

577
В-12

БАВИЛОВА Т. П.

БИОХИМИЯ ПОЛОСТИ РТА

ЭФФЕКТИВНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ГЕПАТИТА С



Hepcinat-LP
новейший комбинированный препарат с индифферентной мазью

- Абсолютно безопасен
- Не вызывает привыкания
- Не имеет побочных эффектов
- Не вызывает головных болей
- Не вызывает тошноты

More Healthy

577
B-12

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

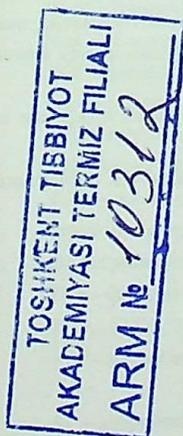
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Вавилова Т.П

БИОХИМИЯ ПОЛОСТИ РТА

Учебное пособие

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинско-
му и фармацевтическому образованию вузов России в качестве
учебного пособия для студентов, обучающихся
по специальности 060105 -Стоматология



Волгоград 2012

УДК 577.1.616.31-08(075.8)

ББК 28.072я7+56.6

УМО – 17-28/486-д

12.08.08

Рецензенты:

зав. кафедрой биохимии Саратовского государственного медицинского университета, д.м.н., профессор *В.Б.Бородулин*;

зав. кафедрой биохимии Кубанской медицинской академии, д.м.н., профессор *И.М.Быков*

В учебно-методическом пособии изложен теоретический материал по биохимии соединительной ткани, костной ткани, тканях зуба и ротовой жидкости, описаны биохимические изменения в полости рта при некоторых патологических состояниях, описаны лабораторные работы по определению низкомолекулярных компонентов в ротовой жидкости, выполняемые студентами на занятиях.

Структура и форма изложения материала соответствует учебной программе по биологической химии.

Учебное пособие предназначено для студентов медицинских вузов, обучающихся по специальности «Стоматология».

Список сокращений:

- α_1 -ПИ - α_1 -ингибитор протеиназ
 α_2 -М - α_2 -макроглобулина
 α_1 -АТ - α_1 -антитрипсин
 γ -ГЛУ - γ -карбоксиглутаминовая кислота
 γ -ИФ - γ -интерферон
Ala - аланин
COL - ген коллагена
ECF - фактор хемотаксиса эозинофилов
GM-CSF - колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов
G-CSF - колониестимулирующий фактор гранулоцитов
Gla - гликозамин
Gly - глицин
HRP - Белки богатые гистидином (гистатины)
Hyr - гидроксипролин
Hyl - гидроксизин
Ig - иммуноглобулин
IP3 - 1,4,5-инозитолтрифосфата
Leu - лейцин
Le - локус Lewis
Met - метионин
M-CSF - колониестимулирующий фактор макрофагов
Me²⁺ - ионы металлов, с зарядом 2+
Mg - молекулярная масса
NAM - N-ацетилмурамовая кислота
NAC - N-ацетилглюкозамин
NCF - фактор хемотаксиса нейтрофилов.
Pro - пролин
PPi - пирофосфат
PRP - Белки богатые пролином
RGD - аминокислотная последовательность аргинин-глицин-аспартат, с помощью которой белки присоединяются к клеточным рецепторам
Str - стрептококки
TNF - фактора некроза опухоли
TGF α , bFGF, TGF β , bFGF - ростовые факторы
VTP - вазоактивный кишечный полипептид
АГ - андрогены

АГП - Анионные гликопротеины
АДФ - аденозиндифосфат
АМК - аминокислоты
АСП – аспарагиновая кислота
АРГ – аргинин
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
БАВ - биологически активные вещества
ВАЛ - валин
ГАГ – гликозамингликан
ГАП – гидроксиапатит
ГК – глюкокортикоиды
ГЛИ - глицин
ГЛУ – глутаминовая кислота
ГК - Гиалуроновая кислота
ГФЛ - глицерофосфолипиды
Д – дальтон
ДЖ - Десневая жидкость
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ – желудочнокишечный тракт
ИО - ингибитор остеиндукции
ИЛ- – интерлейкин
ИЛЕ – изолейцин
ИФ - интерферон
ИФР - инсулиноподобные факторы роста
ИЭТ – изоэлектрическая точка
кДа – килодальтон
КГП - Катионные гликопротеины
КТ – кальцитонин
КСИ - кислотостабильные ингибиторы
КС – кератансульфаты
КЛ1 – коллаген I типа
КП - коэффициент проницаемости
КСБЭ - кальцийсвязывающие белки эмали
КФ – кислая фосфатаза
КЭФР - костноэкстрагируемые факторы роста
ЛЕЙ - лейцин
ЛИЗ – лизин
МБК - морфогенетические белки кости
МВ - мембранные везикулы
МГП - Макромолекулярные гликопротеины
М.м – молекулярная масса

МПО - Миелопероксидаза
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
НКБ - неколлагеновые белки
ОА - оксалоацетата
ОСН – остеоонектин
ОК – остеокальцин
ОП - остеоопонтин
П - протеиназа
ПААГ – полиакриламидный гель
ПГ - простагландин
ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты
ПТГ – паратгормон
ПФ – пирофосфатаза
СЕР – серин
СЖ - слюнные железы
СК, SP - секреторный компонент IgAs
СПО - Слюнная пероксидаза
СТГ – соматотропный гормон
T_{1/2} - полупериод жизни
ТХ - тромбоксан
ФАФС – 3'-фосфоаденозил-5'-фосфосульфат
ФАП - фторалатит
ФГП - Фосфосодержащие гликопротеины
ФРН - Фактор роста нервов
ФРС - фактор роста скелета
ФРЭ - фактор роста эпидермиса
ХС - Хондроитинсульфаты
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
ЦНС – центральная нервная система
ЦПЭ – цепь переноса электронов
ЩФ щелочной фосфатазы
ЭГ – эстрогены
ЭДТА - этилендиаминтетраацетат
ЭР – эндоплазматический ретикулум

Глава 1 СОСТАВ И СТРОЕНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.

Соединительные ткани – широко распространенные ткани мезенхимного генеза. Соединительная ткань выполняет функции структуры, информационного обеспечения, механической, иммунной и бактериологической защиты. Выделяют волокнистые ткани и ткани со специальными свойствами: эмбриональную, ретикулярную и жировую. Волокнистые ткани разделяют на рыхлую, образующую строму всех органов, и плотную оформленную и неоформленную. В полости рта человека представлено несколько разновидностей соединительной ткани. Для соединительной ткани характерно наличие разных видов клеток и значительный процент межклеточного вещества от объема ткани.

Клетки соединительных тканей – фибробласты, макрофаги, тучные клетки, лейкоциты, плазматические, перициты, адипоциты.

Клетки соединительной ткани (в зависимости от выполняемой функции) можно разделить на три основные группы.

(а) Клетки, ответственные за синтез молекул внеклеточного вещества и поддержание структурной целостности ткани. В соединительных тканях это фибробласты. Механоциты — общее наименование таких клеток соединительных и скелетных тканей. К ним относят, помимо фибробластов и фиброцитов, хондробласты и хондроциты, остеобласты и остециты, одонтобласты, ретикулярные клетки.

(б) Клетки, ответственные за накопление и метаболизм жира, — адипоциты; эти клетки образуют жировую ткань.

(в) Клетки с защитными функциями (в т.ч. иммунологическими): тучные, макрофаги и все типы лейкоцитов.

Основными компонентами межклеточного матрикса являются:

- различные виды *коллагена*, придающие тканям прочность;
- *неколлагеновые белки*, преимущественно выполняющие функцию адгезии;
- *гликопротеины, протеогликаны и гиалуроновая кислота*, связывающие воду и придающие тканям упругость.

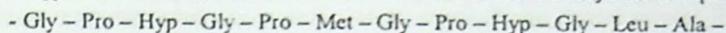
1.1 КОЛЛАГЕН.

Коллаген, наиболее распространённый белок млекопитающих, основной структурный белок межклеточного матрикса. Он составляет от 25 до 33% общего количества белка в организме, т.е. ~6% массы тела, образует основу сухожилий, костей, кожи, зубов и хрящей. Структурной единицей коллагенового волокна является тропоколлагеновая молекула, состоящая из трёх полипептидных цепей, каждая из которых содержит около 1000 аминокислотных остатков. В зависимости от функции коллагена его полипептидные цепи либо идентичны, либо имеют довольно близкие последовательности.

Аминокислотный состав коллагена необычен. Во-первых, примерно одну треть всех остатков составляют остатки глицина, и, во-вторых, имеется большое число остатков пролина. Кроме того, в коллагене встречаются остатки двух аминокислот, обычно

не обнаруживаемых в белках, - гидроксипролина и гидроксизина. Боковые цепи этих аминокислот содержат гидроксильную (-ОН) группу, присоединённую к одному из углеродных атомов вместо атома водорода. Гидроксипролирование осуществляется специфическими ферментами после включения пролина или лизина в полипептидную цепь коллагена.

Аминокислотная последовательность большей части цепи коллагена представлена регулярно повторяющимися единицами Gly - X - Y, где Gly - глицин, X и Y могут быть произвольными аминокислотными остатками. Пролин (Pro) чаще встречается в положении X, тогда как гидроксипролин (Hyp) - преимущественно в положении Y. Типичный фрагмент последовательности коллагена выглядит следующим образом:



Такая регулярная последовательность принимает конформацию, называемую коллагеновой спиралью. В участках из первых 16 остатков у N-конца и из последних 25 остатков у C-конца полипептидной цепи коллагена подобной регулярности в чередовании аминокислотных остатков не обнаруживается. Эти сегменты, называемые телопептидами, имеют конформацию, отличную от коллагеновой спирали.

Одиночная полипептидная цепь коллагена принимает форму спирали, в которой расстояние между аминокислотными остатками вдоль оси составляет 0,29 нм, а на один виток спирали приходится немного менее трёх остатков. Спираль оказывается левой в том смысле, что если пальцы левой руки положить так, чтобы они прослеживали путь G1 - X2 - Y3 - G4, то большой палец будет указывать направление от N- к C-концу. Между атомами основной цепи одиночного полипептида водородных связей не образуется. Тем не менее такая конформация (значительно более вытянутая, чем α -спираль, у которой расстояние между остатками составляет 0,15 нм) оказывается предпочтительной для полипептидной цепи, содержащей массивные пирролидиновые кольца остатков пролина и гидроксипролина.

В тройной коллагеновой спирали три одиночные коллагеновые цепи уложены параллельно и закручены одна вокруг другой, образуя похожую на канат витую структуру. Такое закручивание оказывается возможным благодаря наличию у левых одиночных коллагеновых спиралей правой сверхспирализации, которую можно наблюдать по результирующему смещению A-цепи при переходе от G1 к G4 (G1 и G4 - это глициновые остатки, стоящие соответственно в первом и четвёртом положениях). Одиночная цепь коллагена содержит примерно 1000 остатков, а длина молекулы тропоколлагена составляет при этом около 300 нм.

Глицин - единственный остаток, который может располагаться вблизи оси тройной спирали, поскольку имеющегося там свободного пространства недостаточно для размещения любой другой, большей по объёму, боковой цепи. На один виток одиночной цепи приходится примерно три остатка, поэтому в каждом третьем положении аминокислотной последовательности должен стоять глицин. Боковые цепи последовательности X и Y направлены в сторону от оси тройной спирали и могут быть большими по объёму. В тройной спирали существуют водородные связи между аминогруппой (-

N-H) каждого внутреннего глицинового остатка и карбоксильным остатком (-C=O) другой цепи.

При формировании фибрилл молекулы тропоколлагена располагаются ступенчато, смешаясь относительно друг друга на одну четверть длины, что придает фибриллам характерную исчерченность.

Коллаген - это семейство близкородственных фибриллярных белков.

Гены коллагенов локализованы в разных хромосомах. Стандартное название гена (например, COL1A2) состоит из названия гена COL (от collagen, коллаген), типа коллагена (I, II и т.д.), идентификатора полипептидной цепи (A2, где A, B и т.д. — аббревиатура от alpha, beta и т.д., 1, 2 и т.д. — порядковый номер цепи).

В разных тканях преобладают разные типы коллагена (табл. 1.1), что определяет той ролью, которую коллаген играет в конкретном органе или ткани. Например, в сухожилиях коллаген образует плотные параллельные волокна, которые дают возможность этим структурам выдерживать большие механические нагрузки, а в заживающей ране они агрегированы весьма хаотично.

Таблица 1.1

Типы коллагенов

Типы	Гены	Ткани и органы
I	COL1A1, COL1A2	Кожа, сухожилия, кости, роговица, плацента, артерии, печень, дентин
II	COL2A1	Хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело, роговица
III	COL3A1	Артерии, матка, кожа плода, строма паренхиматозных органов
IV	COL4A1-COL4A6	Базальные мембраны
V	COL5A1-COL5A3	Минорный компонент тканей, содержащих коллаген I и II типов (кожа, роговица, кости, хрящи, межпозвоночные диски, плацента)
VI	COL6A1-COL6A3	Хрящи, кровеносные сосуды, связки, кожа, матка, лёгкие, почки
VII	COL7A1	Амнион, кожа, пищевод, роговица, хорион
VIII	COL8A1-COL8A2	Роговица, кровеносные сосуды, культуральная среда эндотелия
X	COL9A1-COL9A3	Ткани, содержащие коллаген II типа (хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело)
X	COL10A1	Хрящи (гипертрофированные)
XI	COL11A1-COL11A2	Ткани, содержащие коллаген II типа (хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело)
XII	COL12A1	Ткани, содержащие коллаген I типа (кожа, кости, сухожилия, др.)
XIII	COL13A1	Многие ткани
XIV	COL14A1	Ткани, содержащие коллаген I типа (кожа, кости, сухожилия, др.)
XV	COL15A1	Многие ткани
XVI	COL16A1	Многие ткани
XVII	COL17A1	Гемидесмосомы кожи
XVIII	COL18A1	Многие ткани, например печень, почки
XIX	COL19A1	Клетки рабдомиосаркомы

Этапы синтеза и созревания коллагена.

Синтез и созревание коллагена - сложный многоэтапный процесс, начинающийся в клетке, а завершающийся в межклеточном матриксе. Синтез и созревание коллагена включают в себя целый ряд посттрансляционных изменений:

- синтез полипептидных цепей
- гидроксидирование пролина и лизина с образованием гидроксипролина (Нур) и гидроксилизина (Нул);
- гликозилирование гидроксилизина;
- частичный протеолиз - отщепление «сигнального» пептида, а также N- и C-концевых пропептидов;
- образование тройной спирали.

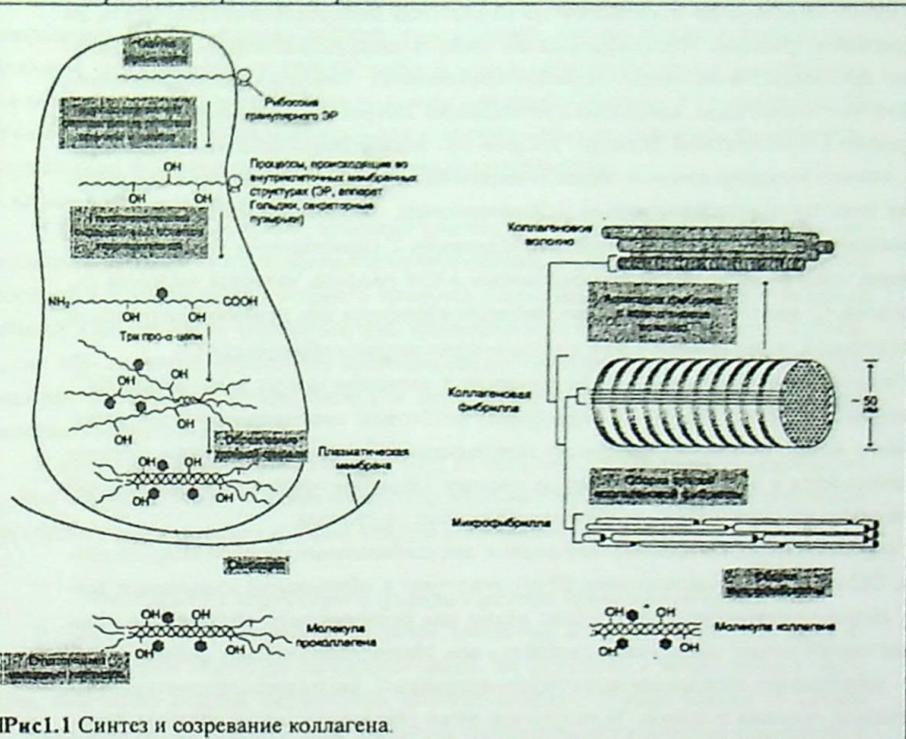


Рис.1.1 Синтез и созревание коллагена.

Синтез полипептидных цепей коллагена.

Полипептидные цепи коллагена синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭР), в виде более длинных, чем зрелые цепи, предшественников - препро- α -цепей. У этих предшественников имеется гидрофобный «сигнальный» пептид на N-конце, содержащий около 100 аминокислот.

Основная функция сигнального пептида - поступление пептидных цепей в полость ЭР. После выполнения этой функции сигнальный пептид сразу же отщепляется. Синтезированная молекула проколлагена содержит дополнительные участки - N- и C-

концевые пропептиды, имеющие около 100 и 250 аминокислот, соответственно. В состав пропептидов входят остатки цистеина, которые образуют внутри- и межпечечные (только в С-пептидах) S-S-связи.

Концевые пропептиды не образуют тройную спираль, а формируют глобулярные домены. Отсутствие N- и C-концевых пептидов в структуре проколлагена нарушает правильное формирование тройной спирали.

Посттрансляционные модификации коллагена. Гидроксилирование пролина и лизина. Роль витамина С.

Гидроксилирование пролина и лизина начинается в период трансляции коллагеновой мРНК на рибосомах и продолжается на растущей полипептидной цепи вплоть до её отделения от рибосом. После образования тройной спирали дальнейшее гидроксилирование пролиловых и лизиловых остатков прекращается. Реакции гидроксилирования катализируют оксигеназы, связанные с мембранами микросом. Пролиловые и лизиловые остатки в Y-положении пептида $(-Gly-x-y)_n$ подвергаются действию, соответственно, пролил-4-гидроксилазы и лизил-5-гидроксилазы. Проллил-3-гидроксилаза действует на некоторые остатки пролина в X-положениях. Необходимыми компонентами этой реакции являются α -кетоглутарат, O_2 и витамин С (аскорбиновая кислота). Донором атома кислорода, который присоединяется к С-4 пролина, является молекула O_2 , второй атом O_2 включается в сукцинат, который образуется при декарбоксилировании α -кетоглутарата, а из карбоксильной группы α -кетоглутарата образуется CO_2 .

Гидроксилазы пролина и лизина содержат в активном центре атом железа Fe^{2+} . Для сохранения атома железа в ферроформе необходим восстанавливающий агент. Роль этого агента выполняет кофермент гидроксилаз - аскорбиновая кислота, которая легко окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту. Обратное превращение происходит в ферментативном процессе за счёт восстановленного глутатиона.

Гидроксилирование пролина необходимо для стабилизации тройной спирали коллагена, ОН-группы гидроксипролина (Нур) участвуют в образовании водородных связей. А гидроксилирование лизина очень важно для последующего образования ковалентных связей между молекулами коллагена при сборке коллагеновых фибрилл. При цинге - заболевании, вызванном недостатком витамина С, нарушается гидроксилирование остатков пролина и лизина. В результате этого образуются менее прочные и стабильные коллагеновые волокна, что приводит к большой хрупкости и ломкости кровеносных сосудов с развитием цинги. Клиническая картина цинги характеризуется возникновением множественных точечных кровоизлияний под кожу и слизистые оболочки, кровоточивостью дёсен, выпадением зубов, анемией.

После завершения гидроксилирования при участии специфических гликозилтрансфераз в состав молекулы проколлагена вводятся углеводные группы. Чаще всего этими углеводами служат галактоза или дисахарид галактозилглюкоза.

Они образуют ковалентную О-гликозидную связь с 5-ОН-группой гидроксилизина. Гликозилирование гидроксилизина происходит в коллагене, ещё не претерпевшем

лизации, и завершается после образования тройной спирали. Число углеводных групп в молекуле коллагена зависит от вида ткани. Так, например, в коллагене сухожилий (тип I) это число равно 6, а в коллагене капсулы хрусталика (тип IV) - 110. Роль углеводных групп неясна, известно только, что при наследственном заболевании, одной из форм которого является дефицит лизилгидроксилазы (синдром Элерса-Данлосова, тип VI), содержание гидроксилизина и углеводов в образующемся коллагене снижено; возможно, это является причиной ухудшения механических свойств кожи и сухожилий у людей с этим заболеванием.

Образование проколлагена и его секрета в межклеточное пространство

После гидроксирования и гликозилирования каждая про- α -цепь соединяется ковалентными связями с двумя другими про- α -цепями, образуя тройную спираль проколлагена. Эти процессы происходят ещё в просвете ЭР и начинаются после образования межклеточных дисульфидных мостиков в области С-концевых пропептидов. Из молекулы проколлагена перемещаются в аппарат Гольджи, включаются в секреторные пузырьки и секретируются в межклеточное пространство.

Образование тропоколлагена.

В межклеточном матриксе концевые пропептиды коллагенов I, II и III типов отщепляются специфическими проколлагенпептидазами, в результате чего образуются молекулы тропоколлагена, которые и являются структурной единицей коллагеновых фибрилл. При снижении активности этих ферментов (синдром Элерса-Данло - Русакон-Вип VII) концевые пропептиды проколлагена не отщепляются, вследствие чего нарушается образование тропоколлагена и далее нарушается образование нормальных коллагеновых фибрилл.

У коллагенов некоторых типов (IV, VIII, X) концевые пропептиды не отщепляются, что связано с тем, что такие коллагены образуют не фибриллы, а сетеподобные структуры, в формировании которых важную роль играют концевые N- и C-пептиды.

Особенности структуры и функции разных типов коллагенов

В настоящее время известно 19 типов коллагена, которые отличаются друг от друга по первичной структуре пептидных цепей, по функциям и локализации в организме. Вариантов α -цепей, образующих тройную спираль, гораздо больше 19 (около 100). Для обозначения каждого вида коллагена пользуются определённой формулой, в которой тип коллагена записывается римской цифрой в скобках, а для обозначения α -цепей используют арабские цифры: например коллагены II и III типа образованы идентичными α -цепями, их формулы, соответственно $[\alpha_1(\text{II})]_3$ и $[\alpha_1(\text{III})]_3$; коллагены I и IV являются гетеротримерами и образуются обычно двумя разными типами α -цепей, формулы, соответственно $[\alpha_1(\text{I})]_2 \alpha_2(\text{I})$ и $[\alpha_1(\text{IV})]_2 \alpha_2(\text{IV})$. Индекс за скобкой обозначает количество идентичных α -цепей. 19 типов коллагена подразделяют на несколько групп в зависимости от того, какие структуры они могут образовывать:

ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРЫ, ОБРАЗУЕМЫЕ КОЛЛАГЕНОМ

Структура	Тип коллагена
Фибриллы	I, II, III, V, XI
Ассиметричные с фибриллами	IX, XII, XIV, XVI, XIX
Сети	IV, VIII, X
Микрофибриллы	VI
«Скороухомые» фибриллы	VII
Триксомерные домены	XIII, XVII
Другие	XV, XVIII

Фибриллообразующие (I, II, III, V и XI) типы

90% всего коллагена в организме человека составляют коллагены I, II и III типов, которые образуют очень прочные фибриллы. Они являются основными структурными компонентами органов и тканей, которые испытывают постоянную или периодическую механическую нагрузку (кости, сухожилия, хрящи, межпозвоночные диски, кровеносные сосуды), а также участвуют в образовании стромы паренхиматозных органов. Поэтому коллагены I, II и III типов часто называют интерстициальными. Во всех минерализованных неэпителиальных тканях присутствует коллаген I типа. Он беден гидроксипролином, слабо гликозилируется, образуя широкие фибриллы. Коллаген II типа, наоборот, богат гидроксипролином сильно гидроксирован. Коллаген III типа содержит большое количество остатков гидроксипролина и имеет межцепочечные дисульфидные связи. В отличие от коллагена I типа он не способен минерализоваться.

К классу фибриллообразующих относят также минорные коллагены V и XI типов. Основа структурной организации коллагеновых фибрилл - ступенчато расположенные параллельные ряды молекул тропоколлагена, которые сдвинуты на 1/4 относительно друг друга. Молекулы коллагена не связаны между собой «конец в конец», а между ними выделены промежутки в 35-40 нм. Предполагается, что в костной ткани эти промежутки выполняют роль центров минерализации, где откладываются кристаллы фосфата кальция. При электронной микроскопии фиксированные и контрастированные фибриллы коллагена выглядят поперечно исчерченными с периодом 67 нм, который включает одну полную и одну светлую полоски. Считают, что такое строение максимально повышает сопротивляемость всего агрегата растягивающим нагрузкам.

Фибриллы коллагена образуются спонтанно, путём самосборки. Но эти фибриллы не являются эрлыми, так как не обладают достаточной прочностью (известно, что эрлы коллагеновое волокно толщиной в 1 мм выдерживает нагрузку до 10 кг).

Узорованные коллагеновые фибриллы укрепляются внутри- и межцепочечными ковалентными связями (они встречаются только в коллагене и эластине). Эти связи образуются следующим образом:

* неспецифичный медьсодержащий фермент лизилоксидаза осуществляет окислительное дезаминирование ϵ -аминогрупп в некоторых остатках лизина и гидро-

ксилизины с образованием реактивных альдегидов (аллизины и гидроксипролины). Для этих реакций необходимо присутствие витаминов PP и B₆.

- образовавшиеся реактивные альдегиды участвуют в формировании ковалентных связей между собой, а также с другими остатками лизина или гидроксипролина соседних молекул тропоколлагена, и в результате возникают поперечные «Лиз-Лиз-сшивки», стабилизирующие фибриллы коллагена.

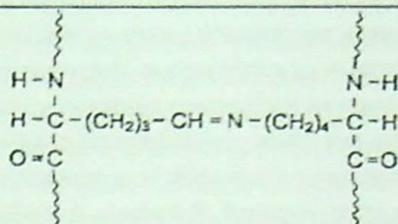


Рис. 1.2. Шиффовы основания, образованные из боковых цепей лизина и аллизина.

Шиффовы основания более часто встречаются в сухожилиях, а альдольная конденсация характерна для костей и зубов. Около 25% молекул тропоколлагена распадается, не образуя фибрилл. Получившиеся фрагменты выполняют сигнальные функции и стимулируют коллагеногенез. Количество поперечных связей в фибриллах коллагена зависит от функции и возраста ткани. Например, между молекулами коллагена ахиллова сухожилия сшивок особенно много, так как для этой структуры важна большая прочность. С возрастом количество поперечных связей в фибриллах коллагена возрастает, что приводит к замедлению скорости его обмена у пожилых и старых людей.

При снижении активности лизилоксидазы, а также при недостатке меди или витаминов PP или B₆ нарушается образование поперечных сшивок и, как следствие, снижаются прочность и упругость коллагеновых волокон. Такие структуры, как кожа, сухожилия, кровеносные сосуды, становятся хрупкими, легко разрываются.

Коллагены, ассоциированные с фибриллами

Этот класс объединяет коллагены, которые выполняют очень важную функцию: они ограничивают размер фибрилл, образуемых интерстициальными коллагенами I (прежде всего, I и II типов), и участвуют в организации межклеточного матрикса в костях, коже, хрящах, сухожилиях. К этим коллагенам относят коллагены IX, XII, XIV и XVI типов. Коллагены этого класса сами фибрилл не формируют, но непосредственно связаны с фибриллами, которые образуют интерстициальные коллагены. К особенностям этого типа коллагенов относят наличие большого количества положительно заряженных групп, к которым могут присоединяться отрицательно заряженные гликозаминогликаны, например, гиалуроновая кислота и хондроитин-сульфат. Это обеспечивает их участие в организации межклеточного матрикса в хряще.

Коллагены, образующие сетеподобные структуры

К этому классу относят коллагены IV, VIII, X типов.

Особенностью коллагена IV типа, структурного компонента базальных мембран, является то, что повторяющиеся спирализованные участки с последовательностью (Гли-х-у) часто прерываются короткими неспиральными сегментами. Это, вероятно, увеличивает гибкость коллагена IV типа и способствует образованию на его основе сетчатых структур.

Молекулы этого коллагена не могут ассоциироваться латерально с образованием фибрилл, так как N- и C-концевые пропептиды у него не отщепляются. Но именно эти фрагменты участвуют в образовании олигомерных форм коллагена, так как они имеют ряд потенциальных мест связывания (остатки цистеина и лизина). Дисульфидные мостики и поперечные лизиновые связи стабилизируют образующиеся олигомеры. Кроме этого, возможны латеральные взаимодействия спирализованных участков разных молекул с образованием суперспиралей. В базальной мембране из этих компонентов формируется сетчатая структура с гексагональными ячейками размером 170 нм.

Коллагены, образующие микрофибриллы

К этому классу относят коллаген VI типа, который является короткоцепочечным белком. Он образует микрофибриллы, которые располагаются между крупными фибриллами интерстициальных коллагенов. Этот коллаген широко представлен в хрящевом матриксе, но больше всего его содержится в межпозвоночных дисках. Две молекулы этого коллагена соединяются антипараллельно с образованием димера. Из димеров образуются тетрамеры, которые секретируются из клетки, и вне клетки связываются «конец в конец» с образованием микрофибрилл.

Функции коллагена VI типа пока полностью неясны, хотя известно, что его микрофибриллы могут связываться со многими компонентами межклеточного матрикса: фибриллами интерстициальных коллагенов, гиалуроновой кислотой, протеогликанами. Молекула этого коллагена содержит многочисленные последовательности Арг-Гли-Асп (RGD), поэтому возможно его участие в клеточной адгезии через присоединение к мембранным адгезивным молекулам, например интегринам.

Коллагены, образующие «заякоренные» фибриллы

К этому классу относят коллагены VII и XVII типов, которые называют также коллагенами, связанными с эпителием, так как они обычно находятся в местах соединения эпителия с субэпителиальными слоями.

Коллаген VII типа - основной структурный компонент «заякоренных» фибрилл. Эти фибриллы играют важную роль в присоединении эпидермиса к дерме, так как одним концом они могут присоединяться к *lamina densa*, на которой лежит кожный эпителий, а другой их конец проникает в более глубокие субэпидермальные слои кожи и связывается там со структурами, называемыми «якорные диски».

Катаболизм коллагена

Как и любой белок, коллаген функционирует в организме определенное время. Его относят к медленно обменивающимся белкам; $T_{1/2}$ составляет недели или месяцы. Разрушение коллагеновых волокон осуществляется активными формами кислорода

и/или ферментативно (гидролитически).

Нативный коллаген не гидролизуется обычными пептидгидролазами. Основной фермент его катаболизма - коллагеназа, которая расщепляет пептидные связи в определённых участках спирализованных областей коллагена.

Тканевая коллагеназа присутствует у человека в различных органах и тканях. В норме она синтезируется клетками соединительной ткани, прежде всего, фибробластами и макрофагами. Тканевая коллагеназа - металлозависимый фермент, который содержит Zn^{2+} в активном центре. Активность коллагеназы зависит от соотношения в межклеточном матриксе ее активаторов и ингибиторов. Среди активаторов особую роль играют плазмин, калликреин и катепсин В. Тканевая коллагеназа обладает высокой специфичностью, она перерезает тройную спираль коллагена в определённом месте, примерно на 1/4 расстояния от С-конца, между остатками глицина и лейцина (или изолейцина).

При кислых значениях рН спиральную часть молекулы коллагена расщепляет катепсин В₁, а отдельные α -спирали и неспирализованные участки - катепсин D.

Образующиеся фрагменты коллагена растворимы в воде, при температуре тела они спонтанно денатурируются и становятся доступными для действия других протеолитических ферментов. Нарушение катаболизма коллагена ведёт к фиброзу органов и тканей (в основном печени и лёгких). А усиление распада коллагена происходит при аутоиммунных заболеваниях (ревматоидном артрите и системной красной волчанке) в результате избыточного синтеза коллагеназы при иммунном ответе.

У молодых людей обмен коллагена протекает интенсивно, с возрастом (и особенно в старости) заметно снижается, так как у пожилых и старых людей увеличивается количество поперечных сшивок, что затрудняет доступность коллагена для действия коллагеназы. Поэтому, если у молодых людей в возрасте 10-20 лет содержание гидроксипролина в моче (показателя интенсивности распада коллагена) может достигать 200 мг/сут, то с возрастом экскреция гидроксипролина снижается до 15-20 мг/сут.

В некоторых ситуациях синтез коллагена заметно увеличивается. Например, фибробласты мигрируют в заживающую рану и начинают активно синтезировать в этой области основные компоненты межклеточного матрикса. Результат этих процессов - образование на месте раны соединительнотканного рубца, содержащего большое количество хаотично расположенных фибрилл коллагена.

Регуляция обмена коллагена

Синтез коллагена регулируется разными способами. Прежде всего, сам коллаген и N-про-пептиды после своего отщепления тормозят трансляцию коллагена по принципу отрицательной обратной связи. Аскорбиновая кислота стимулирует синтез коллагена и протеогликанов, а также пролиферацию фибробластов.

Особую роль в регуляции синтеза коллагена играют гормоны. Глюкокортикоиды тормозят синтез коллагена, во-первых, путём снижения уровня мРНК проколлагена, а во-вторых - ингибированием активности ферментов пролил- и лизилгидроксилазы. Недостаточное гидроксильное окисление остатков пролина и лизина повышает чувствитель-

...чайной конформацией позволяет всей сети волокон эластина растягиваться и сжи...
...ся в разных направлениях, придавая соответствующим тканям свойство эластич...
...ти.

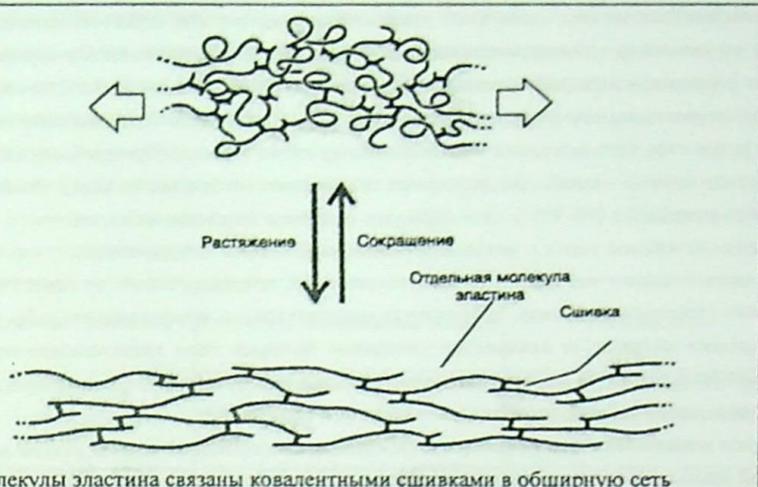


рис. 1.5 Молекулы эластина связаны ковалентными шивками в обширную сеть

Следует отметить, что эластин синтезируется как растворимый мономер, который называется «тропоэластин». После образования поперечных шивок эластин приобретает свою конечную внеклеточную форму, которая характеризуется нерастворимостью, высокой стабильностью и очень низкой скоростью обмена.

Нарушения структуры эластина и их последствия

При снижении образования десмозинов (или их отсутствии) поперечные шивки образуются в недостаточном количестве или не образуются вообще. Вследствие этого у эластических тканей снижается предел прочности на разрыв и появляются такие нарушения, как истонченность, вялость, растяжимость, т.е. утрачиваются их резиноподобные свойства. Клинически такие нарушения могут проявляться кардиоваскулярными изменениями (аневризмы и разрывы аорты, дефекты клапанов сердца), частыми пневмониями и эмфиземой лёгких.

Причины нарушений структуры эластина:

- снижение активности лизилоксидазы, вызванное дефицитом меди или пиридоксала;
- дефицит лизилоксидазы при наследственных заболеваниях;
- синдром Менкеса - нарушение всасывания меди.

Катаболизм эластина

Катаболизм эластина происходит при участии эластазы нейтрофилов. Это очень активная протеаза, которая выделяется во внеклеточное пространство нейтрофилами и разрушает эластин и другие структурные белки. В норме этого не происходит, так как эластаза нейтрофилов и другие протеазы ингибируются белком, называемый α_1 -тит трипсином (α_1 -AT). Основное количество α_1 -

ся в крови.

1.3 ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ И ПРОТЕОГЛИКАНЫ.

Гликозаминогликаны - линейные отрицательно заряженные гетерополисахариды. Раньше их называли мукополисахаридами, так как они обнаруживались в слизистых секретах (мукозах) и придавали этим секретам вязкие, смазочные свойства. Эти свойства обусловлены тем, что гликозаминогликаны могут связывать большие количества воды, в результате чего межклеточное вещество приобретает желеобразный характер.

Протеогликаны - высокомолекулярные соединения, состоящие из белка (5-10%) и гликозаминогликанов (90-95%). Они образуют основное вещество межклеточного матрикса соединительной ткани и могут составлять до 30% сухой массы ткани.

Протеогликаны - это класс сложных соединений, которые состоят из генетически различных стержневых белков, содержащих олигосахариды, присоединенные N- и O-гликозидными связями, и ковалентно связанные боковые цепи гликозамингликанов (ГАГ). Боковые цепи ГАГ состоят из повторяющихся сульфатированных дисахаридных субъединиц: хондроитина, дерматана, кератана или гепарана.

Белки в протеогликанах представлены одной полипептидной цепью разной молекулярной массы. Полисахаридные компоненты у разных протеогликанов разные. Протеогликаны отличаются от большой группы белков, которые называют гликопротеинами. Эти белки тоже содержат олигосахаридные цепи разной длины, ковалентно присоединенные к полипептидной основе. Углеводный компонент гликопротеинов гораздо меньше по массе, чем у протеогликанов, и составляет не более 40% от общей массы.

Гликозаминогликаны и протеогликаны, являясь обязательными компонентами межклеточного матрикса, играют важную роль в межклеточных взаимодействиях, формировании и поддержании формы клеток и органов, образовании каркаса при формировании тканей.

Благодаря особенностям своей структуры и физико-химическим свойствам, протеогликаны и гликозаминогликаны могут выполнять в организме человека следующие функции:

- они являются структурными компонентами межклеточного матрикса;
- протеогликаны и гликозаминогликаны специфически взаимодействуют с коллагеном, эластином, фибронектином, ламинином и другими белками межклеточного матрикса;
- все протеогликаны и гликозаминогликаны, являясь полианионами, могут присоединять, кроме воды, большие количества катионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) и таким образом участвовать в формировании тургора различных тканей;
- протеогликаны и гликозаминогликаны играют роль молекулярного сита в межклеточном матриксе, они препятствуют распространению патогенных микроорганизмов;
- гиалуроновая кислота и протеогликаны выполняют рессорную функцию в суставных хрящах;

- гепарансульфатсодержащие протеогликаны способствуют созданию фильтрационного барьера в почках
- кератансульфаты и дерматансульфаты обеспечивают прозрачность роговицы;
- гепарин - анти коагулянт;
- гепарансульфаты - компоненты плазматических мембран клеток, где они могут функционировать как рецепторы и участвовать в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. Они также выступают компонентами синаптических пузырьков.

Строение и классы гликозаминогликанов.

Таблица 1.3

Структура различных классов гликозаминогликанов

Класс гликозаминогликанов	Структура гликозаминогликанов	Локализация
Гиалуроновая кислота	D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилглюкозамин ($\beta 1 \rightarrow 4$)	Синовиальная жидкость, стекловидное тело, неоформленная соединительная ткань
Хондроитин-4-сульфат (хондроитинсульфат А)	D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$)	Кость
Хондроитин - 6 - сульфат (хондроитинсульфат С)	D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-6-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$)	Неоформленная соединительная ткань
Дерматансульфат	L-идуронозная кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$)	Широко распространен
Кератансульфат	D-галактоза ($\beta 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин($\beta 1 \rightarrow 3$) D-галактоза ($\beta 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 3$)	Суставы, кость
Гепарансульфат	D-глюкуронат-2-сульфат ($\alpha 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат ($\alpha 1 \rightarrow 4$)	Фибробласты кожи, стенка аорты

Гликозаминогликаны представляют собой длинные неразветвленные цепи гетерополисахаридов. Они построены из повторяющихся дисахаридных единиц. Одним номером этого дисахарида является гексуронозная кислота (D-глюкуронозная кислота или L-идуронозная), вторым мономером - производное аминсахара (глюкоз- или галактозамина). NH₂-группа аминсахаров обычно ацетилирована, что приводит к исчезно-

вению присущего им положительного заряда. Кроме гиалуроновой кислоты, все гликозаминогликаны содержат сульфатные группы в виде О-эфиров или N-сульфата.

В настоящее время известна структура шести основных классов гликозаминогликанов.

Гиалуроновая кислота находится во многих органах и тканях. В хряще она связана с белком и участвует в образовании протеогликановых агрегатов, в некоторых органах (стекловидное тело глаза, пупочный канатик, суставная жидкость) встречается и в свободном виде. Предполагается, что в суставной жидкости гиалуроновая кислота выполняет роль смазочного вещества, уменьшая трение между суставными поверхностями.

Хондроитинсульфаты - самые распространённые гликозаминогликаны в организме человека; они содержатся в хряще, коже, сухожилиях, связках, артериях, роговице глаза. Хондроитинсульфаты являются важным составным компонентом агрекана - основного протеогликана хрящевого матрикса. В организме человека встречаются 2 вида хондроитинсульфатов: хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат. Они построены одинаковым образом, отличие касается только положения сульфатной группы в молекуле N-ацетилгалактозамина. Одна полисахаридная цепь хондроитинсульфата содержит около 40 повторяющихся дисахаридных единиц и имеет молекулярную массу 10^4 - 10^6 Д.

Кератансульфаты - наиболее гетерогенные гликозаминогликаны; отличаются друг от друга по суммарному содержанию углеводов и распределению в разных тканях. В отличие от других гликозаминогликанов, кератансульфаты вместо гексуроновой кислоты содержат остаток галактозы. Молекулярная масса одной цепи кератансульфата колеблется от $4 \cdot 10^3$ до $20 \cdot 10^3$ Д.

Дерматансульфат широко распространён в тканях животных, особенно он характерен для кожи, кровеносных сосудов, сердечных клапанов. В составе малых протеогликанов (бигликана и декорина) дерматансульфат содержится в межклеточном веществе хрящей, межпозвоночных дисков, менисков. Повторяющаяся дисахаридная единица дерматансульфата содержит L-идуровую кислоту и N-ацетилгалактозамин-4-сульфат. Молекулярная масса одной цепи дерматансульфата колеблется от $15 \cdot 10^3$ до $40 \cdot 10^3$ Д.

Гепарин - важный компонент противосвёртывающей системы крови (его применяют как антикоагулянт при лечении тромбозов). Он синтезируется тучными клетками и находится в гранулах внутри этих клеток. Наибольшие количества гепарина обнаруживаются в лёгких, печени и коже. Дисахаридная единица гепарина похожа на дисахаридную единицу гепарансульфата. Отличие этих гликозаминогликанов заключается в том, что в гепарине больше N-сульфатных групп, а в гепарансульфате больше N-ацетильных групп. Молекулярная масса гепарина колеблется от $6 \cdot 10^3$ до $25 \cdot 10^3$ Д.

Гепарансульфат находится во многих органах тканей. Он входит в состав протеогликанов базальных мембран. Гепарансульфат является постоянным компонентом клеточной поверхности. Структура дисахаридной единицы гепарансульфата такая же, как у гепарина. Молекулярная масса цепи гепарансульфата колеблется от $5 \cdot 10^3$ до $12 \cdot 10^3$ Д.

Синтез и разрушение гликозаминогликанов.

Метаболизм гликозаминогликанов зависит от соотношения скорости их синтеза и распада.

Синтез гликозаминогликанов

Полисахаридные цепи гликозаминогликанов практически всегда связаны с белком, который называется коровым, или сердцевинным. Присоединение полисахарида к белку осуществляется через связующую область, в состав которой чаще всего входит дисахарид галактоза-галактоза-ксилоза.

Олигосахариды связующей области присоединяются к коровому белку ковалентными связями 3 типов:

- 1) O-гликозидной связью между серином и ксилозой;
- 2) O-гликозидной связью между серином или треонином и N-ацетилгалактозамином;
- 3) N-гликозиламиновой связью между амидным азотом аспарагина и N-ацетилглюкозамином.

Полисахаридные цепи гликозаминогликанов синтезируются путём последовательного присоединения моносахаридов. Донорами моносахаридов обычно являются соответствующие нуклеотид-сахара. Реакции синтеза гликозаминогликанов катализуют ферменты семейства трансфераз, обладающие абсолютной субстратной специфичностью. Эти трансферазы локализованы на мембранах аппарата Гольджи. Сюда по аналогу ЭР поступает коровый белок, синтезированный на полирибосомах, к которому присоединяются моносахариды связующей области и затем наращивается вся полисахаридная цепь. Сульфатирование углеводной части происходит здесь с помощью сульфотрансферазы, донором сульфатной группы выступает ФАФС.

Аминосакхара синтезируются из глюкозы; в соединительной ткани -20% глюкозы используется таким образом. На синтез гликозаминогликанов влияют глюкокортикоиды: они тормозят синтез гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозаминогликанов. Показано также тормозящее действие половых гормонов на синтез сульфатированных гликозаминогликанов в органах-мишенях.

Разрушение гликозаминогликанов

Гликозаминогликаны отличаются высокой скоростью обмена: полупериод жизни ($T_{1/2}$) многих из них составляет от 3 до 10 дней (только для кератансульфата $T_{1/2} = 120$ дней). Разрушение полисахаридных цепей осуществляется экзо- и эндогликозидазами и сульфатазами, к которым относят гиалуронидазу, глюкуронидазу, галактозидазу, идурамидазу и др. Из внеклеточного пространства Гликозаминогликаны поступают в клетку по механизму эндоцитоза и заключаются в эндоцитозные пузырьки, которые затем сливаются с лизосомами. Лизосомальные гидролазы обеспечивают постепенное полное расщепление гликозаминогликанов до мономеров.

Мукополисахаридозы - наследственные тяжёлые заболевания, проявляющиеся значительными нарушениями в умственном развитии детей, поражениями сосудов, помутнением роговицы, деформациями скелета, уменьшением продолжительности

жизни. В основе мукополисахаридозов лежат наследственные дефекты каких-либо гидролаз, участвующих в катаболизме гликозаминогликанов. Эти заболевания характеризуются избыточным накоплением гликозаминогликанов в тканях, приводящим к деформации скелета и увеличению органов, содержащих большие количества внеклеточного матрикса. Обычно поражаются ткани, в которых в норме синтезируются наибольшие количества гликозаминогликанов. В лизосомах при этом накапливаются не полностью разрушенные гликозаминогликаны, а с мочой выделяются их олигосахаридные фрагменты. Известно несколько типов мукополисахаридозов, вызванных дефектами разных ферментов гидролиза гликозаминогликанов.

Строение и виды протеогликанов

Основной протеогликан хрящевого матрикса называется агрекан, он составляет 10% по весу исходной ткани и 25% сухого веса хрящевого матрикса. Это очень большая молекула, в которой к одной полипептидной цепи присоединены до 100 цепей хондроитинсульфатов и около 30 цепей кератансульфатов. По форме молекула агрекана напоминает бутылочный «ёршик».

В хрящевой ткани молекулы агрекана собираются в агрегаты с гиалуроновой кислотой и небольшим связывающим белком. Оба компонента присоединяются к агрекану нековалентными связями в области домена G₁. Домен G₁ взаимодействует примерно с пятью дисахаридными единицами гиалуроновой кислоты, далее этот комплекс стабилизируется связывающим белком; домен G₁ и связывающий белок вместе занимают 25 дисахаридных единиц гиалуроновой кислоты. Конечный агрегат с молекулярной массой более $200 \cdot 10^6$ Д состоит из одной молекулы гиалуроновой кислоты и 100 молекул агрекана (и такого же количества связывающего белка).

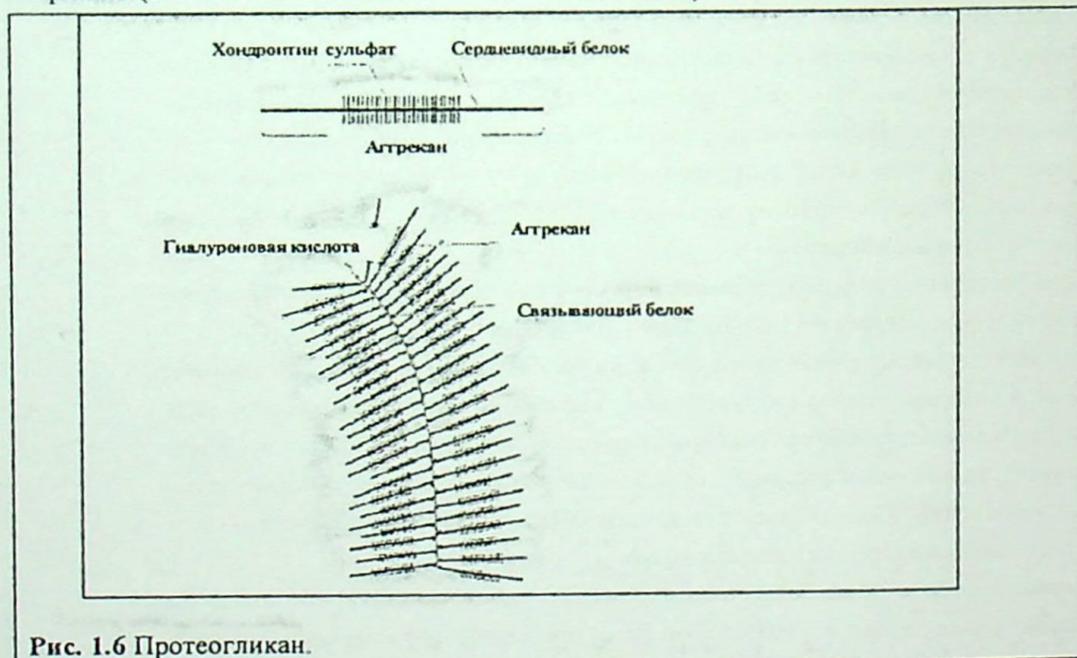


Рис. 1.6 Протеогликан.

Координация сборки этих агрегатов является центральной функцией хондроцитов. Агрекан и связывающий белок продуцируются этими клетками в необходимых количествах. Эти компоненты могут взаимодействовать друг с другом внутри клетки, но процесс агрегации полностью завершается в межклеточном матриксе. Показано, что гиалуроновая кислота образуется на поверхности хондроцитов специфической синтетазой и «выталкивается» в межклеточное пространство, чтобы связаться с агреканом и связывающим белком. Созревание функционально активного тройного комплекса составляет около 24 ч.

Катаболизм агрекана изучен в настоящее время недостаточно. Имеются данные о наличии в хрящевом межклеточном матриксе фермента агреканазы. Местом действия этого фермента является интерглобулярная область между доменами G_1 и G_2 . Кроме того, в зоне присоединения цепей хондроитинсульфата в коровом белке имеются ещё 3 места протеолитического расщепления агрекана. Конечный продукт расщепления агрекана представляет собой комплекс домена G_1 , связывающего белка и гиалуроновой кислоты. Он поступает в хондроцит по механизму эндоцитоза и подвергается расщеплению лизосомальными гидроксилазами. При пародонтите происходит увеличение активности ферментов, участвующих в деградации протеогликанов. Возрастает активность катепсина D, гиалуронидазы, β -D-глюкуронидазы, арилсульфатазы.

1.4 НЕКОЛЛАГЕНОВЫЕ БЕЛКИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.

Фибронектин

Фибронектин – это гликопротеин экстрацеллюлярного матрикса, который синтезируется большинством клеток соединительной ткани.

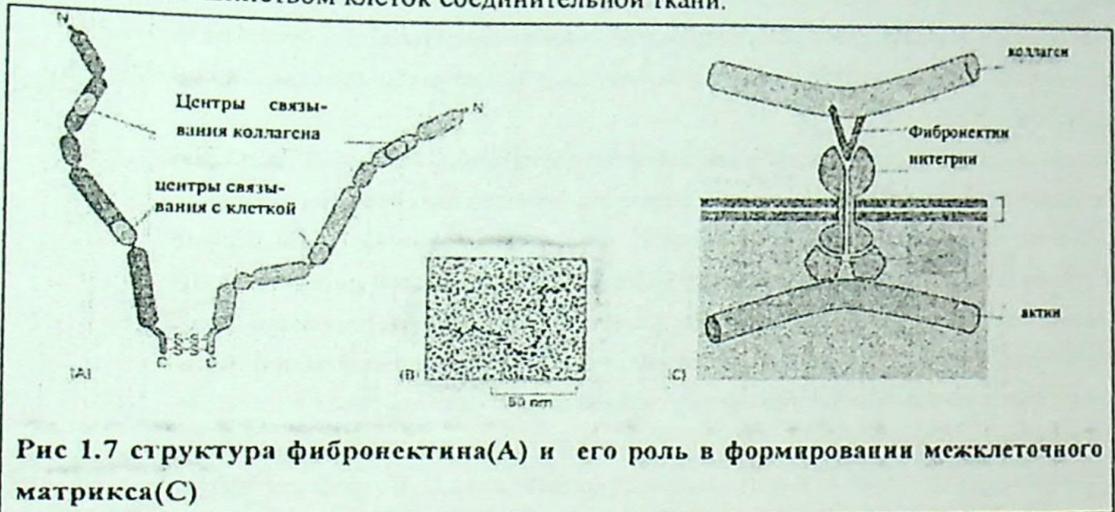


Рис 1.7 структура фибронектина(А) и его роль в формировании межклеточного матрикса(С)

Фибронектин состоит из двух сходных, но не идентичных субъединиц, молекулярная масса которых составляет ~250 000. Каждая субъединица содержит девять различных в функциональном отношении областей, включающих два фибронектин-связывающих сайта, два гепарин-связывающих сайта и по одному связывающему сайту для желатина, коллагена, ДНК и клеточных поверхностей. Фибронектин кодируется одним геном, состоящим из ~50 экзонов (в зависимости от вида животного), который локализуется на 7 хромосоме у человека. Тем не менее, в результате различных видов сплайсинга было идентифицировано около 20 разновидностей мРНК, содержащих 7,5 тыс. пар нуклеотидов. Субъединицы молекулы фибронектина состоят из трех разных типов повторяющихся последовательностей. Повторы I и II типа кодируются каждый одним экзоном и характеризуются петлевидными растяжениями, расположенными между аминокислотами в положениях 45 и 50 и связанными дисульфидными мостиками. Повторы I и II типа локализируются в амино- и карбокситерминальных субъединицах, тогда как повтор III типа находится в центральной части. Повторы III типа кодируются парой экзонов и характеризуются наличием петель, состоящих из 90 аминокислот. В десятом повторе III типа наблюдается измененная последовательность GRGDS - прототип последовательности для прикрепления клеток. Существует и другая последовательность, способствующая прикреплению клеток, но отличающаяся от RGD. В составе субъединиц были идентифицированы три области: EIIIA, EIIB и V, при удалении или вставке которых (полностью или частично), образуются различные типы фибронектина. Клеточный фибронектин состоит из разных комбинаций EIIIA и EIIB областей в зависимости от вида клеток. Пока точные функции этих областей не определены, но предполагается, что EIIIA и EIIB участвуют в процессе организации матрикса.

Фибронектин участвует в адгезии клеток, контролирует их морфологию и архитектуру поверхности, а также формирует фибриллы внеклеточного матрикса. Фибронектин связывает клетки с компонентами внеклеточного матрикса, в частности с коллагеном и гликозаминогликанами. При заживлении ран фибронектин образует пути для миграции клеток.

Рецептор фибронектина - интегрин, встроен в клеточную мембрану. Внутри клетки интегрин взаимодействует с актиновыми микрофиламентами примембранного цитоскелета, а снаружи соединяется с фибронектином. В свою очередь фибронектин образует связи с коллагеном и гликозаминогликаном (гепарансульфат). Так устанавливается структурная непрерывность между цитоскелетом и внеклеточным матриксом. Таким образом, фибронектин участвует в интеграции межклеточного матрикса и в адгезии клеток соединительной ткани.

Ламинин

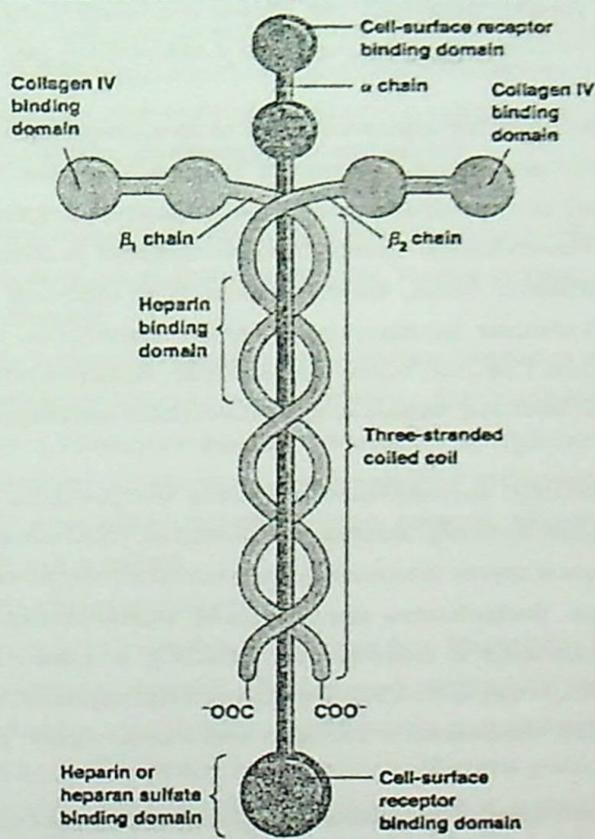


Рис. 1.8 ламинин

Ламинин – это гликопротеин, наиболее распространенный в базальных мембранах. Состоит из 3 полипептидных цепей, которые сначала скручены вместе, а затем 2 расходятся под углом 90 градусов, так, что образуется крест. Ламинин содержит несколько глобулярных и стержневых доменов, с центрами связывания для компонентов

базальных мембран: коллагена IV типа, нидогена, фибронектина, клеток. Ламинин не просто связывает клетки, но модулирует клеточное поведение. Он регулирует рост, дифференцировку, подвижность, морфологию клеток.

Нидоген

Нидоген — это сульфатированный гликопротеин базальных мембран. Он состоит из одной полипептидной цепи, скрученной в 3 глобулярных домена. Один из них может связываться с ламинином, один — с коллагеном IV типа. При этом формируется комплекс ламинин-нидоген-коллаген.

В ЭЦМ разных видов соединительной ткани находится также значительное количество неколлагеновых белков, участвующих в процессах интеграции и адгезии, а также выполняющих специфические функции

1.5 КЛЕТКИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.

Фибробласт — наиболее распространённый тип клеток соединительной ткани; секретирует компоненты внеклеточного матрикса, участвует в заживлении ран, способен к пролиферации и миграции.

Форма фибробластов разнообразна (от веретеновидной до звездообразной). Так, в плотной оформленной соединительной ткани фибробласт (точнее, фиброцит) имеет веретеновидную форму. В рыхлой соединительной ткани фибробласты располагаются свободно и образуют отростки. Размер клетки изменчив. Ядро содержит несколько ядершек. Клетка интенсивно синтезирует белок, что отражается на её строении. Цитоплазма содержит в большом количестве цистерны гранулярной эндоплазматической сети, хорошо выраженный комплекс Гольджи, много митохондрий. Имеются лизосомы и секреторные гранулы, гликоген, многочисленные микрофиламенты и микротрубочки.

Функции:

- Синтез и секреция молекул внеклеточного матрикса. Фибробласты синтезируют коллаген (проколлаген), эластин, фибронектин, гликозаминогликаны, протеогликаны и другие компоненты внеклеточного матрикса.
- Продукция цитокинов. Фибробласты вырабатывают колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF) и колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF). Фибробласты костного мозга секретируют ИЛ-3 и ИЛ-7.
- Заживление ран и воспаление. При заживлении ран и воспалении фибробласты активируются макрофагами, секретирующими bFGF и PDGF. Фибробласты активно пролиферируют и мигрируют к месту повреждения, связываясь с фибриллярными структурами через фибронектин. Одновременно они активно синтезируют вещества внеклеточного матрикса. Фибробласты содержат коллагеназы — ферменты, разрушающие коллаген. Существует несколько типов коллагеназ, разрушающих определённый тип коллагена. Разрушая коллаген и синтезируя новый, фибробласт

способствует его перестройке и образованию рубцов в месте повреждения (воспаления).

Со временем фибробласт трансформируется в фиброцит. Фиброцит сдавлен параллельно идущими волокнами внеклеточного матрикса и имеет веретенообразную форму. Уплотнённое ядро вытянуто и расположено вдоль клетки. Имеются рассеянные в цистерны гранулярной эндоплазматической сети, небольшое количество митохондрий. Комплекс Гольджи развит слабо. Клетка содержит сравнительно немного секреторных гранул. Главная функция — поддержание тканевой структуры путём непрерывного, хотя и медленного обновления компонентов внеклеточного матрикса. При заживлении ран фиброцит может быть стимулирован к синтетической активности. Активированный фиброцит приобретает черты фибробласта: ядро округляется, увеличивается количество цистерн эндоплазматической сети, митохондрий, комплекс Гольджи становится более выраженным.

Макрофаги — дифференцированная форма моноцитов. Макрофаги — профессиональные фагоциты, найдены во всех тканях и органах. Очень мобильная популяция клеток, способная быстро перемещаться. Продолжительность жизни — месяцы. Тканевые макрофаги сохраняют некоторую способность к делению (например, альвеолярные макрофаги при хронических воспалительных процессах).

Функции:

- Бактерицидная активность. Макрофаги проявляют бактерицидную активность, выделяя из лизосом лизоцим, кислые гидролазы, катионные белки, лактоферрин.
- Противоопухолевая активность — прямое цитотоксическое действие H_2O_2 , аргиназы, цитолитической протеиназы, фактора некроза опухоли (TNF).
- Участие в иммунных реакциях. Макрофаг прогрессирует антиген и представляет его лимфоцитам, что приводит к стимуляции лимфоцитов и запуску иммунных реакций. Другими словами, макрофаг — антиген представляющая клетка.
- Участие в реакциях воспаления.
- Реорганизация тканей и заживление ран. Макрофаги фагоцитируют мёртвые клетки и тканевые обломки, секретируют эластазу, коллагеназу, гиалуронидазу, разрушающие компоненты внеклеточного матрикса. С другой стороны, макрофаги секретируют факторы роста. Ростовые факторы, синтезируемые макрофагами, эффективно стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток (TGF α , bFGF), пролиферацию и активацию фибробластов (PDGF), синтез коллагена фибробластами (TGF β), формирование новых кровеносных сосудов (bFGF). Таким образом, основные процессы, лежащие в основе заживления раны (реэпителизация, образование внеклеточного матрикса, восстановление повреждённых сосудов), опосредованы факторами роста, производимыми макрофагами.
- Регуляция гемопоза и функций клеток крови. Вырабатывая ряд факторов

гемопоза, макрофаги влияют на дифференцировку и функцию клеток крови.

Тучные клетки и базофилы. Тучные клетки морфологически и функционально сходны с базофилами крови, но это отдельные клеточные типы. Между тучной клеткой и базофилом существуют различия.

Тучная клетка, как и базофил, происходит из предшественника в костном мозге, но окончательную дифференцировку проходит в соединительной ткани. Ростовые факторы для тучных клеток — ИЛ-3 и ИЛ-10.

Тучные клетки — резидентные клетки соединительной ткани. Их особенно много под кожей, в слизистой оболочке органов дыхательной и пищеварительной систем, брюшной полости и вокруг кровеносных сосудов.

Функции:

Тучная клетка участвует в воспалительных и аллергических реакциях гиперчувствительности немедленного типа. Базофилы могут мигрировать в очаги воспаления и участвовать в поздней фазе реакции гиперчувствительности. Активация и дегрануляция тучных клеток и базофилов происходят при взаимодействии IgE с рецепторами Fc-фрагментов IgE в цитолемме.

Тучная клетка содержит многочисленные крупные метакроматические гранулы, окружённые мембраной (модифицированные лизосомы). В цитоплазме присутствуют несколько округлых митохондрий и умеренно развитая гранулярная эндоплазматическая сеть. Округлое, в отличие от базофила, ядро содержит менее конденсированный хроматин.

Тучные клетки синтезируют и накапливают в гранулах разнообразные биологически активные вещества, медиаторы и ферменты.

- Гистамин
- Гепарин
- Протеазы. Триптаза — главная нейтральная протеаза тучных клеток. Её эффекты: расщепление фибриногена, конверсия С3 в анафилатоксин С3а, активация коллагеназы, деградация фибронектина. Вместе с карбокси-пептидазой В триптаза вызывает разрушение тканевого матрикса. Другие протеазы тучной клетки (эластаза, активатор плазминогена, дипептидаза), видимо, также участвуют в этих процессах.
- Кислые гидролазы — лизосомные ферменты, вместе с нейтральными протеазами разрушающие комплексы гликопротеинов и протеогликанов.
- Химаза — специфический белок тучных клеток, участвует в расщеплении компонентов внеклеточного матрикса.
- Хемоаттрактанты. К ним относят фактор хемотаксиса эозинофилов (ECF) и фактор хемотаксиса нейтрофилов (NCF).
- При активации тучные клетки мобилизуют арахидоновую кислоту — источник простагландинов, тромбоксана ТХА₂ и лейкотриенов. Эти медиаторы обладают вазо- и бронхоактивными свойствами.

Таблица 2 БИОХИМИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ.

Для выполнения биологической функции некоторые виды соединительной ткани должны обладать высокой механической прочностью. Это качество достигается благодаря высокому содержанию минеральных веществ. В организме человека различают 4 вида минерализованных (твёрдых) тканей: кость (рис 2.1), цемент, дентин, эмаль. Первые три ткани - мезенхимального происхождения, а эмаль — эктодермального. Степень минерализации снижается в последовательности: эмаль > дентин > цемент > кость.

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)

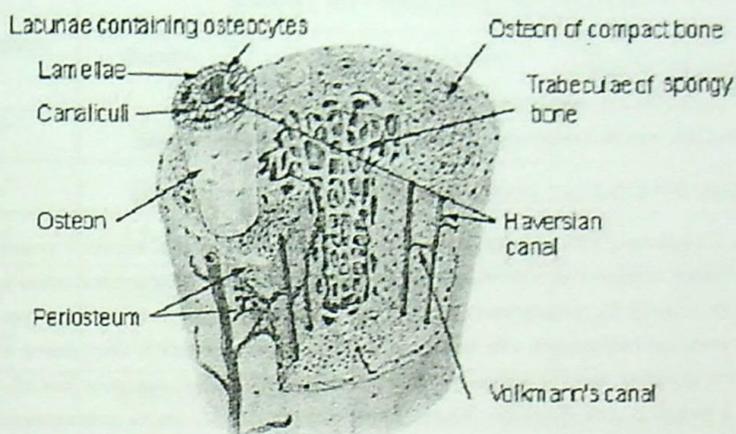


Рис. 2.1 строение кости

- Твёрдые ткани состоят из следующих компонентов:
- неорганические вещества (кристаллы-апатиты, аморфные соли и вода);
 - органическое основное вещество (преимущественно представленное в массивном матриксе);
 - клеточные элементы.

Составные части минерализованных тканей, как и все составные элементы организма, находятся в постоянной перестройке, причем органические вещества и кристаллы все время синтезируются и разрушаются. Особенности строения кристаллов-апатитов и содержание других минеральных соединений определяются видом твёрдой ткани (табл.2.1), топографической локализацией внутри ткани, возрастом и экологическими условиями.

Содержание основных компонентов в минерализованных тканях

ткани	минеральные компоненты/органические компоненты/вода	
	в % к весу ткани	в % к объему ткани
Кость(компактная)	45/30/25	23/37/40
Цемент	61/27/1	33/31/36
Дентин	70/20/1	45/30/25
Эмаль(зрелая)	95/1/4	86/2/12

Костная ткань одновременно выполняет несколько функций:

- структурно-опорную
- механической защиты
- депонирующую для многих макро- и микроэлементов
- поддержание кислотно-основного равновесия внутренней среды.

2.1 МИНЕРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КОСТНОЙ ТКАНИ.

В таблице 2.2 показано, что неорганические составные компоненты костной ткани представлены главным образом кальцием, фосфатом и карбонатом. Из содержащихся в организме 2,2 кг кальция 99% сосредоточено в костях, там же находится 87% фосфора. При усилении процессов резорбции, эти элементы легко мобилизуются и поступают в кровь, где их концентрация жестко регулируется и составляет 2,1-2,6 ммоль/л для общего Ca^{2+} и 1-1,5 ммоль/л для фосфора. Кроме того, значительную часть составляют магний, натрий и калий. В костной ткани сосредоточено 50% Mg^{2+} и 46% Na^+ . Многие другие ионы содержатся в ничтожном количестве.

Неорганические вещества кости имеют правильное расположение в форме кристаллов апатитов шириной от 20 до 50 А и длиной до 500 А. Вследствие такого строения образуется огромная поверхность около 200 м²/г костной ткани, которая играет важную роль в составе и обмене веществ костной ткани.

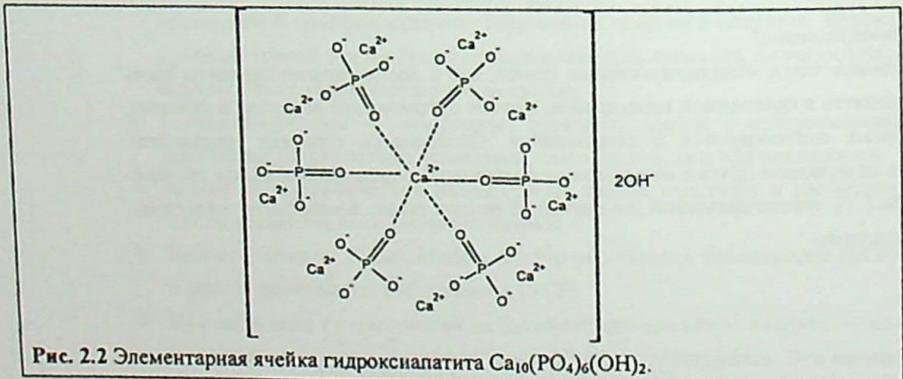


Рис. 2.2 Элементарная ячейка гидроксиапатита $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Общая формула апатитов: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, где X представлен анионами OH^- (гидроксиапатит - ГАП) или другими. Состав идеального ГАП соответствует формуле десятикальциевого соединения: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ с молярным отношением $\text{Ca/P} = 10/6 = 1,67$, называемым молярным кальциево-фосфатным коэффициентом. У природных апатитов величина отношения Ca/P существенно колеблется: от 1,33 до 2,0. Это явление связано с заменой ионов кристаллической решетки апатитов другими ионами, сходными по размеру (по ионному радиусу), заряду, валентности, поляризующим свойствам и т.д.

Таблица 2.2

Количественный состав макроэлементов в минерализованных тканях

Элементы	г/на 100 г ткани (грамм-проценты)			
	Эмаль	Дентин	Цемент	Кость (компактный слой трубчатой кости)
Ca^{2+}	32-39	26-28	21-24	24
PO_4^{3-}	16-18	12-13	10-12	11
CO_3^{2-}	1,9-3,6	3,0-3,5	2,0-4,3	3,9
Na^+	0,25-0,9	0,6-0,8	-	0,8
Mg^{2+}	0,25-0,56	0,8-1,0	0,4-0,7	0,3
Cl^-	0,19-0,3	0,3-0,5	-	0,01
K^+	0,05-0,3	0,02-0,04	-	0,2
фториды	0,5	0,1	-	0,5
Ca/P	1,5-1,68	1,6-1,7	1,6-1,7	1,6-1,7

Апатиты образуют очень стабильную ионную решётку (точка плавления выше 1600°C) в которой ионы тесно контактируют между собой и удерживаются за счет электростатических сил. Каждый катион окружен определенным количеством анионов (в зависимости от их размера), а анионы, в свою очередь, притягивают катионы. Таким образом, формирование ионной решётки происходит в соответствии с их размерами и величинами зарядов. Сравнение размеров и формы ионов фосфата, кальция, гидроксила показывает, что фосфат-ионы имеют наибольшие размеры и, следовательно, занимают в ионной решётке доминирующую долю в общей структуре.

Согласно теоретическим расчётам фосфат-ионы имеют форму шара, поэтому упаковка ионов представляет многослойную гексагональную структуру, в которой каждый фосфат-ион окружен 12 непосредственными соседями - ионами Ca^{2+} и OH^- из которых 6 ионов принадлежат тому же слою ионов, где расположен фосфат-ион, а по 3 иона расположены в выше- и нижележащих слоях ионов.

Между фосфат-ионами формируются каналы, в которых располагаются Ca^{2+} , $-\text{OH}$ и F^- -ионы. Идеальный, или модельный ГАП образует кристаллы в виде гексагональных призм. Анионы могут взаимно обмениваться. Фосфат и цитрат относятся к анионам, которые связаны в костях описанным выше способом. На поверхности кристаллов апатита может адсорбироваться значительное количество ионов. Очевидно, большое количество карбоната и фосфата связывается путем поверхностной адсорбции. В составе кости могут возникать дальнейшие изменения вследствие обмена ионов и рекристаллизации. Благодаря процессам, описанным выше, возникает динамическое равновесие в неорганических составных частях кости. Обмен минералов особенно быстро происходит в поверхностных частях кости и, в частности, сильно выражен в губчатом слое трубчатых костей, который представляет часть кости с лабильным активным обменом веществ. Этот обмен обеспечивается хорошим кровоснабжением.

2.2 КЛЕТКИ.

В костях среди других клеток преобладают остеобласты и остеокласты, которые соответственно осуществляют построение и разрушение костной ткани а также остеоциты – клетки «замурованные» в кальцифицированном межклеточном матриксе.

2.3 ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КОСТИ.

Биологическая роль белковой матрицы минерализованных тканей полностью еще не выяснена, но твердо установлено, что:

- у всех млекопитающих минерализация осуществляется только на белковой матрице;
- кроме структурной, белки выполняют регуляторные функции;
- стимулируют митозы предшественников клеток твердых тканей и являются митогенами;
- воздействуют на дифференцировку и созревание клеток: такие вещества называются морфогены;
- осуществляют межклеточные взаимодействия, прикрепление клеток к межклеточному матриксу, взаимосвязь органической основы с минеральными компонентами - адгезины;
- вызывают направленное движение клеток (хемотаксис) – хемоаттрактанты

Органическое вещество костей состоит примерно на 90%-95% из коллагена I типа, от 3% до 8% массы приходится на неколлагеновые белки кости и фосфолипиды, 1% составляют кислые и нейтральные гликозаминогликаны, которые в качестве скрепляющей субстанции располагаются между ГАП. Хондронинсульфат играет центральную роль в обмене веществ костей. Он образует с белками основное вещество костей и имеет большое значение в обмене кальция. Костная ткань обнаруживает относительно большое количество цитрата (1%). Снабжение костной ткани осуществляется кровеносной системой. Доставка веществ происходит по гаверсовым каналам и лакунам.

Прочностные свойства костной ткани определяются совокупностью трех компонентов: коллаген - прочность, протеогликаны - эластичность, кристаллы гидроксиапатитов - жесткость. Таким образом, кость (а также дентин и цемент) организована наподобие железобетона: коллаген и протеогликаны выполняют роль арматуры, а ГАП роль бетона. Действительно, по ряду характеристик (устойчивость к разрыву, модуль упругости и др.) кость сопоставима с железобетоном или даже превосходит его.

1 Белки

Коллаген составляет приблизительно 90% органического матрикса кости. Коллагеновый состав кости в определенной степени необычен тем, что фактически представлен только коллагеном I типа (КЛ1), хотя следы других типов коллагена, таких как V, XI и XII, все же определяются. На самом деле не исключено, что эти типы коллагена принадлежат другим тканям, которые хотя и находятся в костной ткани, но не входят в состав костного матрикса. Например, V тип коллагена, обычно обнаруживаемый в сосудах, которые пронизывают кость, невозможно обнаружить до того, как будет осуществлена экстракция белков. Тип XI находится в хрящевой ткани и может соответствовать остаткам кальцифицированного хряща. Источником коллагена XII типа на самом деле могут быть "заготовки" коллагеновых фибрилл. В костной ткани коллаген I типа имеет ряд особенностей: в нем меньше поперечных связей, чем в других видах соединительной ткани, и эти связи формируются посредством аллизина. Еще одним возможным отличием является то, что М-терминальный пропептид коллагена I типа фосфорилирован, а также то, что этот пептид сохраняется (по крайней мере, частично) в минерализованном матриксе. Такая посттрансляционная модификация проколлагена, в других видах соединительной ткани пока не выявлена.

Коллаген I типа способен участвовать в минерализации, образуя комплексы с ГАП, только в составе костной ткани, дентина и цемента (в сухожилиях, коже - коллаген I типа не минерализуется). Эти различия в свойствах коллагена I типа разных тканей определяются наличием в минерализующихся тканях особых неколлагеновых регуляторных белков и ферментов.

В жидкости, заполняющей лакунарно-канальцевую систему, циркулируют ферменты, секретируемые остеобластами (щелочная фосфатаза, пирофосфатаза) и остеоцитами (кислая фосфатаза, карбангидраза, коллагеназа и другие лизосомальные ферменты).

Наиболее важные неколлагеновые белки (НКБ) костного матрикса синтезируются остеобластами и остеоцитами, являются гликопротеидами или гликофосфопротеидами и выполняют роль регуляторов короткодистантного действия. Это - морфогенетические белки кости (МБК), фактор роста скелета (ФРС), костноэкстрагируемые факторы роста (КЭФР), остеоонектин (ООН), остеокальцин (ОК) и остеопонтин (ОП).

а) Остеонектин (ООН) - гликопротеин, богатый аминокислотами: ГЛУ, АСП, АРГ, радикалы которых пространственно сближены. ООН — адгезин, связывающий (через углеводный компонент) КЛ1 и ГАП. ГАП фиксируется ионными связями через Ca^{2+} с радикалами АСП и ГЛУ и ионными (по некоторым данным фосфамидными) свя-

зьями через PO_4^{3-} с радикалами АРГ. Таким образом, ОСН образует центры кристаллизации. ОСН секретируется зрелыми остеобластами и функционально активными остеопитами. Поэтому по количеству ОСН в кости можно судить о степени дифференцировки костных клеток.

б) *Остеокальцин* занимает второе место среди НКБ (10-20%), синтезируется в остеобластах и остеоцитах, располагается в этих же клетках, а также в межклеточном матриксе. ОК - низкомолекулярный кислый белок, состоящий из 49 аминокислот, среди которых 3 представлены γ -карбоксихлутаминовой кислотой (γ -ГЛУ). Образование радикалов γ -ГЛУ происходит во время посттрансляционной модификации проостеокальцина. Реакцию катализирует витамин K_1 -зависимый фермент - глутамилкарбоксилаза, использующий витамин K_1 в качестве кофактора и требующий для протекания реакции O_2 и CO_2 .

В ходе реакции CO_2 под действием фермента присоединяется к радикалу ГЛУ, в γ положении с образованием γ -ГЛУ. При этом витамин K_1 (гидрохинон) окисляется в филлохинон-2,3-эпоксид, который в последующих реакциях восстанавливается в витамин K_1 (гидрохинон) в два этапа.

Наличие дополнительной $-COO^-$ группы в γ -ГЛУ обеспечивает ей способность активно связывать Ca^{2+} . Другие Me^{2+} тоже способны связывать с ОК, но с разной степенью сродства ($Ca^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$).

Неколлагеновые белки костной ткани

Белок	Mг	Отличительные признаки
<i>Гликопротеины</i>		
Остеонектин	43 000 – 46 000* 32 000**	Гликозилированный, фосфорилированный протеин, множественная низкая аффинность к Ca^{2+}
Щелочная фосфатаза	S-S димер, 50 000 – 80 000*	Связывание Ca^{2+}
BAG-75	75 000	Содержит 60% углеводов (7% - сиаловая кислота), 8% фосфатов
<i>Белки, содержащие RGD</i>		
Тромбоспондин	S-S три- мер, 150 000	Связывание Ca^{2+} и гидроксиапатита, сайты связывания такие же, как у фибронектина; связывается с остеоонектином; клеточная адгезия
Фибронектин	S-S димер, 250 000	Сайты связывания с поверхностью клеток, фибрином, гепарином, бактериями, желатином, коллагеном, ДНК; начальное прикрепление клеток
Витронектин	70 000	Связывается со многими белками матрикса и сыворотки, ответственными за прикрепление клеток
Остеопонтин	45 000 – 75 000* 41 500**	Содержит N- и O-связанные олигосахариды, фосфосерин и тирозин, участвует в прикреплении клеток
Костный сиало- протеин	~75 000* 33 500**	Содержит 50% углеводов (12% - сиаловая кислота); у некоторых видов происходит сульфатирование тирозина; участвует в прикреплении клеток
<i>Белки, содержащие γ-карбоксиглутаминовую кислоту</i>		
Gla-протеин мат- рикса	15 000	Одна внутримолекулярная связь S-S, 5 остатков gla
Остеокальцин	12 000 – 14 000* 5 800**	Одна внутримолекулярная связь S-S, 3-5 остатков gla, связывание с гидроксиапатитом, зависимое от gla

Mг - относительная молекулярная масса.

S-S - дисульфидная связь.

Gla - гликозамины

*Определено с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

**Для полипептида.

Связанный с Ca^{2+} остеокальцин является фактором хемотаксиса для остеокластов. Предполагается что связывание Ca^{2+} так изменяет конформацию ОК, что он становится способным взаимодействовать с фосфолипидами мембран клеток. Следовательно, вызывать хемотаксис всех подвижных клеток, попадающих в кость. Эта гипотеза подтверждается тем, что ОК действительно «привлекает» не только остеокласты, но и их предшественники - моноциты, а так же другие макрофаги.

Блокирование реакции γ -карбоксилирования остеокальцина варфарином (антагонист витамина К) лишает этот белок биологических свойств.

Предполагаются две основные функции остеокальцина:

- Предохранение кости от избыточной минерализации.
- Запуск процессов ремоделирования кости по схеме: старый остеодит \rightarrow секреция остеокальцина \rightarrow хемотаксис остеокластов \rightarrow резорбция \rightarrow остеогенез \rightarrow молодой остеоцит.

Концентрация остеокальцина в крови является показателем интенсивности метаболизма кости.

в) *Костный сиалопротеин* составляет $\approx 5\%$ от всех НКБ кости, синтезируется в остеобластах, остеоцитах, остеокластах и представляет собой кислый гликопротеин с большим содержанием сиаловых кислот. КСП выполняет функции:

- гликопротеина, связывающего клетки с КЛ1;
- фактора резорбции матрикса кости.

г) *Остеопонтин* - кислый гликопротеин, содержащий сиаловые кислоты, обнаружен в остеобластах и остеоцитах. Основная роль ОП - адгезия клеток кости с ГАП, которая опосредуется пентапептидом: ГЛУ-АРГ-ГЛИ-АСП-СЕР, локализованном в центре белковой молекулы. ОП связан также с мембранными рецепторами остеокластов, регулирует их активность и, соответственно, процессы резорбции костной ткани. Наряду с отмеченными свойствами ОП, установлено, что увеличение содержания м-РНК ОП сопровождается метастазированием опухолей костной ткани, что, как полагают, связано с изменением адгезивных свойств клеток под влиянием ОП и активацией процесса инвазии.

д) *Морфогенетический белок кости* (Gla-протеин матрикса) - олигомерный белок, выделяемый разрушающимися остеоцитами и содержащий 4 или 5 протомеров с молекулярной массой: 32, 24, 17,5, 14, 1,5-2,0 кДа. Протомер 17,5 кДа обладает морфогенетической активностью. Это - кислый гликофосфопротеин, богатый СЕР и ГЛИ, содержащий 3 дисульфидные связи, восстановление которых вызывает его инактивацию. Морфогенетический эффект протомера 17,5 кДа, называется остеоиндукцией, в физиологических условиях проявляется в его действии на перициты (клетки, локализованные вдоль сосудов), вызывающем их дифференцировку в скелетогенные клетки. Остеоиндукция подтверждена экспериментально путем эктопического введения протомера 17,5 кДа в мышцы, переднюю камеру глаза, под капсулу почек. В месте введения через 7 дней возникает хрящ, который через 15 дней замещается костью, а спустя 40-60 дней формируется сферическая кость с костным мозгом внутри.

Действие протомера 17,5 кДа в значительной степени зависит от комплексования с другими протомерами (32, 24, 14 кДа):

- комплекс 17,5 + 32 кДа - биологически инертен;
- комплекс 17,5 + 24 кДа - биологически активен, гидрофобен, устойчив к действию протеиназ;

- комплекс 17,5+14 кДа - гидрофилен и действует на большем расстоянии, чем один протомер 17,5 кДа (радиус действия последнего - 400 нм).

Протомер 14 кДа содержит γ -ГЛУ. Гидрофильные свойства самого протомера 14 кДа, а также комплекса (17,5 + 14 кДа) связывают с наличием радикала γ -ГЛУ, содержащего 2 карбоксильные группы и, особенно, с присоединением к радикалу γ -ГЛУ Ca^{2+} .

Протомер-пептид, с М.м. 1,5-2,0 кДа, богатый ГЛИ, занимает особое положение: может входить в состав олигомерного белка - МБК, но возможно существует самостоятельно и называется ингибитором остеоиндукции (ИО).

е) *Фактор роста скелета (ФРС)* - термо- и рН-стабильный белок. Легко гидролизуетеся кислыми протеиназами. Оказывает двойное регуляторное влияние:

- митогенное - стимулирует деление скелетогенных клеток,
- морфогенное - вызывает дифференцировку скелетогенных клеток в остеогенные. Действие ФРС на клетки-мишени индукционное (клетка переходит в активное состояние после кратковременного контакта с белком).

ж) *Костноиндустралируемые факторы роста (КЭФР)* - два гликопротеина, вызывают митогенный эффект у остеогенных клеток контактным способом (митозы продолжаются, пока КЭФР связан с мембраной).

2. Нуклеиновые кислоты

В костной ткани представлены оба вида нуклеиновых кислот, но количество РНК превышает содержание ДНК в 1,5-2,0 раза. Интенсивность образования органического матрикса костной ткани коррелирует с концентрацией РНК в остеобластах, поскольку количество РНК в клетках отражает активность их биосинтетических процессов.

3 Липиды

Среди липидов костной ткани наибольшее значение имеют глицерофосфолипиды (ГФЛ). Значительное количество ГФЛ содержится в остеобластах, активно их синтезирующих, и экскретирующих во внеклеточное пространство. Находящиеся в молекуле ГФЛ остаток фосфорной кислоты или $-\text{COO}^-$ группа заряжены отрицательно и способны присоединять Ca^{2+} . Считается, что именно ГФЛ играют ведущую роль:

- в начальных этапах минерализации, связывая Ca^{2+} ,
- в реализации непрерывного роста кристаллов ГАП,
- в осуществлении функции посредников для комплексования ГАП с белковой матрицей по схеме:

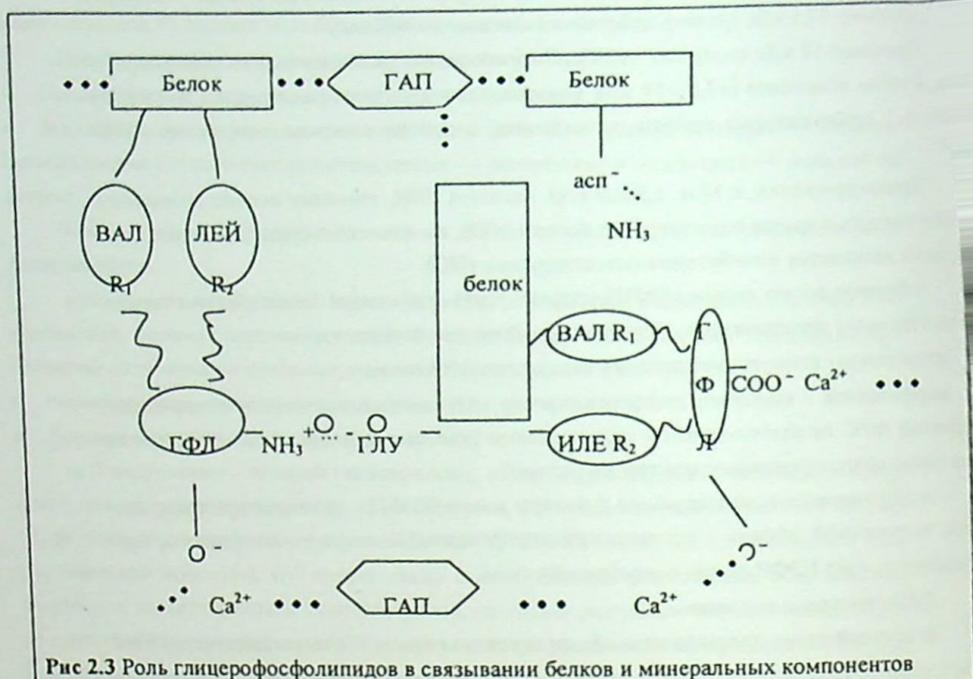


Рис 2.3 Роль глицерофосфолипидов в связывании белков и минеральных компонентов

Взаимосвязь ГФЛ с радикалами аминокислот в белках происходит за счет:

- гидрофобных связей между алифатическими цепями остатков жирных кислот ГФЛ и алифатическими радикалами аминокислот (ВАЛ, ЛЕЙ, ИЛЕ);
- а также за счет ионных связей между ионизированными группировками фосфолипидов и ионизированными радикалами аминокислот (АСП, ГЛУ, ЛИЗ).

4 Углеводы.

Углеводы в костной ткани локализованы внутри- и внеклеточно. Внутриклеточные углеводы представлены гликогеном, а внеклеточные - гликозаминогликанами. Гликоген и глюкоза выполняют в основном, энергетическую функцию, и, образующийся при распаде глюкозы АТФ, используется для минерализации.

Содержание гликогена в костной ткани с увеличением возраста остеобластов снижается с 15-20 мг на грамм ткани до 5-10 мг. В молодых клетках путем гликолиза образуется 60% АТФ, а в старых - 85%. В остеоцитах гликогена нет (или следы) и вся АТФ получается за счет гликолиза.

Состав протестических групп протеогликанов кости меняется на разных стадиях развития. В молодой кости преобладает гиалуронат, в зрелой - сульфатированные гликозаминогликаны (ГАГ) (хондроитин и кератансульфаты). Полианионные сульфатные группы последних активно связывают Ca^{2+} , создавая его депо. Разрушение ГАГ приводит к уменьшению связывания Ca^{2+} , а активация синтеза - увеличивает связывание Ca^{2+} и на определенных этапах развития кости, способствует минерализации.

Среди гликозаминогликанов наибольшая доля приходится на хондроитинсульфаты, среди которых доминирует хондроитин-4-сульфат и кератансульфаты. Хондроитинсульфаты (ХС) и кератансульфаты (КС) являются простетическими группами протеогликанов межклеточного матрикса, обеспечивая соединение последних с КЛП. При удалении ХС и КС, волокна КЛП утрачивают поперечную исчерченность, наблюдаемую в электронный микроскоп, легко подвергаются ограниченному протеолизу, образуя желатину. ХС и КС, связывая Ca^{2+} сульфогруппами, активно участвуют в минерализации костной ткани. Завершение оссификации характеризуется уменьшением доли сульфатированных гликозаминогликанов.

Гиалуроновая кислота (ГК), в отличие от ХС и КС, встречается как в связанном с белками-протеогликанами, так и в свободном состоянии. В молодой костной ткани количество ГК преобладает над содержанием ХС, но синтез обоих гликозаминогликанов необходим для соединения протеогликанов с КЛП и правильного формирования коллагеновых волокон. Таким образом, связанные формы гликозаминогликанов обеспечивают стабилизацию и цементирование волокнистых структур КЛП. Свободная ГК, благодаря полианионным свойствам, активно сорбирует катионы и воду, участвуя, тем самым, в регуляции обмена воды и электролитов.

5 Цитрат

Низкомолекулярное органическое соединение - цитрат присутствует в костной ткани в относительно большом количестве - до 1 % от общей массы, что в 20 раз больше, чем в печени. Наряду с этим, активность фермента цитратсинтазы, катализирующего образование цитрата из ацетил-КоА и оксалоацетата (ОА), в костной ткани значительно выше активности других энзимов. Эти факты подчеркивают особую роль цитрата в метаболических процессах в костной ткани, особенно в обмене Ca^{2+} . Цитрат легко образует растворимые соли Ca^{2+} и, являясь переносчиком кальция, обеспечивает его поступление в минерализующиеся ткани. Так как цитрат является хелатом легко связываемого Ca^{2+} , то увеличение его концентрации в крови снижает ее свертываемость.

Реакция Ca^{2+} с цитратом может идти по разным схемам в зависимости от pH среды, концентрации Ca^{2+} и других факторов. Продукция цитрата гормонозависимый процесс. Она интенсифицируется гормоном парашитовидных желез (ППГ).

2.4 МИНЕРАЛИЗАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ.

Минерализация - отложение кристаллов ГАП в ранее образованный органический матрикс специализированных твердых тканей: эмали, дентина, цемента, костей. Нарушение минерализации органического матрикса (особенно в костной ткани) именуется остеомаляцией. Дефекты образования самой органической основы - остеопороз.

Образование центров кристаллизации зависит от сформированности органического матрикса, наличия достаточного количества Ca^{2+} и PO_4^{3-} , активности щелочной фосфатазы (ЩФ), мобилизующей PO_4^{3-} и пирофосфатазы, разрушающей $H_4P_2O_7$ (ингибитор кристаллообразования). Необходимым условием является достаточное количество O_2 для активного синтеза АТФ, а также наличие депо Ca^{2+} в виде Ca^{2+} связанного с суль-

фогруппами хондроитин- и кератан- сульфатов, а также с фосфатными группами глицирофосфолипидов (ГФЛ).

Начало минерализации характеризуется усилением оксигенации костной ткани, что сопровождается активным накоплением в митохондриях Ca^{2+} , PO_4^{3-} и повышенной выработкой АТФ, путем окислительного фосфорилирования. АТФ используется как источник энергии для процесса синтеза органического матрикса и в качестве донора фосфата для минерализации.

Усиленная оксигенация приводит также к повышению проницаемости мембран остеобластов и активному отпочкованию в межклеточный матрикс особых образований, называемых пузырьками матрикса, или мембранными везикулами (МВ). Установлено, что МВ имеют диаметр до 100 нм, покрыты клеточной мембраной и содержат в высокой концентрации: Ca^{2+} и ГФЛ; ЩФ, пирофосфатазу, АТФ-азу и 5'-АМФ-азу.

Концентрация Ca^{2+} в МВ в 25-50 раз выше, чем в остеобластах. Ca^{2+} связан с ГФЛ, имеющими суммарный отрицательный заряд при физиологическом значении pH: фосфатидилинозитолом и фосфатидилсеринном. Последний имеет особенно высокую аффинность к Ca^{2+} и является главным компонентом ГФЛ минерализованных тканей. В кальций-глицерофосфолипидных комплексах молярное отношение $Ca/P = 1/1$.

Содержащиеся в МВ фосфогидролазы увеличивают локальную концентрацию PO_4^{3-} , гидролизуя соответствующие субстраты. ЩФ среди таких ферментов занимает особое место:

- ее высокая активность характерна для минерализующихся тканей (активность резко снижена при дефекте формирования кости);
- ЩФ действует как гидролаза, отщепляя фосфат от органических соединений, и как фосфотрансфераза, перенося фосфат на акцептор органической природы.

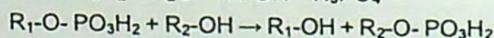
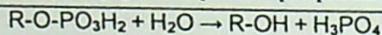


Рис. 2.4 Реакции, катализируемые щелочной фосфатазой

Таким образом, в МВ, в связи с высокой концентрацией Ca^{2+} и PO_4^{3-} , возникает перенасыщенный раствор фосфата кальция, что приводит к формированию первичных микрокристаллов гидроксипатитов (ГАП). Содержащийся в МВ, в составе ГФЛ, кальций взаимодействует со связанным белками фосфатом, образуя протеолипидный комплекс, содержащий первичный фосфат кальция.

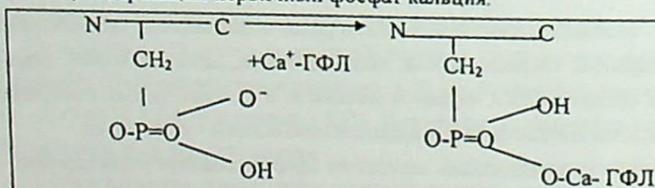
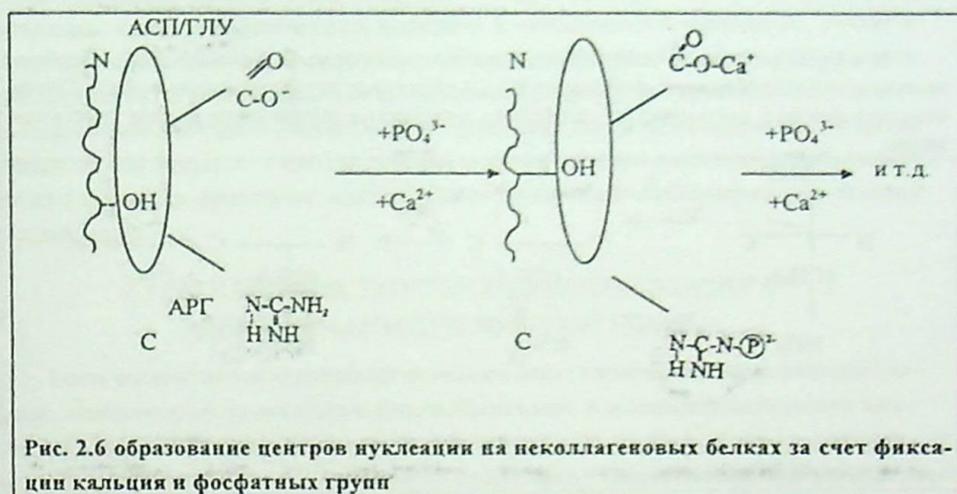


Рис. 2.5 образование первичного фосфата кальция

Однако рост кристаллов не происходит из-за способности протеогликанов и пирофосфатов (PPi) образовывать комплексы с кальцием. Считается, что одним из факторов, препятствующих кальцификации тканей, богатых коллагеном (кожи, сухожилий и др.), является наличие большого количества протеогликанов и отсутствие пирофосфатазы.

Отпочкование МВ из остеобластов в межклеточный матрикс и разрушение их мембран сопровождается освобождением минеральных компонентов и микрокристаллов, а также частичным протеолизом протеогликанов лизосомальными протеиназами.

Частичный протеолиз протеогликанов обеспечивает освобождение Ca^{2+} и PO_4^{3-} и способствует нуклеации - формированию поверхности белков, на которой будет происходить образование кристаллической решетки ГАП. Это становится возможным за счет связывания Ca^{2+} , PO_4^{3-} и микрокристаллов ГАП с радикалами полярных заряженных аминокислот НКБ кости.



Первичное формирование микрокристаллов ГАП в МВ остеобластов называется *внутриклеточным* процессом образования центров кристаллизации (или мест нуклеации). Фиксация Ca^{2+} и PO_4^{3-} на радикалах аминокислот НКБ в межклеточном матриксе называется, соответственно, *внеклеточным* процессом образования центров кристаллизации. В костной ткани протекают оба процесса.

Основное место минерализации (независимо от внутриклеточного или внеклеточного начала процесса) располагается в микроканалах между микрофибриллами КЛ1.

Белками костной ткани, наиболее активно фиксирующими Ca^{2+} и PO_4^{3-} , являются остеоонктин (ОСН) и Gla-протенин. Особая роль ОСН доказана тем, что если в культуре тканей заменить ОСН фибронектином, то минерализации не происходит.

Матричный Gla-белок расположен между микрофибриллами КЛ1, содержит пространственно сближенные радикалы АРГ и 5 остатков γ -ГЛУ (механизм γ -

карбоксилирования аналогичен процессу у остеокальцина). Активно связывает PO_4^{3-} , особенно Ca^{2+} в связи с этим, нередко называется матричным Ca^{2+} -связывающим белком. В детском организме содержание этого протеина на 30% больше чем у взрослых

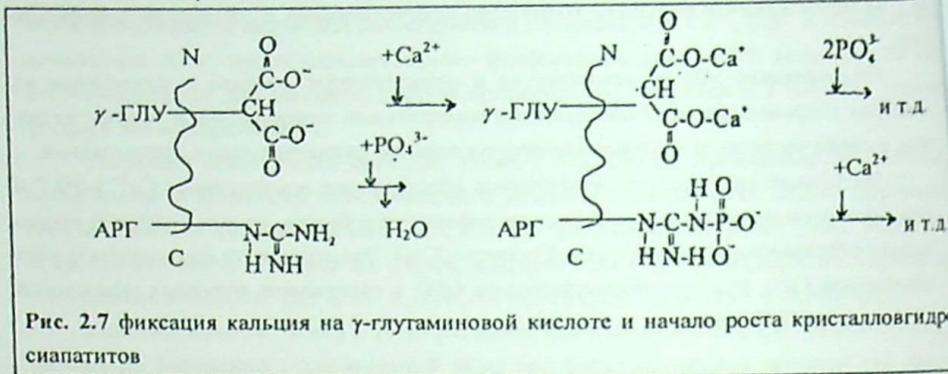


Рис. 2.7 фиксация кальция на γ -глутаминовой кислоте и начало роста кристаллов гидроксиапатитов

В структуре самого КЛ1 костной ткани ϵ -аминогруппа радикала ЛИЗ, освобожденная от протеогликанов, фиксирует PO_4^{3-} с образованием фосфамидной связи. Считается, что фосфат, связывая Ca^{2+} , возможно, участвует в образовании центра кристаллизации.



Рис. 2.8 фиксация фосфатов на лизине, входящем в состав коллагена и начало роста кристаллов гидроксиапатита

Образование фосфоэфирных, а тем более фосфамидных связей, требует особых условий (источника энергии, наличия фермента). Донорами PO_4^{3-} для инициации процессов минерализации, служат РРi и органические эфиры фосфорной кислоты, освобождающие PO_4^{3-} под влиянием пирофосфатазы, 5'-АМФ-азы, АТФ-азы. Однако доминирующее значение в образовании фосфат содержащих центров кристаллизации принадлежит ЦФ, обеспечивающей перенос PO_4^{3-} от фосфорорганических эфиров к белкам, осуществляющим минерализацию.

После формирования центров кристаллизации начинается эпитактический (самоорганизованный, направленный) рост кристаллов ГАП на белковой матрице костной ткани.

По завершении процесса роста кристаллов ГАП, остеобласты оказываются окруженными по периферии минерализованным матриксом и превращаются в остеоциты,

вное назначение которых - поддержание стабильности обменных процессов в уже минерализованных отделах костной ткани, то есть сохранение постоянства ее органического и минерального состава. Это возможно только при наличии непрерывного динамического равновесия между процессами образования костной ткани, осуществляемыми остеобластами и остеоцитами, и процессами ее разрушения, или резорбции, выполняемыми остеокластами. Последние располагаются по поверхности костей в особых углублениях - нишах резорбции, образуемых за счет деятельности этих клеток.

Пусковыми факторами, способствующими активации резорбции костной ткани, является снижение оксигенации ткани и интенсификации в остеокластах анаэробного гликолиза, вызывающего накопление лактата и соответственно, H^+ . Другой источник H^+ это H_2CO_3 , образуемая карбагидразой. Снижение pH приводит к повышению проницаемости мембран лизосом и освобождение соответствующих гидролаз: коллагеназы, гликозидаз, сульфатаз. Остеокласты выделяют в межклеточный матрикс H^+ , лактат и лизосомальные гидролазы. В результате местного ацидоза происходит распад связи кристаллов ГАП и белков межклеточного матрикса, кристаллы разрушаются. Ферменты гидролизуют соответствующие белки и происходит разрушение матрицы. Продукты распада белков матрикса и ГАП постулают в кровь, которая доставляет в остеобласты кальций и фосфор, происходит восстановление органического и минерального состава костной ткани.

2.5 РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА, МИНЕРАЛИЗАЦИИ И ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ.

Кость состоит из так называемых основных многоклеточных единиц ремоделирования, ответственных за локальные формообразование и местные концентрации кальция и фосфора. В составе таких единиц имеются моноклеарные потомки недифференцированных мезенхимальных клеток - остеобласты. Они синтезируют коллаген I типа, располагают рецепторами паратгормона и ответственны за отложение органического остеоида и его последующую минерализацию. Маркером их активности служит секретируемый ими фермент - щелочная фосфатаза. Минерализация обеспечивается при участии минорных неколлагеновых кальций-связывающих белков остеобластов, которые содержат остатки α -карбоксиглутаминовой кислоты, фиксирующей кальций. К ним относятся остеокальцин и мофогенетический белок кости (матриксный кабоксиглутамил-содержащий белок, Gla-протеин матрикса). Карбоксиглутаминирование обоих белков зависит от витамина K. Остеокальцин уникален для костей и зубов и его уровень в крови отражает скорость остеогенеза.

Параллельно, через тромбоспондин, остеоонектин и остеопонтин, эти фиксаторы кальция (и магния) закрепляются на коллагеновой матрице. Окружая себя минерализованным остеоидом, остеобласты превращаются в остеоциты, цитоплазма которых образует отростки, через гаверсовы каналы остеоида связанные с соседними остеоцитами. Остеоциты участвуют в локальной перилакунарной деструкции кости и могут влиять на быстрые колебания уровня кальция в крови. Однако, основную остеолитическую

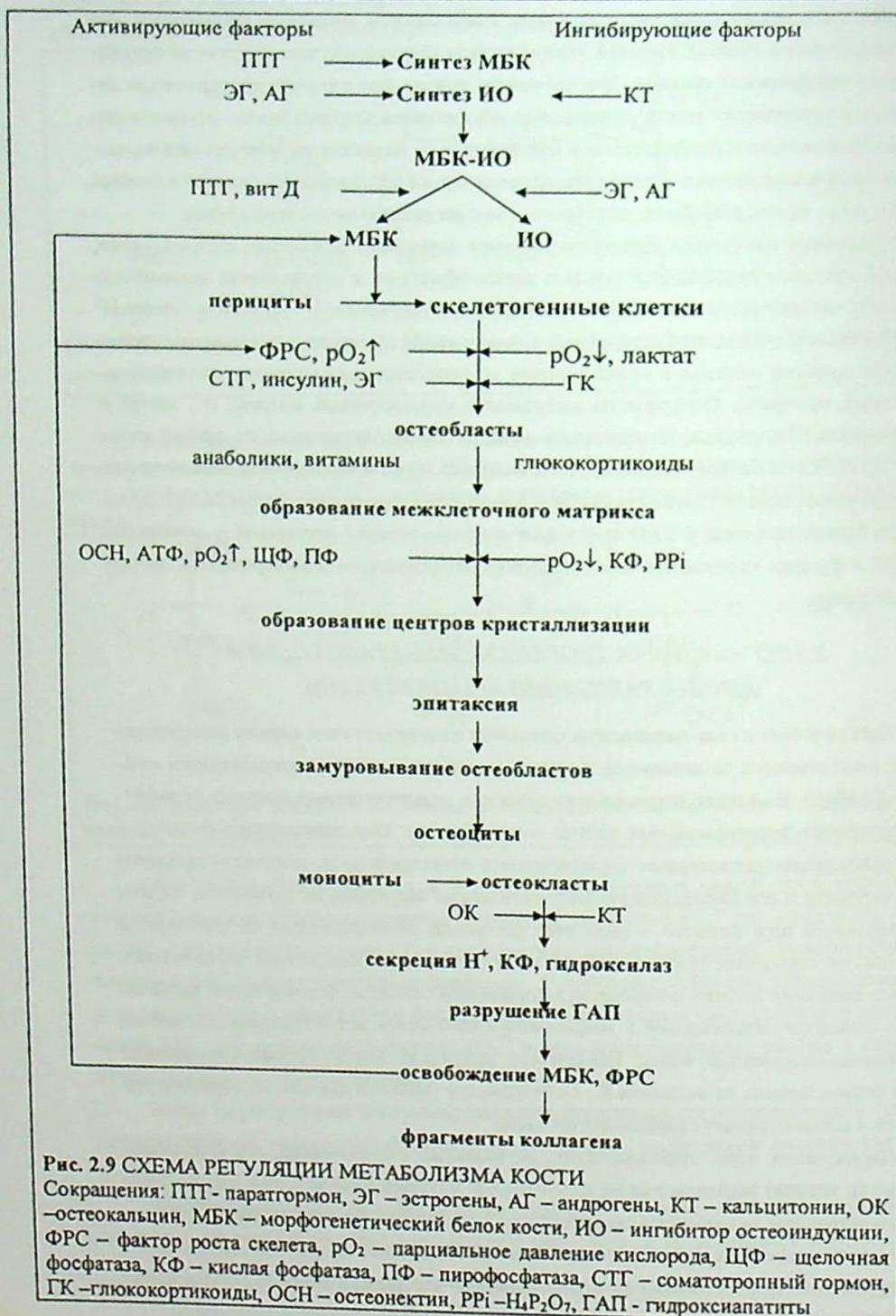


Рис. 2.9 СХЕМА РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА КОСТИ

Сокращения: ПТГ - паратгормон, ЭГ - эстрогены, АГ - андрогены, КТ - кальцитонин, ОК - остеокальцин, МБК - морфогенетический белок кости, ИО - ингибитор остеоиндукции, ФРС - фактор роста скелета, pO_2 - парциальное давление кислорода, ЩФ - щелочная фосфатаза, КФ - кислая фосфатаза, ПФ - пирофосфатаза, СТГ - соматотропный гормон, ГК - глюкокортикоиды, ОСН - остеоонектин, PРi - $H_4P_2O_7$, ГАП - гидроксипатиты

функцию в единицах ремоделирования кости выполняют потомки моноцитов – гигантские многоядерные макрофаги костей – остеокласты. Остеокласты перемещаются и образуют в участках резорбируемой кости, в особых лакунах Хоушипа, активный слой, прикрепляясь через специальный адаптер – $\alpha\beta_3$ -интегрин – к остеопонтину. Они выделяют на своей активной гофрированной каёмке коллагеназу и маркерный фермент – кислую фосфатазу, лизируя минерализованный остеоид и растворяя кристаллы гидроксиапатита. Для этого, с помощью специальных протонного АТФазного насоса и карбоангидразы 2 типа, ими локально создаётся зона кислого pH=4. Молодой неминерализованный остеоид устойчив к их действию. Повреждённая кость при воспалении резорбируется ими и заменяется остеобластами на новую. Молодые остеокласты имеют рецепторы парат-гормона и кальцитонина, но на зрелых остаются лишь последние. Нет у них и рецепторов кальцитриола. Дифференцировка остеокластов зависит от гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора, интерлейкина ИЛ-6 и паратгормона.

Остеобласты и остеокласты функционируют согласованно (рис 2.9), что приводит к обновлению всего кальция костей за период, примерно, в 5-6 лет. Рост костей в длину зависит от энхондрального образования костной ткани на месте метаэпифизарного хряща, а в ширину (толщину) – от периостального окостенения.

Костная ткань находится под контролем многих гормонов. Так, *СТГ, пролактин, инсулин и андрогены* способствуют синтезу остеоида. *Инсулин* стимулирует пролиферацию клеток и синтез в них КЛ1 и НКБ. Потенцирует действие фактор роста скелета (ФРС). (Установлено, что инсулин – необходимый компонент всех сред для культивирования клеток и тканей, т.е. роль в репликации и росте клеток несомненна). *Глюкагон* стимулирует секрецию кальцитонина (КТ). *Глюкокортикоиды* снижают в костях синтез коллагена, а также, препятствуя действию КТ в кишечнике и, уменьшая почечную реабсорбцию кальция, способствуют потере этого иона и остеопорозу. *Эстрогены* способствуют синтезу остеоида и отложению кальция в костях, как опосредованно через главные регуляторы кальциевого обмена, так и непосредственно. *Андрогены* (наиболее активный представитель – тестостерон) вызывают общий анаболический эффект. Индуцируют синтез белка в хондроцитах хрящевой зоны роста и в остеобластах, что сопровождается задержкой Ca^{2+} и PO_4^{3-} и увеличением массы костной ткани. Анаболический эффект тестостерона оптимально проявляется в присутствии гормона роста. Тестостерон усиливает синтез ингибитора остеоиндукции. Поэтому наступление половой зрелости тормозит рост скелета (в длину). *Эстрогены* (наиболее активный гормон – $17-\beta$ -эстрадиол- E_2) обладают общим анаболическим действием. В остеобластах, обладающих специфическими рецепторами к E_2 , возрастает синтез КЛ1, активность ЦФ и, в меньшей степени, повышается синтез остеопонтина. Особенность действия E_2 , по сравнению с андрогенами, заключается в чрезвычайно активной стимуляции дифференцировки хондрогенных клеток в хондроциты в хрящевой зоне роста. Данный феномен обуславливает закрытие ростовых зон, раннюю минерализацию и интраскелетную оссификацию. Следовательно, в период полового созревания происходит остановка роста

скелета.

Мощными паракринными стимуляторами остеогенеза служат различные факторы роста (фибробластов, тромбоцитов, а также трансформирующий и инсулиноподобный). Резорбция кости стимулируется, через простагландины, такими паракринными регуляторами, как интерлейкин-1 (ИЛ-1), кахексин, лимфотоксин и γ -интерферон. Цитокины - интерлейкин-1 и γ -интерферон (γ -ИФ) оказывают влияние следующим образом: ИЛ-1 - белок-митоген индуцирует пролиферацию преosteобластов и синтез osteобластами двух белков: остеопонтина и остеокальцина, последнего - в большей степени. γ -ИФ белок ингибирующий действие ИЛ-1. К факторам роста относят фактор роста эпидермиса (ФРЭ), инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 (ИФР-1; ИФР-2). Эти белки-митогены стимулируют пролиферацию предшественников osteобластов и синтез osteобластами КП1 и НКБ.

Но решающей остаётся регуляция с помощью кальцитонина, кальцитриола и паратгормона.

Паратгормон способен осуществлять в организме следующие эффекты, определяющие ход вышеописанных процессов:

- Стимуляцию второго гидроксилирования витамина D в почках, превращающего этот прогормон в активный гормон 1, 25-дигидроксивитамин D. Кальцитриол - не полный синергист действия паратгормона. Он, подобно паратгормону, стимулирует нарастание содержания кальция и магния в плазме, но, в отличие от паратиреокальцитрина, задерживает фосфаты.
- Активацию остеокластов, остеолиза и освобождения кальция из костей. Гормон способствует появлению у молодых остеокластов специфической гофрированной каймки, с помощью которой они резорбируют костное вещество, а также, в более отдалённые сроки, увеличивает само количество остеокластов, ускоряя их дифференцировку из моноцитов. Гормон стимулирует остеолиз глубокими остеоцитами. В последнее время показано, что активирующее действие гормона на зрелые остеокласты носит непрямой характер. Оно паракринно опосредовано цитокинами, выделяемыми в ответ на гормон в osteобластах и фибробластах (ИЛ-1, кахексином и лимфотоксином, а также, возможно, ИЛ-6 и гранулоцитарно-моноцитарным колониестимулирующим фактором). Параллельно этому, паратгормон, через osteобластические рецепторы, стимулирует и остеогенез. При высоких концентрациях гормона преобладает стимуляция остеолиза, при низких - остеогенеза. Периодические курсовые воздействия небольших доз паратгормона оказывают анаболический эффект на костную ткань.
- В целом, паратгормон способствует отрицательному костному балансу, то есть соотношению темпов остеогенеза и остеолиза, с преобладанием последнего, показателем чего служат наблюдаемые при гиперпаратиреозе повышение выведения оксипролина и сиаловых кислот с мочой. Кальцитриол действует синергично с паратиреокальцитрином, а 24,25-дигидроксивитамин D (секальциферол) стимулирует остеогенез.

- Усиление экскреции фосфата с мочой; это сопровождается также понижением реабсорбции сульфата, бикарбоната, натрия, хлоридов и аминокислот. В силу подобных эффектов, парат-гормон способствует развитию выделительного ацидоза. Кальцитриол выступает частичным антагонистом и частичным синергистом паратиреокартина, задерживая и фосфат, и кальций.
- Увеличение всасывания кальция (магния) в ЖКТ. Этот эффект, по-видимому, отчасти, опосредован через кальцитриол, который действует аналогично, но, вдобавок – способствует ещё и абсорбции фосфатов.

У паратгормона существует гормональный физиологический антагонист, реципрокно влияющий на кальций-фосфатный метаболизм, это гормон С-клеток щитовидной железы – кальцитонин (КТ). Кальцитонин – пептид из 32-х аминокислот, из которых 7 остатков на аминоконце замкнуты дисульфидной связью в кольцо. Гормон синтезируется из прокальцитонина. Кальцитониновые рецепторы находятся в остеокластах, а также в клетках почек и ЖКТ. Эффекты кальцитонина сводятся к тому, что:

- подавляется резорбция костного вещества остеокластами (при длительном действии нарушается остегенез остеобластами);
- подавляется реабсорбция кальция и фосфата (а также Na^+ , Mg^{2+} , K^+) в почках;
- возможно тормозит активацию макрофагов

24,25(OH)₂D₃ - 24,25-дигидроксиолекальциферол, один из активных метаболитов холекальциферола - (витамина D₃), рассматривается в настоящее время как стероидный гормон. Образуется в митохондриях клеток почек, костей, хрящей, тонкого кишечника и плаценты при гидроксировании метаболита 25(OH) D₃ по 24 атому углерода. В хрящевой зоне роста эпифизов стимулирует пролиферацию и дифференцировку хондрогенных клеток, содержащих специфические рецепторы для данного соединения. По некоторым данным, 24,25(OH)₂D₃ стимулирует синтез коллагена остеобластами. Характер биологического эффекта зависит от природы клетки-мишени:

- в молодых остеобластах - усиление синтеза КЛ1, активация щелочной фосфатазы, увеличение скорости дифференцировки;
- в зрелых остеобластах и остеоцитах - уменьшение активности ЩФ, синтеза коллагена, усиление синтеза ОК и продукции цитрата;
- в моноцитах - стимуляция дифференцировки в макрофаги и остеокласты, активация синтеза лизосомальных ферментов;
- в макрофагах- стимуляция дифференцировки в остеокласты,
- в Т-лимфоцитах - увеличение продукции лимфокининов, усиливающих дифференцировку моноцитов и макрофагов в остеокласты,
- в остеокластах рецепторов к кальцитриолу нет.

В почках: в проксимальных канальцах происходит стимуляция реабсорбции PO_4^{3-} , а в дистальных - Ca^{2+} . Механизмы процессов аналогичны тем, которые реализуются в энтероцитах.

Витамин А (ретинол) - непосредственно, а также, в большей мере, в форме метаболита - ретиноевой кислоты (гормона) активирует пролиферацию и дифференцировку хондрогенных клеток в хрящевой зоне роста эпифизов, синтез хондроитинсульфатов протеогликанов; усиливает задержку SO_4^{2-} , Ca^{2+} , PO_4^{3-} .

Действие витаминов С и K_1 связано с созреванием коллагена, и γ -карбоксилированием ОК.

Механизмы регуляции анаболических и катаболических путей тесно взаимосвязаны и призваны сохранить баланс и стабильность обмена как органических веществ, в первую очередь - белков, так и минеральных компонентов, обеспечивая константы $[\text{Ca}^{2+}]$ и $[\text{PO}_4^{3-}]$ в крови.

Гипофиз, щитовидная железа и половые железы оказывают глубокое влияние на обмен веществ и формирование костной системы. При выпадении функции гипофиза или щитовидной железы тормозится рост и развитие, нарушаются процессы дифференциации, что ведет к карликовости. Введение гипофизарных гормонов усиливает отложение кальция.

2.6 ВЛИЯНИЕ ПИТАНИЯ.

Значение введения кальция и магния в костеобразовании общеизвестно. Недостаточное белковое питание вызывает уменьшение образования мукопротеидов, что ведет к нарушению процесса костеобразования. Многие витамины влияют различным образом на костеобразование. При недостаточном поступлении в организм витамина А тормозится деятельность остеобластов и уменьшается включение S^{35} и P^{32} в состав костной ткани. Недостаток аскорбиновой кислоты ведет к полному прекращению пролиферации остеобластов и тем самым к уменьшению образования органического основного вещества. Падает содержание щелочной фосфатазы. Недостаток витамина Д приводит к рахиту.

ГЛАВА 3 БИОХИМИЯ ТКАНЕЙ ЗУБА.

Известно, что в построении зуба принимает участие три вида плотных тканей: эмаль, дентин и цемент. Эти ткани в зубе имеют различную локализацию. Кроме того, имеется зубная пульпа, похожая на костный мозг. Эти составные части отличаются друг от друга своим химическим составом (см. таблицы № 2.1, 2.2, 3.1) и гистологическим строением. Существует значительная разница между молочными и постоянными зубами.

3.1 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭМАЛИ.

Таблица 3.1

Химический состав эмали и дентина (в процентах от сухой массы).

	Ca	P	Mg	CO ₂	Органическое вещество
Эмаль	36	17	0,45	2,5	1,3
Дентин	27	13	0,4	3,3	20

Эмаль составляет до 20—25% зубной ткани и расположена только в области коронки зуба. Эмаль представляет собой самую плотную субстанцию и образует кристаллическую плотную структуру. По сравнению с другими тканями зуба эмаль содержит ничтожное количество воды и органического вещества. В качестве минеральной составной части зуба служат кристаллы гидроксиапатита размером 400-1600 А, которые располагаются тонкими пучками и проходят параллельно или под острым углом к общей оси. Такие пучки, похожие на призму, образуют своеобразные микрокристаллы. Органическое основное вещество эмали содержит особые белки — амелогенин и знамлин. В эмали находят также цитрат (0,1%). Эмаль образуется специфическими клетками адамантобластами (амелобластами), которые встречаются в органической матрице в виде перышек. Состав эмали различен. Эмаль коренных зубов отличается большой плотностью и содержит соответственно меньше азота, чем эмаль резцов. Эмаль молочных зубов содержит много азота и не отличается другими особенностями. Отложение минеральных веществ начинается вдоль амелодентинального соединения. Повышение содержания минералов сопровождается снижением количества воды и белка.

Структура минеральных компонентов эмали.

«Биологическими» минералами тканей зуба, как и кости являются апатиты Ca₁₀(PO₄)₆X₂, где X представлен анионами OH⁻ (гидроксиапатит - ГАП) или F⁻ (фторапатит - ФАП). ФАП - чрезвычайно распространенный в природе материал, однако в минеральной фазе твёрдых тканей встречается в малом количестве (<0,7%), ГАП - весьма редко встречаемый в неживой природе, в биологических объектах является главным компонентом минеральной фазы твёрдых тканей (≈ 75%).

Идеальный, или модельный ГАП образует кристаллы в виде гексагональных призм, значительно различающихся между собой по размерам (в 200 раз) в эмали и дентине.

Каждый кристалл ГАП покрыт водной оболочкой (гидратный слой) толщиной ~ 1 нм. Сами кристаллы отделены друг от друга пространством \approx в 2,5 нм.

Строгого соответствия между гексагональными призмами разных кристаллов нет, из-за включения в апатиты других ионов: фторида, хлорида, карбоната, магния и др. Они нарушают жесткое соответствие пространственных размеров, определяемое ионными радиусами между ионами ГАП и вышеуказанными ионами, встраивающимися в ионную решетку в ходе реакций обмена.

Обмен ионов в ионной решетке ГАП.

Так как замещающие ионы никогда не совпадают по всем параметрам с замещаемыми принято говорить о несовершенном изоморфизме или «изоморфном замещении».

Наиболее часто встречаются следующие варианты обмена ионов:

1. Ca^{2+} замещается катионами Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mo^{2+} , реже Mg^{2+} , Pb^{2+} . Катионы Ca^{2+} поверхностного слоя кристаллов, могут на короткое время замещаться катионами K^+ , Na^+ .
2. $(\text{PO}_4)^{3-}$ обменивается с $(\text{HPO}_4)^{2-}$, $(\text{CO}_3)^{2-}$. В поверхностный слой кристалла вместо фосфат-аниона может войти цитрат.
3. $(\text{OH})^-$ замещается анионами галогенов (Cl^- , F^- , I^- , Br^-).

Реакции внутрикристаллического обмена ионов протекают очень медленно и условно подразделены на 3 стадии:

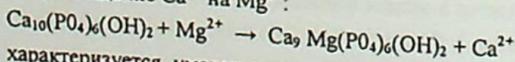
На *I стадии* - осуществляется обмен ионов между окружающей биологической жидкостью и гидратной оболочкой кристаллов. Некоторые ионы (K^+ , Cl^-) только заходят в гидратный слой и легко его покидают, чаще всего не проникая в кристаллы. Другие ионы (Na^+ , F^-) также легко проходят в гидратную оболочку и, не задерживаясь, проникают в поверхностные слои кристалла. Продолжительность первой стадии - несколько минут, механизм - простая диффузия.

II стадия - обмен между ионами гидратного слоя и поверхностью кристаллов ГАП. Ионы гидратного слоя способствуют изменению заряда, приводя поверхность кристаллов в уравновешенное состояние. В поверхность кристаллов в течение нескольких часов проникают ионы Ca^{2+} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , Sr^{2+} , F^- и др.

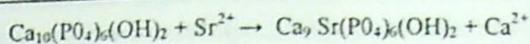
На *III стадии* происходит внедрение ионов с поверхности кристаллов вглубь ионной решетки, продолжительность процесса - от нескольких дней до нескольких месяцев. Во внутреннюю часть кристалла проникают немногие ионы: Ca^{2+} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , Sr^{2+} , F^- . Решающими факторами скорости и масштаба обмена ионов являются концентрации ионов, ионный радиус и продолжительность взаимодействия ионов.

Обмен ионов, протекающий в живом организме, в ионной решетке ГАП изменяет его свойства, в том числе, прочность, и существенно влияет на рост кристаллов.

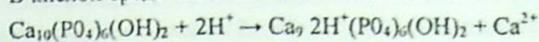
Так, замещение Ca^{2+} на Mg^{2+} :



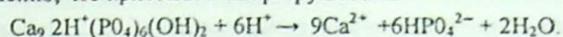
характеризуется уменьшением молярного соотношения Ca/P , снижением резистентности кристаллов к неблагоприятным воздействиям физического и химического характера. Аналогичное изменение молярного коэффициента Ca/P и свойств ГАП возникает при вытеснении Ca^{2+} ионами Sr^{2+} .



В кислой среде ионы Ca^{2+} начинают замещаться катионами H^+ по схеме:

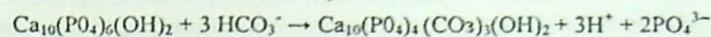


Так как ионы H^+ во много раз меньше катиона Ca^{2+} замещение настолько несовершенено, что кристалл ГАП разрушается.

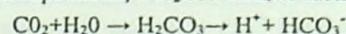


Видно, что во всех случаях нарушаются прочностные характеристики кристаллов и, соответственно, минерализованных тканей. Так в регионах, где вода и почва, а следовательно пища, богаты Sr наблюдаются патологические переломы костей у людей и животных.

Хрупкость кристаллов возрастает и при замене фосфат-аниона апатитов. Чаще всего они замещаются ионами HCO_3^- по схеме:



Интенсивность процесса зависит от общего числа бикарбонатов в организме. Анионы HCO_3^- образуются за счет взаимодействия CO_2 , получаемого в реакциях декарбонирования, и H_2O . Реакция катализируется карбоангидразой (КА).



Из рисунка видно, что общее количество HCO_3^- , и, следовательно, вероятность формирования карбонатапатитов зависит от пищевого рациона и интенсивности стрессовых перегрузок. С возрастом количество карбонатапатитов увеличивается.

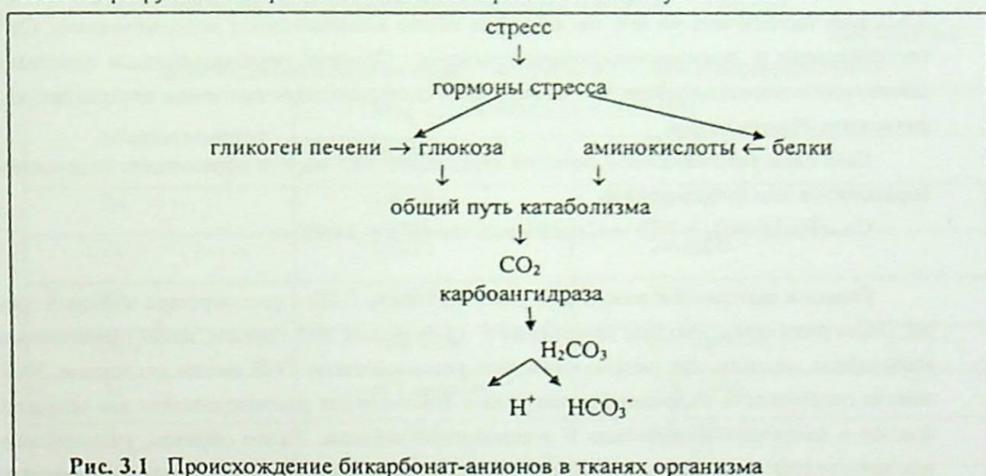


Рис. 3.1 Происхождение бикарбонат-анионов в тканях организма

Карбонатапатиты эмали имеют двойственное происхождение. В непосредственной близости от эмалево-дентинной границы они образуются за счет общего пула HCO_3^- и за счет продукции HCO_3^- одонтобластами, в которых, благодаря архитектоники дентина, достаточно O_2 для активных аэробных процессов, основных поставщиков CO_2 .

В поверхностных слоях эмали карбонатапатиты образуются за счет деятельности микрофлоры зубного камня, которая создает большие количества HCO_3^- . В результате

в этих участках $[\text{HCO}_3^-]$ настолько превышает, $[\text{PO}_4^{3-}]$, что возможен процесс замещения.

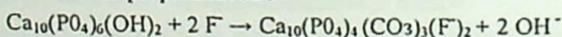
Накопление карбонатапатита свыше 3-4% от общей массы ГАП снижает кариезрезистентность эмали.

Поверхностное замещение PO_4^{3-} на ионы AsO_3^- или AlO_3^{2-} также приводят к дестабилизации ГАП (например при использовании препаратов As и Al, аллюминиевой посуды, экологических аномалиях).

Следовательно реакции замещения Ca^{2+} или PO_4^{3-} другими ионами, как естественными для живой природы, так и чуждыми ей, неблагоприятно влияют на ГАП как путем дестабилизации его структуры, так и в последующем, путем нарушения направленного роста кристаллов (эпитаксии) ГАП в минерализованных тканях. Реакции изоморфного замещения значительно интенсифицируются при состоянии дефицита в организме Ca^{2+} и PO_4^{3-} , который возникает при недостаточном поступлении этих соединений с пищей или из-за нарушения их всасывания в тонком кишечнике. Наоборот, под влиянием рационов, обогащенных солями кальция, повышается выведение из организма антагонистов Ca^{2+} , в частности, Sr^{2+} . Следует подчеркнуть, что возможность вытеснения изоморфного иона в кристаллической решетке ГАП кальцием или занятие последним вакантных мест за счет повышения концентрации Ca^{2+} в окружающей среде, используется для разработки и проведения реминерализующей терапии эмали.

Реминерализация предусматривает занятие вакантных мест в ионной решетке ГАП или вытеснение из нее изоморфных ионов повышенными концентрациями Ca^{2+} содержащими в реминерализующих растворах. Процесс реминерализации протекает длительно и многостадийно, что объясняется особенностями динамики внутрикристаллического обмена ионов.

Еще одна разновидность реакций замещения: HO^- на F^- и образование гидроксифторофосфатов или фторофосфатов.



Реакции замещения повышают резистентность ГАП к растворению в кислой среде. Подчеркивается, что при замещении F^- даже одной HO^- группы, из 50 теоретически возможных, происходит резкое снижение растворимости ГАП эмали кислотами. Указанная особенность гидроксифторофосфата и фторофосфата рассматривается как ведущий фактор в лактическом действии F^- в отношении кариеса. Таким образом, изоморфного замещения HO^- в ионной решетке ГАП фтором, т.е. фторирование, оказывает защитный эффект, способствуя формированию кристаллов ГАП, за счет усиления преципитации и увеличения их размеров. Важно, что положительное действие оказывают только низкие концентрации фтора. При действии высоких концентраций F^- на ГАП, реакция протекает иначе, и формируется малорастворимый фторид кальция (флюорид), который быстро исчезает с поверхности зубов (эмали) при значении pH среды > 7 .

Заблевание зубов и костей, развивающееся при избыточной концентрации F в воде и почве и сопровождающееся разрушением ГАП называется флюороз.

Макро- и микроэлементы в твердых тканях зуба.

Преобладающим минеральным компонентом твердых тканей зуба являются кристаллы гидроксиапатита ($\geq 75\%$). Содержание остальных апатитов колеблется от долей %, до нескольких процентов (табл. 3.2) и зависит от многих факторов.

Наиболее выраженные особенности минерального состава твердых тканей, выявленные методом рентгенодифракционного анализа, заключаются в следующем:

а) молярное соотношение Ca/P в минерализованных тканях вариабельно и колеблется в диапазоне между 1,5 и 1,7; в наибольшей степени - в эмали;

б) некоторая часть Ca^{2+} , PO_4^{3-} и CO_3^{2-} находится в аморфном состоянии в виде: восьмикальциевого фосфата пентагидрата - $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, кальция гидрофосфата дигидрата (брушита) - $\text{CaHP}_0_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; кальция гидрокарбоната $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$.

Внутри ионной решетки апатитов могут кратковременно возникать вакантные места. В результате нарушаются соотношения зарядов «+» и «-» в кристалле.

Образование вакансий приводит практически к моментальной абсорбции на кристалле соответствующих ионов. Так как разнообразие ионов в живых организмах велико, то в минерализованных тканях в поверхностном слое апатитов встречаются ионы, отсутствующие в модельных ГАП: CO_3^{2-} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , F^- и ионы микроэлементов.

Причины возникновения вакантных мест:

- Промежуточный этап формирования кристаллов.
- Вымывание ионов из сформированных кристаллов ($\text{H}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$).

Таблица 3.2

Количественный состав микроэлементов в минерализованных тканях:

Микроэлементы	Мг/г сухой ткани (1:1 000 000)*	
	Эмаль	Дентин
Ba	0,8-13	10-100
Fe	1,0-20	10-1000
Pb	1,3-6,6	1-10
SO_4^{2-**}	100-1000	нет данных
Si	нет данных	100-1000
Sr	26-280	70-620
Zn	90-400	10-1400

* - микроэлементы, концентрация которых в твердых тканях < 100 мг/г: Ag, Al, As, Au, Cd, Mn, Se, Ti, V, W.

** - в гликозаминогликанах.

Апатиты минерализованных тканей обладают огромной суммарной поверхностью, что позволяет им сорбировать не только заряженные частицы, но и электронейтральные молекулы.

В эмали, по сравнению с другими твердыми тканями, отмечается наиболее высокая концентрация Ca^{2+} и PO_4^{3-} . Количество почти всех минеральных элементов в этой ткани уменьшается в направлении от поверхности к эмалево-дентинной границе. Поверхностный слой эмали, таким образом, является гиперминерализованной зоной с максимальной концентрацией F, достигающей 5 г/кг. Количество фтора жестко коррелирует с его содержанием в питьевой воде. Высокую концентрацию F в поверхностном слое эмали рассматривают как фактор, обеспечивающий ее резистентность к кариесу.

В более глубоких слоях эмали концентрация F снижается, но возрастает соотношение Ca/P, поскольку ближе к эмалево-дентинной границе возрастает количество карбонатапатитов.

Содержание в эмали Mg^{2+} , Na^+ и Cl^- несколько меньше, чем в дентине, и увеличивается во внутренних слоях эмали. Так, концентрация Mg^{2+} на границе с дентином почти втрое выше, чем в поверхностном слое.

Минеральный компонент эмали отличается от других твердых тканей не только составом элементов, но и размерами и формой кристаллов апатитов. В эмали кристаллы ГАП мельче, имеют игольчатую форму и плотнее упакованы.

Органические компоненты эмали

Таблица 3.3

Содержание органических веществ в эмали (в процентах от сухой массы)

	Премоляры-моляры	Резцы-клыки
Нерастворимые белки	0,3-0,4	0,2-0,25
Растворимые белки	0,05	0,05
Жиры	0,6	0,6
Цитраты	0,1	0,1
Всего	1,0-1,1	0,9-1,0

Органические вещества распределены в эмали топографически неравномерно. В полностью минерализованном зубе больше всего их содержится в области эмалево-дентинного соединения, в эмалевых веретенах, пучках и полосах Гунтера-Шрегерера. Полагают, что межпризменные пространства в сформированной эмали содержат органические вещества, преимущественно белки.

После мягкой деминерализации межпризменные пространства остаются в виде сеточки с пустотами на местах деминерализованных призм. Эмалевые призмы на поперечном срезе имеют разную форму: аркадную, овальную, реже гексагональную. Как известно, уникальные свойства любых белков, в том числе иницирующих минерализацию, определяются главным образом количеством и последовательностью определенных аминокислот в полипептидной цепи.

Установлены химическая природа и множественность белков эмали. Раньше считали, что белок эмали представлен коллагеном либо кератином, так как он содержит гидроксипролин и имеет β -складчатую структуру. Однако сейчас установлено, что в

эмали зуба содержатся специфические белки, преимущественно амелогенин и энамелин

Амелогенины и энамелины являются гликофосфопротеинами. Первые содержат 0,6-0,9% сиаловых кислот, 0,2-0,4% галактозамина, 0,12-0,14% глюкозамина, вторые - 2,8-4,7% сиаловых кислот, 1,1% галактозамина, 2,6-3,2% глюкозамина. Фракция амелогенина из матрикса эмали плода содержит около 75% всего органического фосфата, а фракция энамелина - 25%. Эти белки негомогенны. При дальнейшем фракционировании методом электрофореза амелогенин разделяется на 5 фракций с молекулярной массой (округленно) 25, 15, 9,5, 7,5, 6 кДа. Для энамелина установлено, что, очевидно, высокомолекулярные фракции (56, 42, 21 кДа) являются полимерами низкомолекулярных (8 и 13 кДа) фракций. По мере созревания эмали изменяется соотношение между высокомолекулярными и низкомолекулярными фракциями энамелина в результате деградации крупных молекул до более мелких.

Кроме амелогенина и энамелина, методом электрофореза в ПААГ выделены из белка эмали плода коровы еще фосфопротеин E₃, состоящий из 46 аминокислот и фосфопротеин E₄, состоящий из 43 аминокислот. У обоих белков молекулярная масса около 5-6 кДа. Аминокислотный спектр этих фосфопротеинов почти не различался. Оба белка содержат по три остатка фосфосерина. Гидроксипролин и гидроксизин отсутствуют.

Неколлагеновые белки эмали участвуют в первичной нуклеации кристаллов гидроксиапатита в двух направлениях: во-первых, инициируя минерализацию и, во-вторых, регулируя ее, в частности путем ингибирования инициации минерализации.

Механизм кристаллизации эмали заключается в следующем. Сначала происходит первичное связывание ортофосфата гидроксильной группой остатка серина белка эмали. Остатки фосфосерина, образующиеся при этом, обнаружены в амелогенине, энамелине, фосфопротеинах E₃ и E₄. Гидроксил серина фосфорилируется ферментом протенинкиназой за счет γ -фосфата АТФ с образованием фосфосерила и АДФ. Затем происходит связывание кальция фосфатом фосфосерина либо карбоксильной группой дикарбоновой аминокислоты. Возможно дальнейшее последовательное присоединение ортофосфата и кальция с образованием первичной молекулы гидроксиапатита и с последующим ростом кристаллов гидроксиапатита по типу эпитаксии без непосредственного взаимодействия с белком.

Кристаллы гидроксиапатита ориентированы вдоль полипептидных цепей эмали. Такую ориентировку наблюдают в ультраструктурных исследованиях. Вероятно определенная ориентировка кристаллов ГАП по отношению к оси цепи белка вызывается связью кристалла с эмалью несколькими кальциевыми мостиками.

Особенностью белка эмали является его способность образовывать комплексы с липидами. Р. Prout и соавт. (1976) нашли в эмали 570 мг липидов на 100 г ткани, из которых $\frac{1}{3}$ была связана с органической матрицей. Особенностью эмали является связь липидов именно с белковой матрицей, так как значительная часть жиров может быть экстрагирована лишь после предварительной деминерализации эмали. Эмаль - это

единственная минерализованная ткань, минерализация которой сопровождается увеличением количества липидов. Липиды в эмали, возможно, находятся в прочной химической связи с ее органическими и минеральными компонентами, выполняя роль «мостиков» между ними.

Помимо инициации минерализации белки эмали играют и регулирующую роль, например амелогенин 27 кДа ингибирует осаждение кристаллов ГАП.

Для понимания молекулярной организации эмали используют классификацию белков, предложенную в работах К.С. Десятниченко в 1974-1977 годах. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле, белки эмали разделили на 3 группы:

1. белки, нерастворимые в этилен-диаминтетрауксусной кислоте (ЭДТА) и соляной кислоте (НСI),
2. кальцийсвязывающие белки эмали (КСБЭ),
3. водорастворимые белки эмали.

На основании исследования химического состава и свойств компонентов эмали предложена молекулярно-функциональная модель ее структуры, по которой основой для формирования эмали является белковая матрица. Субъединицы этой структуры представлены Ca^{2+} -связывающим белком эмали (КСБЭ) с молекулярной массой 20 000, способным в нейтральной среде образовывать нерастворимый комплекс с Ca^{2+} . Причем мономеры белка образуют агрегаты типа ди-, три- и тетрамеров с молекулярной массой 40000 - 80000. Один моль КСБЭ способен связать 8-10 ионов Ca^{2+} . В кислой среде комплекс распадается, в результате чего освобождается мономерный белок (КСБЭ).

Установлено, что в образовании агрегатов КСБЭ важное значение имеют фосфолипиды, но их роль отличается от роли Ca^{2+} . Предполагается, что фосфолипиды играют роль мостика между агрегатом КСБЭ и минеральной фазой, а также принимают участие в образовании комплекса КСБЭ.

Исходные водорастворимые субъединицы КСБЭ путем присоединения Ca^{2+} и мультиплицированием связи белок- Ca^{2+} -белок образуют нерастворимую в воде белковую матрицу эмали. Таким образом, строится трехмерная сетка эмали, состоящая из субъединиц, соединенных между собой Ca^{2+} -мостиками.

Связь минерального и белкового компонентов через Ca^{2+} может осуществляться за счет карбоксильных групп остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот в белках, что не исключает возможности присоединения Ca^{2+} к фосфату фосфосерила или фосфолипидов.

Длина субъединиц КСБЭ, состоящих из 160-180 аминокислотных остатков, около 25 нм. Это примерно соответствует длине основного кристалла эмали - гидроксиапатита. Соизмеримость кристаллов гидроксиапатита и субъединиц КСБЭ создает возможность их широкого связывания. Поскольку молекула КСБЭ эмали может связывать 8-10 ионов Ca^{2+} , очевидно, одна часть групп используется на создание белковой трехмерной матричной сетки через Ca^{2+} -мостики, а другая - на взаимодействие этой сетки с минеральной фазой - гидроксиапатитом эмали (рис.3.3).

Вероятно, связанные с матрицей ионы Ca^{2+} служат точками нуклеации, а в даль

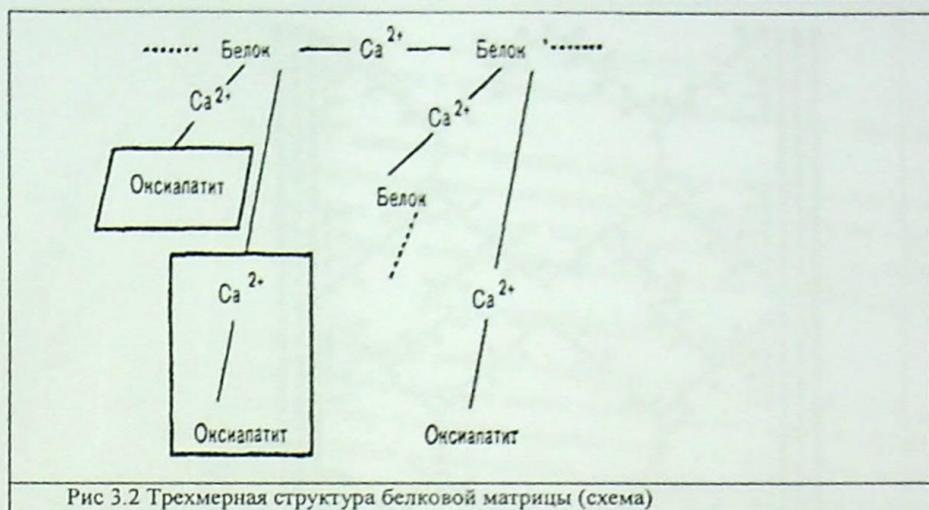


Рис 3.2 Трехмерная структура белковой матрицы (схема)

нейшем - зонами роста кристаллов гидроксиапатита, которые ориентируются в соответствии с формирующейся белковой сетью - матрицей эмали. Это обеспечивает их строго упорядоченное расположение, регулярность строения, прочность и другие свойства эмали.

Расчеты показывают, что КСБЭ может связывать не более 2,5-5% минеральных веществ эмали. Остальная часть минеральных веществ непосредственно не связана с белками, но ее формирование, ориентация и расположение в эмали уже запрограммированы белковой матрицей и связанными с ней кристаллами гидроксиапатита.

Важное значение придают и белку, не растворимому в ЭДТА и HCl. Это очень устойчивый белок, не растворимый даже в 1н HCl. Высокая устойчивость, роднящая его с коллагеном и эластином, позволяет предположить, что он выполняет роль остова, «скелета», придающего устойчивость всей структуре эмали в целом. В связи с этим в молекулярно-функциональной модели эмали нерастворимому белку отведена роль высокомолекулярного, нерастворимого остова - каркаса, с которым связана трехмерная сетка КСБЭ, соединенная с гидроксиапатитом.

Как видно из рис., нерастворимая трехмерная сетка, образованная путем агрегации субъединиц КСБЭ с помощью Ca^{2+} прикреплена, вероятно, также через Ca^{2+} к мягкому остову — белку, нерастворимому в ЭДТА и HCl. Белковая матрица непосредственно связана с гидроксиапатитом, кристаллизацию которого она инициирует. Этим достигается упорядоченность и равномерность структуры эмали.

Таким образом, белковая матрица выполняет следующие функции:

1. Белок, нерастворимый в ЭДТА и HCl, образует остов - каркас, на котором крепятся КСБЭ.
2. КСБЭ образует трехмерную, нерастворимую в нейтральной среде матрицу для минерализации путем взаимодействия мономеров белка с ионами Ca^{2+} с превращением их в нерастворимую сетку.

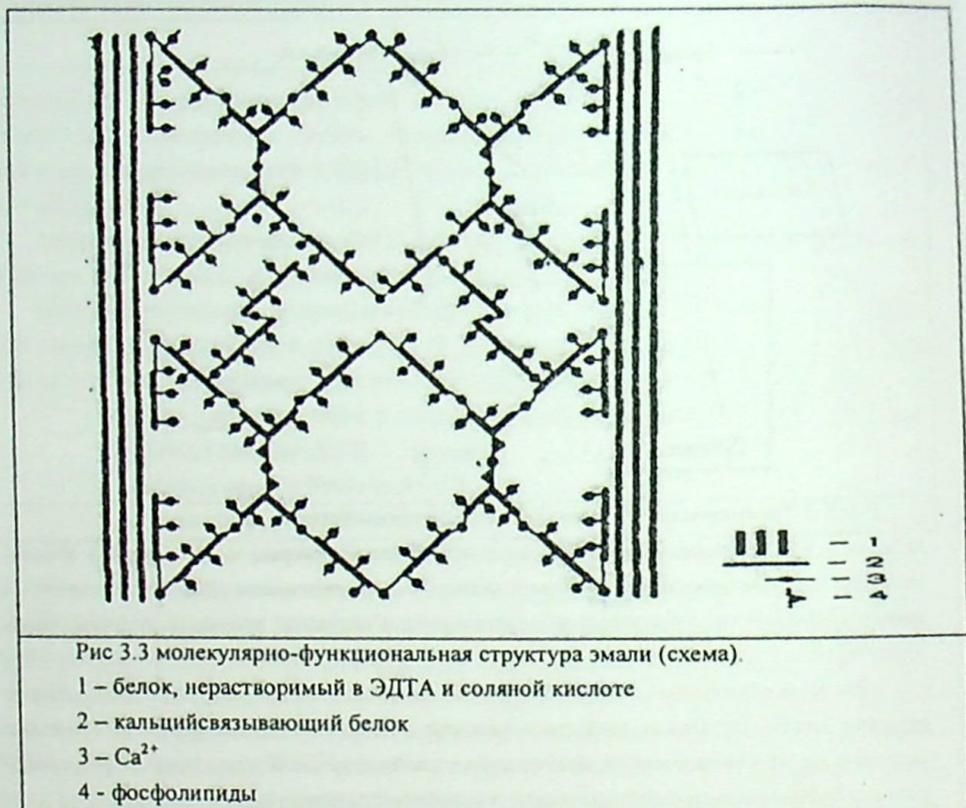


Рис 3.3 молекулярно-функциональная структура эмали (схема).

- 1 – белок, нерастворимый в ЭДТА и соляной кислоте
 2 – кальцийсвязывающий белок
 3 – Ca^{2+}
 4 – фосфолипиды

3. Функциональные группы КСБЭ (вероятно, фосфат фосфосерина и фосфолипидов, свободный карбоксил аспартата и глутамата, белковосвязанного цитрата, гидрофобные группы фосфолипидов и др.) образуют центры (ядра) нуклеации и кристаллизации.
4. КСБЭ и частично белок, не растворимый в ЭДТА и HCl , ориентируют ход кристаллизации, обеспечивая упорядоченность, регулярность и прочность новообразуемой структуры эмали.

Значение белков в эмали до настоящего времени изучено недостаточно. Большинство исследователей отводят им пассивную роль. Однако существует и другое мнение. С. Robinson и соавт. (1981), считают, что, в частности, кариесрезистентность эмали зависит от содержания в ней не только неорганических веществ, но и белка. По их мнению, «белковая сеть», окружающая апатиты, предотвращает контакт кислоты с апатитом и смягчает ее влияние. Так, в ранней стадии развития кариозного процесса (в стадии белого и пигментированного пятна) содержание белка на участке поражения увеличивается в 3-4 раза. Как следует из клинических наблюдений, пигментированное пятно в течение нескольких лет может не превращаться в кариозную полость, хотя здесь отмечается значительное уменьшение содержания кальция и фосфора (при белом пятне эти изменения менее выражены). Это является важным, хотя и косвенным, дока-

зательством роли белка в стабилизации очаговой деминерализации (кариозного процесса).

Сведения о химической структуре, свойствах и количестве белков эмали необходимы для понимания механизмов ее созревания, функционирования и нарушений при кариесе, гипоплазии эмали и других видах патологии, а также для разработки рациональной профилактики и терапии этих заболеваний, в том числе реминерализующей.

3. 2 ФОРМИРОВАНИЕ ЭМАЛИ.

Одна из особенностей развития тканей зуба состоит в том, что эмаль развивается из эктодермы, остальные же ткани имеют мезенхимальную природу. Данный факт позволяет понять, почему существуют отличия эмали, как минерализованной ткани от других минерализованных тканей организма, имеющих мезенхимальную природу.

Развитие эмали начинается вскоре после начала образования дентина. Эмаль образуется путем секреции энамелобластами содержимого гранул в межклеточное пространство. На схеме показано превращение презнамелобластов в энамелобласты и последующие стадии генеза эмали.

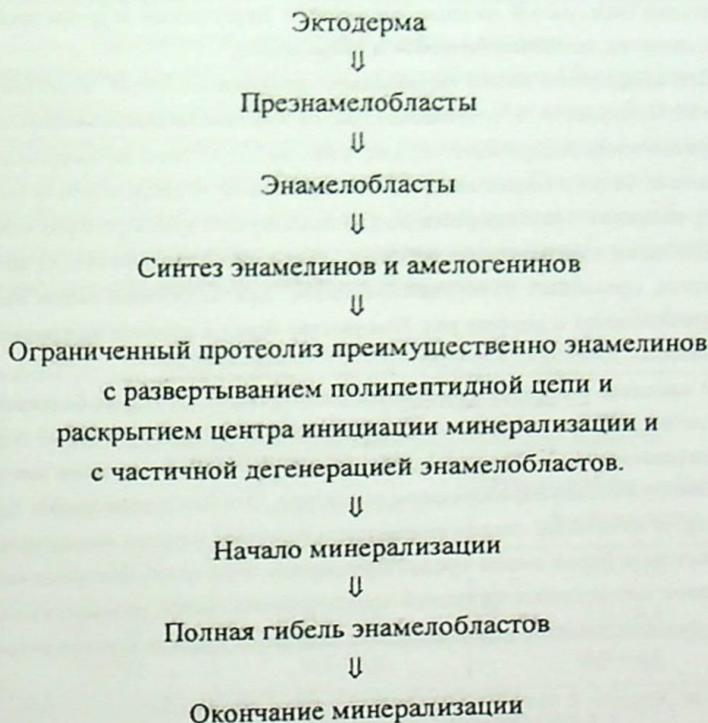


Рис. 3.4 Механизм генеза эмали

Формирование эмалевых призм происходит вне цитоплазмы энамелобластов. Новообразованная эмаль содержит большое количество белков, главным образом эмалинов и амелогенинов.

По мере созревания эмали содержание белков в ней резко уменьшается за счет ограниченного протеолиза преимущественно с раскручиванием полипептидных цепей и раскрытием центров инициации минерализации. Соотношение амелогенин/энамелин сдвигается с 9:1 на начальных стадиях формирования эмали до 1:1 к завершению ее окончательного созревания. Следовательно, по мере созревания эмали амелогенин исчезает в 10 раз быстрее энамелина.

Накапливающиеся и организующиеся в кристаллы ГАП минеральные компоненты в ходе созревания эмали вызывают отчуждение энамелобластов друг от друга, от крови, от других клеток и выключение их из метаболизма. Энамелобласты дегенерируют, погибают, и зрелая эмаль становится бесклеточной структурой, не содержащей регуляторных белков. В связи с данной особенностью в эмали не протекают процессы регенерации, а, благодаря возможности обмена ионов при контакте со смешанной слюной, осуществляется реминерализация.

Нарушения обмена в период развития, формирования и созревания зубов влияют на состав и структуру зубных тканей, и, соответственно, могут ослабить их резистентность к патологии. Ярким примером, подтверждающим сказанное, служит недостаточное питание беременной женщины и ребенка. Беременным и детям необходимо полноценное питание, особенно белковое и витаминное.

При созревании эмали кардинально меняется ее состав. Большая часть ее белка (более 90 %) теряется. У оставшихся белков изменяется аминокислотный состав вследствие увеличения содержания серина, аланина и т.д. Если на начальных этапах развития уровень белка в эмали около 20% и кристаллы гидроксиапатита полностью отсутствуют, то зрелая эмаль прорезавшегося постоянного зуба взрослого человека содержит 0,3-1,3% белка, а минеральная фаза, состоящая преимущественно из кристаллов гидроксиапатита, превышает 95%. Таким образом, при созревании эмали содержание белка в ней уменьшается в десятки раз. Количество белка в дентине на протяжении онтогенеза постоянно - 20-25%.

В процессе созревания эмали изменяется также структура белковой матрицы эмали. У эмбриональной ткани она представляет собой бесструктурный гель, содержащий лишь ограниченное количество регулярных структур, в то время как в зрелой эмали белок имеет высокоупорядоченную структуру. Эти изменения имеют функциональный характер. В начальной стадии амелогенеза белковая матрица накапливает минеральные компоненты и белки эмали предназначены для этой цели. При развитии эмали в соответствии с меняющейся функцией накапливаются белки, инициирующие минерализацию и способствующие возникновению высокорегулярной и упорядоченной структуры эмали.

3.3 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДЕНТИНА И ЦЕМЕНТА.

Минеральные элементы дентина и цемента

Наиболее важными и постоянно присутствующими элементами минеральной фазы дентина, наряду с Ca^{2+} и PO_4^{3-} , являются CO_3^{2-} , Mg^{2+} и F^- . Концентрация фтора на

границе с пульпарной полостью достигает наибольших значений и в течение жизни возрастает в 3-4 раза Mg^{2+} в дентине содержится в 2-3 раза больше, чем в эмали и в костной ткани, и максимальное его количество определяется на границе с эмалью. Концентрация Na^+ и Cl^- четко возрастает во внутренних слоях дентина. Из микроэлементов в дентине, по сравнению с эмалью, преобладают: Si, Fe, Ba; и в 2-3 раза выше концентрация Sr и Zn, но нет отличий в содержании свинца. Повышенное поступление Pb в организм связано с экологическими проблемами. Происходит накопление его в костной ткани до 90 % от поступающего вещества. Высвобождение Pb из костей является длительным процессом и вызывает хроническую интоксикацию. Свинец ингибирует активность ферментов биосинтеза порфиринов, с последующим развитием анемии и порфирии. Избыток Pb выводится со слюной, что приводит к образованию PbS, соединения темного цвета, откладывающегося в тканях десен, и появляется «свинцовая кайма».

В цементе, как в клеточнофибриллярной структуре, так и в бесклеточнофибриллярной, содержание минеральных элементов одинаково и не меняется с возрастом.

Органические вещества дентина и цемента

Клетки, формирующие цемент, называются цементобластами. Цементобласты окружены минерализованным матриксом, подобно остеоцитам. В зрелом зубе отсутствуют сосуды, цементобласты встречаются в единичных экземплярах только в нижней части, таким образом, цемент – это метаболически инертная ткань. Состав органического матрикса цемента сходен с составом костной ткани: несколько ниже количество коллагеновых и неколлагеновых белков, выше доля минеральных компонентов (см таблицы 3.4, 3.1, 2.1), процессы минерализации протекают аналогично.

Таблица 3.4

Содержание органических веществ

ткани	Количество органических веществ % от общего состава / % от органических веществ		
	Коллаген-1	протеогликаны	Неколлагеновые белки и фосфолипиды
Костная	28 / 90,3	0,2 / 0,7	2,8 / 9,0
Цемент	25 / 92,6	0,2 / 0,8	1,8 / 6,7
дентин	19 / 95	0,1 / 0,5	0,9 / 4,5

Дентин формируется одонтобластами. Эта ткань более плотная и твердая, чем цемент и кость, за счет большего, до 70 %, содержания минеральных компонентов. Одонтобласты не замуровываются в органическом матриксе в отличие от остеоцитов и цементобластов. Они постоянно находятся на поверхности, разделяющей дентин и пульпу. Новые одонтобласты формируются из паренхиматозных клеток пульпы в течение всей жизни. Таким образом, наиболее старый дентин будет располагаться на границе с эмалью, а на границе с пульпой активно идет морфогенез. Превращение мезенхималь-

ных клеток пульпы в одонтобласты регулирует белок МБК (см белки костной ткани), концентрация которого в дентине выше, чем в костной ткани.

Формирование, минерализация и распад дентина протекает так же, как в костной ткани. В то же время, дентин отличается от последней особенностями белкового состава и скоростью некоторых метаболических процессов. Так, в дентине отсутствует матричный Gla-протеин, но помимо КЛ1 и ОСН, подвергающихся минерализации в соответствии с разобранными выше схемами, присутствует специфический белок, синтезируемый одонтобластами - фосфофорин. На его долю приходится до 1% всех белков дентина, молекулярная масса - 151-1.67 кДа, в первичной структуре преобладает СЕР и АСП: 426 и 447 радикалов на 1000 АМК. Формирование первичных центров минерализации фосфофорина осуществляется, главным образом, по внутриклеточному типу, под влиянием соответствующих ферментов, согласно схеме:

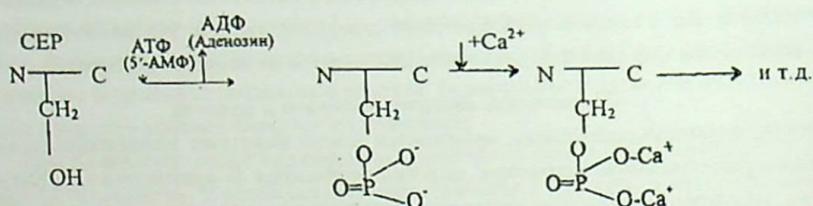


Рис. 3.5 Фиксация на серине фосфофорина остатков фосфорной кислоты и начало формирования кристаллов гидроксиапатитов

После образования центров минерализации рост кристаллов ГАП осуществляется эпитаксией.

В отличие от костной ткани, скорость обмена минеральных компонентов в дентине ниже, особенно в участках дентина, удаленных от пульпы. При внутривенном введении ^{32}P оказалось, что количество ^{32}P , участвовавшего в обмене Pi в ГАП костной ткани, близко к 100%, в ГАП дентина $\approx 15\%$, в ГАП эмали - около 0,1%. Следовательно, обновление Pi в дентине осуществляется в 6-7 раз медленнее, чем в костях, но значительно интенсивнее, чем в эмали. Такой замедленный обмен минеральных компонентов дентина и эмали, определяет их устойчивость к деминерализации при беременности, лактации, стрессах или патологических процессах.

ГЛАВА 4 БИОХИМИЯ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ.**4.1 СЛЮНЫЕ ЖЕЛЕЗЫ.**

Существуют 3 пары больших слюнных желез (СЖ) (околоушные, подъязычные и поднижнечелюстные) и малые слюнные железы, расположенные на губах, кончике и корне языка, передней поверхности твердого неба. За сутки в полость рта поступает 0,75-1,0 л (по некоторым данным до 1,5 л) слюны. Большую часть слюны образуют поднижнечелюстные СЖ ($\approx 70\%$), $\approx 25\%$ - околоушные СЖ, $\approx 4\%$ - подъязычные СЖ и 1% - малые СЖ. Такая слюна называется собственно слюной или проточной слюной. При попадании в полость рта проточная слюна смешивается с лейкоцитами и микроорганизмами, таким образом, формируется цельная или смешанная слюна (Whole Saliva, mixed Saliva). Ее получают путем сплевывания. При введении в полость рта абсорбционного материала (коллектора) получают ротовую жидкость.

Функции слюнных желез.

Слюна из слюнных желез поступает в полость рта, где она выполняет следующие функции:

1. *Минерализационную* - участвует в формировании апатитов эмали.
2. *Защитную* - слюна увлажняет и очищает ткани ротовой полости, поддерживает видовой состав микрофлоры полости рта, формирует защитный барьер из муцина и других железистых белков, лейкоцитов. Участвует в образовании пелликулы зубов, предотвращает осаждение из слюны перенасыщенного раствора фосфата кальция.
3. *Пищеварительную* - слюна смачивает пищу, обволакивает пищевые частицы муцином, облегчает проглатывание, вызывает растворение солей, сахаров, расщепление поли- и олигосахаридов.
4. *Регуляторную* - регулирует образование пищеварительных соков в желудочно-кишечном тракте, выделение гормонов и гормоноидов, регулирующих процессы минерализации эмали зуба и гомеостаз полости рта.
5. *Выделительную* - со слюной выделяются низкомолекулярные азотосодержащие соединения (мочевина), катионы и анионы, метаболиты гормонов, лекарств и др.

Кроме того, клетки слюнных желез вырабатывают и выделяют в биологические жидкости ряд гормонов, ферментов и факторов роста, объединенных в понятие "биологически активные вещества" (БАВ). Большинство БАВ слюнных желез имеют общее строение: длинные полипептидные цепи, соединенные между собой -S-S- связями и стабилизированные Zn^{2+} . Они выделяются в виде предшественника, который затем активируется. Действуют БАВ слюнных желез на рецепторы трансмембранного типа, оказывая через них гомеостатическую регуляцию на клетки, органы и системы организма.

Секреция слюны.

Формирование слюны в СЖ включает два этапа:

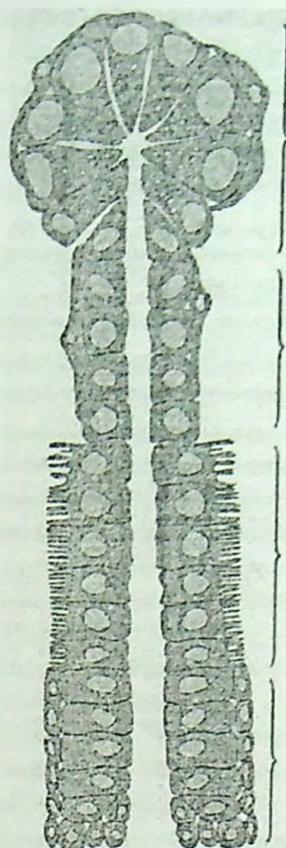
I этап - происходит в ацинусах с образованием изотоничного раствора, близкого по электролитному составу к сыворотке крови.

II этап - перемещение этой жидкости через систему протоков. При этом происходит реабсорбция большей части содержащихся в ней ионов Na^+ , Cl^- и секреция K^+ и HCO_3^- . Здесь также секретируется небольшое количество белка и некоторые другие ионы. Конечная слюна, поступающая в полость рта, является гипотоничной (осмотическое давление составляет $1/6$ от давления в ацинарных клетках).

Важную роль в формировании секрета играют протоки, выстланные исчерченным эпителием. Клетки протоков обладают различной проницаемостью. Со стороны апикальной мембраны, обращенной в полость протоков, избирательно проходят одни вещества и задерживаются другие. Базальная мембрана, прилегающая к кровеносным капиллярам, легко проницаема для различных веществ.

Избирательный перенос из крови в слюну связан со специфическим гематосаливарным барьером, описанным Ю.А. Петровичем и Р.П. Подорожной (1977). Он включает 3 компартамента:

1. Кровеносные и лимфатические микрососуды;
2. Интерстициальное пространство;
3. Эпителиальные трубки, содержащие соответственно кровь, лимфу и межтканевую жидкость.



- Na+
- K+
- Cl-
- IgA
- амилаза
- муцин
- мочевина
- альбумин

- лизоцим
- калликреин
- мочевина
- альбумин K+

- SCN-
- NO3-
- HPO4
- мочевина
- альбумин
- K+
- реабсорбация Na+Cl-

Рис. 4.1 формирование слюны

Секрет и компартменты разделены между собой эндотелием, соединительноткан-ными элементами и эпителиальными клетками. Интерстициальное пространство заполнено геле-подобным основным веществом, состоящим из белков, полисахаридов и солей, которые формируют линейные полианионы. Они образуют в воде вязкие растворы и во многом определяют транспортные процессы в интерстициальном пространстве. Поступление веществ в железистую клетку может осуществляться диффузией или путем пиноцитоза. Диффузия обеспечивает прохождение мелких молекул, пиноцитозом поступают высокомолекулярные соединения.

Коэффициент проницаемости (КП) отражает концентрацию веществ по обе стороны гемато-саливарного барьера, а именно в слюне и крови. КП выражается в условных единицах. Высокий КП для многих гормонов, белков, глюкозы и др. веществ не позволяет им перейти из плазмы в слюну.

Регуляция слюнной секреции.

Не существует спонтанной секреции слюнными железами, она регулируется симпатической и парасимпатической иннервацией, гормонами и нейропептидами. Симпа-

тическая иннервация побуждает секрецию белков, а парасимпатическая повышает выход жидкой фазы секрета. Помимо нейротрансмиттеров (адреналина, норадреналина и ацетилхолина) в регуляции тонуса сосудов СЖ важную роль играют нейропептиды: субстанция Р, которая освобождается из капсаицин-чувствительных афферентных нервов и является медиатором повышения проницаемости для белков плазмы крови; вазоактивный кишечный полипептид (VTP) участвующий в нехолинэргическом расширении сосудов и вызывающий повышение секреции белков.

Освобождаемые нейротрансмиттеры связываются со специфическими рецепторами (α -AR, β -AR, musc) на базолатеральной мембране ацинарной клетки.

Образовавшиеся комплексы передают сигналы через белки G_s и G_p . Образование 3',5' цАМФ приводит к экзоцитозу белков, а образование 1,4,5-инозитолтрифосфата (IP₃) сопровождается мобилизацией Ca^{2+} с последующей секрецией жидкости. Накопление в клетке Ca^{2+} обеспечивается двумя путями. Второй путь накопления Ca^{2+} связан с активацией α -AR на базолатеральной мембране. За время секреции клетки теряют Ca^{2+} , который меняет проницаемость мембран в железистых клетках. Жидкий секрет является результатом функционирования нескольких транспортных систем, включающих:

1. $Na^+ / K^+ / 2Cl^-$ транспорт, локализованный на базолатеральной мембране;
2. базолатеральный Ca^{2+} -активируемый K^+ -канал;
3. Ca^{2+} -активируемый Cl^- -канал, расположенный на апикальной мембране;
4. K^+ / Ca^{2+} -АТФ-аза.

Стимуляция секреции приводит к повышению концентрации Ca^{2+} внутри клетки, что сопровождается открытием базолатеральных Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов и апикального Cl^- -канала. Накопление ионов Cl^- приводит к поступлению Na^+ и последующему истечению воды из клетки. Поток Cl^- в клетку также поддерживается через K^+ / Na^+ транспортер при участии K^+ / Na^+ -АТФ-азы. После прекращения сигнала концентрация Ca^{2+} в клетке падает, K^+ и Cl^- каналы закрываются и клетка возвращается в исходное состояние. Возможен также вход Cl^- в обмен на ионы HCO_3^- через Cl^- / HCO_3^- ионообмен, а не через $Na^+ / K^+ / 2Cl^-$ транспортирующую систему. В образовании HCO_3^- участвует карбангидраза.

Реабсорбция Na^+ в протоках слюнных желез аналогична таковой в канальцах почек и регулируется альдостероном. Альдостерон вызывает реабсорбцию Na^+ и усиливает секрецию (выделение) K^+ . Поэтому при альдостеронизме конечная слюна бедна Na^+ и Cl^- и обогащается K^+ напротив, при болезни Аддисона в моче и слюне увеличивается содержание Na^+ и уменьшается количество K^+ .

В подчелюстных и околоушных СЖ обмен ионов зависит от скорости секреции слюны: при увеличении скорости секреции слюны ионный состав конечной слюны становится аналогичным ионному составу первичной слюны. В подъязычных СЖ тканевая структура исключает возможность обмена ионов Na^+ и K^+ и поэтому катионный состав секрета подъязычных СЖ не зависит от скорости секреции.

Факторы, влияющие на скорость секреции слюны.

Скорость секреции слюны в среднем равна 0,3-0,5 мл/мин; во время сна снижается до 0,05 мл/мин, а под влиянием раздражителей возрастает до 1,5-2,3 мл/мин.

Недостаток слюны приводит к ксеростомии, избыточная секреция слюны называется сialорея.

На скорость секреции влияет прием пищи и ее характер, биоритмы, состав плазмы крови, гормональный статус, болезни слюнных желез, системные заболевания. Скорость секреции слюны снижается под влиянием адреналина, норадреналина, дофамина. Пониженная скорость секреции отмечается у новорожденных, при ацидном состоянии, уремии, сахарном диабете, обезвоживании, лихорадочных состояниях, климаксе, системном поражении СЖ - болезни Сьегрена.

Секреция слюны повышается под влиянием ацетилхолина, пилокарпина, брадикинина, никотина, наркотических веществ: морфина, кокаина. Повышенная скорость секреции выявлена при беременности, прорезывании молочных зубов, гиперацидных состояниях, язве 12-перстной кишки, под влиянием кислых и сладких раздражителей, жевании жевательных резинок или парафина, воспалительных заболеваниях слизистой оболочки ротовой полости. Применение вкусовых раздражителей приводит к образованию стимулированной слюны. Кислые раздражители и экспериментальное жевание стимулируют отделение жидкой слюны из околоушных СЖ. Под влиянием сахарозы усиливается секреция густой слюны из поднижнечелюстных, подъязычных и малых СЖ.

Биохимические аспекты слюнообразования.

Метаболические процессы, обеспечивающие слюнообразование в клетках ацинусов слюнных желез (СЖ), характеризуются высокой интенсивностью, превышающей аналогичные процессы в гепатоцитах и немного уступая им в клетках почек.

Энергообразование осуществляется в процессе гликолиза (в реакциях субстратного фосфорилирования) и в ЦПЭ (в ходе окислительного фосфорилирования). Субстратами для получения энергии служит, в основном, глюкоза и АМК, поступающие в постоянных концентрациях в клетки ацинусов из плазмы. Энергообеспечение процесса секреции слюны из клеток ацинусов в выводные протоки осуществляется за счет гидролиза АТФ под действием Na^+/K^+ -АТФ-азы, обеспечивающей поддержание электрохимического градиента Na^+ .

Образованный энергетический фонд клеток ацинусов обеспечивает: синтез специфичных для СЖ пептидов, белков, включая ферменты и вещества, определяющие группу крови, а так же их транспорт по сети ЭР и секрецию в выводные протоки; связывание синтезированного в ацинусах секреторного компонента (СК) с димерами I_gA_1 с образованием молекулы секреторного I_gA_2 (I_gA_2) и секрецией последнего в выводные протоки; селективный транспорт ионов из плазмы в первичную слюну и селективную секрецию ионов и тяжелых металлов. Наряду с этим, клетки ацинусов, не используя АТФ, обеспечивают транспорт и секрецию не электролитных органических соединений (альбуминов, глобулинов, иммуноглобулинов ($\text{G}, \text{M}, \text{A}_1$)), ингибиторов протеиназ, АМК, мочевины.

Биологически активные вещества слюнных желез.

Фактор роста нервов (ФРН) — белок, синтезируемый в поднижнечелюстной слюнной железе (у человека еще и в плаценте) с $M_r = 140$ кДа в виде неактивного комплекса, содержащего Zn^{2+} . ФРН выделяется в слюну и кровь. Клетками-мишенями для данного гормона являются: 1) нейроны периферического отдела симпатической нервной системы; хромоафинные клетки надпочечников; 2) сенсорные нейроны спинного мозга; 3) холинэргические нейроны ЦНС; 4) фибробласты.

Биологические эффекты ФРН выражаются: а) в стимуляции роста нейронов и митоза фибробластов; б) обеспечении выживаемости нейронов; в) защите нейронов от канцерогенов; г) дифференцировке нервных клеток с последующим превращением нейробластов в нейроны, что сопровождается увеличением синтеза нейромедиаторов.

Выделение ФРН в полость рта стимулирует заживление поврежденных тканей ротовой полости. Биологические эффекты ФРН являются следствием действия на обменные процессы клеток. В них активируется K^+/Na^+ -АТФ-аза. Это приводит к накоплению K^+ и выведению Na^+ , стимулируется аэробный распад глюкозы, обмен полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и глицерофосфолипидов. Образование фосфоинозитолов сопровождается повышением количества внутриклеточного кальция. ФРН повышает активность орнитиндекарбоксилазы с последующим синтезом полиаминов.

В свою очередь полиамины стимулируют синтез нуклеиновых кислот и белка. Синтез и освобождение ФРН регулируется нейромедиаторами и гормонами. Холиномиметики, андрогены и тироксин увеличивают количество ФРН. Аналогичный эффект отмечается при беременности и лактации.

Фактор роста эпителия (ФРЭ) - белок с $M_r = 70$ кДа вырабатываемый в поднижнечелюстных слюнных железах, а также в бруннеровских клетках 12-перстной кишки, гипофизе, щитовидной железе, слизистой желудка. ФРЭ является полимером и состоит из 2 субъединиц с $M_r = 6$ кДа и 2 субъединиц с $M_r = 30$ кДа. Биологические эффекты ФРЭ: 1) раннее прорезывание резцов; 2) раннее раскрытие век; 3) пролиферация и кератинизация эпителия; 4) торможение секреции соляной кислоты; 5) заживление язв желудка и 12-перстной кишки; 6) новообразование сосудов.

ФРЭ оказывает свое действие на клетки эктодермы: кераноциты кожи, эпителиоциты слизистой оболочки полости рта, глотки, пищевода, роговицы глаза, молочной железы, легочных альвеол, а также мезодермы: хондроциты, эндотелий сосудов.

Механизм действия ФРЭ на клетки связан с изменением проницаемости плазматической мембраны, приводящей к задержке Na^+ в клетке. Установлено, что существует определенная корреляция между накоплением Na^+ в клетке и митотической активностью; с повышением концентрации 3',5'-цГМФ в клетке; с ускоренным распадом глицерофосфолипидов и освобождением фосфоинозитолов и ПНЖК. Освобождающиеся ПНЖК превращаются по циклооксигеназному пути в простагландины и другие соединения.

ФРЭ также оказывает действие на минерализованные ткани. Он действует подобно паратгормону и повышает резорбцию костной ткани. ФРЭ стимулирует деление

одонтобластов и повышает в них синтез ДНК. Однако ФРЭ угнетает дифференцировку одонтобластов, что сопровождается, уменьшением синтеза коллагена I типа, при этом замедляется его созревание и падает активность щелочной фосфатазы.

Образование ФРЭ повышают андрогены, тироксин и прогестерон. В случае повышенной продукции ФРЭ стимулируется опухолевая трансформация клеток.

Паротин - белок с $M_r = 100$ кДа, выделен из околоушных слюнных желез. Белки, сходные с паротином выделены также из поднижнечелюстных слюнных желез (S-паротин), слюны (паротин А, В, С), крови, мочи. Активное действие паротина связано с гликопротеином, оказывающим влияние на мезенхимные ткани: хрящ, трубчатые кости, дентин зуба. Паротин усиливает пролиферацию хряща, стимулирует синтез нуклеиновых кислот и белка в одонтоблестах, минерализацию дентина и костей, понижает содержание кальция и глюкозы в плазме крови. Паротин также оказывает действие на сперматогенный эпителий и эпителий слюнных желез, стимулируя синтез белка в этих клетках.

В Японии α -паротин, паротин А производится в промышленных масштабах и используются при пародонтозе, деформирующем артрите и других заболеваниях костно-мышечного аппарата.

Калликреин - гликопротеин $M_r = 30-40$ кДа, сериновая трипсиноподобная протеиназа, вырабатываемая клетками исчерченных протоков СЖ. В отличие от других тканей, в СЖ калликреин вырабатывается в активной форме. Калликреин вызывает ограниченный протеолиз глобулярных белков кининогенов с образованием биологически активных пептидов-кининов: каллидина и брадикинина.

Кинины инактивируются кининазами эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта. Кинины вызывают расширение сосудов слюнных желез и слизистых оболочек, что приводит к гиперемии, повышению проницаемости сосудов, снижению АД (гипотензивный эффект). Свое действие калликреин оказывает в протоках слюнных желез, на слизистые оболочки полости рта и в сосудах, попадая в кровь из слюнных желез. Калликреин обладает инсулиноподобным действием. Синтез калликреина увеличивается под влиянием андрогенов, тироксина, простагландина F_{2a} (ПГФ_{2a}), холиномиметиков (в 1500 раз), β -адренометиков (в 40 раз).

Ренин - аспартильная протеиназа с $M_r = 40$ кДа. Синтезируется в крупных слюнных железах, преимущественно в поднижнечелюстных, а также в почках, аденогипофизе и семенниках. Фермент содержит 2 полипептидные цепи, объединенные дисульфидной связью. Выделяется в виде препроенина и активируется путем ограниченного протеолиза.

Биологическое действие ренина связано с регуляцией сосудистого тонуса и микроциркуляции, что в свою очередь влияет на процессы репарации слизистой оболочки полости рта и слюноотделение. Ренин также оказывает прессорный эффект, связанный с эмоциональным стрессом и агрессией.

4.2 СОСТАВ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ.

Смешанная слюна состоит из воды на 94-99% и сухого остатка. Сухой остаток представлен неорганическими веществами и органическими соединениями. Химический состав слюны достаточно лабилен и зависит от суточных (циркадных) ритмов, стимуляторов слюноотделения, приема лекарств. Например, прием аскорбиновой кислоты, а также введение пилокарпина увеличивает скорость секреции слюны и вызывает сдвиги в составе и свойствах слюнных белков.

Неорганические вещества смешанной слюны.

Неорганические вещества слюны представлены макро- и микроэлементами: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , чаще всего Mo^{6+} , но есть Mo^{5+} , Mo^{4+} , Mo^{3+} , Mo^{2+} , Cu^+ , Fe^{3+} , F^- , Cl^- , I^- и др. Минеральные вещества находятся как в ионизированной форме в виде простых ионов, так и в составе соединений - солей, хелатов, белков.

Таблица 4.1

Неорганические компоненты нестимулированной смешанной слюны и плазмы крови в ммоль/л

Вещество	Слюна	Плазма крови
Na^+	6,6 - 24,0	130- 150
K^+	12-25	3,6 - 5,0
Cl^-	11-20	97-108
Са общ.	0,75 - 3,0	2,1 -2,8
Фн	2,2 - 6,5	1,0-1,6
Фобш	3,0-7,0	3,0-5,0
HCO_3^-	20 - 60	25
SCN- (тиоцианаты)	0,5-1,2	0,1-0,2
Cu^{2+}	0,3	0,1
I^-	0,1	0,01
F^-	0,001-0,15	0,15

Существует тесная взаимосвязь между количеством электролита в слюне, скоростью слюноотделения, временными колебаниями pH и температурой полости рта. При этом количественный и качественный состав электролитов в слюне определяют ее pH и буферную емкость.

Значение pH смешанной слюны близко к нейтральному (6,5 - 7,4) и зависит от отношения $\text{NaHPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, аммонийных групп (NH_4^+), CO_2 и белка. pH слюны "покоя" отличается от pH стимулированной слюны. Так, нестимулированный секрет из паротидной и поднижнечелюстной слюнных желез имеет умеренно кислый pH (5,8), который увеличивается до 7,4 при последующей стимуляции. Интересно, что этот сдвиг совпадает с увеличением в слюне HCO_3^- до 60 ммоль/л и уменьшением $\text{NaH}_2\text{PO}_4^{2-}$. Таким образом, гидрокарбонат, поступающий преимущественно с секретом околоушной и

поднижнечелюстной СЖ определяет буферную емкость слюны. При длительном стоянии слюны происходит потеря CO_2 .

В смешанную слюну Na^+ и K^+ поступают с секретом околоушных и подчелюстных слюнных желез. Слюна из подчелюстных слюнных желез содержит 8-14 ммоль/л K^+ и 6-12 ммоль/л Na^+ . Паротидная слюна содержит еще большее количество K^+ - около 25 - 49 ммоль/л и значительно меньше Na^+ , всего 2-8 ммоль/л. Увеличение секреции приводит к повышению содержания Na^+ и K^+ в слюне. Это связано с процессами реабсорбции Na^+ в протоках и экскреции K^+ и находится под контролем гипофиза и коры надпочечников. Уровень ионов хлора также повышается при стимуляции, но всегда остается ниже, чем в плазме крови.

Слюна перенасыщена ионами фосфора и кальция. В слюне фосфат содержится в двух формах: неорганический - свободный (Фн) и связанный с белками и другими соединениями. Содержание общего фосфата в слюне достигает 7,0 ммоль/л, из них 70 - 95% приходится на долю неорганического фосфата (2,2 — 6,5 ммоль/л). В свою очередь Фн представлен в виде HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- которые образуют фосфатную буферную систему.

Содержание кальция в слюне различно и колеблется от 1,0 до 3,0 ммоль/л. Кальций, как и фосфаты, находится в ионизированной форме и в соединении с белками. Существует коэффициент соотношения $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}_{\text{общий}}$; он равен 0,53 - 0,69.

Такая концентрация кальция и фосфатов необходима для поддержания постоянства тканей зуба, которое поддерживается благодаря трем основным процессам:

- 1) регуляции pH;
- 2) препятствию растворения зуба;
- 3) внедрению ионов в минерализованные ткани.

Почему же кальций и фосфаты не выпадают в осадок? Согласно представлениям В.К. Леонтьева с соавторами основу слюны составляют мицеллы, связывающие большое количество воды, в результате чего все водное пространство оказывается связанным и поделенным между ними.

Каков же вероятный состав мицелл в слюне? Предполагается, что основным видом мицелл являются мицеллы фосфата кальция, $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_m$, который образует нерастворимое ядро. На поверхности ядра сорбируются находящиеся в слюне в избытке молекулы гидрофосфата (HPO_4^{2-}). В адсорбционном и диффузных слоях мицеллы будут находиться ионы Ca^{2+} , являющиеся противоионами. Белки, связывающие большое количество воды (в частности муцин), способствуют распределению всего объема слюны между мицеллами, в результате чего она структурируется, приобретает высокую вязкость, становится малоподвижной.

В кислой среде заряд мицеллы может уменьшиться вдвое и снизиться устойчивость мицеллы, а ионы дигидрофосфата такой мицеллы не участвуют в процессе реминерализации. При понижении pH до 6,2 слюна становится недонасыщенной кальцием и неорганическим фосфатом и превращается в деминерализующую. Появляются ионы H_2PO_4^- вместо HPO_4^{2-} . Подщелачивание приводит к увеличению ионов PO_4^{3-} , которые

участвуют в образовании трудно растворимого соединения $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ осаждающегося в виде зубного камня.

В слюне могут содержаться и другие неорганические вещества: тяжелые металлы, аммиак и тиоцианаты.

Увеличение в плазме крови до нефизиологических величин ионов тяжелых металлов (Ag^+ , Hg^+ , Pb^{2+}), сопровождается их выведением через слюнные железы. Поступившие со слюной в ротовую полость ионы тяжелых металлов взаимодействуют с образованными микроорганизмами H_2S и образуются сульфиды металлов. Появляется "свинцовая кайма" зубов,

NH_3 в смешанной слюне образуется при разрушении мочевины уреазой микроорганизмов.

Тиоцианаты (SCN^- , роданиды) и иодиды поступают в слюну из плазмы крови. Количество этих веществ зависит от скорости слюноотделения и снижается при увеличении секреции. Иодиды в СЖ также освобождаются при распаде йодтиронинов. Тиоцианиты образуются из синильной кислоты с участием фермента роданезы. Их количество в 4-10 раз увеличивается у курильщиков. Оно также может возрастать при воспалении пародонта.

Белковые компоненты смешанной слюны

Смешанная слюна содержит белки, полипептиды, липиды, витамины, гормоны, органические кислоты. Количество их зависит от состояния организма, ротовой полости и различается по количественным оценкам в осадке слюны и надосадочной жидкости. Все компоненты имеют различное происхождение и оказывает существенное влияние на гомеостаз полости рта.

Белки слюны

В слюне белка содержится от 1,5 до 4,0 г/л. Методом двумерного электрофореза определено присутствие в слюне около 500 различных пятен, характеризующих различные белки и полипептиды. Из них только 120-150 являются секреторными, т.е. попадают из больших и малых слюнных желез, а остальные имеют бактериальное и клеточное (из форменных элементов и лейкоцитов) происхождение.

Таблица 4.2

№	Гликопротеины	Молекулярная масса в кДа	Содержание в %	
			Белки	Углеводы
1.	Макромолекулярные гликопротеины (МГП)	500-1000	30-50	50-70
2.	Анионные гликопротеины (АГП)	500-1000	58	42
3.	Катионные гликопротеины (КГП)	36,5	57	43

4.	Фосфосодержащие гликопротеины (ФГП)	12	94	6
5.	Димер IgA	320	90	10
6.	Секреторный компонент IgA (SK, CK)	75	88	12

Слюнные белки способны объединяться как между собой, так и с неорганическими компонентами, создавая тем самым определенную внутреннюю среду ротовой полости. Они смогут выполнять одну или несколько функций, что свидетельствует об их полифункциональности.

Некоторые слюнные белки охарактеризованы (табл.4.2), у них определен аминокислотный состав, биологическая значимость.

Гликопротеины слюны. Характеризуя белки слюны, без преувеличения можно сказать, что большинство их является гликопротеинами, в которых количество углеводов достигает 4-40%. Секреты различных слюнных желез содержат гликопротеины в различных пропорциях, что и определяет разницу в их вязкости. Так, наиболее вязкая слюна - секрет подъязычной железы (коэффициент вязкости - 13,4), затем подчелюстной (3,4) и паротидной (1,5).

Синтез гликопротеинов слюны протекает в несколько стадий. Вначале синтезируется белковое ядро, к которому затем присоединяются углеводные цепи. В условиях стимуляции могут синтезироваться неполноценные гликопротеины и слюна становится менее вязкой. Слюнные гликопротеины неоднородны.

Макромолекулярные гликопротеины (МГП) Для этих белков характерна высокая степень гидратированности. Присоединение и связывание воды МГП определяется:

- 1) большими размерами белковой молекулы;
- 2) зарядом радикалов внутримолекулярных аминокислот;
- 3) присутствием полярных углеводных цепей.

Белковая часть МГП содержит большое количество остатков серина, треонина, пролина и аланина. Олигосахаридные цепи связываются с гидроксильной группой серина и треонина О-гликозидной связью. МГП совместно с анионными гликопротеинами обеспечивают вязкость слюны, которая осуществляет защиту слизистой оболочки полости рта от механических, температурных, химических и бактериальных воздействий. Они увлажняют и обволакивают пищевой комок, что облегчает его прохождение в глотку и пищевод. Среди МГП наиболее исследованы группоспецифические вещества и муцин.

Группоспецифические вещества. В 1900 году Ландштейнер описал группы крови АВО. На сегодняшний день известно более 20 систем групп крови, экспрессирующих более 160 различных антигенов. В наибольшей степени изучены группы крови АВН(О) и система Льюиса. Вещества, обладающие антигенной специфичностью А, В и определяющие группу крови, прочно связаны в эритроцитах со специфическими мембранными белками О-гликозидными связями и не могут быть извлечены из их стромы ни во-

дой ни солевыми растворами. Специфические олигосахариды, образующие данные антигены присутствуют в трех формах:

- 1) в виде сфинголипидов и гликопротеинов на поверхности эритроцитов;
- 2) в виде олигосахаридов в молоке и моче;
- 3) в виде олигосахаридов, связанных с муцинами, секретируемыми в желудочно-кишечном, мочеполовом и дыхательном трактах.

Слюнные группоспецифические вещества в отличие от эритроцитарных гликолипидов содержат до 85% углеводов и 15% белка. Антигенная специфичность группоспецифических веществ определяется строением некоторых остатков сахаров, разложенных на концах углеводных цепей. Так, цепь антигена А заканчивается остатком N-ацетилгалактозамина, а цепь антигена В остатком галактозы. Во всем остальном обе цепи одинаковы. Следует отметить, что между галактозой и остатком N-ацетилгалактозамина может иметься β -1,3 – связь (цепи типа 1) или β -1,4-связь (цепи типа 2) и такие цепи могут обладать как А- так и В-специфичностью. Цепи с Н-специфичностью отличаются от цепей А и В лишь тем, что в них отсутствуют терминальные остатки N-ацетилгалактозамина и галактозы.

Встречаются индивидуумы, у которых гликопротеины, содержащиеся в секретах, лишены характерной специфичности А, В или Н. Людей можно разделить по этому признаку на две четко разграниченные группы. У представителей одной из них, так называемых "секретеров", слюна и другие секреты обладают специфичностью А, В и Н, тогда как у представителей второй группы ("не - секретеры") эта специфичность отсутствует. Около 80% европейцев являются "секреторами" и около 20% - "не - секреторами". Секреторный статус данного индивидуума постоянен и детерминирован генетически.

На биосинтез и, следовательно, также на антигенную специфичность водорастворимых гликопротеинов, влияет еще один генный локус - локус Lewis (Le). Секреты или эритроциты, обладающие Le - специфичностью, обозначают Le(a+), а те, которые ею не обладают, Le(a-). Известно, что Le-активность в секретах значительно более выражена у "не - секретеров", чем у "секретеров".

Концентрация группоспецифических веществ в слюне равна 10-130 мг/л. Они, в основном, поступают с секретом малых слюнных желез и точно соответствуют группе крови, исследование группоспецифических веществ в слюне используется в судебной медицине для установления группы крови в тех случаях, когда это невозможно сделать иначе.

Муцины слюны.

Вязкость слюны прямо связана с муцином. Муцины также входят в состав секретов бронхов и кишечника, семенной жидкости и выделений шейки матки. Все они играют роль смазки и, кроме того, защищают подлежащие ткани от повреждений, как механических, так и химических.

В полипептидной цепи муцина из подчелюстной слюнной железы содержится большое количество серина и треонина, их насчитывается около 200 на одну полипеп-

тидную цепь. Третьей, наиболее часто встречающейся аминокислотой, в муцине является пролин и поэтому гликозилированные участки им очень богаты. К остаткам серина и треонина через О-гликозидную связь присоединены остатки N-ацетилнейраминной кислоты, N-ацетилгалактозамина, фукозы и галактозы. Сам белок напоминает по своему строению гребенку: короткие углеводные цепи, как зубья, торчат из жесткой, богатой пролином полипептидной основы. Эти подобные гребенке структуры с помощью дисульфидных мостиков между белковыми глобулами и создают большие молекулы протейна с особыми вязкими свойствами.

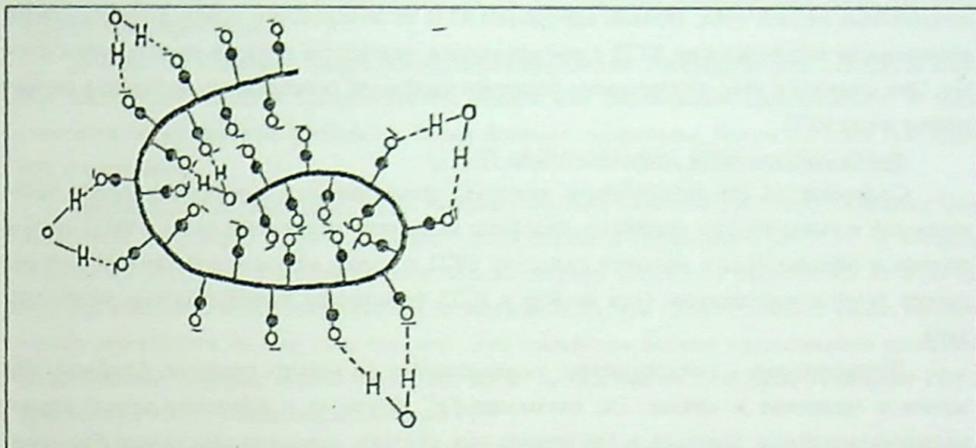


Рис. 4.2 структура слюнного муцина

- Сиаловая кислота
- N-ацетилглюкозамин

Анионные гликопротеины (АГП).

Из секрета поднижнечелюстных слюнных желез был выделен кислый белок, содержащий большое количество остатков серина (18 сер на 100 амк) и 600-800 дисахаридных цепей. Терминальное положение в олигосахаридных цепях АГП представлено остатками N-ацетилнейраминной кислоты.

Высокое содержание N-ацетилнейраминной кислоты в АГП обеспечивает защиту тканей полости рта от вирусной инфекции. Известно, что патогенные вирусы выделяют нейраминидазу и с ее помощью фиксируются на мембране клеток хозяина. Остатки N-ацетилнейраминной кислоты в АГП выполняют роль рецепторов для связывания нейраминидазы вирусов. Вирусы, контактируя с АГП, теряют свою вирулентность и со слюной попадают в пищеварительный тракт, где расщепляются пищеварительными ферментами.

Катионные гликопротеины (КГП)

КГП были выделены из секрета околоушных желез. Они составляют 25% общего белка и 75% всех углеводов, присутствующих в паротидной слюне. КГП содержат большое количество остатков лизина, аргинина и гистидина и поэтому при физиологических значениях рН заряжены положительно. Кроме того, в этих белках определяется

высокое содержание пролина (74 на 100 амк), глицина (46 остатков на 100 амк), глутамина (46 на 100 амк) и аспарагина. Углеводная часть КГП представлена остатками N-ацетилгалактозамина, L-фукозы и галактозы. Углеводные цепи к белку присоединены через N-гликозидную связь.

После секреции слюнными железами КГП адсорбируются на поверхности эмали зуба и формируют основную часть зубной пелликулы. Адсорбция КГП на зубных поверхностях осуществляется путем взаимодействия положительно заряженных радикалов аминокислот с отрицательно заряженными фосфатами гидроксипатитов минерализованных тканей зуба. Начало адсорбции КГП на поверхности эмали сопровождается изменением конформации КГП с последующим переходом в плохо растворимую форму. Это связано с тем, что осевшие бактерии выделяют гликозидазы, которые и расщепляют цепи КГП.

Фосфосодержащие гликопротеины (ФГП).

Содержат до 1% ортофосфата, который присоединяется к остаткам серина, треонина или к аминогруппе аргинина. Фосфаты защищают пептидные связи в ФГП от гидролиза и обеспечивают высокое сродство ФГП к ионам кальция кристаллической решетки гидроксипатитов. Они вместе с КГП формируют приобретенную пелликулу зуба.

Лактоферрин – гликопротеин, содержащийся во многих секретах. Особенно его много в молозиве и слюне. Он связывает Fe^{3+} бактерий и нарушает окислительно-восстановительные реакции в бактериальных клетках, оказывая тем самым бактериостатическое действие.

Иммуноглобулины слюны.

В слюне присутствуют все 5 классов иммуноглобулинов-IgA, IgAs, IgG, IgM, IgE. Как известно, все иммуноглобулины различаются по молекулярной массе, конфигурации, углеводному компоненту, и состоят из 2-х типов полипептидных цепей – H (тяжелая цепь) и L (легкая цепь). Иммуноглобулины A можно разделить на 2 подкласса, а иммуноглобулины G на четыре. Иммуноглобулин A1 содержится, преимущественно, в плазме крови и соответствует типу строения, который описывается 4-х цепочечной моделью, как димер.

Секреторный иммуноглобулин A (IgAs, IgA₂) образуется плазматическими клетками, находящимися в анатомической связи с эпителием слизистых оболочек и ацинарных клеток слюнных желез. Синтезированный в плазматических клетках димер IgA, состоит из 2H, 2L и J цепей затем покидает их и связывается с секреторным компонентом IgAs(СК, SP). Секреторный компонент (гликопротеин с м.м. 80 кДа) образуется в слюнных железах и располагается на плазматической мембране ацинарных клеток в качестве рецептора. Образовавшийся комплекс димер AgA-SP путем пиноцитоза перемещается к апикальной части клетки и поступает в слюнные протоки.

Околоушные слюнные железы поставляют 90% IgAs, а поднижнечелюстные только 10% IgAs. Секреторный компонент IgAs защищает молекулу антитела от разрушения ферментами различных клеток, а также повышает ее устойчивость к воздействию дена-

турирующих факторов. IgAs по своей активности превосходит все другие иммуноглобулины. Свое антибактериальное действие он оказывает не связываясь с комплементом. Считается, что комплемент заменяется на лизоцим.

Цельная слюна у взрослых содержит от 30 до 160 мкг/мл IgAs, все другие иммуноглобулины определяются в количестве меньшим, чем 1 мкг/мл, поскольку они поступают из плазмы крови путем простой трансудации через малые слюнные железы и зубо-десневую бороздку. Следовательно, IgE, IgG, IgM имеют двойное происхождение. Дефицит IgAs встречается в одном случае на 500 человек и сопровождается частыми вирусными инфекциями.

В секретах слюнных желез обнаружено несколько специфических слюнных белков, характеризующихся преобладанием одной или нескольких аминокислот. К ним относятся белки богатые пролином, белки богатые тирозином, белки богатые гистидином и цистатины.

Белки богатые пролином (PRP). Впервые об этих белках в 1971 году сообщил Оппенгеймер. Они были открыты в паротидной слюне и составляют до 70% от общего количества всех белков в этом секрете. Молекулярная масса PRP колеблется от 6 до 12 кДа. Исследование аминокислотного состава выявило, что 75% от общего числа аминокислот приходится на про, гли, глу, асп. Это семейство белков представлено несколькими белками, которые можно разделить по их свойствам на 3 группы: 1) кислые PRP; 2) основные PRP; 3) гликозилированные PRP.

Белки богатые пролином выполняют в полости рта несколько функций. В первую очередь они легко адсорбируются на поверхности эмали и являются компонентами приобретенной пелликулы зуба. Кислые PRP, входящие в состав пелликулы зуба, задерживая деминерализацию зуба и ингибируя излишнее осаждение минералов, поддерживают постоянство кальция и фосфора в эмали зуба. Кроме того, кислые и гликозилированные PRP способны связывать определенные микроорганизмы и тем самым участвуют в образовании микробных колоний бляшки. Гликозилированные PRP также необходимы для смачивания пищевого комка. Роль основных PRP пока до конца неясна. Однако, предполагается, что они играют определенную роль в связывании танинов пищи и тем самым защищают слизистую оболочку полости рта от их повреждающего действия, а также придают вязко-эластические свойства слюне.

Белки богатые гистидином (гистатины HRP). Из секретов околоушных и подчелюстных слюнных желез человека выделено семейство основных полипептидов, отличающихся большим содержанием гистидина. Эта группа включает 12 полипептидов. Исследование первичной структуры гистатинов показало, что они состоят из 7-38 аминокислотных остатков и имеют большую степень сходства между собой. Гистатины 1 и 2 значительно отличаются от других членов этого семейства белков. Считается, что гистатин 2 является фрагментом гистатина 1, а гистатины 4-12 образуются при гидролизе гистатина 3 при участии ряда протеиназ, в частности, калликреина. Предполагается, что образование гистатинов путем ограниченного протеолиза происходит либо в секреторных везикулах, либо при прохождении белков через железистые протоки.

Хотя биологические функции гистатинов окончательно не выяснены, уже установлено, что гистатин I участвует в образовании приобретенной пелликулы зуба и является мощным ингибитором роста кристаллов гидроксипапатитов в слюне. Смесь очищенных гистатинов подавляет рост некоторых видов *Str.mutans*. Гистатин 5 вовлечен в процесс подавления слюной вируса иммунодефицита и грибков (*Candida albicans*). Считается, что одним из механизмов такого антимикробного и противовирусного действия является взаимодействие гистатина 5 с различными протеиназами, выделенными из микроорганизмов ротовой полости.

Статерины. Statherin (белки богатые тирозином). Из секрета околоушной слюнной железы выделен фосфопроtein, состоящий из 43 аминокислот. Он вместе с другими секреторными белками ингибирует спонтанную преципитацию фосфорнокальциевых солей на поверхности зуба, в ротовой полости и в слюнных железах.

Цистатины. В 1984 году две группы японских исследователей независимо друг от друга сообщили о присутствии в слюне еще одной группы секреторных белков - цистатинов.

Цистатины синтезируются в серозных клетках околоушных и подчелюстных слюнных желез. Всего обнаружено 8 слюнных цистатинов. Цистатины - кислые белки с молекулярной массой 9,5-13 кДа. Они ингибируют активность цистеиновых протеиназ. К цистеиновым протеиназам относятся катепсины В, Н, L и другие протеиназы, у которых в активном центре присутствует остаток аминокислоты цистеина.

Помимо ингибирующей активности цистатин SA-III содержит 4 остатка фосфорина и возможно он вовлекается в связывание фосфорнокальциевых соединений с эмалью зуба, и часть цистатинов определена в приобретенной пелликуле зуба. Высокая степень присоединения SA I, SAIII вероятно связана с тем, что цистатины имеют сходство в аминокислотной последовательности с другими адгезивными белками - фибронектином и ламинином. Сходный участок включает около 100 аминокислотных остатков и находится в ламинине вблизи участка связывания с клетками.

Считается, что через ингибирование активности цистеиновых протеиназ слюнные цистатины выполняют антимикробную и противовирусную функции. Они также защищают белки слюны от энзиматического расщепления, поскольку секреторные белки могут функционировать только в интактном состоянии.

Альбумин. В смешанной слюне этот белок определяется в небольшом количестве. В слюну альбумин попадает из плазмы крови с десневой жидкостью, а также вместе с RPR в секрете околоушных слюнных желез. Количество альбумина в слюне может меняться при стоматитах и ряде других заболеваний, например, хроническом панкреатите.

Ферменты слюны. В смешанной слюне определяется активность более 100 ферментов (табл. 4.3), различных по происхождению и выполнению биологических функций.

Гликозидазы. В слюне определяется активность эндо- и экзогликозидаз. К эндогликозидазам в первую очередь относится α -амилаза слюны и лизоцим.

α-Амилаза. Слюнная α-амилаза расщепляет 1—4 гликозидные связи в крахмале и гликогене. По своим иммунохимическим свойствам и аминокислотному составу слюнная α-амилаза очень сходна с панкреатической амилазой. У обеих амилаз определяется 94% сходства в аминокислотной последовательности. Определенные различия между этими амилазами обусловлены тем, что слюнная и панкреатическая амилазы кодируются различными генами (АМУ₁ и АМУ₂). α-Амилаза выделяется с секретом паротидной железы, где концентрация ее составляет 648-803 мкг/мл и не зависит от возраста, но меняется в течение суток и зависит от чистки зубов и приема пищи.

Таблица 4.3

Характеристика некоторых ферментов слюны

Ферменты	Источники фермента			Биологическое действие
	Железы	Микроорганизмы	Лейкоциты	
α-амилаза	+	0	0	Пищеварит., защитное
Мальтаза	0	+	+	Пищеварит.
Сахараза	0		+	Пищеварит.
Гиалуронидаза	0	+	0	Гидролиз ГАГ соединительной ткани
Лизоцим	+	0	+	Защитное
Кислая фосфатаза	+	+	+	Повреждение клеток
Щелочная фосфатаза	+	+	+	Минерализация
Липаза	+	+	+	Пищеварит.
Протеиназы	0	+	+	Гидролиз белков
Пептидазы	0	+	+	Гидролиз пептидов
Уреаза	0	+	0	Образование NH ₃ ⁺
Катаптаза	0	+	0	Защитное
Лактопероксидаза	+	0	+	Защитное
Мислонпероксидаза	0	0	+	Защитное
Гексокиназа	0	+	0	Утилизация
Альдолаза	+	+	+	сахаров с образованием органических кислот
Лактальдегидрогеназа	0	+	+	

Лизоцим. Гидролизует гликозидную связь между С-1 N-ацетилмурамовой кислотой (NAM) и С-4 N-ацетилглюкозамина (NAC), которые формируют полисахарид муреин клеточной стенки бактерий. Фермент представляет собой одну полипептидную цепь из 129 аминокислотных остатков и массой 14,6 кДа. Стабильность фермента обеспечивают четыре поперечных дисульфидных мостика. Лизоцим определяется не только в слюне, но и в десневой жидкости, слезах, курином белке, и является компонентом неспецифической антибактериальной защиты. Активность этого фермента в ротовой полости может уменьшаться при тяжелых формах пародонтита.

Другие гликозидазы. В смешанной слюне определяется активность еще нескольких гликозидаз, это α-L-фукозидазы, α и β-гликозидаз -, α и β-галактозидаз, α-D-маннозидаза, β-глюкуронидазы, β-гиалуронидазы, β-N-ацетилгексозаминидазы, нейра-

минидазы. Все они имеют различное происхождение и разные свойства. Если α -L-фукозидаза выделяется с секретом околоушной железы и расщепляет (α 1→2 связи) в коротких олигосахаридных цепях, то β -N-D-ацетилгексозаминидаза содержится как в смешанной слюне, так и в секретах больших слюнных желез, и образуется смешанной культурой микрофлоры полости рта.

α и β -Глюкозидазы, α и β -галактозидазы, β -глюкуронидаза, нейраминидаза и гиалуронидаза имеют бактериальное происхождение и наиболее активны в кислой среде. β -D-гиалуронидаза катализирует гидролиз β 1,4 связей в гиалуроновой кислоте, хондроитинсульфате и дерматансульфате. Изменение гиалуронидазной активности в слюне и десневой жидкости коррелирует с повышением числа G^+ бактерий и возрастает при воспалении десны. Вместе с гиалуронидазной активностью возрастает активность β -глюкуронидазы, которая в норме подавляется ингибитором β -глюкуронидазы, поступающего из плазмы крови. Хотя активность кислых гликозидаз в слюне невелика, все же было показано, что слюнные гликозидазы расщепляют белково-гликозидные группы в слюнных муцинах. Во время инкубации слюны при 37°C из слюнных муцинов быстро образуются сиаловые кислоты и аминсахара.

Пероксидаза.

Слюнная пероксидаза (СПО) катализирует окисление тиоцианатов (SCN^-) путем расщепления H_2O_2 образованием $^{\circ}OSCN$ (гипотиоцианат) и $HOOSCN$, которые оказывают антимикробное действие. В цельной смешанной слюне определяется две разных группы СПО, имеющих ИЭТ в кислой и щелочной средах. Фермент с ИЭТ в щелочной среде образуется в околоушной и подчелюстной слюнных железах и представлен множественными формами с м.м. 78; 80 и 28 кДа. Это гликопротеин, т.к. содержит до 4,6% углеводов. Поскольку СПО содержит гем, она также относится к гемопротенам.

Бактерии зубной бляшки, мелкие слюнные железы и эпителиальная выстилка лишены этого фермента.

В процессе очистки и выделения СПО было обнаружено, что фермент находится в комплексе с одним из белков богатых пролином. Образование этого комплекса неясно. Изучение кинетик равновесного состояния окисления тиоцианата (SCN^-), катализируемого СПО позволило выяснить, что, механизм окисления SCN^- включает несколько реакций. Окисление начинается с рН независимого окисления фермента H_2O_2 с последующим образованием соединения I, которое затем протонируется и вызывает окисление SCN^- . Эта реакция также независима от значения рН. Однако, второе протонирование соединения I порождает образование неактивного продукта. Наибольшее окисление SCN^- СПО протекает при рН = 5-6. Это имеет определенное значение, поскольку кинетические свойства СПО показывают, что ее антибактериальный эффект увеличивается при кислых значениях рН. Известно, что *Str.mutans* наиболее чувствителен к ингибированию гипотиоцианатом при рН < 7,0, что позволяет говорить о том, что таким способом включается пероксидазная система слюны и ее антибактериальные свойства при кислых значениях рН увеличиваются до предела. Это формирует в свою очередь опасность деминерализации твердых тканей зубов хозяина.

Образовавшийся гипотиоционат оказывает в 10 раз более мощное антибактериальное действие, чем H_2O_2 . При спонтанном распаде H_2O_2 образуются реакционные формы O_2 , гидроксидный радикал, супероксидный анионрадикал. O_2^- ; OH^\cdot ; $OSCN^-$ совместно воздействуют на ненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), белки и нуклеиновые кислоты, что приводит к образованию продуктов свободно радикального окисления, нарушению структур клеток и их гибели.

Таким образом, биологическая роль СПО в полости рта заключается в том, что с одной стороны продукты окисления тиоцианатов ингибируют рост и метаболизм лактобацилл и некоторых других микроорганизмов, а с другой стороны предотвращают аккумуляцию H_2O_2 многими видами стрептококков полости рта, а также клетками холяина. Интересно, что антимикробная активность СПО модулируется углеводными компонентами смешанной слюны. Глюкозамины и сахараза стимулируют образование H_2O_2 .

Протеиназы слюны.

В слюне определяется невысокая активность протеиназ, рН оптимум которых находится в кислой и слабощелочной среде. Низкая их активность в норме связана с присутствием в слюне ингибиторов протеиназ белковой природы. Из слабощелочных трипсиноподобных протеиназ в слюне наиболее активен калликреин. Кислые протеиназы представлены катепсинами D и B, активность которых увеличивается при гингивитах и пародонтитах.

Ингибиторы протеиназ. В смешанной слюне человека определяется активность α_1 -ингибитора протеиназ (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулина (α_2 -М), цистатинов и низкомолекулярных кислотостабильных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ (КСИ).

α_1 -ИП поступают в ротовую полость из сыворотки крови и определяется только в одной трети исследуемых образцов слюны. Это одноцепочечный белок, состоящий из 294 амк, синтезируется в печени а виде предшественника. α_1 -ИП ингибирует эластазу, коллагеназу, плазмин, калликреин, микробные сериновые протеиназы.

α_2 -макроглобулин - поливалентный ингибитор протеиназ. Это гликопротеин с м.м. 725 кДа, состоящий из 4-х субъединиц. Синтезируется в печени и поступает из сыворотки крови в слюну у 10% обследуемых. В последние годы выполнены исследования, раскрывающие механизм взаимодействия α_2 -М с протеиназами. На первом этапе активная протеиназа (П) реагирует с определенным участком молекулы α_2 -М. При этом образуется непрочный комплекс α_2 -М-П. На втором этапе фермент расщепляет специфическую пептидную связь (приманку), что приводит к конформационным изменениям молекулы белка (α_2 -М). На третьем этапе протеиназа ковалентно присоединяется к особому участку в молекуле α_2 -М, что сопровождается образованием более компактной структуры.

В слюнных железах человека и животных содержатся ингибиторы типа семейства Кунитца и другие кислотостабильные ингибиторы протеиназ. Это низкомолекулярные белки с м.м. от 6,5 до 10 кДа, они ингибируют калликреин, трипсин, эластазу, катепсин G. В смешанной слюне часть этих ингибиторов находятся в комплексе с протеиназами

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1 СОСТАВ И СТРОЕНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.	6
1.1 КОЛЛАГЕН.	6
1.2 ЭЛАСТИН.	16
1.3 ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ И ПРОТЕОГЛИКАНЫ.	18
1.4 НЕКОЛЛАГЕНОВЫЕ БЕЛКИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.	24
1.5 КЛЕТКИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.	26
Глава 2 БИОХИМИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ.	29
2.1 МИНЕРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КОСТНОЙ ТКАНИ.	30
2.2 КЛЕТКИ.	32
2.3 ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА КОСТИ.	32
2.4 МИНЕРАЛИЗАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ.	39
2.5 РЕГУЛЯЦИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА, МИНЕРАЛИЗАЦИИ И ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ.	43
2.6 ВЛИЯНИЕ ПИТАНИЯ.	48
Глава 3 БИОХИМИЯ ТКАНЕЙ ЗУБА.	49
3.1 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭМАЛИ.	49
3.2 ФОРМИРОВАНИЕ ЭМАЛИ.	59
3.3 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДЕНТИНА И ЦЕМЕНТА.	60
Глава 4 БИОХИМИЯ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ.	63
4.1 СЛЮНЫЕ ЖЕЛЕЗЫ.	63
4.2 СОСТАВ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ.	70
4.3 ЗАЩИТНЫЕ СИСТЕМЫ ПОЛОСТИ РТА.	84
4.4 БИОХИМИЯ ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ.	86
Глава 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОЛОСТИ РТА ПРИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ.	90
5.1 ЗУБНОЙ НАЛЕТ.	90
5.2 ЗУБНОЙ КАМЕНЬ.	93
5.3 БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ КАРИЕСЕ. КАРИЕСРЕЗИСТЕНТНОСТЬ И КАРИЕСВОСПРИИМЧИВОСТЬ.	95

5.4 ВЛИЯНИЕ ЧАСТИЧНОГО ОТСУТСТВИЯ ЗУБОВ НА БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТЕЙ. _____	102
5.5 БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ДЕФЕКТАХ КОРОНОК ЖЕВАТЕЛЬНЫХ ЗУБОВ И ЗУБНЫХ РЯДОВ. _____	104
Глава 6. СЛЮНА КАК ОБЪЕКТ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ. _____	106
6.1 НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ И МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ. _____	107
6.2 МИКРОКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ. _____	112
ЛИТЕРАТУРА _____	112