

POST ACADEMIAM

DE REMMING VAN DE VORMING VAN CALCIUMFOSFAATNEERSLAGEN DOOR SPEEKSELEIWITTEN \*)

J. FEBERWEE  
T. J. MEYER  
A. C. JURIAANSE

Uit de vakgroep *Materia Technica*  
van de rijksuniversiteit te Groningen

Trefwoorden: Biochemie van de mondholte – Speeksel – Tandsteen.

Inleiding

Speeksel kan worden beschouwd als een eiwitoplossing, die oververzadigd is aan calcium- en fosfaationen. De oververzadiging houdt in, dat er hogere calcium- en fosfaatgehalten in speeksel voorkomen dan in een verzadigde oplossing in water. De calcium- en fosfaationen zijn in speeksel aanwezig als ionen, maar komen ook voor als complexen of gebonden aan speeksel-eiwitten (Juriaanse, 1979).

Het voordeel van deze oververzadiging aan calcium- en fosfaationen is, dat er een beschermend milieu wordt gehandhaafd, dat demineralisatie van glazuur tegengaat. Nadeel van een oververzadiging is, dat uit een dergelijke oplossing gemakkelijk neerslagen (onoplosbare calciumfosfaat-zouten) kunnen ontstaan, die we kennen als speekselstenen en tandsteen. Ondanks deze kans op vorming van neerslagen treedt dit verschijnsel relatief weinig op.

In dit artikel zal worden ingegaan op het proces van neerslagvorming en de structuur en werking van speekseiwitten, die dat proces kunnen beïnvloeden.

Neerslagvorming van calciumfosfaat-zouten in water

Calciumfosfaat-zouten slaan neer als aan water voldoende calcium en fosfaationen worden toegevoegd. In dit

proces kunnen drie fasen worden onderscheiden, die in afbeelding 1 achtereenvolgens, worden aangegeven met een stippellijn, een getrokken lijn en een stippellijn.

In de eerste fase, de zogenaamde 'inductiefase' (stippellijn), worden calcium- en fosfaationen omgezet in een amorf calciumfosfaat-zout – ACP.

In de tweede fase (getrokken lijn), wordt deze amorfe stof, via een proces van oplossen en opnieuw neerslaan (afb. 1), omgezet in kristallijn materiaal. In de derde fase (2e stippellijn in afb. 1) vindt kristalgroei plaats en worden door de al ontstane kristallen met een calciumdeficiëntie, extra calcium-ionen opgenomen (Termine en Posner, 1970).

Op de neerslagvorming hebben verschillende factoren invloed (Termine et al., 1970):

– de calciumfosfaatverhouding: een grote calciumfosfaatverhouding geeft een snellere ACP-vorming, doch door stabilisatie van dit ACP vertraagt het de overgang naar kristallijne structuren;

– de temperatuur: verhoging van de temperatuur doet zowel de ACP-vorming, als de kristallijne structuurvorming versnellen;

Samenvatting:

Alhoewel speeksel oververzadigd is aan calcium- en fosfaationen, worden gewoonlijk geen neerslagen van betekenis in het speeksel gevormd. Speeksel blijkt eiwitten te bevatten, zoals de prolinerijke eiwitten en statherine, die de vorming van neerslagen en de groei van kristallen remmen. Als voorlopige verklaring van het werkingsmechanisme wordt verondersteld, dat de eiwitten adsorberen aan de eerste kristallisatiekiemen en zodoende de plaatsen voor kristalgroei blokkeren. De sterk geladen stukken van de eiwitten hebben hun grootste invloed op de neerslagvorming, terwijl de niet-geladen stukken hun grootste effect lijken te hebben op de groei van reeds bestaande kristallen.

De biologische betekenis voor deze eiwitten wordt behandeld in relatie tot speekselstenen, tandsteen en cariës.

– de zuurgraad: een hogere pH geeft een zelfde effect als een grotere calciumfosfaatverhouding, namelijk snellere ACP-vorming en stabilisatie van dit ACP;

– laagmoleculaire stoffen: citraat, EDTA en difosfonaten zoals EHDP, geven remming van de vorming van kristallijne structuren en kristalgroei;

– macromoleculaire stoffen: verschillende eiwitten remmen de neerslagvorming. Hierop wordt later teruggekomen.

Welke neerslagen kunnen er nu ontstaan?

Bij oververzadiging van een oplossing aan calcium- en fosfaationen kunnen deze samen neerslaan in verschillende kristallijne vormen. Er zijn meerdere calciumfosfaatneerslagen mogelijk. In de mond voorkomende neerslagen zijn:

dicalciumfosfaatdihydraat	DCPD	2 CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
octacalciumfosfaat	OCP	Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> · 5H <sub>2</sub> O	
tricalciumfosfaat	TCP	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	toenemende
hydroxylapatiet	HAP	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	stabiliteit

\*) Dit artikel kwam tot stand naar aanleiding van de doctoraalscriptie van J. Feberwee en T. J. Meyer.



Als eerste neerslagvorm wordt meestal DCPD waargenomen. Dit DCPD kan in de loop van de tijd omgezet worden in de meer stabielere vormen als OCP, TCP en eventueel HAP (zie Grøn, 1973). HAP is het meest stabiele calciumfosfaat-zout: de gebitselementen zijn voornamelijk uit dit HAP opgebouwd

*Remmers van de neerslagvorming*

Experimenten waarin de snelheid van neerslagvorming werd vergeleken tussen verschillende oplossingen die aan calcium en fosfaat verzadigd waren, gaven aan dat zich in alle waterige oplossingen, behalve in speeksel, de

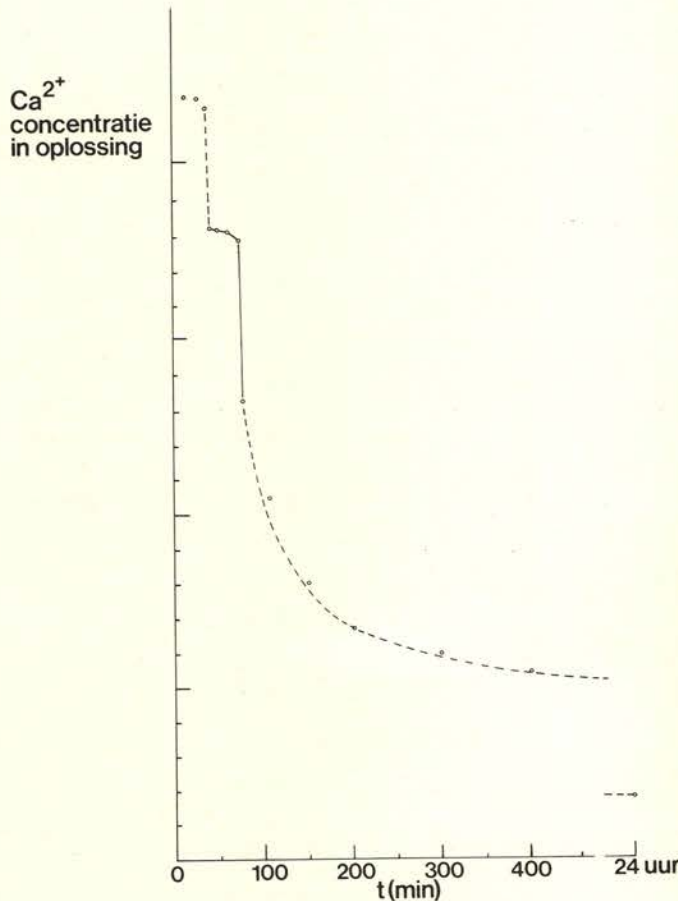
meer basische calciumfosfaatneerslagen, zoals OCP en HAP, bevonden. Wanneer uit speeksel de macromoleculaire stoffen door middel van ultrafiltratie van het water werden gescheiden, bleek dat de macromoleculen wel, en het ultrafiltraat van speeksel géén remmende invloed op de neerslagvorming hadden.

De remmende werking van speekselei-witten op neerslagvorming van calciumfosfaat-zouten is geen algemene eigenschap van eiwitten, hetgeen blijkt uit het feit, dat serumeiwitten, zoals albumine, geen enkele remmende werking bezitten (Grøn en Hay, 1976). Er schijnt geen relatie te bestaan tussen de remmende werking en de

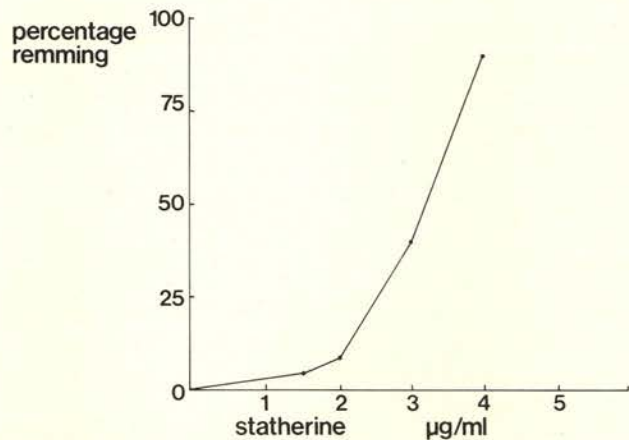
totale speekselei-witconcentratie, hetgeen suggereert, dat de remmende activiteit is gerelateerd aan slechts enkele speekselei-witten.

Onderzoekingen, gedaan naar de actieve rol van eiwitten op de remming van neerslagvorming, maken gebruik van twee typen experimenten:

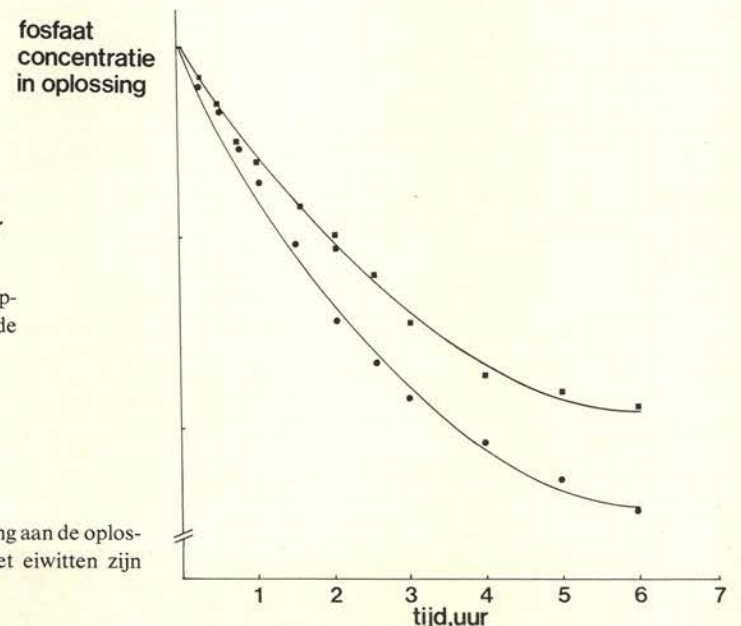
*Type 1:* Experimenten die informatie geven over de spontane vorming van neerslagen uit oververzadigde oplossingen (analoog afb. 1). Toevoeging van speekselei-witten aan de oplossing geeft een verlenging van de tijd, waarbinnen het neerslag gevormd wordt. Zo wordt een relatie verkregen tussen de mate van remming en de concentra-



Afb. 1. De vorming van neerslagen uit een verzadigde calciumfosfaatoplossing. In dit proces kunnen drie fasen worden onderscheiden, zoals in de afbeelding weergegeven. (Naar Termine et al., 1970.)



Afb. 2. De relatie tussen speekselei-witconcentratie (hier: statherine) en het percentage remming van de neerslagvorming. (Naar Moreno et al., 1979.)



Afb. 3. De afname van de fosfaatconcentratie na toevoeging aan de oplossing van kristallisatiekiemen die niet (●) en wel (■) met eiwitten zijn behandeld. (Naar Moreno et al., 1979.)



tie eiwit, die voor deze remming nodig is. Uit afbeelding 2 blijkt, dat een verhoging van de eiwitconcentratie een verhoging van de remmende werking tot gevolg heeft.

*Type 2:* Neerslagvorming kan veroorzaakt worden door aan een oververzadigde calciumfosfaatoplossing kristallatiekiemen, dat wil zeggen kleine kristalletjes, toe te voegen. Op deze kiemen vindt vervolgens verdere aangroei van kristallen plaats. Door de kristallatiekiemen vooraf te bedekken met eiwitten kan de kristalgroei (fase 3 in afb. 1) worden beïnvloed. Uit afbeelding 3 blijkt, dat voorbehandeling van de HAP-kiemen met deze eiwitten een verminderde afname van de fosfaatconcentratie in oplossing geeft; dus een langzamere neerslagvorming.

#### *Macromoleculaire remmers*

Moreno et al. (1979) en Hay et al. (1979) onderscheiden twee verschillende macromoleculaire fracties uit speeksel met een remmende werking. Echter moet niet uitgesloten worden, dat er meerdere stoffen zijn, die deze remmende werking ook bezitten. De tot nu toe bekende en onderzochte fracties zijn:

1. Proline-rijke fosfaateiwitten (PRP).
2. Statherine.

#### *Ad 1. Proline-rijke fosfaateiwitten*

Deze groep wordt verder onderverdeeld in PRP 1 t/m 4 en de iets minder belangrijke PRP A t/m H (Hay et al., 1979). Bennick en Connell (1971) noemen PRP 1 t/m 4 in hun eigen codering PRP A t/m D. PRP 1 en PRP 3 zijn nauw aan elkaar gerelateerd (Moreno et al., 1979). De aminozuursamenstelling is van de beide PRP's gelijk, wat betreft residue 1 tot en met 106. PRP 1 heeft echter nog 50 residuen meer. Daarnaast vertonen PRP 2 en PRP 4, onderling ook sterke gelijkenis. Alle vier de PRP's hebben een stuk in het molecuul waarin de meeste negatieve lading is geconcentreerd.

Er vindt een selectieve adsorptie plaats van de PRP's aan het HAP, dat

wil zeggen dat deze eiwitten meer en sterker worden geadsorbeerd dan andere speekseiwitten. Dit komt overeen met het feit, dat in jonge pellicel een hoog proline-gehalte voorkomt, met andere woorden, PRP's zitten vooral in jonge pellicel. De oude pellicel bevat een lager proline-gehalte hetgeen toegeschreven wordt aan modificaties van de geadsorbeerde eiwitten, doordat na adsorptie het proline-rijke deel wordt afgesplitst door enzymen uit micro-organismen, leucocyten, epitheliale cellen en dergelijke (Bennick et al., 1977). Uit resultaten van Bennick (1976) blijkt, dat fosfaatgroepen, gebonden aan de eiwitmoleculen, van belang zijn bij zowel de adsorptie aan glazuur, als het binden van calcium. Afsplitsing van de fosfaatgroep van het eiwit met behulp van specifieke enzymen, geeft een reductie van 60% van het vermogen calcium te binden. Dit geeft aan, dat de fosfaatgroepen van het eiwit wel erg belangrijk zijn voor de calcium bindende werking, maar dat daarnaast nog andere calcium bindende plaatsen in het molecuul aanwezig zijn. Hierbij kan worden gedacht aan carboxylgroepen.

#### *Ad 2. Statherine*

Statherine is een tyrosine-rijk eiwit, dat bestaat uit 43 aminozuren en een molecuulgewicht heeft van 5380. De ladingen van het eiwit zijn asymmetrisch over het molecuul verdeeld; in het ene eind van het molecuul (de aminozuren 1-6) bevinden zich 5 van de 6 negatieve groepen. De rest van het molecuul bestaat voornamelijk uit ongeladen aminozuren (Hay et al., 1979).

Statherine heeft zowel een remmende invloed op de spontane neerslagvorming als op de kristalgroei van calciumfosfaat-zouten.

In parotisspeeksel zijn van statherine concentraties gemeten, die varieerden tussen 10-30 µg/ml. Tijdens deze experimenten bleek, dat een concentratie van 2-5 µg/ml al een remming gaf van bijna 100% (afb. 2). De statherine-concentraties in parotisspeeksel zijn dus ruim voldoende om de oververzadiging van calcium- en fosfaationen te

stabiliseren (Hay en Schlesinger, 1977).

Uit vergelijkingen van de werkzame concentratie van de verschillende eiwitten blijkt, dat statherine veruit de sterkste remmer is van de neerslagvorming (Hay et al., 1979).

#### *Werkingsmechanismen*

Uit het bovenstaande is duidelijk geworden, dat enkele van de in speeksel aanwezige eiwitten kristalgroei en de vorming van calciumfosfaat-zouten beïnvloeden.

#### *a. Neerslagvorming*

Uit experimenten van type I blijkt, dat het statherine zeer effectief neerslagvorming kan voorkomen uit onverzadigde oplossingen. Na splitsing van het statherine in fragmenten blijkt, dat het sterk geladen deel minder effectief neerslagvorming remt, dan het hele molecuul.

Gezien het ladingskarakter van de wisselwerking tussen eiwit en kristallen is het verrassend, dat het niet-geladen deel veel beter de neerslagvorming remt, dan het gehele molecuul.

#### *b. Kristalgroei*

Resultaten van experimenten van type 2 geven een duidelijke relatie aan tussen de remmende werking van eiwitten op neerslagvorming en de adsorptie van deze eiwitten op de groeikiemen. Dit suggereert, dat de eiwitten op die plaatsen op het kristal adsorberen, waar kristalgroei plaatsvindt en de aangroei dus verhinderen.

Bij vergelijking van de effecten van PRP's met statherine blijkt, dat de PRP's effectievere remmers van de kristalgroei zijn. Aangezien zowel de PRP's als statherine een asymmetrische ladingsverdeling in het molecuul hebben, kan het verschil in remmende werking mogelijk worden toegeschreven aan de verschillen in molecuulgewicht en de absolute hoeveelheid ladingen in het molecuul. PRP's hebben meer ladingen die zijn verdeeld over een groter aantal aminozuren in het eiwit. Dit kan de reden zijn van hun



grotere effectiviteit. Door het eiwitmolecuul te splitsen in fragmenten, kan worden aangetoond, dat het negatief geladen deel van de eiwitten de actieve plaats bevat, die kristalgroei remt.

Deze waarnemingen brengen Hay et al. (1979) tot het model, dat statherine met het geladen deel adsorbeert aan een calciumfosfaatkiem, waarna het totale complex wordt afgeschermd door het niet-geladen deel.

#### De biologische betekenis van remmers

Bij wisselende orale condities zouden de calciumfosfaat-zouten van de gebitselementen in een waterig milieu gemakkelijk afwisselend kunnen oplossen en weer neerslaan. De oververzadiging aan calciumfosfaat-zouten in speeksel zorgt er voor, dat de calciumfosfaat-zouten van de gebitselementen gestabiliseerd worden. Deze oververzadiging geeft zo bescherming tegen demineralisatie van de gebitselementen en leidt tot remineralisatie van vroege carieuze lesies. De ongewenste effecten van oververzadiging worden tegengegaan door de neerslagremmers in speeksel. De tot nu toe bekende gegevens over deze macromoleculaire remmers leiden Hay et al. (1979) tot de volgende ideeën betreffende de klinische betekenis in de mond.

#### De speekselklieren met uitvoergangen

Deze worden door de aanwezigheid van de remmers beschermd tegen ongunstige neerslagvorming. Een verstoring van het evenwicht tussen remming en neerslagvorming kan leiden tot het ontstaan van speekselstenen.

#### De mond

In de mond zijn statherine en de PRP's aan microbiële veranderingen onderhevig. Ondanks deze veranderingen blijven de remmers actief gedurende

de tijd, dat het speeksel zich in de mond bevindt.

#### Het tandoppervlak

a. Op het tandoppervlak hebben de remmers te maken met ophopingen van bacteriën en plaque. Het tandoppervlak biedt een ideale gelegenheid tot kristalgroei van calciumfosfaat-zouten, maar dit wordt waarschijnlijk tegengegaan door de adsorptie van de remmers aan het tandoppervlak (in de pellicel), waar ze de kristalgroei blokkeren.

b. De in de plaque aanwezige remmers worden afgebroken ten gevolge van microbiële activiteit en verliezen hun remmende werking. De macromoleculaire remmers kunnen niet diffunderen in de diepere lagen van een dikke plaque. Hierdoor kunnen de calciumfosfaat-zouten neerslaan en ontstaat er tandsteen.

Dit beeld komt overeen met de resultaten van vroegere histologische studies die de eerste vormen van tandsteen onderin de plaque waarnemen.

#### De lesie

Omtrent de permeabiliteit van glazuur voor macromoleculaire remmers is nog weinig bekend. Dit is echter alleen van belang, indien het glazuuroppervlak door een vergaand cariësproces poreus is geworden. Indringing van de remmers in de lesie, zal de remineralisatie remmen.

#### Summary:

Title: The inhibition of calcium phosphate precipitation by salivary proteins. A literature survey.

Although saliva is supersaturated with calcium and phosphate ions, normally no precipitation of calcium phosphates occurs. Saliva contains several proteins which inhibit the formation of precipitates.

The present knowledge about these proteins is discussed in relation to their biological function.

#### Literatuur:

1. Bennick, A., Connell, G. E. (1971): Purification and partial characterization of four proteins from parotid saliva. *Biochem J* 123: 455-464.
2. Bennick, A. (1976): The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein A, common to human parotid and submandibular secretions. *Biochem J* 155(1): 163-169.
3. Bennick, A. (1977): The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. *Biochem J* 163(2): 241-245.
4. Bennick, A., Wong, R., Cannon, N. (1977): Structure and biological activities of salivary acidic proline rich phosphoproteins. Calcium binding proteins and calcium function. Wasserman et al. (editors), North Holland N.Y.P. 391.
5. Grøn, P. (1973): The demonstration of a dicalcium phosphate stabilizing factor in human saliva. *Arch Oral Biol* 18: 1379-1383.
6. Grøn, P., Hay, D. I. (1976): Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary secretions. *Arch Oral Biol* 21: 201-205.
7. Hay, D. I., Moreno, E. C., Schlessinger, D. H. (1979): Phosphoprotein inhibitors of calcium phosphate precipitation from salivary secretions. *Inorganic perspectives in biology and medicine* 2: 271-285.
8. Hay, D. I., Schlesinger, D. H. (1977): Human salivary statherin: A peptide inhibitor of calcium phosphate precipitation. Calcium binding proteins and calcium function. Wasserman et al. (editors), North Holland N.Y.P. 401.
9. Jurriaanse, A. C. (1979): Enkele functionele aspecten van speeksel-eiwitten. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 86: 226-231.
10. Moreno, E. C., Varughese, K., Hay, D. I. (1979): Effects of human, salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int* 28: 7-16.
11. Termine, J. D., Posner, A. S. (1970): Calcium phosphate formation in vitro I: Factors affecting initial phase separation. *Arch Biochem and Biophys* 140: 307-317.
12. Termine, J. D., Peckauskas, R. A., Posner, A. S. (1970): Calcium phosphate formation in vitro II: Effects of environment on amorphous crystalline transformation. *Arch Biochem and Biophys* 140: 318-325.

Maart 1980. Adres: Dr. A. C. Jurriaanse, Postbus 114, 3130 AC Vlaardingen.