

Влияние иммобилизованной щелочной фосфатазы слюны на процессы реминерализации

М.Ю. ЖИТКОВ

Relationship between immobilized salivary alkaline phosphatase and remineralization processes

M.YU. ZHITKOV

Группа биохимии лаборатории общей патологии Центрального НИИ стоматологии, Москва

Целью исследования было определить, влияет ли щелочная фосфатаза (ЩФ), иммобилизованная на апатите, на процессы реминерализации. Установлено, что фермент заметно увеличивает скорость реминерализации. Имеются различия в зоне ферментативной реминерализации в зависимости от того, является ли источником фосфора неорганический фосфат или бета-глицерофосфат. В присутствии бета-глицерофосфата наблюдается особенно сильное ускорение включения кальция в реминерализуемую поверхность. Причиной этого может являться большее ускорение образования под действием иммобилизованной ЩФ апатита, чем брушита или витлокита.

Relationship between alkaline phosphatase immobilized on apatite and remineralization processes has been studied. The enzyme notably accelerated the remineralization. The course of enzymatic remineralization depended on the source of phosphorus (inorganic phosphorus or beta-glycerophosphate). Calcium incorporation in remineralizing surface was the most rapid in the presence of beta-glycerophosphate. This may be explained by a higher rate of formation of apatite under the effect of immobilized alkaline phosphatase, than of brushite or vitlokitite.

Целенаправленная борьба с кариесом зубов требует отчетливого представления о причинах, вызывающих это заболевание. Устойчивость зубов к кариесу современные авторы ставят в зависимость от состава и свойств эмали зубов, в особенности ее поверхности [6, 7]. Одним из факторов, препятствующих развитию кариеса, является наличие на поверхности эмали зубов тонкого слоя органического материала — пелликулы. Пелликула предохраняет в определенной мере эмаль зубов от неблагоприятного воздействия снижения pH , вызываемого деятельностью оральной микрофлоры, препятствует адгезии к эмали зубов кариесогенных микроорганизмов. Кроме того, в ней обнаружено большое количество ферментов, угнетающих кариесогенную микрофлору [1, 6, 12].

В пелликуле найдена щелочная фосфатаза (ЩФ), играющая важную роль в биоминерализации [4, 11]. Было высказано предположение, что иммобилизованная в пелликуле ЩФ может способствовать реминерализации эмали зубов [4]. В какой-то степени в пользу такой возможности говорит снижение проницаемости эмали зубов под воздействием растворов ЩФ [9] и усиление минерализации эмали зубов после применения зубных паст, содержащих ЩФ или ее субстрат, — бета-глицерофосфат [6, 7].

Исследования, проведенные в лаборатории биохимии ЦНИИС, позволили установить некоторые стороны механизма иммобилизации ЩФ на эмали зубов. ЩФ способна к химической адсорбции на основном компоненте зубов, которым является апатит [2]. Скорость взаимодействия с апатитом для ЩФ на 1 — 2 порядка выше, чем для других исследованных компо-

нентов слюны и сыворотки крови, причем в слюне содержится ЩФ с высоким сродством к апатиту. Адсорбция протекает в 2 стадии, сопровождаясь изменением константы Михаэлиса фермента. Близость значений константы Михаэлиса ЩФ слюны, адсорбированной на апатите, и ЩФ, иммобилизованной на эмали зубов, позволяет предполагать их идентичность. Вероятно, активность ЩФ в пелликуле обусловлена избирательной хемосорбцией фермента слюны на апатите эмали зубов [3]. Наличие механизма, обеспечивающего концентрирование ЩФ на поверхности эмали зубов, указывает на возможную важную физиологическую роль явления иммобилизации на эмали зубов.

Прямых доказательств наличия или отсутствия непосредственного участия иммобилизованной ЩФ или любого другого иммобилизованного фермента в процессах минерализации нет. Разрешение этой проблемы имело бы важное значение для профилактики и лечения кариеса зубов. Если процессы минерализации эмали зубов в заметной степени контролируются иммобилизованной ЩФ (или каким-то другим ферментом), то открывается возможность реализации принципиально нового метода стимуляции и коррекции процессов минерализации путем воздействия на иммобилизованные ферментные системы.

В предлагаемой работе исследованы возможность участия иммобилизованной ЩФ в реминерализации эмали зубов и вероятный механизм этого явления.

Материал и методы

В исследовании использовали блоки спрессованного апатита в виде дисков диаметром 11 мм и толщиной 3 мм, полученные из лаборатории тонкого неорганического син-

теза МХТИ им. Д.И. Менделеева. Каждый диск покрывали дихлорэтановым клеем из набора для получения изделий из пластмассы «Протакрил-М», оставляя окно диаметром 11 мм. Смешанную слюну отбирали у 8 пациентов отделения профилактики ЦНИИС утром натощак. Собранную слюну использовали в течение 0,5 — 1 ч после отбора, сохраняя при комнатной температуре. Реминерализующие растворы готовили на 0,05 М трис-малеатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,001 моль/л сульфата магния. Раствор «Ca» получали добавлением к буферу хлорида кальция до концентрации 0,001 моль/л, раствор «P» — добавлением однозамещенного фосфата калия до концентрации 0,005 моль/л, раствор «Ca+P» — добавлением хлорида кальция до концентрации 0,001 моль/л, однозамещенного фосфата калия до концентрации 0,005 моль/л и 0,5% агарозы А (производство «Fagmascia», Швеция); раствор «Ca+ГФ» — добавлением хлорида кальция до концентрации 0,001 моль/л и бета-глицерофосфата натрия до концентрации 0,005 моль/л. Для исследования протекания реминерализации в условиях ингибирования иммобилизованной ЩФ использовали эти же растворы, добавляя к ним левамизол (производство «Gedeon Richter», Венгрия) до концентрации 0,005 моль/л. Выбор концентрации левамизола, необходимой для ингибирования иммобилизованной ЩФ слюны, провели в предварительном эксперименте на двух пулах слюны. Графической экстраполяцией данных по степени снижения активности фермента в диапазоне концентраций левамизола от 0,0005 до 0,0025 М определили, что в концентрации 0,0035 — 0,004 М активность снижается не менее чем на 90%.

Состав поверхности апатита контролировали модифицированным нами методом кислотной биопсии [8]. На исследуемую поверхность наносили 10 мкл 0,1 М раствора соляной кислоты, загущенной добавлением 5% карбоксиметилцеллюлозы. Точно через 3 мин отбирали 8 мкл биоптата и вносили в 152 мкл деионизированной воды. В полученном растворе определяли фотометрией с использованием наборов реактивов фирмы «ЛАХЕМА» содержание кальция методом с ГБОА и фосфора молибдат-ванадатным методом. По содержанию элементов рассчитывали скорости их выхода в биоптат V_{Ca} и V_P и отношение этих скоростей Ca/P .

Методика эксперимента состояла в следующем. Диск апатита обрабатывали 15 мин при комнатной температуре в 2 мл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,0. После 15 мин промывки в воде его помещали на 90 мин в 1 мл слюны при 37°C для осаждения искусственной пелликулы, содержащей иммобилизованную ЩФ. Одновременно в одном эксперименте использовали 7 дисков. На одном из них определяли активность иммобилизованной ЩФ по разработанной нами методике [2]. Оставшиеся диски ополаскивали водой 2 — 3 мин и инкубировали 19 ч при 37°C каждый в 2 мл реминерализующего раствора. По числу дисков в одном эксперименте испытывали 6 реминерализующих растворов. После реминерализации состав поверхности апатита контролировали кислотной биопсией.

Во всех сериях из 7 дисков, обработанных в одном пуле слюны и соответственно имеющих близкие значения активности иммобилизованной ЩФ, кроме абсолютных значений параметров биоптата (V_{Ca} , V_P , Ca/P), рассчитывали относительные, принимая за 100% значения после воздействия раствора «Ca».

Для абсолютных значений параметров определяли коэффициенты корреляции с активностью иммобилизованной ЩФ, для относительных рассчитывали среднее значение и доверительный интервал по Стьюденту. Оценку достоверности различий проводили по критерию знаков и критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Приведенные в табл. 1 коэффициенты корреляции между активностью иммобилизованной ЩФ и соста-

вом биоптата поверхности апатита после реминерализации указывают на существование между ними ряда зависимостей. Их анализ позволяет судить как о самом факте наличия, так и о механизме влияния иммобилизованной ЩФ на процессы реминерализации.

В последней строке табл. 1 представлены суммарные коэффициенты корреляции по всем реминерализующим растворам. В этом случае наблюдается средней силы корреляция между активностью иммобилизованной ЩФ и скоростью выхода из биоптат кальция — V_{Ca} . На скорость выхода фосфора — V_P — и отношение этих скоростей — Ca/P — фермент влияния не оказывает.

Анализ по отдельным реминерализующим средам позволяет выявить закономерности, ускользающие при обобщенном рассмотрении. Как ни парадоксальным это кажется на первый взгляд, но в растворе «Ca», содержащем только ионы кальция, связи с активностью иммобилизованной ЩФ нет ни для одного из параметров. Сходное явление наблюдается и в растворе «Ca+P», содержащем и кальций, и фосфат. Значительные коэффициенты корреляции для V_{Ca} и V_P наблюдаются в растворах «P» (содержащем только ионы фосфата) и «Ca+ГФ» (содержащем кальций и бета-глицерофосфат). Близкие значения коэффициентов корреляции для V_{Ca} и V_P в растворе «P» указывают, что в этом случае иммобилизованная ЩФ примерно одинаково ускоряет включение в апатит как кальция, так и фосфора. Поэтому отношение Ca/P под действием фермента меняется незначительно, что отражается в низком коэффициенте корреляции для этого параметра. В растворе «Ca+ГФ» наивысшее из всех значение коэффициента корреляции для V_{Ca} и единственный положительный коэффициент корреляции для Ca/P показывают, что иммобилизованная ЩФ ускоряет включение не только фосфора, но и в еще большей степени — кальция.

Приведенные в табл. 2 результаты изучения влияния на скорость реминерализации специфического ингибитора ЩФ — левамизола — позволяют уточнить механизм участия фермента в этом процессе. Без левамизола при наличии активности иммобилизованной ЩФ наблюдается легко объяснимая закономер-

Таблица 1. Коэффициенты корреляции абсолютных значений параметров биоптата с активностью иммобилизованной ЩФ

Реминерализующий раствор	Скорость выхода кальция, V_{Ca} , нмоль/с	Скорость выхода фосфора, V_P , нмоль	Отношение скоростей Ca/P
Раствор «Ca» (19 измерений)	0,057	0,115	-0,173
Раствор «P» (14 измерений)	0,519	0,562	-0,079
Раствор «Ca+P» (13 измерений)	0,053	0,143	-0,237
Раствор «Ca+ГФ» (16 измерений)	0,766	0,445	0,373
По всем растворам — 62 измерения	0,384	0,229	0,010

Таблица 2. Относительные значения параметров биоптата после реминерализации (уровень значимости $p=0,05$; $M \pm m$)

Реминерализующий раствор	Число измерений	Скорость выхода кальция, V_{Ca} , %	Скорость выхода фосфора, V_P , %	Отношение Ca/P , %
Без левамизола:				
раствор «Ca»	14	100	100	100
раствор «P»	10	137±37	123±22	108±12
раствор «Ca+P»	10	117±7	107±18	117±23
раствор «Ca+ГФ»	11	152±24	118±24	137±32
С левамизолом:				
раствор «Ca»	7	106±18	99±29	108±27
раствор «P»	6	99±62	64±17	153±71
раствор «Ca+P»	5	143±74	73±22	185±66
раствор «Ca+ГФ»	4	100±11	98±8	96±17

ность: чем больше коэффициент корреляции с активностью иммобилизованной ЩФ для абсолютного значения данного параметра, тем больше его относительное значение в соответствующей графе табл. 2.

В растворе «Ca» левамизол совершенно не изменяет характер реминерализации. Учитывая отсутствие корреляций между составом биоптата и активностью ЩФ в этом растворе, можно заключить, что реминерализация апатита под действием только ионов кальция протекает совершенно независимо от наличия или отсутствия иммобилизованной ЩФ.

Среды, содержащие ионы фосфата (растворы «P» и «Ca+P»), оказывают более сильное реминерализующее действие, чем раствор «Ca», что выражается в больших значениях V_{Ca} и V_P и Ca/P . Устранение влияния иммобилизованной ЩФ ингибитором позволяет убедиться в том, что этот эффект во многом опосредован ферментом. В обеих средах происходит резкое снижение включения фосфора. Скорость включения кальция в растворе «P» несколько снижается, а в растворе «Ca+P» повышается. В результате отношение Ca/P в обоих случаях повышается примерно в полтора раза. Очевидно, иммобилизованная ЩФ в сильной степени ускоряет поступление в минеральную фазу неорганического фосфата, а на включение кальция ее влияние намного слабее.

Сочетание ионов кальция с бета-глицерофосфатом в растворе «Ca+ГФ» характеризуется самыми высокими V_{Ca} и Ca/P , отличающимися его от всех других сред; добавление левамизола приводит к тому, что реминерализация начинает протекать совершенно так же, как и в содержащем только ионы кальция растворе «Ca». Несомненно, влияние бета-глицерофосфата на реминерализацию полностью определяется иммобилизованной ЩФ.

Можно заключить, что ферментативная реминерализация приводит к образованию различных по составу продуктов в зависимости от источника фосфора. Для иона фосфата наиболее вероятным пред-

ставляется простое увеличение скорости его включения в кристаллическую решетку фосфатов кальция, сопровождающееся образованием каких-то бедных кальцием соединений, например гидрофосфата кальция. Обогащение поверхности апатита кальцием под действием бета-глицерофосфата говорит об образовании богатых кальцием фаз, одной из которых может быть апатит. Одной из причин этого может быть медленное образование в приповерхностных слоях иона фосфата из бета-глицерофосфата под действием иммобилизованной ЩФ. Существуют указания на то, что снижение скорости осаждения в некоторых случаях увеличивает выход апатита [10]. Другой возможной причиной может быть наличие некоторой дополнительной свободной энергии у иона фосфата сразу после отщепления от активного центра фермента. Благодаря этому его реакционная способность отличается от таковой у иона в обычном состоянии. Дальнейшие исследования должны пролить свет на эту проблему.

Для профилактики и лечения кариеса зубов явление ферментативной минерализации может иметь большое значение. Лечебное действие кальций-фосфатных реминерализующих композиций ограничивается невозможностью одновременного достижения высоких концентраций кальция и фосфата [1, 5, 7]. Замена неорганического фосфата подходящим субстратом ЩФ позволяет обойти это ограничение. Кроме подбора наилучших субстратов, еще одним направлением исследований должно явиться определение условий для оптимального проявления минерализующего эффекта иммобилизованной ЩФ: природы и концентрации активаторов, буферных веществ и т. д.

Таким образом, можно констатировать обнаружение неизвестного ранее механизма ферментативной реминерализации под действием иммобилизованной ЩФ. Дальнейшее его изучение не только позволит яснее понимать сущность процессов минерализации, но и существенно продвинуться в деле профилактики и лечения кариеса зубов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабаш Р.Д., Левецкий А.П. Ферментативные механизмы анти-микробной защиты ротовой полости. *Вопр мед химии* 1978; 24: 3: 291 — 310.
2. Житков М.Ю. Метод выявления ферментов слюны, иммобилизованных на поверхности эмали. 2-й симпозиум «Неинвазивные методы диагностики»: Тезисы докладов и стендовых сообщений. М 1995; 50 — 51.

3. Житков М.Ю., Леонтьев В.К. Возможные механизмы иммобилизации щелочной фосфатазы и альфа-амилазы на эмали зубов. *Стоматология* 1997; 76: 6: 9 — 12.
4. Леонтьев В.К., Алексина О.А., Веселова М.Н., Полторак О.М., Чухрай Е.С. Иммобилизация ферментов на эмали зубов и их вероятная роль в физиологии и патологии полости рта. *Стоматология* 1992; 71: 2: 6 — 7.
5. Леонтьев В.К., Павлова Г.А. Реминерализующий гель при лечении глубокого кариеса. Профилактика, лечение, исходы и осложнения кариеса зубов. Пермь: ПГМА 1987; 60 — 63.
6. Лукиных Л.М. Лечение и профилактика кариеса зубов. Нижний Новгород: ПГМА 1998; 168.
7. Овруцкий Г.Д., Леонтьев В.К. Кариес зубов. М: Медицина 1986.
8. Справочник по стоматологии. Под ред. А.И. Рыбакова, Г.М. Ивашенко. Изд. 2-е, перераб и доп. М: Медицина 1977; 582.
9. Чиликин В.Н. Экспериментальное исследование влияния щелочной фосфатазы на проницаемость твердых тканей зубов. Актуальные вопросы стоматологии: Материалы 9-й Республиканской конференции стоматологов Эстонской ССР. Таллин: Валгус 1979; 78 — 83.
10. Amjad Z., Nancollas G.H. A kinetic and morphological study of mineralisation of bovine tooth enamel surfaces. *Arch oral biol* 1980; 25: 2: 95 — 101.
11. McComb R.B., Bowers G.N., Posen S. Alkaline phosphatase. New York: Plenum Press 1979; 986.
12. Menaker L. The biological basis of dental caries. An oral biology textbook. New York: Hurper&Row, Publishers, Inc 1980; 532.

Поступила 27.05.98

* * *

РЕЦЕНЗИЯ

В.В. Кравченко, П.Ю. Столяренко. Обезболивание в стоматологии у лиц пожилого возраста: Методическое пособие. М 1999.

Review of methodological aid by V. V. Kravchenko and P. Yu. Stolyarenko «Analgesia for Elderly Patients in Dentistry». Moscow 1999.

Обезболивание в стоматологии всегда будет являться одним из основных вопросов, который необходимо решить стоматологу при оказании хирургической или терапевтической стоматологической помощи. Особенно большие проблемы возникают при оказании помощи на амбулаторном приеме лицам пожилого возраста, у которых, как правило, в анамнезе имеется не одно соматическое заболевание. Порой риск от проведения анестезии пожилым людям может превысить риск от стоматологических вмешательств, что в общей хирургической практике допустимо только при операциях по жизненным показаниям.

Посвятив свое исследование этим вопросам, авторы во введении отмечают, что, к сожалению, у лиц пожилого возраста болезненные стоматологические вмешательства нередко проводятся вообще без обезболивания, и этой важной проблеме в современной стоматологии не уделяется должного внимания. Подчеркивается, что при выборе вида обезболивания необходимо учитывать сопутствующие заболевания у этой категории больных.

К факторам риска у лиц пожилого возраста авторы относят гипертоническую болезнь, сердечную недостаточность, ишемическую болезнь сердца (стенокардию, инфаркт миокарда), сердечные аритмии и блокады, нарушение мозгового кровообращения (инсульт), сахарный диабет и глаукому.

Приводятся клинические симптомы каждого из перечисленных факторов риска, описана профилактика осложнений. Однако, на наш взгляд, факторы риска здесь целесообразно переименовать в осложнения, так как фактором риска является само заболевание, на фоне которого могут развиваться осложнения.

Ознакомившись с пособием, хотелось бы сделать некоторые замечания.

В подразделе 2.1. «Гипертоническая болезнь» из раздела «Профилактика» (с.10) желательнее было бы указать, при каких цифрах артериального давления противопоказано проведение стоматологического лечения. Без этого не совсем понятно, когда проводить медикаментозную подготовку и применять весь предложенный набор препаратов.

На с. 11 в подразделе 2.2. «Сердечная недостаточность» целесообразно придерживаться общепринятой классификации и трактовать сердечную недостаточность как состояние, характеризующееся нарушением сократительной способности миокарда и проявляющееся недостаточностью кровообращения.

В медикаментозном лечении людей пожилого и старческого возраста вообще и в лечении недостаточности кровообращения, в частности, следует придерживаться главного правила гериатрической фармакотерапии — более осторожного применения лекарственных средств.

Подраздел 2.4. «Сердечные аритмии и блокады» лучше было бы назвать, согласно существующей классификации, «Расстройства сердечного ритма и проводимости».

На с. 17 в разделе «Профилактика» авторы рекомендуют «для профилактики желудочковых нарушений ритма назначать лидокаин внутримышечно по 300 — 600 мг». Подобные рекомендации требуют очень серьезной проверки и, на наш взгляд, необоснованы. Лидокаин применяется для лечения желудочковой тахикардии, но вводится внутривенно струйно в дозе 1 мг на 1 кг массы тела больного в течение нескольких минут (Н.А. Мазур. «Руководство по кардиологии»).

В подразделе 2.5. «Нарушение мозгового кровообращения» инсульт трактуется авторами как кровотечение в мозг, однако геморрагический инсульт развивается в результате кровоизлияния в головной мозг.

У больных сахарным диабетом забывчивость в приеме пищи может привести не к гипопроteinемии, а к гипогликемии, которая, в свою очередь, приводит к развитию гипогликемической комы.

В последующих разделах авторы приводят общие рекомендации по профилактике развития осложнений при анестезии и оказании стоматологической помощи пациентам пожилого и старческого возраста, принципы мониторинга и рекомендации по проведению общей и местной анестезии, куда входят предоперационное обследование и премедикация, наркоз и особенности анестезиологического обеспечения, особенности местной проводниковой анестезии, послеоперационное обезболивание, применение вазоконстрикторов и ультракаина у лиц пожилого возраста, а также анестезиологическое обеспечение при дентальной имплантации у этих пациентов.

В целом работа актуальна, заслуживает безусловного внимания не только студентов, но и врачей, и может способствовать повышению эффективности и снижения риска анестезиологического пособия при стоматологической помощи пожилым людям.

Доктор мед. наук Л.А. Григорьянц