

MIROŚŁAWA KASIAK¹, MARCIN KASIAK², MACIEJ TRZEŚNIEWSKI², AGATA GRYGORCEWICZ²

Wpływ aktywności cystatyn w ślinie mieszanej na wzrost kryształów hydroksyapatytów szkliwa – badania *in vitro*

Influence of Cystatins Activity in Whole Saliva on Enamel Apatites Crystals Grow – *in vitro* Study

¹ Zakład Propedeutyki Stomatologicznej Katedry Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej AM we Wrocławiu

² Studenckie Koło przy Zakładzie Propedeutyki Stomatologicznej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Badania wstępne wykazały, że zwiększeniu aktywności antypapainowej cystatyn towarzyszy wzrost aktywności próchnicy.

Cel pracy. Sprawdzenie w badaniach *in vitro*, czy aktywność cystatyn ma wpływ na wzrost kryształów hydroksyapatytów szkliwa.

Materiał i metody. Materiał badawczy stanowił zdrowy, bez próchnicy, ząb trzonowy 27, który został usunięty wskutek choroby przyzębia u 48-letniej pacjentki. Ząb pocięto piłą tarczową na 4 części. Fragmenty zęba umieszczono w trzech próbkach, w których znajdowała się: I – ślina mieszana o dużej aktywności antypapainowej cystatyn (85 mg/ml), II – ślina mieszana o małej aktywności antypapainowej cystatyn (20,5 mg/ml), III – ślina syntetyczna (bez aktywności antypapainowej cystatyn). Po upływie 24 godzin badane fragmenty zostały umieszczone na 4 godziny w nasyconym roztworze fosforanu wapnia o pH = 7, a następnie wysuszone. Tak przygotowane preparaty napyłono węglem i poddano obserwacji w mikroskopie elektronowym Jeol JSM-5800 LV.

Wyniki. W mikroskopie elektronowym obserwowano szkliwo z powierzchni policzkowej i językowej badanego zęba. Wszystkie badane fragmenty zostały powiększone 1000×. Uzyskane wyniki potwierdzają, że duża aktywność tego enzymu hamuje krystalizację hydroksyapatytów szkliwa. Na powierzchni szkliwa fragmentu zęba, na które oddziaływał enzym o dużej aktywności (próbówka I) w obrazie SEM prawie nie obserwowano miejsc krystalizacji hydroksyapatytu. Obraz szkliwa w SEM z II i III próbki był podobny i były widoczne miejsca o bardzo intensywnej krystalizacji.

Wnioski. Wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów, którzy uważają, że obecność jonów Ca i P jest konieczna do procesu remineralizacji. Przeprowadzone badania wydają się wskazywać jednak, że duża aktywność antypapainowa cystatyn w ślinie może w znacznym stopniu ograniczyć ten proces (**Dent. Med. Probl. 2005, 42, 1, 45–48**).

Słowa kluczowe: próchnica, hydroksyapatyty szkliwa, cystatyny.

Abstract

Background. The initial study has shown that the increase in cystatins antipapaine activity is followed by caries activity level grow.

Objectives. The goal of the study was to determine if cystatins activity has an influence on enamel hydroxyapatite crystals grow.

Material and Methods. The study material was a healthy tooth without caries, molar 27. which was removed due to periodontal disease from 48-year-old female patient. The tooth was sliced into four parts. The fragments were inserted into three probes containing: probe I – whole saliva with high cystatins antipapaine activity level (85 mg/ml), probe II – whole saliva with low cystatins antipapaine activity level (20.5 mg/ml), probe III – synthetic saliva. After 24 hours the fragments were inserted in saturated solution of calcium phosphate with pH = 7 for 4 hours, and after that – dried. The tooth fragments prepared in this way were covered with carbon and observed in EM Jeol JSM-5800 LV.

Results. The enamel from side surfaces of studied tooth was observed with electron microscope. All fragments were enlarged ×1000. The results confirm that high cystatin activity level inhibit hydroxyapatite crystallization in enamel.

On the enamel surface treated with enzyme with high activity level (probe I) in (SEM) picture almost no crystallization spots were found. SEM pictures of enamel from II and III probe were similar and many spots of very intensive crystallization were found.

Conclusions. The results confirm observations of other authors, which hold the view that presence of calcium and phosphate ions is essential for restorative processes. Presented study seem to point out that cystatins high activity level in saliva can strongly inhibit this process (*Dent. Med. Probl.* 2005, 42, 1, 45–48).

Key words: caries, enamel hydroxyapatite, cystatins.

Próchnica jest procesem patologicznym, wywołanym głównie przez czynniki zewnątrzustrojowe. Powstaje wskutek działania drobnoustrojów patogennych oraz niektórych czynników ekologicznych. Wśród tych ostatnich najczęściej wymienia się składniki węglowodanowe pożywienia oraz różnorodne czynniki gospodarza, takie jak: skład i zdolność buforową śliny, histologiczną, chemiczną i anatomiczną budowę zębów. Na próchnicę mają również wpływ zewnętrzne czynniki środowiskowe.

Próchnica nadal jest głównym problemem współczesnej stomatologii. Wiele badań zostało poświęconych składowi śliny. Wiadomo, że u różnych ludzi jest inna ilościowo.

Wśród czynników, mających wpływ na rozwój próchnicy, często wymienia się enzymy. Ich udział w procesie kariogenezy został udowodniony przez wielu badaczy.

Przedmiotem zainteresowania autorów były inhibitory proteaz lizosomalnych – cystatyny, które zostały odkryte przez Isemurę w 1984 r. [1–4]. Według klasyfikacji MEROPS należą do rodziny enzymów I 25 klanu IH. W ślinie ludzkiej stwierdzono obecność cystatyn C, D, S, SA i SN [3, 5, 6], które należą do typu 2 cystatyn wydzielanych zewnątrzkomórkowo i do podrodziny B [7]. We wstępnych badaniach własnych przeprowadzonych na 46 osobach wykazano, że zwiększeniu aktywności antypapainowej cystatyn towarzyszył wzrost aktywności próchnicy [8].

Celem pracy była ocena w mikroskopie elektronowym wpływu tych enzymów na powierzchnię szkliwa.

Material i metody

Materiał badawczy stanowił zdrowy, bez próchnicy, ząb trzonowy 27, który został usunięty wskutek choroby przyzębia u 48-letniej pacjentki. Ząb pocięto na 4 części za pomocą piły tarczowej.

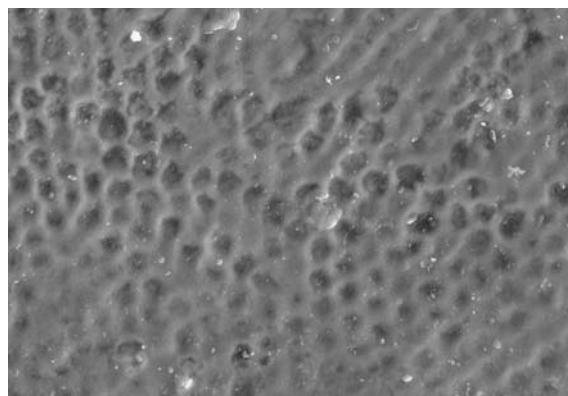
W doświadczeniu wykorzystano również ślinę mieszaną pobraną od dwóch pacjentów. U pierwszego z nich stwierdzono dużą, a u drugiego – małą aktywność antypapainową cystatyn. Oznaczenia zostały przeprowadzone metodą Baretta [9] w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej AM we Wrocławiu.

Do badania przygotowano trzy próbówki, które napełniono śliną mieszaną: I – o dużej aktywności antypapainowej cystatyn (85 mg/ml), II – o małej aktywności antypapainowej cystatyn (20,5 mg/ml), III – śliną syntetyczną bez aktywności antypapainowej cystatyn, która stanowiła badanie kontrolne. Pocięte fragmenty zęba zostały umieszczone w kolejnych próbówkach i pozostawiały tam przez 24 godz. w temperaturze 37°C. Następnie umieszczono je w nasyconym roztworze fosforanu wapnia o pH = 7 sporządzonym w laboratorium biochemicznym Katedry Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej AM we Wrocławiu. Po upływie 4 godzin zęby zostały najpierw wypłukane, a potem wysuszone. Tak przygotowane preparaty napyłono węglem i poddano obserwacji w mikroskopie elektronowym Jeol JSM-5800 LV.

W mikroskopie elektronowym obserwowano szkliwo z powierzchni bocznych badanego zęba. Wszystkie badane fragmenty zostały pierwotnie powiększone 1000×. Potem wybrane miejsca powiększono 2500×.

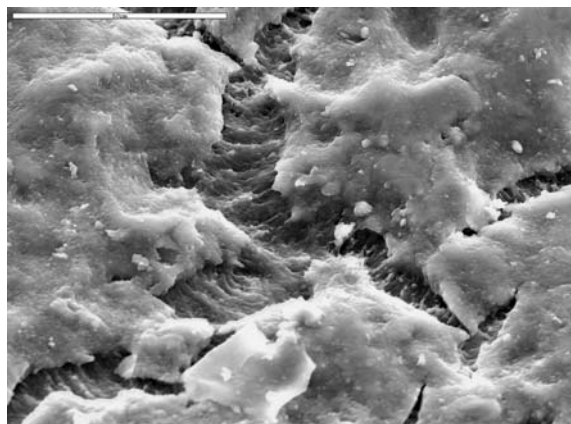
Wyniki

Na rycinie 1. przedstawiono preparat z I próbówki, gdzie szkliwo zostało poddane działaniu enzymu o dużej aktywności antypapainowej. Widać



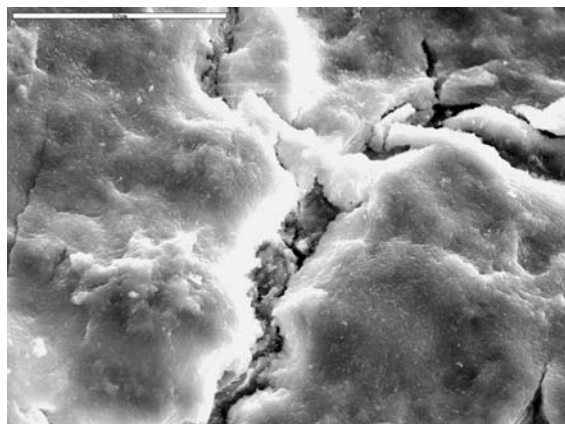
Ryc. 1. Obraz SEM szkliwa z próbówki I ze śliną o dużej aktywności antypapainowej cystatyn. Nieliczne pola krystalizacji. Powiększenie 1000×

Fig. 1. SEM picture of enamel from probe no. I, containing saliva with high antipapain activity of cystatins. There are not many crystallization fields. Magnification ×1000



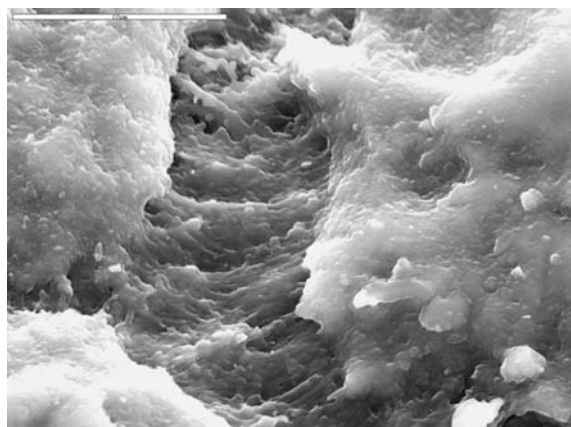
Ryc. 2a. Obraz SEM szkliwa z próbki II ze śliną o małej aktywności antypapainowej cystatyn. Liczne pola krystalizacji. Powiększenie 1000×

Fig. 2a. SEM picture of enamel from probe no. II, containing saliva with low antipapain activity of cystatins. There are many crystallization fields. Magnification $\times 1000$



Ryc. 3. Obraz szkliwa z próbki III – ślina syntetyczna, próba kontrolna, bez aktywności antypapainowej cystatyn. Liczne pola krystalizacji. Powiększenie 1000×

Fig. 3. SEM picture of enamel from probe no. III – artificial saliva, control test, no antipapain activity of cystatins. Numerous crystallization fields. Magnification $\times 1000$



Ryc. 2b. Obraz SEM szkliwa z próbki II o małej aktywności antypapainowej cystatyn. Zbliżenie pola krystalizacji. Powiększenie 2500×

Fig. 2b. SEM picture of enamel from probe no. II, containing saliva with low antipapain activity of cystatins. Enlargement of the crystallization field. Magnification $\times 2500$

wyraźnie strukturę hydroksyapatytów i nieliczne miejsca krystalizacji. Preparat z II próbki, w której na ząb oddziaływał enzym o małej aktywności antypapainowej przedstawiono na rycinie 2a. Obraz z SEM wykazuje liczne pola krystalizacji. Rycina 2b przedstawia fragment tego samego pola krystalizacji z obserwowanej wcześniej powierzchni, powiększony 2500 \times . Obraz szkliwa z próbki, w której znajdowała się ślina syntetyczna, nie było więc w niej żadnego oddziaływania cystatyn, uwidacznia rycina 3. Obraz z SEM jest zbliżony do próbki II, w której w naturalnej ślinie aktywność antypapainowa cystatyn była niewielka. Tu również są widoczne rozległe pola krystalizacji.

Omówienie

Wykonane badania wskazują, że na rozwój próchnicy mają wpływ osobnicze właściwości śliny. Wiadomo, że ślina jest płynem biologicznym, przesyconym związkami wapnia i fosforu, które biorą udział w dojrzewaniu szkliwa [1, 10–13]. Badania Kochańskiej i Borowskiej-Afeltowicz [10] wykazały, że wraz ze wzrostem podatności na próchnicę obniża się istotnie stężenie fosforanów nieorganicznych w spoczynkowej ślinie mieszanej oraz istotnie obniża się poziom pH. Podobnie wapń bierze udział w tworzeniu równowagi między zmineralizowanymi tkankami zęba a śliną w jamie ustnej. W badaniach przeprowadzonych u ludzi dorosłych nie stwierdzono korelacji między stężeniem wapnia w ślinie a próchnicą zębów [13], ale badania Radlińskiej [11] wykazały taką zależność u 12-letnich dzieci, u których próchnica występowała z dużą intensywnością. Badania własne wydają się wskazywać, że nawet gdy nasycenie wapniem i fosforanami jest optymalne, mogą zaistnieć takie okoliczności, że krystalizacja jest zahamowana. Jednym z czynników, które mogą hamować ten proces jest duża aktywność antypapainowa cystatyn. Te obserwacje potwierdzają badania Johnssona et al. [14], którzy badali oddziaływanie stateryn i cystatyn na powierzchnię syntetycznych kryształów hydroksyapatytów. Mimo niższego powinowactwa tych drugich do powierzchni szkliwa, miały one większy wpływ na kinetykę wzrostu hydroksyapatytu. Przy jednakowym stężeniu tych enzymów cystatyny hamowały krystalizację o 80–95%, podczas gdy stateryny o 40%. Autorzy ci tłumaczą to faktem, że cząsteczka cystatyn jest większa od stateryn i dla-

tęgo skuteczniej blokuje wzrost kryształów hydroksyapatytów. Wykonane przez autorów niniejszej pracy badania w mikroskopie SEM wydają się potwierdzać uzyskane wcześniej wyniki obserwacji przeprowadzonych na pacjentach [8], że duża aktywność cystatyn w ślinie może sprzyjać rozwojowi próchnicy.

Jednocześnie cystatyny są uważane za białka, które oprócz stateryn, białek bogatych w proliny i histatyn, silnie hamują precypitację z przesyconych roztworów Ca i P [15]. Biorą udział w mechanizmach zapobiegających spontanicznej precypita-

cji tych soli w przewodach ślinowych i jamie ustnej. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że duże stężenia badanych przez autorów enzymów będą sprzyjały rozwojowi próchnicy oraz opóźniały odkładanie się kamienia nazębnego. Wnioski te wydają się potwierdzać wyniki badań Kielan [16], która u osób ze zdrowym przyzęciem obserwowała w ślinie mieszanej duże stężenie cystatyn. Podobne wyniki uzyskali Baron et al. [17]. Być może w przyszłości można będzie rozważyć zastosowanie cystatyn w profilaktyce próchnicy i chorób przyzębia.

Piśmiennictwo

- [1] EXTERKATE R. A. M., DAMEN J. J. M., TEN CATE J. M.: A single-section model for enamel de- and remineralization studies. 1. The effects of different Ca/P ratios in remineralization solutions. *J. Dent. Res.* 1972, 51, 1599–1603.
- [2] ISEMURA S., SAIOH E., SANADA K.: Characterization and amino acid sequence of a new acidic cysteine proteinase inhibitor (cystatin SA) structurally closely related to cystatin S, from whole saliva. *J. Biochem.* 1987, 102, 693–704.
- [3] ISEMURA S., SAIOH E.: Cystatin – S-cysteine proteinases inhibitor from human saliva. *J. Biochem.* 1984, 96, 1311–1314.
- [4] ISEMURA S., SAIOH E.: Inhibitory activities of partially degraded salivary cystatins. *Int. J. Biochem.* 1994, 26, 825–831.
- [5] BOBEK L., AQUIRRE A., LEVINE M. J.: Human salivary cystatin S. *J. Biochem.* 1991, 15, 278, 627–635.
- [6] LIE M. A., LOOS B. G., HENSSENS Y. M., TIMMERMAN M. F., VEERMAN E. C., VELDEN U. V., WEIJDEN G. A.: Salivary cystatin C in natural and experimental gingivitis in smokers and non-smokers. *J. Clin. Periodontol.* 2001, 28, 979–984.
- [7] ABRAHAMSON M., ALVAREZ-FERNANDEZ M., NATHANSON C. M.: Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* 2003, 70, 179–199.
- [8] KASIAK M., WARWAS M.: Aktywność cystatyn w ślinie mieszanej u osób odpornych i podatnych na próchnicę zębów. *Czas. Stomat.* 2003, 56, 410–414.
- [9] BARRET A. J.: A new assay cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Analyt. Biochem.* 1972, 47, 280–293.
- [10] KOCHAŃSKA B., BOROWSKA-AFELTOWICZ E.: Stężenie fosforanów nieorganicznych w ślinie spoczynkowej mieszanej a podatność na próchnicę zębów. *Czas. Stomat.* 1996, 49, 665–671.
- [11] RADLIŃSKA J.: Zależność intensywności próchnicy od wybranych biochemicznych składników śliny u 12-letnich dzieci. *Czas. Stomat.* 1996, 49, 321–325.
- [12] SURDACKA A., MATTHEWS-BRZOZOWSKA T., STOPA J.: Wpływ żelu z dodatkiem syntetycznego hydroksyapatytu na remineralizację sztucznych uszkodzeń szkliwa w warunkach *in situ*. *Czas. Stomat.* 2003, 56, 373–378.
- [13] SURDACKA A.: Udział śliny w zapobieganiu próchnicy zębów – przegląd piśmiennictwa. *Czas. Stomat.* 2003, 56, 585–590.
- [14] JOHNSON M., RICHARDSON C. F., BERGEY E. J., LEVINE M. J., NANCOLLAS G. H.: The effects of human salivary cystatins and statherin on hydroxyapatite crystallization. *Arch. Oral. Biol.* 1991, 36, 631–636.
- [15] VERDIER J. M., DUSSOL B., BERLAND Y., DAGORN J. C.: Protein inhibitors of calcium salt crystal growth in saliva, bile and pancreatic juice. *Scanning Microsc.* 1993, 7, 1017–1030.
- [16] KIELAN E.: Aktywność inhibitorów proteinaz tiolowych w ślinie a choroby przyzębia. Rozprawa doktorska, AM Wrocław 1993.
- [17] BARON A. C., GANSKY S. A., RYDER M. I., FEATHERSTONE J. D.: Cysteine protease inhibitory activity and levels of salivary cystatins in whole saliva of periodontally diseased patients. *J. Periodontal Res.* 1999, 34, 473–444.

Adres do korespondencji:

Mirosława Kasiak
Zakład Propedeutyki Stomatologicznej
Katedry Stomatologii Dziecięcej Zachowawczej i Dziecięcej AM
ul. Kuźnicza 43/45
50-138 Wrocław
tel./fax: + 48 71 791 91 91
e-mail: mirosława.kasiak@poczta.fm

Praca wpłynęła do Redakcji: 21.06.2004 r.
Po recenzji: 21.07.2004 r.
Zaakceptowano do druku: 21.07.2004 r.

Received: 21.06.2004
Revised: 21.07.2004
Accepted: 21.07.2004