных групп, проживающих в городе Архангельске / С.И. Малявская, И.Н. Захарова, Г.Н. Кострова. – DOI 10.15690/vsp.v14i6.1476 // Вопросы современной педиатрии. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 681-685.
32. Матриксные металлопротеиназы и воспалительные цитокины в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами / Н.Е. Кушлинский, Е.А. Соловых, Т.Б. Караогланова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 1. – С. 82-87.
33. Милехина С.А. Кариес зубов у детей: значение локальных нарушений кальций-фосфорного обмена // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10. – С. 314-318.
34. Молекулы контроля иммунитета семейства В7. Часть 1. Общая характеристика и первые представители: В7-1, В7-2, В7-Н1, В7-Н2 И В7-DC /

А.И. Шаповал, С.П. Шаповал, Н.С. Щербакова, Д.Н. Щербаков // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, № 4. – С. 348-364.

35. Молекулы контроля иммунитета семейства V7. Часть 2. Представители семейства V7: V7-N3, V7-N4, V7-N5, V7-N6, V7-N7 и ILDR2 и их рецепторы / А.И. Шаповал С.П. Шаповал, Н.С. Щербакова, Д.Н. Щербаков // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, № 5. – С. 472-487.

36. Морфологические особенности и роль дентин-матриксной металлопротеиназы в деградации дентинного матрикса (обзорная статья) / Ю.А. Македонова, А.В. Поройская, Т.К. Чурсина [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 25-28.

37. Москалец О.В. Молекулы клеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 при инфекционной патологии // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 21-25.

38. Николаева В.В. Роль витамина D в развитии стоматологических заболеваний (обзор литературы) / В.В. Николаева, Д.Ф. Терещенко, В.В. Волобуев // Colloquium-journal. – 2019. – Т. 34, № 10. – С. 26-29.

39. Определение некоторых показателей иммунитета и липопероксидации в ротовой жидкости у лиц с низким уровнем витамина D / Т.М. Караваева, Е.В. Фефелова, М.В. Максименя [и др.] – DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-12-753-757 // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 12 – С. 753-757.

40. Оценка распространенности и интенсивности кариеса и некариозных поражений у взрослого населения города Барнаула / С.И. Токмакова, О.В. Бондаренко, А.А. Шевцова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 4. – С. 186-186.

41. Парамонов Ю.О. Оптимизация лечения начального кариеса с применением медицинского озона: специальность 14.01.14 «Стоматология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Парамонов Юрий Олегович. – Москва, 2019. – 24 с.

42. Пигарова Е.А. Влияние витамина D на иммунную систему / Е.А. Пигарова, А.В. Плещеев, Л.К. Дзеранова // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 1. – С. 62-66.

43. Пигарова Е.А. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике, лечению и профилактике дефицита витамина D у взрослых / Е.А. Пигарова, Л.Я. Рожинская, Ж.Е. Белая [и др.]. – DOI 10.14341/probl201662460-84 // Проблемы эндокринологии. – 2016. – Т. 62, № 4. – С. 60-84.
44. Пигарова Е.А. Неклассические эффекты витамина D / Е.А. Пигарова, А.А. Петрушкина // Остеопароз и остеопатии. – 2017. – Т. 20, № 3. – С. 90-101.
45. Проходная В.А. Прогнозирование рецидивного течения кариеса зубов у беременных женщин лабораторным методом оценки активности антимикробного иммунитета ротовой жидкости / В.А. Проходная, Т.В. Гайворонская, А.С. Ломова. – DOI 10.25207/1608-6228-2015-2-131-136 // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – № 2. – С 131-136.
46. Проценко А.С. Факторы, влияющие на распространенность основных стоматологических заболеваний у студенческой молодежи Москвы / А.С. Проценко, И.М. Макеева // Стоматология. – 2010. – № 1. – С. 4-6.
47. Распространенность кариеса у студентов с различным уровнем тревожности / С.Н. Разумова, Н.Б. Карабущенко, О.М.Х. Байт Саид [и др.]. – DOI 10.33667/2078-5631-2019-3-23(398)-55-57 // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 3, № 23 (398). – С. 55–57.
48. Рылова Н.В. Роль витамина D в регуляции иммунной системы / Н.В. Рылова, С.В. Мальцев, А.В. Жолинский // Практическая медицина. – 2017. – № 5. – С.10-14.
49. Снопов С.А. Механизмы действия витамина D на иммунную систему / С.А. Снопов. – DOI 10.15789/1563-0625-2014-6-499-530 // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 6. – С. 499-530.
50. Содержание некоторых противомикробных и регуляторных пептидов в смешанной слюне у лиц с кариесом в зависимости от уровня витамина D / А.С. Путнева, Т.М. Караваева, Е.В. Фефелова [и др.] – DOI: 10.52485/19986173_2021_3_19 // Забайкальский медицинский вестник. – 2021. - № 3. – С. 35-39.

51. Стоматологическая заболеваемость населения России. Результаты эпидемиологического стоматологического обследования населения России / Э.М. Кузьмина [и др.]. - М.: Изд-во МГМСУ.- 2009. - 236 с
52. Топтыгина А.П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (CHECKPOINT) иммунорегуляции. Часть 1. Роль коингибирующих молекул в нормальном иммунном ответе, при аллергии и аутоиммунных заболеваниях // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 20, № 4. – С. 3-14.
53. Топтыгина А.П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (CHECKPOINT) иммунорегуляции. Часть 2. Участие коингибирующих молекул в развитии инфекционной и онкологической патологии. Моноклональные антитела – блокаторы контрольных точек / А.П. Топтыгина. – DOI 10.7868/S102872211801001X // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12, № 1. – С. 3-16.
54. Ходжаева М. Ю. Недостаточность витамина D и состояние тканей полости рта / М.Ю. Ходжаева, Д. Ортикова // World Science. – 2021. – Т. 56, № 4. – С. 37-40.
55. Черкасов С.М. Анализ распространенности заболеваний зубочелюстной системы, формирующих спрос на стоматологические услуги // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 2. – С. 186-189.
56. Щубелко Р.В. Мукозальный иммунитет верхних дыхательных путей / Р.В. Щубелко, И.Н. Зуйкова, А.Е. Шульженко // Иммунология. – 2018. – Т. 39, № 1. – С. 81-88.
57. Экспресс-методы определения показателей метаболизма в ротовой жидкости (обзор литературы) / А.В Колсанов, С.С. Чаплыгин, А.В. Соколов [и др.]. – DOI 10.18821/0869-2084-2018-63-8-489-495 // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, № 8. – С. 489-495.
58. A characteristic signature of insulin-like growth factor (IGF) axis expression during osteogenic differentiation of human dental pulp cells (hDPCs): Potential coordinated regulation of IGF action / H. Al-Khafaji, P.R. Noer, H. Alkharobi [et al.]. –

DOI 10.1016/j.ghir.2018.07.003 // Growth Horm. IGF Res. – 2018. – Vol. 42-43. – P. 14-21.

59. A cross-sectional study on the association between vitamin D levels and caries in the permanent dentition of Korean children / I.J. Kim, H.S. Lee, H.J. Ju [et al.]. – DOI 10.1186/s12903-018-0505-7 // BMC. Oral. Health. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 43.

60. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression / A. Jurczak, D. Kościelniak, M. Papież [et al.]. – DOI 10.1186/s40659-015-0050-7 // Biol Res. – 2015. – Vol. 48. – P. 61.

61. Adhesion molecules: Master controllers of the circulatory system / E.P. Schmidt, W.M. Kuiebler, W.L. Lee, G.P. Downey // Compr. Physiol. – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 945-973.

62. Akbar A.N. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? / A.N. Akbar, S.M. Henson. – DOI 10.1038/nri2959 // Nat. Rev. Immunol. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 289-295.

63. Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries / N.H. Colombo, L.F. Ribas, J.A. Pereira [et al.]. – DOI 10.1016/j.archoralbio.2016.05.009 // Arch. Oral. Biol. – 2016. – Vol. 69. – P. 40-46.

64. Association between salivary s-IgA concentration and dental caries: A systematic review and meta-analysis / Z. Wu, Y. Gong, C. Wang [et al.]. – DOI 10.1042/BSR20203208 // Biosci Rep. – 2020. – Vol. 40 (12). – BSR20203208.

65. Association of cardiometabolic risk factors and dental caries in a population-based sample of youths / R. Kelishadi, S. Mortazavi, T.R. Hossein, P. Poursafa. – DOI 10.1186/1758-5996-2-22 // Diabetology & metabolic syndrome. – 2010. – Vol. 2. – P. 22.

66. Association of vitamin D and dental caries in children: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2006 / K. Herzog, J.M. Scott, P. Hujoel, A.L. Seminario. – DOI 10.1016/j.adaj.2015.12.013 // J. Am. Dent. Assoc. – 2016. – Vol. 47 (6). – P. 413-420.

67. Baker J.L. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*-the more we know, the more we don't / J.L. Baker, R.C. Faustoferri, R.G. Jr Quivey. – doi:10.1111/omi.12162 // *Mol. Oral. Microbiol.* – 2017. – V. 32(2). – P. 107-117.
68. Banas J.A. Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? / J.A. Banas, D.R. Drake. – DOI 10.1186/s12903-018-0595-2 // *BMC. Oral. Health.* – 2018. – Vol. 31, № 18 (1). – P. 129.
69. Bikle D. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications / D. Bikle. – DOI 10.1016/j.chembiol.2013.12.016 // *Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 21, № 3. – P. 319-329.
70. Bikle D.D. Physiologic and pathophysiologic roles of extra renal CYP27b1: Case report and review / D.D. Bikle, S. Patzek, Y. Wang. – DOI 10.1016/j.bonr.2018.02.004 // *Bone Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 255-267.
71. Bivona G. The immunological implication of the new vitamin D metabolism / G. Bivona, L. Agnello, M. Ciaccio. – DOI 10.5114/ceji.2018.80053 // *Cent. Eur. J. Immunol.* – 2018. – Vol. 43, № 3. – P. 331-334.
72. Brodgen K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brodgen. – DOI 10.1038/nrmicro1098 // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 238-250.
73. Castro R.J. Salivary protein characteristics from saliva of carious lesionfree and high caries adults. / R.J Castro., R Herrera, R.A. Giacaman // *Acta Odontol. Latinoam.* – 2016. – V. 29, № 2. – P. 178-185.
74. Characteristics, diagnosis and treatment of the most common bacterial diseases of the oral cavity / M. Karoly, N. Gabor, N. Adam, B. Andrea // *Orvosi Hetilap.* – 2019. – Vol. 60. – P. 739-746.
75. Charoenngam N. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease / N. Charoenngam, M.F. Holick. – DOI 10.3390/nu12072097 // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 2, № 7. – P. 2097.
76. Circulating insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) is not regulated by parathyroid hormone and vitamin D in vivo: evidence from children with

ricketts / A. Bereket, Y. Cesur, B. Özkan [et al.]. – DOI 10.4274/jcrpe.v2i1.17 // J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol. – 2010. – № 2 (1). – P. 17-20.

77. Clemmons D.R. Role of IGF-binding proteins in regulating IGF responses to changes in metabolism / D.R. Clemmons. – DOI 10.1530/JME-18-0016 // J. Mol. Endocrinol. – 2018. – Vol. 61, № 1. – P. 139-169.

78. Combined analysis of the salivary microbiome and host defence peptides predicts dental disease / A. Simon-Soro, A. Sherriff, S. Sadique [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-018-20085-x // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 1484.

79. Combined deficiencies of 25-hydroxyvitamin D and anemia in preschool children with severe early childhood caries: a case-control study / S. Deane, R.J. Schroth, A. Sharma, C. Rodd. – DOI 10.1093/pch/pxx150 // Paediatr. Child. Health. – 2018. – Vol. 23, № 3. – P. 40-45.

80. Common social determinants for overweight and obesity, and dental caries among adolescents in Northern Norway: a cross-sectional study from the Tromsø Study Fit Futures cohort / L. Stangvaltaite-Mouhat, A.S. Furberg, S.N. Drachev, T.A. Trovik. – DOI 10.1186/s12903-021-01406-5 // BMC Oral Health. – 2021. – Vol. 21 (1). – P. 53.

81. Cortes-Vieyra R. Neutrophil functions in periodontal homeostasis / R. Cortes-Vieyra, C. Rosale, E. Uribe-Querol. – DOI 10.1155/2016/1396106 // J. Immunol. Res. – 2016. – Vol. 10. – P. 1396106.

82. Cutting Edge: Active TGF- β 1 Released from GARP/TGF- β 1 Complexes on the Surface of Stimulated Human B Lymphocytes Increases Class-Switch Recombination and Production of IgA / O. Dedobbeleer, J. Stockis, B. van der Woning [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1601882 // J. Immunol. – 2017. – Vol. 99, № 2. – P. 391-396.

83. Deletion of vitamin D receptor leads to premature emphysema/COPD by increased matrix metalloproteinases and lymphoid aggregates formation / I.K. Sundar, J.W. Hwang [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbrc.2011.02.011 // Biochem Biophys Res Commun. – 2011. – Vol. 406 (1). – P. 127-133.

84. Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis / M. Kazeminia, A. Abdi, S. Shohaimi [et

- al.]. – DOI 10.1186/s13005-020-00237-z // *Head Face Med.* – 2020. – Vol. 16 (1). – P. 22.
85. Dental Caries Status and its Related Factors in Iran: A Meta-Analysis / M.R. Soltani, M. Sayadizadeh, S. Raeisi Estabragh [et al.]. – DOI 10.30476/DENTJODS.2020.82596.1024 // *J Dent (Shiraz)*. – 2020. – Vol. 21 (3). – P. 158-176.
86. Dentin caries progression and the role of metalloproteinases: an update / F. Femiano, R. Femiano, L. Femiano [et al.] // *European Journal of Paediatric Dentistry*. – 2016. – Vol. 7, № 3. – P. 243-247.
87. Ding P.H. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: a revisit and its relevance to oral/periodontal health / P.H. Ding, L.J. Jin // *J. Periodontal Res.* – 2014. – Vol. 49, № 1. – P. 1-9.
88. Distribution of vitamin D status in the UK: a cross-sectional analysis of UK Biobank / L.Y. Lin, L. Smeeth, S. Langan, C. Warren-Gash. – DOI 10.1136/bmjopen-2020-038503 // *BMJ Open*. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. e038503.
89. Drachev S.N. Dental caries experience and determinants in young adults of the Northern State Medical University, Arkhangelsk, North-West Russia: a cross-sectional study / S.N. Drachev, T. Brenn, T.A. Trovik. – DOI 10.1186/s12903-017-0426-x // *BMC Oral Health*. – 2017. – Vol. 17. – P. 136.
90. Effects of TGF- β s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro / C.P. Chan, W.H Lan, M.C. Chang [et al.]. – DOI 10.1016/j.archoralbio.2004.10.005 // *Arch. Oral. Biol.* – 2005. – Vol. 50, № 5. – P. 469-479.
91. Effect of Saliva Composition on Experimental Root Caries / A.A. Bardow, E.A. Hofer, B.B. Nyvad [et al.]. – DOI: 10.1159/000081660 // *Caries Res.* – 2005. – V. 39. – P.71–77
92. Evaluating the relationship between dental caries number and salivary level of IgA in adults / H. Haeri-Araghi, M. Zarabadipour, S. Safarzadeh-Khosroshahi [at al.] – DOI:10.4317/jced.54271// *J. Clin. Exp. Dent.* – 2018. – V. 10(1). – P.66-69.

93. Examining the causal association between 25-hydroxyvitamin D and caries in children and adults: a two-sample Mendelian randomization approach / S.A. Dodhia, N.X. West, S.J. Thomas [et al.]. – DOI 10.12688/wellcomeopenres.16369.2 // Wellcome. Open Res. – 2021. – Vol. 5. – P. 281.
94. Extracellular matrix degradation by host matrix metalloproteinases in restorative dentistry and endodontics: An overview / V.P. Anshida, R.A. Kumari, C.S. Murthy, A. Samuel. – DOI 10.4103/jomfp.JOMFP_34_20 // J. Oral Maxillofac. Pathol. – 2020. – Vol. 24, № 2. – P. 352-360.
95. Fischer K.D. Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition / K.D. Fischer, D.K. Agrawal. – DOI 10.1186/s12931-014-0146-6 // Respir. Res. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 146.
96. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D / S.Fukumoto. – DOI 10.1038/bonekey.2013.231 // Bonekey Rep. – 2014. – Vol. 3. – P. 497.
97. Genetic and Early-Life Environmental Influences on Dental Caries Risk: A Twin Study / M.J. Silva, N.M. Kilpatrick, J.M. Craig [et al.]. – DOI 10.1542/peds.2018-3499 // Pediatrics. – 2019. – Vol. 143 (5). – P. e20183499.
98. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 / T. Vos, C. Allen, M. Arora [et al.]. – DOI 10.1016/S0140-6736(16)31678-6 // The Lancet. – 2016. – Vol. 388. – P. 1545-1602.
99. Hajishengallis G. Innate Humoral Defense Factors / G. Hajishengallis, M.W. Russell. – DOI 10.1016/B978-0-12-415847-4.00015-X // Mucosal Immunology. – 2015. – № 3. – P. 251-270.
100. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme / M. Hewison. – DOI 10.1016/j.ecl.2010.02.010 // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. – 2010. – Vol. 39, № 2. – P. 365-379.
101. Hujoel P.P. Nutrition, dental caries and periodontal disease: a narrative review / P.P. Hujoel, P. Lingström. – DOI 10.1111/jcpe.12672 // J. Clin. Periodontol. – 2017. – suppl. 18. – S79-S84.

102. Human neutrophils degrade methacrylate resin composites and tooth dentin / R. Gitalis, L. Zhou, M.Q. Marashdeh [et al.]. – DOI 10.1016/j.actbio.2019.02.033 // *Acta Biomater.* – 2019. – Vol. 88. – P. 325-331.
103. IGF and IGFBP as an index for discrimination between vitamin D supplementation responders and nonresponders in overweight Saudi subjects / N.M. Al-Daghri, S.M. Yakout, K. Wani [et al.]. – DOI 10.1097/MD.0000000000010702 // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – Vol. 97, № 19. – P. e0702.
104. IGFBP-2 and -3 co-ordinately regulate IGF1 induced matrix mineralisation of differentiating human dental pulp cells / H. Alkharobi, A. Alhodhodi, Y. Hawsawi [et al.] // *Stem. Cell Res.* – 2016. – Vol. 7, № 3. – P. 517-522.
105. Immune checkpoint: The novel target for antitumor therapy / X. Jiang, G. Liu, Y. Li, Y. Pan. – DOI 10.1016/j.gendis.2019.12.004 // *Genes Dis.* – 2019. – Vol. 8 (1). – P. 25-37.
106. Inflammatory response mechanisms of the dentine-pulp complex and the periapical tissues / K.M. Galler, M. Weber, Y. Korkmaz [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22031480 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22 (3). – P. 1480.
107. IGFBP-1 and IGFBP-2 are associated with a decreased pulse-wave velocity in young, healthy adults/ P. Pettersson-Pablo, T.K. Nilsson, L.H. Breimer [et al.] // *BMC Cardiovasc Disord.* – 2021. – V. 131 <https://doi.org/10.1186/s12872-021-01914-w>
108. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms / G.T. Huang, D. Kim, J.K. Lee [et al.]. – DOI 10.1128/IAI.69.3.1364-1372.2001 // *Infect Immun.* – 2001. – Vol. 69 (3). – P. 1364-1372.
109. Intracellular adhesion molecule-1 is regulated by *porphyromonas gingivalis* through nucleotide binding oligomerization domain-containing proteins 1 and 2 molecules in periodontal fibroblasts / L. Jianru, D. Jinyu, W. Yixiang, O. Xiangying. – DOI 10.1902/jop.2013.130152 // *J. Periodontol.* – 2014. – Vol. 85 (2). – P. 358-368.

110. iTRAQ-based quantitative analysis of age-specific variations in salivary proteome of caries-susceptible individuals / K. Wang, X. Wang, S. Zheng [et al.]. – DOI 10.1186/s12967-018-1669-2 // *J Transl Med.* – 2018. – Vol. 16 (1). – P. 293.
111. Jain A. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview / A. Jain, R. Bahuguna. – DOI 10.1016/j.jobcr.2015.06.015 // *Journal of oral biology and craniofacial research.* – 2015. – Vol. 5 (3). – P. 212-218.
112. Johansen F.-E. Transcriptional regulation of the mucosal IgA system / F.-E. Johansen, P. Brandtzaeg // *Trends Immunol.* – 2004. – Vol. 25. – P. 150-157.
113. Joller N. Tim-3, Lag-3, and TIGIT / N. Joller, V.K. Kuchroo. – DOI 10.1007/82_2017_62 // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2017. – Vol. 410. – P. 127-156.
114. Kahlenberg J.M. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease / J.M. Kahlenberg, M.J. Kaplan // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 5. – P. 191-201.
115. Kim K. Association between overweight, obesity and incidence of advanced dental caries in South Korean adults: A 10-year nationwide population-based observational study / K. Kim, K. Han, S. Yang. – DOI 10.1371/journal.pone.0229572 // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15 (2). – P. e0229572.
116. Kiyono H. The mucosal immune system: From dentistry to vaccine development / H. Kiyono, T. Azegami T. – DOI: 10.2183/pjab.91.423 // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* – 2015. – Vol. 91(8). – P. 423-439.
117. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8+ T cells / S.M. Henson, O. Franzese, R. Macaulay [et al.]. – DOI 10.1182/blood-2009-01-199588 // *Blood.* – 2009. – Vol. 113 (26). – P. 6619-6628.
118. Larsson S. Neuroprotective effects of vitamin D on high fat diet- and palmitic acid-induced enteric neuronal loss in mice / S. Larsson, U. Voss. – DOI 10.1186/s12876-018-0905-9 // *BMC Gastroenterol.* – 2018. – Vol. 18 (1). – P. 175.
119. Leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction induces a novel genetic signature resulting in T-cells refractory to

transforming growth factor- β signaling / N.K. Verma, E. Dempsey, A. Long. – DOI 10.1074/jbc.M112.376616 // The Journal of biological chemistry. – 2012. – Vol. 287 (32). – P. 27204-27216.

120. Mak A. The impact of vitamin D on the immunopathophysiology, disease activity, and extra-musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus / A. Mak. – DOI 10.3390/ijms19082355 // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19 (8). – P. 2355.

121. Microbial Etiology and Prevention of Dental Caries: Exploiting Natural Products to Inhibit Cariogenic Biofilms / X. Chen, E.B. Daliri, N. Kim [et al.]. – DOI 10.3390/pathogens9070569 // Pathogens. – 2020. – Vol. 4, № 9. – P. 569.

122. Molecular actions of vitamin D in reproductive cell biology / K.N. Keane, V.F. Cruzat, E.K. Calton [et al.]. – DOI 10.1530/REP-16-0386 // Reproduction. – 2017. – Vol. 53, № 1. – P. 29-42.

123. Multicenter study on caries risk assessment in Japanese adult patients / M. Arino, I. Ataru, S. Fujiki [et al.]. – DOI 10.1016/j.jdent.2015.07.010 // J. Dent. – 2015. – Vol. 43, № 10. – P. 1223-1228.

124. Multiple components contribute to ability of saliva to inhibit influenza viruses / M.R. White, E.J. Helmerhorst, A. Ligtenberg [et al.]. – DOI 10.1111/j.1399-302X.2008.00468.x // Oral Microbiol. Immunol. – 2009. – Vol. 24. – P. 18-24.

125. Observational Study Regarding the Relationship between Nutritional Status, Dental Caries, Mutans Streptococci, and Lactobacillus Bacterial Colonies / E.S. Bud, C.I. Bica, O.E. Stoica [et al.]. – DOI 10.3390/ijerph18073551 // Int. J. Environ. Res. Public. Health. – 2021. – Vol. 29, № 18 (7). – P. 3551.

126. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria / J.-C. Farges, B. Alliot-Licht, C. Baudouin [et al.]. – DOI 10.3389/fphys.2013.00326 // Front. Physiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 326.

127. Oh C. Vitamin D maintains E-cadherin intercellular junctions by downregulating MMP-9 production in human gingival keratinocytes treated by TNF- α / C. Oh, H.J. Kim, H.M. Kim. – DOI 10.5051/jpis.2019.49.5.270 // J. Periodontal. Implant. Sci. – 2019. – Vol. 49 (5). – P. 270-286.

128. Oral Lactobacilli and salivary acidic proline-rich proteins (APRP-1/2) in dental caries / A. K. Szkaradkiewicz-Karpinska, A. Zeidler, O. Goslinska-Kuzniarek [et al.] – DOI: 10.26402/jpp.2018.1.15 // *J Physiol Pharmacol.* – 2018. – Vol. 69(1). – P.139-144.
129. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3 / L.E. Jeffery, F. Burke, M. Mura [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 183. – P. 5458-5467.
130. 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection / A. Coussens, P.M. Timms, B.J. Boucher [et al.]. – DOI 10.1111/j.1365-2567.2008.03024.x // *Immunology.* – 2009. – Vol. 27, № 4. – P. 539-548.
131. Oral diseases: A global public health challenge / M.A. Peres, L.M.D. Macpherson, R.J. Weyant [et al.]. – DOI 10.1016/S0140-6736(19)31146-8 // *Lancet.* – 2019. – Vol. 394. – P. 249-260.
132. Oral microbial biofilms: An update / S.A. Mosaddad, E. Tahmasebi, A. Yazdanian [et al.]. – DOI 10.1007/s10096-019-03641-9 // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 38. – P. 2005-2019.
133. Pender N. Detection, assessment, diagnosis and monitoring of caries / N. Pender. – DOI 10.1093/ejo/cjp133 // *The European Journal of Orthodontics.* – 2010. – Vol. 32 (1). – P. 115-116.
134. Prevalence of Dental Caries in the Indian Population: A Systematic Review and Meta-analysis / P. Pandey, T. Nandkeoliar, A.P. Tikku [et al.]. – DOI 10.4103/jispcd.JISPCD_42_21 // *J Int Soc Prev Community Dent.* – 2021. – Vol. 11 (3). – P. 256-265.
135. Pronounced virus-dependent activation drives exhaustion but sustains IFN- γ transcript levels / K.J. Mackerness, M.A. Cox, L.M. Lilly [et al.] // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 185. – P. 3643-3651.
136. Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of caries-free and caries-active children / S. Shifa, M.S. Muthu, D. Amarlal, V. Prabhu Rathna. –

DOI 10.4103/0970-4388.44031 // J. Indian Soc. Pedodont. Prev. Dent. – 2008. – Vol. 26 (4). – P. 158-161.

137. Regulation of enamel and dentin mineralization by vitamin D receptor / X. Zhang, P. Beck, F. Rahemtulla [et al.] // Comparative Dental Morphology. – 2008. – Vol. 13. – P. 102-109.

138. Regulation of vitamin D metabolizing enzymes in murine renal and extrarenal tissues by dietary phosphate, FGF23, and 1,25(OH)2D3 / L. Kägi, C. Bettoni, E.M. Pastor-Arroyo [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0195427 // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 5. – P. e0195427.

139. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability / A. Mazzone, L. Tjäderhane, V. Checchi [et al.]. – DOI 10.1177/0022034514562833 // J. Dent. Res. – 2015. – Vol. 94 (2). – P. 241-251.

140. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment / A.S. Hemadi, R. Huang, Y. Zhou, J. Zou. – DOI 10.1038/ijos.2017.35 // Int J Oral Sci. – 2017. – Vol. 9 (11). – P. e1.

141. Salivary proteins in health and disease / D. Koscielniak, A. Jurczak, A. Zygmunt, W. Krzysciak // Acta Biochim. Pol. – 2012. – Vol. 59 (4). – P. 451-457.

142. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity/ T.K. Fábíán, P. Hermann, A. Beck [et al.] – DOI:10.3390/ijms13044295 // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – V. 13(4). – P. 4295-4320.

143. Serum transforming growth factor-beta levels in patients with vitamin D deficiency / S. Isik, U. Ozuguz, Y.A. Tutuncu [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejim.2011.09.017 // European Journal of Internal Medicine. – 2011. – Vol. 23 (1). – P. 93-97.

144. Severity of dental caries and risk of coronary heart disease in middle-aged men and women: a population-based cohort study of Korean adults, 2002-2013 / K. Kim, S. Choi, J. Chang [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-019-47029-3 // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 10491.

145. Significance and Diagnostic Role of Antimicrobial Cathelicidins (LL-37) Peptides in Oral Health / Z. Khurshid, M. Naseem, I. Yahya [et al.]. – DOI 10.3390/biom7040080 // *Biomolecules*. – 2017. – Vol. 7 (4). – P. 80.
146. Smith T.J. Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? / T.J. Smith. – DOI 10.1124/pr.109.002469 // *Pharmacol Rev.* – 2010. – Vol. 62, № 2. – P. 199-236.
147. Sun J. Vitamin D and mucosal immune function / Sun J. – DOI: 10.1097/MOG.0b013e32833d4b9f // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 26(6). – P. 591-595.
148. Swapna L.A. Vitamin D Deficiency and its Effects on Tooth Structure and pulpal changes / L.A. Swapna, R. Abdulsalam. – DOI 10.3889/oamjms.2021.5651 // *Open Access Maced J Med Sci.* – 2021. – Vol. 9 (F). – P. 81-87.
149. The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis / J. Petersen, E.-M. Glaßl, P. Nasserri [et al.]. – DOI 10.1007/s00784-013-1156-3 // *Clinical oral investigations*. – 2014. – Vol. 18. – P. 1813-1823.
150. The assessment of sIgA, histatin-5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries./ A, Gornowicz, G. Tokajuk, A. Bielawska [et al.] – DOI:10.12659/MSM.890468 // *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. – 2014. – Vol. 20. –P 1095-1100.
151. The dynamics of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin / T. Niwa, Y. Yamakoshi, H. Yamazaki [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-018-22823-7 // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 4450.
152. The effect of vitamin D administration on intracellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 levels in hemodialysis patients: a placebo-controlled, double-blinded clinical trial / A.E. Naeini, F. Moeinzadeh, S. Vahdat [et al.]. – DOI 10.4103/2279-042X.200994 // *J. Res. Pharm. Pract.* – 2017. – Vol. 6 (1). – P. 16-20.
153. The prevalence of dental caries among Egyptian children and adolescences and its association with age, socioeconomic status, dietary habits and other risk factors. A cross-sectional study / M.M.S. Abbass, S.A. Mahmoud, S. El Moshy [et al.]. – DOI 10.12688/f1000research.17047.1 // *F1000Res.* – 2019. – Vol. 8. – P. 8.

154. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children / E. Ranadheer, U.A. Nayak, N.V. Reddy, V.A. Rao. – DOI 10.4103/0970-4388.84681 // *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. – 2011. – Vol. 29. – P. 106-112.
155. The relationship between unspecific s-IgA and dental caries: a systematic review and meta-analysis / T.K. Fidalgo, L.B. Freitas-Fernandes, M. Ammari [et al.]. – DOI 10.1016/j.jdent.2014.07.011 // *J. Dent*. – 2014. – Vol. 42, № 11. – P. 1372-1381.
156. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries / C. Chaussain-Miller, F. Fioretti, M. Goldberg, S.J. Menashi. – DOI 10.1177/154405910608500104 // *Dent. Res*. – 2006. – Vol. 85, № 1. – P. 22-32.
157. The Role of Vitamin D Receptor Polymorphisms on Dental Caries / D. Cogulu, H. Onay, Y. Ozdemir [et al.]. – DOI 10.17796/1053-4628-40.3.211 // *J. Clin. Pediatr. Dent*. – 2016. – Vol. 40, № 3. – P. 211-214.
158. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier / N.M. Moutsopoulos, J.E. Konkel. [et al.] – DOI: 10.1016/j.it.2017.08.005. // *Trends. Immunol*. – 2018. – Vol. 39(4). – P. 276-287.
159. TNF- α augmented Porphyromonas gingivalis invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1 / Y. Kato, M. Hagiwara, Y. Ishihara [et al.]. – DOI 10.1186/s12866-014-0229-z // *BMC microbiology*. – 2014. – Vol. 14. – P. 229.
160. 25-hydroxyvitamin D concentration is inversely associated with serum MMP-9 in a cross-sectional study of African American ESRD patients / H. Wasse, F. Cardarelli, C. De Staercke [et al.]. – DOI 10.1186/1471-2369-12-24 // *BMC Nephrol*. – 2011. – Vol. 12. – P. 24.
161. Umar M. Role of Vitamin D Beyond the Skeletal Function: A Review of the Molecular and Clinical Studies / M. Umar, K.S. Sastry, A.I. Chouchane. – DOI 10.3390/ijms19061618 // *Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol. 19 (6). – P. 1618.
162. Validation and verification of predictive salivary biomarkers for oral health / N. Bostanci, K. Mitsakakis, B. Afacan [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-021-85120-w // *Sci. Rep*. – 2021. – Vol. 11. – P. 6406.
163. Vanherwegen A.S. Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism / A.S. Vanherwegen, C. Gysemans, C. Mathieu. – DOI

10.1016/j.mce.2017.04.018 // Mol. Cell. Endocrinol. – 2017. – Vol. 15, № 453. – P. 52-67.

164. Vitamin D and dental caries in children / R.J. Schroth, R. Rabbani, G. Loewen, M.E. Moffatt. – DOI 10.1177/0022034515616335 // Journal of Dental Research. – 2016. – Vol. 95 (2). – P. 173-179.

165. Vitamin D and Its Potential Interplay With Pain Signaling Pathways / A.M. Habib, K. Nagi, N.B. Thillaiappan [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2020.00820 // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 820.

166. Vitamin D Antagonises the Suppressive Effect of Inflammatory Cytokines on CTLA-4 Expression and Regulatory Function / L.E. Jeffery, O.S. Qureshi, D. Gardner [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0131539 // PloS One. – 2015. – Vol. 10. – P. e0131539.

167. Vitamin D attenuates rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet-activating factor receptor (PAFR) in respiratory epithelial cells / C.L. Greillera, R. Suria, D.A. Jolliffea [et al.]. – DOI 10.1016/j.jsbmb.2018.11.013 // J Steroid Biochem Mol Biol. – 2019. – Vol. 187. – P. 152-159.

168. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity / L. Rolf, A.H. Muris, R. Hupperts, J. Damoiseaux. – DOI 10.1111/nyas.12440 // Ann N Y Acad Sci. – 2014. – Vol. 1317. – P. 84-91.

169. Vitamin D Increases CTLA-4 Gene Expression in Patients with Mild to Moderate Ulcerative Colitis / A. Sharifi, H. Vahedi, M.R. Honarvar [et al.]. – DOI 10.15171/mejdd.2019.149 // Middle East journal of digestive diseases. – 2019. – Vol. 11 (4). – P. 199-204.

170. Vitamin D status and dental caries in healthy / G. Johanna, R. Karin, Ö. Inger [et al.]. – DOI 10.1186/s12937-018-0318-1 // Swedish children Nutr J. – 2018. – Vol. 17. – P. 11.

171. Vitamin D, calcium homeostasis and aging / V. Veldurthy, R. Wei, L. Oz [et al.]. – DOI 10.1038/boneres.2016.41 // Bone Res. – 2016. – Vol. 4. – P. 16041.

172. Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions / A.I. Trochoutsou, V. Kloukina, K. Samitas [et al.]. – DOI 10.2174/1389557515666150519110830 // *Mini. Rev. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 15, № 11. – P. 953-963.
173. Wei R. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D / R. Wei, S. Christakos. – DOI 10.3390/nu7105392 // *Nutrients.* – 2015. – Vol. 7, № 10. – P. 8251-8260.
174. Young D. A., Nový B. B., Zeller G. G. Truelove E.L. and the American Dental Association Council on Scientific Affairs. 2015. The American Dental Association Caries Classification System for clinical practice: A report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. / DOI 10.1016/j.adaj.2014.11.018 // *Journal of the American Dental Association* . 2015. – V. 146(2). P.79–86.