

Pojemność buforowa, pH i stężenie immunoglobuliny A w ślinie całkowitej, spoczynkowej osób młodych odpornych i podatnych na próchnicę

Buffer capacity, pH, and immunoglobulin A concentration in whole, resting saliva in caries resistant or susceptible young patients

Anna Zalewska¹, Danuta Waszkiel¹, Katarzyna Błahuszewska²,
Justyna Marciniak³, Agnieszka Kowalczyk⁴

Z Zakładu Stomatologii Dziecięcej AM w Białymstoku¹

Kierownik: dr hab. n. med. D. Waszkiel

Z Zakładu Chirurgii Szczękowej AM w Białymstoku²

Kierownik: prof. dr hab. n. med. S. Z. Grabowska

Z Kliniki Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej AM w Białymstoku³

Kierownik: dr hab. n. med. J. Popko

Z Zakładu Propedeutyki Stomatologii AM w Białymstoku⁴

Kierownik: dr hab. n. med. A. Kierklo

Streszczenie

Cel pracy: zbadano pojemności buforowe i stężenia IgA w ślinie osób młodych podatnych i odpornych na próchnicę.

Material i metody: materiał stanowiła ślina niestymulowana uzyskana od 55 osób ogólnie zdrowych, w wieku 18-35 lat obojga płci (30 kobiet i 25 mężczyzn). Badanych podzielono na grupy: I – odporną na próchnicę (PUW <5) i II – podatną na próchnicę (PUW >15). Oceniono intensywność próchnicy oraz oznaczono pojemność buforową i stężenie immunoglobuliny A.

Wyniki: znamiennie wyższą pojemność buforową ($p < 0,00002$) śliny odnotowano u osób odpornych na próchnicę. W obrębie grupy z wysokim PUW zaobserwowano istotnie wyższe stężenie IgA w ślinie mężczyzn ($p < 0,007$) w porównaniu z grupą kobiet.

Podsumowanie: na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że zarówno pojemność buforowa, jak i stężenie IgA są istotnymi czynnikami umożliwiającymi zachowanie zdrowia jamy ustnej.

Summary

Aim of the study: Buffer capacity and IgA concentration in saliva were examined in young patients who were either resistant, or susceptible to caries.

Material and methods: The study material consisted of unstimulated saliva collected from 55 patients with no medical history aged between 18 and 35 years, of both genders (30 females and 25 males). The patients were divided into study groups: I – resistant to caries (DMF <5) and II – susceptible to caries (DMF >15). The intensity of caries was assessed and the buffer capacity and IgA concentration were noted.

Results: A significantly higher buffer capacity ($p < 0.00002$) of saliva in caries resistant patients was noted. Significantly higher IgA concentration was observed in saliva of men ($p < 0.007$) in comparison with women in the high DMF group.

Conclusion: The results obtained seem to indicate that both buffer capacity and IgA concentration are significant factors in maintaining oral health.

HASŁA INDEKSOWE:

ślina, pojemność buforowa, IgA

KEYWORDS:

saliva, buffer capacity, IgA

Wstęp

Biochemiczne i kliniczne badania analizujące wpływ środowiska jamy ustnej na przebieg procesu próchnicowego zwróciły uwagę badaczy na ślinę, która odpowiada za ograniczenie, hamowanie, a nawet cofanie się początkowych próchnicowych uszkodzeń szkliwa.

Zgodnie z teorią *Mossa* (10) ślina jest tym dla szkliwa, czym krew dla komórek ciała, bowiem dostarcza substratu do budowy tkanek twardej zęba i stwarza mikrośrodowisko warunkujące prawidłowy przebieg wielu reakcji biochemiczno-fizycznych i biologicznych. Ślina chroni powierzchnię szkliwa przed zakwaszeniem za pomocą dwóch buforów: węglanowego (CO_2) NaHCO_3 , fosforanowego $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ i grup zasadowych aminokwasów wolnych i tworzących białka (1). Warunkują one tzw. pojemność buforową pozwalającą na utrzymanie stałego odczynu śliny, wahającego się od 6,8 do 7,2. W tym zakresie pH śliny stanowi przesycony roztwór fosforanu wapnia. Zakwaszenie środowiska (np. wskutek fermentacji cukrów przez enzymy bakteryjne płytki bakteryjnej) zmniejsza stopień nasycenia śliny fosforanami wapnia. Wówczas ślina staje się roztworem nienasyconym, czego następstwem jest zwiększenie rozpuszczalności szkliwa zębów. W kwaśnym środowisku grupy fosforanowe hydroksyapatytu mogą przyłączać protony (jony PO_4^{3-} są przekształcane w HPO_4^{2-} lub H_2PO_4). Przyłączenie dwóch protonów powoduje uwolnienie jednego jonu Ca^{2+} z kryształu apatyty, zwiększenie rozpuszczalności powstałego wodorofosforanu wapnia i wzrost, co w konsekwencji sprzyja próchnicy (16).

Udział bakterii płytki nazębnej w rozwoju próchnicy jest ograniczony przez wrodzony system odporności, tzw. odporność nieswoistą (innate immunity) oraz system odporności nabytej, wyrażającej się produkcją przeciwciał. Najważniejszą z punktu widzenia zdrowia jamy ustnej jest immunoglobulina A (Ig A), która począwszy od 1 tygodnia życia syn-

tetyzowana jest przez komórki plazmatyczne związane z nabłonkiem przewodów wyprowadzających gruczołów ślinowych (13). U osób z selektywnym niedoborem Ig A dochodzi do kompensacyjnego wydzielania przez śliniankę przyuszną zwiększonej ilości Ig M (8). Ślinowa Ig A w swej strukturze molekularnej różni się od surowiczej, między innymi obecnością komponenty wydzielniczej S.C., ułatwiającej transport i wydzielanie sIg A oraz ochraniającej łańcuchy polipeptydowe sIg A przed działaniem proteaz (15).

Wykazano, że ludzka sIg A występuje w dwóch formach: sIg A1 i sIg A2. Ta ostatnia ma jeszcze dwie odmiany: A2 m (1) u osób rasy kaukaskiej i A2 m(2) dominującą w pozostałych rasach (7). Wszystkie immunoglobuliny ślinowe jako przeciwciała wiążą się z determinantami antygenowymi bakterii jamy ustnej, jednak związek specyficznych czynników obronnych śliny z rozwojem próchnicy nie jest do końca wyjaśniony. Wiadomo jedynie, że obecność ognisk próchnicy indukuje powstanie specyficznych przeciwciał Ig G, które pozostają na wysokim poziomie przez kilka tygodni, czy nawet miesięcy po zakończeniu leczenia próchnicy (7). Natomiast diagnozowanie chorych z selektywnym niedoborem Ig A wykazało wzrost, spadek lub brak jakiegokolwiek korelacji pomiędzy stężeniem immunoglobuliny a podatnością czy odpornością na próchnicę.

W dostępnym piśmiennictwie krajowym i światowym brak jest danych charakteryzujących pH, pojemność buforową i stężenie Ig A w grupie ludzi młodych podatnych i odpornych na próchnicę.

Poszukiwanie markerów procesu próchnicowego powinno być jednym z elementów profilaktyki. Ułatwiłoby to opracowanie testów diagnostycznych i selekcjonowanie pacjentów z grupy ryzyka we wczesnym okresie choroby. Na uwagę zasługuje fakt, że przedstawione poniżej badania są nieinwazyjne, gdyż pobranie śliny do badań nie stwarza jakiegokolwiek

zagrożenia dla zdrowia i życia pacjentów objętych eksperymentem.

Material i metody

Badaniami objęto 55 osób ogólnie zdrowych, w wieku 18-35 lat, obojga płci (30 kobiet i 25 mężczyzn). Badanych podzielono na dwie grupy: I – odporną na próchnicę z niskim PUW < 5 (16 mężczyzn, 11 kobiet) i II – podatną na próchnicę z wysokim PUW > 15 (9 mężczyzn, 19 kobiet).

Badanie stanu jamy ustnej wykonano w oświetleniu sztucznym z użyciem stomatologicznych narzędzi diagnostycznych. Oceniono stan tkanek twardych zębów przez zsumowanie zębów próchnicowo zmienionych, usuniętych z powodu próchnicy i wypełnionych.

Ślinę mieszaną, niestymulowaną pobierano w godzinach od 8-10; dwie godziny po spożyciu ostatniego posiłku stałego lub/ i płynnego. Podczas badania pacjentowi zapewniono niekłępujące go warunki (oddzielne pomieszczenie, wygodna pozycja siedząca).

Zbieranie materiału rozpoczęto po 5 minutach od przybycia pacjenta na badania, po przepłukaniu jamy ustnej wodą o temp. pokojowej. Pacjent wypluwał ślinę w odstępach 1 minutowych (spitting method), do zlewki umieszczonej w pojemniku z lodem. Jednorazowo pobierano 3 ml śliny. Bezpośrednio po zebraniu, ślinę odwirowano (14000 g, 20 min, 4°C) oraz dzielono na porcje po 200 µl i przechowywano w -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

W uzyskanym materiale oznaczono pH, pojemność buforową i stężenie immunoglobuliny A. Pomiar stężenia IgA w ślinie wykonano metodą immunodyszufji radialnej, za pomocą gotowych zestawów BINDARID (Human Immunoglobulin Classes 'ML' RID) firmy Binding Site.

pH śliny oznaczono, posługując się pH/ Jonometrem CPI- 501 Elmetron, a uzyskane wyniki rejestrowano pod symbolem pH i wykorzystano do wyznaczenia pojemności buforowej. Pojemność buforową oznaczono wobec 0,1 M HCl. Do każdej próbki śliny o objętości 1,2 ml, z zarejestrowanym wcześniej pH dodawano 0,06 ml 0,1 M HCl, intensywnie mieszano oraz ponownie oznaczano pH i zapisywano jako pH₁. Na podstawie definicji o zdolności buforowej, z różnicy pomiędzy wartościami pH a pH₁ (=ΔpH), obliczono pojemność buforową według wzoru: pojemność buforowa = 0,006 / [V(dcm³) próby x ΔpH] (14).

Wyniki opracowano za pomocą pakietu Statistica 6, wykorzystując metodę analizy. W celu wykazania najmniejszych istotnych różnic dla grup badanych i ich kolejnych par średnich posłużono się testem NIR, czyli testem wielokrotnych porównań. We wszystkich obliczeniach za poziom istotności przyjęto p < 0,05.

Wyniki

Wartości pH śliny w zależności od wysokości wskaźnika PUW i płci badanych zestawiono w tab. I. Zaobserwowano nieistotnie wyż-

Tab e l a I. pH śliny, z uwzględnieniem wskaźnika PUW i płci badanych

	N	Średnia	Min	Maks.	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	p
PUW < 5 (I)	27	7,82	6,82	8,95	0,49	0,09	0,63
PUW > 15 (II)	28	7,77	6,54	8,22	0,44	0,08	
I	K	11	7,97	7,06	8,95	0,47	0,23
	M	16	7,73	6,82	8,80	0,51	
II	K	19	7,74	6,72	8,21	0,41	0,68
	M	9	7,82	6,54	8,08	0,50	

sze pH u osób odpornych na próchnicę – 7,82 w porównaniu z grupą podatną na tę chorobę – 7,77. Tendencja do wzrostu pH ujawniła się w przypadku kobiet z PUW<5 i w przypadku mężczyzn z PUW>15.

Pojemność buforowa śliny istotnie wzrosła ($p < 0,00002$) w grupie odpornej – 8,95 w stosunku do podatnej – 5,84 na próchnicę. Uzyskane wyniki były nieistotnie wyższe w ślinie mężczyzn obu grup badanych (tab. II).

Tendencja do wzrostu stężeń IgA w ślinie ujawniła się w przypadku grupy z wysokim PUW (90,18 mg/l) w stosunku do grupy z PUW<5 (81,34 mg/l). W grupie z PUW>15 zanotowano znamienne wyższe ($p < 0,007$) stężenie IgA w ślinie mężczyzn (114,35 mg/l) w porównaniu ze śliną kobiet (77 mg/l). Tendencję do wzrostu stężenia IgA odnotowano w ślinie mężczyzn grupy odpornej na próchnicę (tab. III).

Dyskusja

Ślinę zalicza się do tzw. „endogennych czynników” wpływających na przebieg próchnicowych uszkodzeń tkanek twardych zęba. Ślina nie tylko mechanicznie obmywa jamę ustną, ale jest źródłem licznych składników organicznych i nieorganicznych utrzymujących równowagę na granicy jej oddziaływań z hydroksyapatytem szkliwa. Duże znaczenie w etiologii próchnicy zębów przypisuje się czynności układów buforowych śliny. Neutralizują one protony wodoru, dzięki czemu pH śliny utrzymuje się na poziomie od 6,8 do 7,2. Tak, jak wspomnieliśmy we wstępie, niewyrównane zakwaszenie mikrośrodowiska jamy ustnej, zapoczątkowuje wiele reakcji biochemicznych prowadzących do wzrostu rozpuszczalności hydroksyapatytu szkliwa (2). Można wnioskować, że genetycznie

T a b e l a II. Pojemność buforowa, z uwzględnieniem wskaźnika PUW i płci badanych

	N	Średnia	Min.	Maks.	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	p
PUW< 5 (I)	27	8,95	4,55	17,61	3,26	0,73	0,000018
PUW> 15 (II)	28	5,84	1,36	10,75	1,69	0,32	
I	K	11	8,51	5,62	12,95	2,46	0,545
	M	16	9,27	4,55	17,61	3,54	
II	K	19	5,71	1,36	10,75	1,96	0,585
	M	9	6,09	4,56	7,59	0,93	

T a b e l a III. Stężenie IgA (mg/ml), z uwzględnieniem wskaźnika PUW i płci badanych

	N	Średnia mg/l	Min. mg/l	Maks. mg/l	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	p
PUW< 5 (I)	27	81,34	35,4	152	29,65	5,70	0,308
PUW> 15 (II)	28	90,18	33,2	152	33,88	6,40	
I	K	11	72,94	35,4	116	30,03	0,23
	M	16	87,06	35,4	152	28,96	
II	K	19	77,00	33,2	134	31,80	0,0069
	M	9	114,35	79,2	152	26,56	

niska lub patologicznie zmniejszona wydolność układu buforującego śliny sprzyja rozwojowi próchnicy.

Wyniki przedstawionych badań potwierdzają to założenie. Wykazano w nich, że ślina osób odpornych na próchnicę charakteryzuje się istotnie wyższą zdolnością do buforowania kwasów niż ślina osób podatnych na tę chorobę. Podobne zależności uzyskali inni autorzy (2, 5, 6). *Ericsson* i współ. (2) utrzymują, iż pojemność buforowa śliny jest uwarunkowana tempem metabolizmu, czynnością hormonalną ustroju i ogólnym stanem zdrowia, jak również, że jest ona wyższa u mężczyzn niż u kobiet (5).

W przypadku badanej przez nas populacji nie uzyskaliśmy wyników, które jednoznacznie (tzn. statystycznie) zgadzają się z tym ostatnim stwierdzeniem, zauważamy jednak, że pojemność buforowa śliny wykazuje tendencję do osiągania wyższych wartości u mężczyzn, niezależnie od wielkości wskaźnika PUW.

W wykonanych przez nas badaniach średnie wartości pH śliny mieściły się w optymalnym zakresie od 6 do 8 i nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. Wynika z tego, że odczyn śliny nie może stanowić bezpośredniej determinanty odporności czy podatności na próchnicę. Jest jednak prawdopodobne, że poprzez współtworzenie mikrośrodowiska jamy ustnej determinuje przebieg wielu procesów biochemicznych i fizycznych wpływających na progresję lub zahamowanie próchnicy. Udowodniono związek pomiędzy odczynem śliny a jej reologią, zdolnością do remineralizacji początkowych uszkodzeń szkliwa czy też dojrzewaniem płytki nazębnej i kamienia nazębnego (9, 16). Wszystkie zaś, wymienione czynniki mają bezpośredni lub pośredni wpływ na utrzymanie integralności twardych tkanek zęba.

IgA zapewnia pierwszą linię obrony przed patogenami kolonizującymi jamę ustną. Zakres biologicznych oddziaływań IgA obejmuje ak-

tywność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i przeciwgrzybiczą, a związany jest z różnymi mechanizmami odporności swoistej i nieswoistej. Wystarczy wymienić chociażby mechanizm aglutynacji bakterii, osłabienia adhezji drobnoustrojów do błon śluzowych i tkanek twardych zęba, inaktywacji toksyn i enzymów bakteryjnych oraz łączenie się z antygenami bakteryjnymi (3, 4). Pomimo tak wielokierunkowego zakresu oddziaływań udział IgA w ograniczeniu procesu próchnicowego nie został udowodniony. U badanych przez nas osób stwierdzono nieistotnie wyższe stężenie IgA w ślinie osób podatnych w porównaniu z osobami odpornymi na próchnicę, co może wskazywać na pobudzenie i/lub sprawne funkcjonowanie mechanizmów odporności swoistej i jej czynnego udziału w zwalczaniu infekcji bakteryjnej w jamie ustnej. Wśród osób z wysokim PUW uzyskano znamienne wyższe stężenie immunoglobuliny w ślinie mężczyzn w porównaniu ze śliną kobiet.

Podobne zależności, ale nieistotne statystycznie, zanotowano w grupie z niską frekwencją próchnicy. Wyniki określające związek pomiędzy stężeniem IgA a próchnicą, uzyskane przez niezależne ośrodki badawcze, charakteryzują się dużą rozbieżnością. Ich porównywanie jest dodatkowo utrudnione, ze względu na fakt, że niektóre wynikają z korelacji stężenia IgA ze wskaźnikiem PUW, a pozostałe z obecności aktywnych miejsc próchnicy lub z poziomu *S. mutans* w ślinie (8). Również badania wykonane w grupie osób z selektywnym niedoborem IgA nie dostarczyły jednoznacznej odpowiedzi.

Robertson i współ. (12) wykazali, iż u osób z hipoimmunoglobulinemią A i/lub nieprawidłową syntezą/sekrecją IgA dochodzi do zwiększonej zapadalności na próchnicę. *Norhagen* i współ. (11) stwierdzili natomiast, iż spadek stężenia IgA kompensowany jest wzrostem stężenia IgM. Sprawia to, że intensywność próchnicy jest taka sama, jak u osób zdrowych.

Podsumowanie

Podsumowując powyższe rozważania stężenie IgA w ślinie nie jest bezwzględny wyznacznikiem procesu próchnicowego. Jest częścią układu, w którym współdziałanie pojedynczych elementów warunkuje sprawność czynność całego systemu obronnego jamy ustnej.

Rezultaty powyższych badań mogą świadczyć o sprawniejszym u mężczyzn w porównaniu z kobietami (tendencja do osiągania wyższych wartości pojemności buforowej, statystycznie wyższe stężenie IgA – dane niewykazane) działaniu mechanizmów obronnych śliny, a tym samym mniejszej skłonności do występowania próchnicy i innych schorzeń jamy ustnej u mężczyzn.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących podobnych badań, co z jednej strony nie pozwala na analizę porównawczą uzyskanych wyników, a z drugiej wyłącza potrzebę wykonania dodatkowych badań klinicznych i biochemicznych, które mogłyby potwierdzić lub wykluczyć taką hipotezę.

W świetle przedstawionych wyników i hipotez wydaje się, że zarówno pojemność buforowa, jak i stężenie IgA są istotnymi czynnikami umożliwiającymi zachowanie zdrowia jamy ustnej.

Piśmiennictwo

1. *Bardow A., Moe D., Nyvad B., Nauntofte B.*: The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Arch. Oral. Biol.*, 2000, 45, 1-12. – 2. *Ericsson Y.*: Clinical investigation of the salivary buffering action. *Acta. Odontol. Scand.*, 1959, 17, 131-165. – 3. *Fukui Y., Fukui K., Moriyama T.*: Inhibition of Enzymes by Human Salivary Immunoglobulin A. *Infect. Immunity.*, 1973, 8, 3, 335-340. – 4. *Gibbons R. J., van Houte J.*: Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role

as an ecological determinant. *Infect. Immunity.*, 1971, 3, 567-574. – 5. *Heintze U., Birkhed D., Bjorn H.*: Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated saliva as a function of age and sex. *Swed. Dent. J.*, 1983, 7, 227-238. – 6. *Larsen M. J.*: Chemical events during tooth dissolution. *J. Dent. Res.*, 1990, 69, 575-580. – 7. *Lenander-Lumikari M.*: Inhibition of *Candida albicans* by the peroxidase/ SCN⁻/ H₂O₂ system. *Oral. Microbiol. Immunol.*, 1992, 7, 315-320. – 8. *Lenander-Lumikari M., Loimaranta V.*: Saliva and dental caries. *Adv. Dent. Res.*, 2000, 14, 40-47. – 9. *Litt M., Khan M. A., Shih C. K.*: The role of sialic acid in determining rheological and transport properties of mucus secretions. *Biorheology.*, 1977, 14, 127-132. – 10. *Moss S.*: Rola śliny w utrzymaniu zdrowia jamy ustnej. *Stomatol. Współcz.*, 1994, 2, 154-158.

11. *Norhagen G., Engstrom P. E., Hammarstrom L., Soder P. O., Smith C. I.*: Immunoglobulin levels in saliva in individuals with selective IgA deficiency: compensatory IgM secretion and its correlation with HLA and susceptibility to infections. *J. Clin. Immunol.*, 1989, 9, 279-286. – 12. *Robertson P. B., Wright T. E., Macler B. F., Lenertz D. M., Levy B. M.*: Periodontal status of patients with abnormalities of the immune system. *J. Periodontal. Res.*, 1978, 13, 37-45. – 13. *Tappuni A. R., Challacombe S. J.*: A comparison of salivary immunoglobulin A (IgA) and IgA subclass concentrations in pre-dentate and dentate children and adults. *Oral. Microbiol. Immunol.*, 1994, 9, 142-145. – 14. *Waszkiel D.*: Nadżerki nietypowe szkliwa – etiopatogeneza, klinika i zapobieganie w świetle badań własnych. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Białymstoku. 2000. – 15. *Zalewska A., Borzym M., Marcinkiewicz M., Zwierz K.*: Glikoproteiny śliny ludzkiej. *Mag. Stomatol.*, 1999, 10, 28-35. – 16. *Zalewska A., Pietruska M. D., Knaś M., Zwierz K.*: Niemucynowe białka śliny o wysokim stopniu homologii łańcucha polipeptydowego. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 2001, 55, 733-754.

Otrzymano: dnia 14.XII.2005 r.

Adres autorów: 15-222 Białystok, ul. Waszyngtona 15a.