

ОГЛЯДИ

УДК 577.352.462:616

О. И. Сукманский, д. мед. н., И. О. СукманскийОдесский государственный аграрный университет,
ГУ Институт стоматологии АМНУ**АКВАПОРИНЫ. СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ****О. І. Сукманський, І. О. Сукманський**Одеський державний аграрний університет,
ДУ Інститут стоматології АМНУ**АКВАПОРИНИ. СТОМАТОЛОГІЧНІ
АСПЕКТИ****O. I. Sukmansky, I. O. Sukmansky**Odesa State Agrarian University, The SE Institute of
Stomatology of AMSU**AQUAPORINS. STOMATOLOGICAL
ASPECTS**

Организм человека и животных на 60-70 % состоит из воды. Две третьих этой воды находится внутри клеток, а $\frac{1}{3}$ - составляет внеклеточную жидкость (вода крови и межклеточного пространства). Оба вида жидкостей организма имеют примерно одинаковую осмолярность (около 300 мосм.), но весьма различный ионный состав. Так, главным катионом внеклеточной (экстрацеллюлярной) воды является натрий, а главным анионом – хлорид. В то же время, основным катионом внутриклеточной (интрацеллюлярной) воды является калий, а тремя ведущими анионами служат фосфаты, гидрокарбонат и белки[6]. Поддержание отличий и постоянства состава обоих видов воды лежит в основе жизненных процессов и обеспечивается биологическими барьерами – мембранами клеток и их органелл, стенками капилляров и др. Давно открыты и далее интенсивно изучаются каналы электролитов в биологических мембранах, которые выполняют такую функцию. Что же касается воды, то до недавнего времени считали, что она легко преодолевает биологические мембраны путем простой физико-химической диффузии, хотя такое представление противоречит ряду фактов и точным расчетам. Открытие водных каналов (аквапоринов) в начале 90-х годов минувшего столетия убедительно опровергло подобную концепцию и явилось фундаментальным достижением биоло-

гии, физиологии и медицины. Первооткрывателем аквапоринов является американский ученый Р.Агре, а выдающееся значение этого научного достижения подчеркнуто присуждением ему в 2003 году Нобелевской премии по химии «за открытие водных каналов»[7, 17].

Аквапорины (АКПы, AQP) - семейство относительно небольших (мол. масса мономера около 30 кДа), гидрофобных мембранных белков у всех живых организмов (высших и беспозвоночных животных, растений и микроорганизмов). Оно насчитывает несколько сот изоформ, из которых сегодня не менее 13 описаны у млекопитающих (АКП0-АКП12)[10,17]. В зависимости от избирательности проницаемости их разделяют на две подгруппы: 1) собственно *аквапорины* (АКП0, АКП1, АКП2, АКП4, АКП5, АКП6, АКП8), проницаемые только для воды, и *акваглицеропорины* (АКП3, АКП7, АКП9, АКП10), проницаемые для воды, глицерина, мочевины и некоторых других мелких молекул. АКП11 и АКП12 несколько отличаются от других аквапоринов и не могут быть отнесены ни к одной из двух подгрупп[7,8,10,30]. Остается дискуссионной возможность проникновения газов (CO_2 , O_2 , NO , NH_3) и некоторых малых ионов через АКПы [51, 52].

В биологических мембранах АКПы представлены в виде тетрамеров, однако функцию водного канала выполняет каждый мономер. Он состоит из шести α -спиральных доменов, которые пронизывают биомембрану, образуя три внеклеточных (А, С, Е) и две внутриклеточных (В, D) петли. При этом канал переноса воды (водную пору) образуют петли В и Е (содержащие консервативный мотив: аспарагин, пролин, аланин). Транспорт воды через АКПы происходит в двух направлениях, а его направленность определяет осмотический градиент [8,10,30]. На основании кристаллографических и рентгеноструктурных исследований создана пространственная модель АКПа, согласно которой он имеет форму песочных часов. Каждый конец канала АКПа имеет воронкообразное расширение, открывающееся соответственно во внеклеточное или внутриклеточное пространство. В наиболее узком месте канал имеет диаметр около 0,3 нм, что является достаточным для прохождения молекул воды, однако стерические и электростатические факторы предотвращают транспорт через него протонов [10,51].

Основная функция АКПАов – быстрый трансцеллюлярный транспорт воды. Она имеет наибольшее значение для органов и тканей, которые транспортируют много воды: почки, эпителий секреторных желез (пищеварительных, потовых, слезных, субмукозных дыхательных путей). Кроме того, АКПы регулируют объём и осмосенсорность клеток, принимают участие в их миграции, адгезии, пролиферации и апоптозе, заживлении ран и канцерогенезе, жировом обмене и передаче нервных сигналов [51,52].

Для понимания роли аквапоринов в функционировании слюнных желез необходимо рассмотреть механизм слюноотделения. Согласно современным представлениям, формирование слюны, как и образование мочи, является двухэтапным процессом. На первом этапе в клетках ацинусов (концевых отделов) происходит фильтрация первичной слюны, которая по составу электролитов мало отличается от плазмы крови и межклеточной жидкости. На втором этапе состав первичной слюны изменяется путем реабсорбции и секреции отдельных компонентов во внутридольковых протоках. У человека и всех млекопитающих они представлены исчерченными протоками (ан. – striated ducts), а у грызунов (крыс, хомяков и мышей) исчерченным предшествует другой вид внутридольковых протоков – извитые (зернистые) трубочки (ан. – convoluted, granular tubules). В обоих видах внутридольковых протоков происходит реабсорбция в кровь ионов натрия и хлоридов и дополнительная секреция в просвет ионов K^+ и HCO_3^- [45].

К сожалению, современные представления о двухэтапном образовании слюны обычно не приводятся в российских и украинских учебниках по физиологии и даже в солидной монографии, посвященной слюнным железам (Денисов А.П. Слюна и слюнные железы. М.: Изд-во РАМН, 2006.-372 с.) изложены противоречиво. Так, на с. 33 автор приводит правильную схему секреции и реабсорбции воды и электролитов в слюнных железах (рис. 1.20), но на с.34, говоря об исчерченных протоках, пишет, что «в области протоков происходит интенсивное поступление ионов Na, K, Cl, I через стенку протоков в слюну». Как уже было сказано выше, ионы натрия, как и хлориды поступают в первичную слюну в ацинусах (концевых отделах), а не в исчерченных протоках. Во внутридольковых же протоках (извитых и исчерченных) ионы Na и Cl (в отличие от калия и гидрокарбоната) не поступают в слюну, а реабсорбируются из нее в кровь. К тому же на с. 34 цитируемой монографии исчерченные протоки (являющиеся внутридольковыми) неверно названы междольковыми, а на схеме двухэтапного

образования слюны (с. 34, рис. 1.21) перепутаны ионы K^+ и Cl.

Общая концентрация электролитов в слюне колеблется в широких пределах, но она (а также содержание Na^+ и Cl) всегда ниже, чем в крови. Согласно закону Гейденгайна, концентрация неорганических веществ в слюне прямо пропорциональна скорости секреции. При малой скорости секреции первичная слюна медленно движется по внутридольковым протокам, вследствие чего успевает реабсорбироваться большая часть натрия и хлоридов (их концентрация в окончательной, вторичной слюне снижается в 5-7 и более раз). Одновременно секреторируются в проток ионы K и гидрокарбоната (концентрация K^+ возрастает в 5-7 раз, а HCO_3^- – в 2-3 раза. При высокой скорости секреции первичная слюна быстро движется по протокам, вследствие чего реабсорбция натрия и хлорида, как и секреция калия и гидрокарбоната меньше изменяют её состав. С внешней секрецией (слюноотделением) тесно связана инкреторная (эндокринная) функция слюнных желез, т.к. большинство инкретов слюнных желез (фактор роста нервов, фактор роста эпидермиса, паротин, ренин и др.), вырабатываемых в исчерченных и зернистых протоках, поступает одновременно в кровь и слюну [2,4,5].

Регуляция внешней и внутренней секреции слюнных желез осуществляется автономной (вегетативной) нервной системой. Парасимпатические нервы (через M_3 и, в меньшей мере – M_1 -холинергические рецепторы) стимулируют секрецию воды и электролитов. Симпатические нервы стимулируют секрецию ферментов и других белковых веществ, в том числе инкретов. При этом стимуляция секреции ферментов является преимущественно β -адренергической, а выделения инкретов –

α -адренергической [5, 42]. В последние годы установлено, что автономная (M-холинергическая и α -адренергическая) иннервация регулирует также экспрессию и транслокация АКП5 в слюнных железах [26,34].

Исследованию АКПов посвящено более 4 тыс. публикаций, в числе которых более 100 касаются аквапоринов слюнных желез. По данным ряда авторов в слюнных железах присутствуют АКПы 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 11 [21, 24,32, 54].

Наибольшее значение для секреции воды слюнными железами имеет АКП5. Об этом свидетельствуют исследования на трансгенных мышцах, которые показали, что у животных с нокаутом гена АКП5 более, чем вдвое снижается секреция слюны на пилокарпин. При этом слюна становится более вязкой и в ней повышается содержание электролитов, а секреция амилазы и белков не нарушается [31, 37]. Вместе с тем но-

каут генов АКП1 и АКП4 у мышей не изменяет объема и состава слюны [37].

АКП5 локализуется в апикальных (люминальных) и каналикулярных мембранах, а АКП3 – в базолатеральных мембранах ацинозных клеток. Таким образом, эти два аквапорина вместе составляют путь для трансцеллюлярного осмотического тока при секреции первичной слюны [24]. АКП1 локализуется в эндотелии капилляров и миоэпителиальных клетках слюнных желез [Ibid.], а АКП8 – также в миоэпителиальных клетках околоушных и поднижнечелюстных желез, но отсутствует в ацинозных клетках [55]. АКП6 обнаружен в ацинозных клетках околоушных желез мышей и крыс, где он локализуется в апикальных мембранах и мембранах секреторных гранул [25, 39]. По мнению авторов этих исследований, он принимает участие в секреции анионов слюнными железами. АКП 11 обнаружен в развивающихся поднижнечелюстных железах мышей [32]. При этом в протоковых структурах он присутствует на всех стадиях индивидуального развития, а в ацинусах содержание АКП11 снижается в процессе развития слюнных желез. Сведения о присутствии и локализации АКП4 и АКП7 в слюнных железах скудны и противоречивы.

Большой интерес для практической стоматологии представляют данные о роли аквапоринов в патогенезе заболеваний и поражений слюнных желез, сопровождающихся ксеростомией. Это – синдром (болезнь) Шёгрена, сиаладенозы, лучевые поражения слюнных желез, а также гипосаливация при приеме некоторых медикаментов.

Синдром Шёгрена (Sjögren syndrome) – системное аутоиммунное заболевание, проявляющееся ксеростомией, ксерофтальмией и кератоконъюнктивитом, обусловленными лимфоидной инфильтрацией и выраженной гипофункцией слюнных и слезных желез. Целесообразно напомнить, что в 70-х годах минувшего столетия в Одесском НИИ стоматологии под руководством проф. В. И. Яковлевой-Митиной и одного из авторов настоящей статьи было проведено фундаментальное клинико-экспериментальное исследование проблем ксеростомии, был разработан метод определения функции мелких слюнных желез и предложен ряд эффективных методов лечения ксеростомии. Итогом исследования явилось оформление методических рекомендаций «Диагностика и лечение ксеростомии» [9]. Добавим, что в ходе работы, выполненной совместно с Институтом глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова, были обобщены результаты обследования уникального в мировой практике контингента лиц, страдающих синдромом Шёгрена (свыше 60 пациентов).

Роли АКПов в патогенезе этого заболевания посвящен ряд публикаций. Исследование биоптатов губных слюнных желез у 11 больных первичным синдромом Шёгрена и у 9 здоровых лиц показало, что в нормальных условиях АКП1 локализуется в миоэпителиальных клетках, окружающих ацинусы, а также в эндотелиальных клетках нефенестрированных капилляров, а АКП3 – в базолатеральных мембранах клеток ацинусов. У больных синдромом Шёгрена авторы не нашли изменений в экспрессии и локализации АКП3, но обнаружили снижение на 38% экспрессии АКП1 в миоэпителиальных клетках и заключили, что нарушение функции этих клеток может играть критическую роль в патогенезе синдрома Шёгрена [15]. Далее было установлено, что АКП5 при синдроме Шёгрена обнаруживается преимущественно в базальных мембранах клеток ацинусов, в то время как у здоровых лиц он локализуется в апикальных мембранах этих клеток. При этом успешное лечение синдрома Шёгрена инфликсимабом нормализовало и распределение АКП5 в клетках ацинусов мелких слюнных желез [47, 48]. В подтверждение приведенных выше данных снижение экспрессии АКП1 в миоэпителиальных клетках биоптатов лабиальных слюнных желез и уменьшение экспрессии АКП5 в апикальных мембранах клеток ацинусов было обнаружено у женщины, страдающей синдромом Шёгрена и дистальным почечным тубулярным ацидозом. При этом успешное лечение болезни ритуксимабом, подавляющим В-лимфоциты, сопровождалось отчетливым повышением экспрессии АКП1 в миоэпителиальных клетках и АКП5 в апикальных мембранах ацинозных клеток [44]. Повышение экспрессии АКП5 в апикальных мембранах клеток ацинусов губных слюнных желез обнаружено также после успешного лечения (повышение секреции слюны на 65 %) 16 больных синдромом Шёгрена экстрактом *Dendrobium candidum* [56]. О возможной роли ещё одного АКП в механизме аутоиммунного поражения слюнных желез свидетельствуют данные о присутствии в крови антител против АКП4 при сочетании синдрома Шёгрена с нейромиелитом глазного нерва и энцефаломиелитом [27, 28]. Опубликован подробный обзор о роли аквапоринов в патогенезе синдрома Шёгрена [19] и обсуждается вопрос о возможности генной терапии этого заболевания, мишенью которой могут быть гены АКПов [16].

Сиаладенозом именуют массивное припухание слюнных желез без видимых патологических изменений, которое нередко сопровождается выраженной гипосаливацией и ксеростомией. Иногда оно возникает при нарушении функции эндокринных желез и может носить компенсатор-

ный характер [3]. Описан случай припухания больших слюнных желез у пациентки, страдавшей несхарным диабетом и получавшей интраназально антидиуретический гормон (вазопрессин). При этом в ацинарных клетках слюнных желез пациентки наблюдалась повышенная экспрессия АКП5, регулирующего объем клеток [38]. Гипосаливация и ксеростомия могут возникать также при применении некоторых лекарственных средств (антигистаминных, седативных, антигипертензивных и др.). В этом плане заслуживает внимания исследование на культуре клеток поднижнечелюстной слюнной железы человека, которое показало, что гистамин (подобно тому, как это делают холинергические стимуляторы слюноотделения) вызывает транслокацию АКП5 в плазматические мембраны клеток, причем этот эффект осуществляется через H_1 -рецепторы [29]. Изменение экспрессии и локализации АКПов при сиаладенозе и действии некоторых лекарственных средств позволяет думать, что они играют известную роль в патогенезе возникающих при этом нарушений слюноотделения.

Известно, что тяжелое поражение слюнных желез и ксеростомия нередко возникают при лучевой терапии опухолей шеи и головы [14]. Опыты на крысах показали, что облучение вызывает уменьшение массы слюнных желез и секреции слюны, а также выраженное снижение в облученных поднижнечелюстных железах содержания мРНК и белка АКП5. При этом возникало повышение осмолярности слюны и концентрации в ней белка, а содержание АКП1 в железе и активность Na^+/K^+ -АТФазы лишь слегка уменьшались [35]. У мышей после рентгеновского облучения также обнаружено снижение секреции слюны и экспрессии АКП5 в поднижнечелюстных железах. Введение агониста М-холинорецепторов цевимелина перед облучением предотвращало снижение слюноотделения и экспрессии АКП5, однако после облучения препарат был неэффективен [49]. Введение другого М-холиномиметика – пилокарпина в дозах 0,4 и 0,8 мг/кг достоверно повышало слюноотделение у облученных крыс, однако объем секрета оставался более низким, чем у контрольных животных. При этом пилокарпин не влиял на экспрессию АКП5 в железах облученных крыс, хотя повышал его содержание в апикальных мембранах клеток околоушных желез у нормальных животных [12].

Отметим, что для лечения ксеростомии мы также использовали средства с холинергическим действием – пилокарпин и блокатор холинэстеразы галантамин [9].

Однако эти средства не всегда оказываются эффективными. Поэтому сегодня ведется интен-

сивная разработка методов генной терапии последствий облучения слюнных желез и других форм тяжелой ксеростомии. Так для лечения лучевой ксеростомии предложено использовать введение в железы белков теплового шока (шаперонов) [33], которые, как известно [1], защищают белки организма от конформационных изменений и денатурации, вызванных физическими, химическими, осмотическими и другими повреждающими факторами. В экспериментах на крысах авторы нашли, что облучение вызывает активацию апоптоза клеток поднижнечелюстной железы, снижение слюноотделения и экспрессии АКП5, а также изменения состава слюны (амилаза, белок, Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-). Введение в железу при помощи аденовирусного вектора белков теплового шока HSP25 и HSP70 смягчало эти нарушения. Особенно эффективным оказался HSP25, который почти полностью предотвращал как гистологические изменения в железе, так и снижение экспрессии АКП5, вызванное облучением [33].

В связи с тем, что после облучения в слюнных железах драматически снижается число ацинозных клеток, продуцирующих первичную слюну и выживают преимущественно клетки протоков [53], практически непроницаемые для воды, было предложено [14,20] переносить в эти клетки ген неполяризованного водного канала АКП1 с целью придать этим клеткам способность выполнять осмотический трансцеллюлярный транспорт воды и, таким образом, секретировать жидкость.

Для переноса гена человеческого АКП1 (чАКП1) был сконструирован аденовирусный вектор, с помощью которого этот ген был введен (методом ретроградной инстилляции в протоки) в поднижнечелюстные железы крыс, облученных однократной высокой дозой ионизирующей радиации [20]. После этого слюноотделение у облученных животных возрастало втрое, а в железах иммуногистохимически выявлялась экспрессия чАКП1 в клетках ацинусов и протоков. Сходные результаты принесли эксперименты с переносом кДНК чАКП1 в облученные околоушные железы более крупных животных – минисвиной [23, 46]. При этом у обоих видов животных не было обнаружено каких-либо заметных патологических изменений, связанных с введением аденовируса в организм. Успешные эксперименты на двух видах животных позволили разработать протокол для клинических испытаний на людях [14] и перейти к таким испытаниям [13]. Введение аденовирусного вектора, кодирующего чАКП1, здоровому индивиду в целом прошло успешно. Правда, у пациента на 7-й день после введения вектора был обнаружен низкий уровень аденовируса в слюне, однако у него не

возникло каких-либо симптомов вирусного заболевания [57].

Таким образом, проведенные экспериментальные и клинические исследования открывают путь для внедрения в клиническую практику генно-инженерной терапии ксеростомии, а также для использования с этой целью шаперонов и модуляторов действия аквапоринов [52].

В отличие от слюнных желез, сведения литературы о присутствии и функции АКПов в зубах и других тканях и органах полости рта и челюстно-лицевой области весьма скудны.

В работе, опубликованной в 2003 г., американские авторы [54] исследовали экспрессию всех известных на то время АКПов (АКП0-АКП10) в тканях развивающихся зубов человека методами обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и Вестерн-блот анализа. При помощи ОТ-ПЦР авторы обнаружили в тканях развивающихся зубов ДНК АКПов 1, 3, 4, 5, 6 и 10. Вестерн-блот анализ подтвердил присутствие в развивающихся зубах АКПов 1, 3, 5 и 6. АКП4 не был определен в тканях зубов, а данные об отсутствии недавно открытого АКП10 авторы считают недостаточно надёжными в связи с низким качеством антител против него. Со своей стороны отметим, что АКП1 обычно локализуется в эндотелии микрососудов, АКП2 присутствует почти исключительно в почках, а АКП5 является главным для секреторного эпителия.

В другой работе, выполненной венгерскими учеными с участием первооткрывателя АКПов P. Agre [22], исследовали с помощью специфических антител присутствие в зачатках развивающихся зубов человека и мышцы 6 изоформ АКПов (АКП1-5 и АКП9). При этом на стадии купола (колокола) АКП1 был обнаружен только в эндотелиальных клетках мелких сосудов. Сильная экспрессия АКП4 и АКП5 выявлена в зубной пластинке, внутреннем эпителии эмали, stratum intermedium, звездчатом ретикулуме и наружном эпителии эмали. Иммунореактивность АКП 2, 3 и 9 в зачатках зубов не была обнаружена. Во время развития матрикса твердых тканей зуба АКП4 и АКП5 определены в одонтобластах и их отростках, а также в секреторных амелобластах и их апикальных отростках. Ранее авторы обнаружили сходную локализацию в зачатках развивающихся зубов человека гиалуроновой кислоты и её главного рецептора CD44, а потому полагают, что АКПы играют роль в гидратации экстрацеллюлярного матрикса во время развития зубов. Сопоставляя данные двух цитированных выше работ, отметим, что они совпадают в плане присутствия в развивающихся зубах АКП1 и АКП5, отсутствия в них АКП2 и акваглицеропоринов

9 и 10, но несколько расходятся относительно АКП3 и АКП4.

Из других тканей полости рта АКП 7 и АКП10 определены в десне, АКПы 1, 3, 4, 5 и 6 – в хряще Меккеля, АКПы 1, 3, 4, 7, 8, 9 и 10 – в жевательной мышце, АКПы 1, 3, 4 и 10 – в инфрагиоидальной мышце [54]. В хондроцитах и хрящах другой локализации выявлены АКП1 и АКП3 [40,43,50]. Кроме того, АКП1 и АКП4 обнаружены в тройничном ганглии (АКП1 – в 16% нейронов ганглии и АКП4 – в клетках-сателлитах нейронов), а АКП1 – также в механорецепторах Руффини периодонта [41]. Мало сведений об АКПях костной ткани. Известно лишь, что АКП9 принимает участие в дифференцировке остеокластов [11,36] и что ген АКП9 ассоциирован с плотностью костной ткани [18].

Заключение. Представленные в обзоре данные свидетельствуют о важной роли аквапоринов в функционировании слюнных желез, а также в патогенезе их заболеваний.

Менее изучена роль аквапоринов в развитии и функции зубов, костной и хрящевой ткани.

Список литературы находится в редакции

Поступила 21.12.10



УДК 616.716-018.4-007-089

*М. Вендель¹, Г. Тур^{1, 2},
В. О. Маланчук², д. мед. н., І. Ткаченко¹*

¹Відділення стоматології Каролінського інституту
Стокгольм, Швеція

²Національний медичний університет
імені О. О. Богомольця

**ІНЖЕНЕРІЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ
ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЕВОЇ ДІЛЯНКИ:
СТАН, МОЖЛИВОСТІ, ПЕРСПЕКТИВИ**

*М. Вендель, Г. Тур, В. А. Маланчук,
І. Ткаченко*

Отделение стоматологии Каролинского института
Стокгольм, Швеция

Национальный медицинский университет
им. А. А. Богомольца