

Πρωτεΐνες και πεπτίδια του σάλιου με αντιμικροβιακή δράση

**Γ. Βάραγκας, Μ. Κουρτίδου, Δ. Τέγου, Φ. Καρβούνη,
Σ. Δαυίδοπούλου**

Οδοντίατροι, μεταπτυχιακοί φοιτητές

Σ. Κάλφας

Αν. Καθηγητής Α.Π.Θ.

Εργαστήριο Προληπτικής Οδοντιατρικής, Περιοδοντολογίας
και Βιολογίας Εμφυτευμάτων, Οδοντιατρική Σχολή, Α.Π.Θ.

Περίληψη

Το σάλιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του οικοσυστήματος του στόματος. Το σάλιο περιέχει πολλά συστατικά τα οποία με ποικίλους τρόπους αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση της στοματικής μικροχλωρίδας. Αρκετές πρωτεΐνες και πεπτίδια του σάλιου, όπως οι βλεννίνες, οι ανοσοσφαιρίνες, οι πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη, οι συγκολλητίνες, η λακτοφερρίνη, οι κυστατίνες, η λυσοζύμη, οι ντεφενσίνες, οι καθελισιδίνες και οι ιστατίνες, έχουν αντιμικροβιακή δράση και θεωρούνται ότι συμβάλλουν σημαντικά στην άμυνα του στόματος έναντι διαφόρων μικροβίων. Για πολλές από αυτές τις ενώσεις ο ακριβής βιολογικός τους ρόλος παραμένει ασαφής, καθώς έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα δύσκολη και παραπλανητική η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις βιολογικές τους λειτουργίες, όταν τα συμπεράσματα βασίζονται στις βιοχημικές τους ιδιότητες. Ειδικά για τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, η πλήρης κατανόηση του βιολογικού τους ρόλου έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς θα μπορούσαν να

αποτελέσουν υπόστρωμα για το σχεδιασμό μίας νέας γενιάς αντιβιοτικών. Η παρουσία ανασκόπηση εστιάζεται στην παρουσίαση των παραπάνω πεπτιδίων και πρωτεϊνών του σάλιου υπό το πρίσμα της προέλευσής τους, της γονιδιακής εντόπισης, της δομής και των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων.

Εισαγωγή

Οι φυσιολογικές συνθήκες που επικρατούν στη στοματική κοιλότητα, όπως η θερμοκρασία, το pH, η υγρασία και οι θρεπτικές ουσίες, ευνοούν την ανάπτυξη πολλών αναερόβιων και αερόβιων μικροοργανισμών, που συνιστούν ένα σύνθετο οικοσύστημα αποτελούμενο από μια πληθώρα μικρο-οικοσυστημάτων. Το σάλιο ανήκει στους παράγοντες της στοματικής κοιλότητας που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση συγκεκριμένων συνθηκών στα οικοσυστήματα αυτά και που επηρεάζει τη σταθερότητα τους.

Πέραν των προστατευτικών λειτουργιών για τους ιστούς του στόματος, αποδίδονται στο σάλιο και αντιμικροβιακές ιδιότητες που συνδέονται με την παρουσία συγκεκριμένων πεπτιδίων και πρωτεϊνών.

Τα αντιμικροβιακά αυτά συστατικά παράγονται κυρίως από κύτταρα των σιελογόνων αδένων, τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου και τα λεμφοκύτταρα και εκκρίνονται στη στοματική κοιλότητα. Η περιεκτικότητά τους στο σάλιο ποικίλει ανάλογα με το ρυθμό ροής του, την ηλικία, τους ορμονικούς παράγοντες, το κάπνισμα, τη συναισθηματική κατάσταση, τη φυσική δραστηριότητα και το γενετικό υπόβαθρο.

Η αντιμικροβιακή δράση των συ-

στατικών αυτών εκφράζεται μέσω ποικίλων μηχανισμών αλληλεπίδρασης με τα μικρόβια. Ωστόσο, για πολλές από αυτές τις ενώσεις, ο ακριβής βιολογικός τους ρόλος παραμένει ασαφής, καθώς η συσχέτιση των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους με τις βιολογικές τους ιδιότητες αποδεικνύεται δυσχερής και χρήζει περισσότερης διερεύνησης.

Βλεννίνες (Mucins)

Οι βλεννίνες ανήκουν στις σημαντικότερες γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούν το 26%¹ των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του σάλιου. Παράγονται και εκκρίνονται από τα κύτταρα των σιελογόνων αδένων της στοματικής κοιλότητας σε ποσότητες που εξαρτώνται από τον τύπο (ορογόνος ή βλεννογόνος) των κυττάρων². Πρόκειται για ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους, η δομή των οποίων εμφανίζει πολυπεπτιδικές αλυσίδες γλυκοσυλιωμένες με ποικίλους τρόπους.

Στο σάλιο, οι βλεννίνες απαντώνται είτε ως μονομερείς είτε ως ολιγομερείς σχηματισμοί με μεγάλη μοριακή ετερογένεια που οφείλεται στο γενετικό πολυμορφισμό των γονιδίων τους, στην διαφορετική γλυκοσυλίωση των πεπτιδικών αλυσίδων τους και στην διαφορετική περιεκτικότητά σε θείο³.

Οι βλεννίνες λειτουργούν ως λιπαυτική ουσία της στοματικής κοιλότητας, επικαλύπτοντας με ένα προστατευτικό στρώμα τους βλεννογόνους και τις σκληρές οδοντικές επιφάνειες του στόματος. Η επικάλυψη αυτή προστατεύει τους υποκείμενους ιστούς από περιβαλλοντικές προσβολές, περιορίζει την διάχυση ερεθιστικών και τοξικών παραγόντων και επηρεάζει την αποίκιση των επιφανειών από μικροοργανισμούς¹.

Σε γενετικό επίπεδο, διακρίνονται δυο διαφορετικοί τύποι βλεννινών, οι MG1 και MG2^{4,5}. Η MG1 ανήκει στις κλασσικές βλεννίνες υψηλού μοριακού βάρους (1×10^6 kDa), σχηματίζει ολιγομερή και απαντάται ως κύριο συστατικό στα βλενώδη επιχρίσματα που καλύπτουν τους βλεννογόνους σε όλο το σώμα (πεπτική οδός, αναπνευστική οδός, κ.α.). Παράγεται στα βλενογόνα κύτταρα των υπογλώσσιων, των υπογνάθιων, των υπερώιων και των χειλικών σιελογόνων αδένων². Διαφορετικοί αδένες καθώς και διαφορετικά κύτταρα μέσα στον ίδιο αδένά εκκρίνουν διαφορετικές μορφές της MG1⁶.

Η MG1 συντίθεται από 5-16 υπομονάδες, μοριακού βάρους 2,5 - 2,9 $\times 10^5$ kDa, που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς στα άκρα τους, ώστε να δημιουργούν γραμμικά ολιγομερή. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με υψηλή περιεκτικότητα (20-55%) στα αμινοξέα προλίνη, σερίνη και θρεονίνη. Τα αμινοξέα αυτά είναι γλυκοσυλιωμένα σε μεγάλο βαθμό και με ποικίλους τρόπους, με αποτέλεσμα το 40-80% της μάζας της MG1 να αποτελείται από ολιγοσακχαρίτες. Οι γλυκοσυ-

λιωμένες περιοχές διακόπτονται από άλλες υδρόφοβες περιοχές χωρίς πλευρικές αλυσίδες ολιγοσακχαριτών¹. Οι περιφερικές δομές των ολιγοσακχαριτών της MG1 παρουσιάζουν αντιγονική συμπεριφορά παρόμοια των αντιγόνων T, sialyl-T, A, B, H, Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, i και I των ομάδων αίματος και πιθανόν να αποτελούν σημεία δέσμευσης των μικροβίων^{1,8}.

Οι MG1 σχηματίζουν εύκολα υδρόφιλες ινοελαστικές γέλες που επικαλύπτουν το βλεννογόνο. Ως συστατικό του επίκτητου υμένα, οι MG1 θεωρείται ότι προστατεύουν την αδαμαντίνη των δοντιών από τα οξέα των μικροβίων και ότι επηρεάζουν την προσκόλληση των μικροβίων στις οδοντικές επιφάνειες⁹. In vitro πειράματα έδειξαν ότι η πλειοψηφία των καλλιεργούμενων μικροβίων της στοματικής κοιλότητας δεν συνδέεται με την βλεννίνη MG1¹⁰.

Σε σύγκριση με τις MG1, η βλεννίνη MG2 έχει μικρότερο μοριακό βάρος (125 kDa), δεν σχηματίζει ολιγομερή, έχει περιορισμένες ινοελαστικές ιδιότητες, και δεν εμφανίζει δραστηριότητα ομάδων αίματος ABO⁷. Έχει μικρότερο αριθμό επαναλαμβανόμενων τμημάτων αμινοξέων και παρουσιάζει μικρή ετερογένεια στη σύνθεση των περιφερικών γλυκανών¹¹. Παράγεται από τα ορογόνα κύτταρα κυρίως των υπογνάθιων, των υπογλώσσιων και των ελάσσονων σιελογόνων αδένων, όπως επίσης και από τους υποβλεννογόνιους αδένες του βρογχικού δέντρου¹². Η MG2 εμφανίζεται in vivo ως μονομερές, ενώ έρευνες in vitro έχουν δείξει ότι μπορεί να σχηματίσει διμερή και τετραμερή μέσω υδρόφοβων αντιδράσεων και ηλε-

κτροστατικών δυνάμεων και όχι μέσω δισουλφιδικών δεσμών όπως η MG1¹³.

Η MG2 αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα γλυκοσυλιωμένη με περίπου 170 αλυσίδες δι- ή τρισακχαρίτων. Τα πλευρικά τμήματα του μορίου εμφανίζουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα αντιγόνα T, Le^x, Le^y, sialyl-T και sialyl-Le^y¹.

In vitro, η MG2 αντιδρά μέσω των υδατανθρακικών αλυσίδων της με πολλά μικρόβια της στοματικής χλωρίδας. Συγκεκριμένα, η MG2 προσκολλάται σε διάφορα είδη μικροβίων, όπως *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, και *Streptococcus gordonii*, στο *Actinobacillus actinomycetemcomitans* και στο μύκητα *Candida albicans*¹⁴. Επίσης η MG2 αντιδρά και με μικρόβια που δεν ανήκουν στη φυσιολογική στοματική χλωρίδα, όπως το *Pseudomonas aeruginosa* και το *Escherichia coli*. Οι αντιδράσεις προσκόλλησης με επιφανειακά δομικά στοιχεία των μικροοργανισμών αυτών γίνεται μέσω της κυστεΐνης του αμινοτελικού άκρου του μορίου και μάλιστα μέσω εκτεθειμένων πεπτιδικών περιοχών¹⁵.

Η MG2 προσκολλάται στον υδροξυαπατίτη της αδαμαντίνης αποτελώντας βασικό συστατικό του επίκτητου υμένα και καθορίζοντας με τον τρόπο αυτό τη συγκράτηση μικροοργανισμών στις οδοντικές επιφάνειες¹⁶. Επίσης μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία μικροβιακών συσσωματώσεων σε συνεργεία με την εκκριτική ανοσοσφαιρίνη sIgA¹⁷. Εικάζεται λοιπόν ότι η MG2 έχει διττή λειτουργία, προστατευτική και επιβαρυντική, ανάλογα με το περιβάλλον όπου πραγματοποιείται η αντίδραση με τους μικροοργανισμούς (σάλιο ή δόντια).

Σιαλική συγκολλητίνη (Salivary agglutinin, SAg)

Πρόκειται για μια έντονα γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 340 kDa, που περιέχει ενεργά αντιγόνα των ομάδων αίματος¹⁸. Στη γλυκοπρωτεΐνη αυτή υπάρχουν αλληλουχίες αμινοξέων που λειτουργούν ως υποδοχείς για τη δέσμευση διάφορων ουσιών, όπως τμήματα μικροβίων, κυτταρικά υπολείμματα κ.α.¹⁹. Η SAg εμφανίζει ετερογένεια στη δομή της, η οποία οφείλεται στο διαφορετικό ανασυνδυασμό του γονιδίου DMBT1 (έχουν ανακαλυφθεί 3 διαφορετικές μορφές) και στο διαφορετικό τρόπο γλυκοσυλίωσης της πεπτιδικής αλυσίδας. Η ετερογένεια αυτή εικάζεται ότι δίνει το πλεονέκτημα στην σιαλική συγκολλητίνη να συνδέεται με διάφορα είδη μικροοργανισμών¹⁸.

Η SAg εκκρίνεται από την παρωτίδα, τον υπογνάθιο σιελογόνο αδένα και τους χειλικούς αδένες²⁰.

Η σιαλική συγκολλητίνη μπορεί να προσκολληθεί in vitro σε διάφορα είδη στρεπτόκοκκων όπως στους *Streptococcus mutans* και *Streptococcus mitis* της οδοντικής πλάκας, στον *Streptococcus agalactiae* που σχετίζεται με τη νεογνική μηνιγγίτιδα, και στον *Streptococcus pyogenes* που εμπλέκεται σε λοιμώξεις του φάρυγγα²¹. Σε μικρότερο βαθμό αντιδρά με τους στρεπτόκοκκους της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus oralis* και *Streptococcus gordonii*²¹. Επιπλέον, αντιδράσεις προσκόλλησης, και μάλιστα τύπου πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, όπου δεν εμπλέκονται άμεσα οι πλευρικοί πολυσακχαρί-

τες, έχουν παρατηρηθεί *in vitro* και με άλλα μικρόβια, όπως τα *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* και τον ιό HIV^{21,22}.

Η SAg μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας συσσωμάτωσης των *S. mutans* και *S. sanguinis* μέσω της σύνδεσής της με το αντιγόνο B στην επιφάνεια των μικροβίων²³. Παλιότερα έχει αναφερθεί συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα SAg του σάλιου και τον αριθμό των *S. mutans* στη οδοντική πλάκα²⁴, το ρυθμό με τον οποίο η οδοντική πλάκα σχηματίζεται²⁵ και την ευαισθησία στη νόσο τερηδόνα²⁶. όμως νεότερες έρευνες δεν επιβεβαιώνουν τους παραπάνω συσχετισμούς^{27,28}.

Η SAg παρουσιάζει ποικίλες αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες της στοματικής κοιλότητας. Αντιδρά με την ανοσοσφαιρίνη sIgA και δημιουργεί συμπλέγματα, η σταθερότητα των οποίων εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Μικρόβια, που αρχικά συνδέονται με την ανοσοσφαιρίνη, συσσωματώνονται μέσω των συμπλεγμάτων SAg-sIgA σε μεγαλύτερες μάζες²⁹. Φαίνεται ακόμη ότι αντιδρά με τη λακτοφερρίνη και την MG1 συμβάλλοντας και πάλι στη συσσωμάτωση μικροβιακών κυττάρων⁴.

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η SAg έχει τη δυνατότητα σύνδεσης με κύτταρα του αμυντικού συστήματος³⁰ και με παράγοντες του συμπληρώματος³¹. Μέσω των πλευρικών υδατανθρακικών αλυσίδων μπορεί να συνδεθεί ταυτόχρονα με μικροοργανισμούς και λευκοκύτταρα, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο

στις ανοσοχημικές αντιδράσεις στο στόμα²¹.

Τέλος, εμφανίζει χημική συγγένεια με τον υδροξυαπατίτη³² και πιστεύεται ότι μαζί με τις βλεννίνες, συμβάλλει στον έλεγχο της αποίκισης της στοματικής κοιλότητας από τους μικροοργανισμούς.

Πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη (Proline-rich proteins, PRP)

Ανήκουν σε ομάδα ειδικών φωσφοπρωτεϊνών που εκκρίνονται από τους υπογνάθιους αδένες και την παρωτίδα αντιπροσωπεύοντας το 70% των πρωτεϊνικών εκκρίσεών τους. Μπορεί να είναι γλυκοσυλιωμένες ή μη και διακρίνονται σε όξινες και βασικές³³. Η παραγωγή των PRP κωδικοποιείται από έξι στενά συνδεδεμένα γονίδια³⁴ που συχνά παρουσιάζουν πολυμορφισμούς και που σε συνδυασμό με σημειακές μεταλλάξεις και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε επίπεδο γλυκοσυλίωσης, φωσφορυλίωσης και πρωτεόλυσης, έχουν ως αποτέλεσμα τη σύνθεση πολλών διαφορετικών μοριακών μορφών³⁵. Υπάρχουν 10 μορφές όξινων PRP από τις οποίες περισσότερο έχει μελετηθεί η PRP-1, ενώ στις βασικές PRP ανήκουν οι μεγάλοι μοριακού βάρους, γλυκοπρωτεΐνες Ps1 και Ps2, καθώς και οι μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες IB1 έως IB9³⁵. Ο βιολογικός τους ρόλος παραμένει ασαφής.

Είναι γνωστό ότι οι όξινες PRP έχουν χημική συγγένεια με τον υδροξυαπατίτη και δεσμεύονται στις οδοντικές επιφάνειες συμβάλλοντας μαζί με άλλες

πρωτεΐνες στο σχηματισμό του επίκτητου υμένα. Επιπλέον, δεσμεύουν το ασβέστιο και σταθεροποιούν τη σύσταση υπερκορεσμένων διαλυμάτων ασβεστίου και φωσφόρου όπως το σάλιο, ενώ αναστέλλουν την αύξηση των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη^{33,36}. In vitro, οι όξινες PRP προσκολλώνται στην επιφάνεια πολλών βακτηρίων της οδοντικής πλάκας, όπως *Eikenella corrodens*, *Prevotella loescheii*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, και *Porphyromonas gingivalis*^{37,38,39,40,41,42}. Η συγκόλληση όξινων PRP σε μικροβιακούς υποδοχείς πραγματοποιείται μέσω “κρυμμένων” περιοχών (cryptitopes) στο μόριο των PRP. Οι περιοχές αυτές αποκαλύπτονται κατά την αντίδραση προσκόλλησης των PRP στην επιφάνεια του υδροξυαπατίτη^{38,39,40}.

Για τις βασικές PRP έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να προσκολληθούν, πιθανόν μέσω των φωσφορικών ομάδων, στην επιφάνεια κάποιων μικροβιακών ειδών που αποικίζουν την οδοντική πλάκα σε αρχικά στάδια, όπως το *Streptococcus gordonii*^{43,44}. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι μπορούν να προσκολληθούν στον ιό HIV και συγκεκριμένα στη γλυκοπρωτεΐνη gp120 του περιβλήματός του, που είναι απαραίτητη για την προσκόλλησή του ιού στα κύτταρα του ξενιστή⁴⁵. Μαζί με τις κυστατίνες, οι βασικές PRP μπορούν να μειώσουν τη λοιμογόνο δύναμη του ερπητοϊού τύπου 1 (HSV-1)⁴⁶. Μία PRP που βρίσκεται μόνο στο σάλιο της παρωτί-

δας, η PRG, έχει την ικανότητα προσκόλλησης στο αναερόβιο μικρόβιο *Fusobacterium nucleatum*⁴⁷.

Τέλος, σε πρόσφατη κλινική μελέτη, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα των IB1-IB9 στο σάλιο ατόμων ελεύθερων τερηδόνας σε σύγκριση με άτομα που παρουσίαζαν τερηδονική δραστηριότητα⁴⁸, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει συμμετοχή των πρωτεϊνών αυτών σε προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι της νόσου τερηδόνας.

Η Γλυκοπρωτεΐνη EP-GP (Extra Parotid GlycoProtein)

Η EP-GP είναι μία όξινη γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 19-20 kDa που παράγεται από τους υπογνάθιους και υπογλώσσιους σιελογόνους αδένες. Η ονομασία της οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει στο σάλιο της παρωτίδας. Έχει ανιχνευθεί και σε άλλες εκκρίσεις, όπως στα δάκρυα, στον ιδρώτα, στο σπέρμα και στη ρινική βλέννα. Είναι ταυτόσημη, όπως προέκυψε από τη σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων, με τις πρωτεΐνες SABP (Secretory Actin Binding Proteins), GCDFP-15 (Groos Cystic Disease Fluid Protein 15), PIP (Plolactine Induced Protein), gp-17 (CD4 binding glycoprotein)^{7,49,50,51,52}.

Ο βιολογικός ρόλος της EP-GP είναι υπό διερεύνηση. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι συμμετέχει στη δημιουργία του επίκτητου υμένα στις οδοντικές επιφάνειες, εξαιτίας της συγγένειάς της με τον υδροξυαπατίτη. Σε μεταγενέστερες έρευνες διαπιστώθηκε ότι αλληλεπιδρά

και με διάφορες πρωτεΐνες, όπως την ακτίνη⁵², το ινωδογόνο⁵³, την κερατίνη, τη μυοσίνη και τη ινονεκτίνη⁵⁰. In vitro μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να προσκολληθεί στην επιφάνεια μικροβίων που αποικίζουν τη στοματική κοιλότητα, τον ακουστικό πόρο και το δέρμα^{54,55}.

Η EP-GP δεσμεύεται στους υποδοχείς του CD4 στα μονοκύτταρα^{56,57}, γεγονός που ίσως υποδηλώνει ένα γενικότερο προστατευτικό ρόλο. Ο υποδοχέας CD4 αποτελεί στόχο του ιού HIV-1. Η προσκόλληση της EP-GP στους υποδοχείς του CD4 βρέθηκε ότι αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων που προκαλείται από τη δέσμευση του HIV-1 και του παράγοντα CD4⁵⁷. Σε in vitro μελέτες βρέθηκε ότι δρα ως ασπαραγική πρωτεΐνάση και υδρολύει τη ζελατίνη και τη ινονεκτίνη, ιδιότητα που μπορεί να εμπλέκεται στην ομοιοστάση της θεμέλιας ουσίας. Ωστόσο, εκφράσθηκε και η άποψη ότι η πρωτεόλυση της εξωκυττάριας ουσίας μπορεί να ευνοεί τη διείσδυση των μικροβίων στους ιστούς⁵⁸.

Η EP-GP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός δείκτης για την αναγνώριση διαφόρων τύπων νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών των σιελογόνων αδένων, όπως και για τη διαφοροδιάγνωση του πολύμορφου αδενώματος των σιελογόνων αδένων από ιστολογικά παρόμοια κακοήγη νεοπλάσματα⁴⁹.

Ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins)

Στο σάλιο και σε άλλες εκκρίσεις όπως τα δάκρυα, το μητρικό γάλα και

στις εκκρίσεις του αναπνευστικού, γαστρεντερικού και ουρογεννητικού συστήματος η ανοσοσφαιρίνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η εκκριτική μορφή της IgA, η sIgA. Σε μικρότερα ποσοστά στο σάλιο βρίσκονται η IgA, η IgM και η IgG^{31,59,60}. Η sIgA είναι ο μοναδικός τύπος ανοσοσφαιρίνης που εκκρίνεται ενεργά στη στοματική κοιλότητα.

Το μόριο της sIgA παρουσιάζει την ίδια δομή με τις υπόλοιπες ομάδες και περιέχει μία πρόσθετη γλυκοπεπτιδική αλυσίδα, τον εκκριτικό παράγοντα⁵⁹. Η παρουσία του εκκριτικού παράγοντα φαίνεται να σταθεροποιεί τη δομή του μορίου της sIgA προστατεύοντάς την από διάφορα ένζυμα στη στοματική κοιλότητα^{59,61}.

Η sIgA συντίθεται από τα πλασματοκύτταρα που βρίσκονται κοντά στα κύτταρα των κυψελίδων και των εκφορητικών πόρων των σιελογόνων αδένων. Ο εκκριτικός παράγοντας συντίθεται από τα κύτταρα των κυψελίδων και προσδένεται στο ένα μέρος της διμερούς μορφής της IgA κατά τον χρόνο που διέρχεται από τη μεμβράνη των κυττάρων των κυψελίδων καθ' οδόν προς τους εκφορητικούς πόρους^{31,59,60}. Υπάρχουν δύο υποομάδες, η IgA1 και IgA2, οι οποίες εμφανίζουν διαφορές στη σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως η λειτουργική σημασία των διαφορών αυτών⁵⁹.

Η αντιμικροβιακή δράση της sIgA περιλαμβάνει:

α) *Αναστολή της προσκόλλησης των*

μικροοργανισμών στα επιθηλιακά κύτταρα και στις οδοντικές επιφάνειες. Η sIgA αντιδρά με υποδοχείς στην επιφάνεια των μικροβίων αποκλείοντας με τον τρόπο αυτό την προσκόλλησή τους στα κύτταρα ή στις οδοντικές επιφάνειες⁶². Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι αντιδρά με τα αντιγόνα I/II στην επιφάνεια των στρεπτόκοκκων^{31,63} και ότι αναστέλλει *in vitro* την προσκόλληση των μυκήτων *Candida albicans* και *Candida dubliniensis* σε ακρυλικές επιφάνειες^{64,65}. Η προσκόλληση της sIgA στην επιφάνεια των μικροβίων μεταβάλλει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι επιφάνειες τους καθίστανται πιο υδρόφιλες και διευκολύνεται η παγίδευση των μικροβίων στη βλέννα, η δημιουργία συσσωματωμάτων και τελικά η απομάκρυνσή τους με το σάλιο³¹. Ωστόσο, είναι πιθανό η σύνδεση της sIgA με τα μικρόβια να ευνοεί την προσκόλλησή τους στην οδοντική πλάκα, όταν η sIgA έχει ήδη δεσμευτεί στις οδοντικές επιφάνειες⁶².

β) *Αδρανοποίηση τοξινών και μικροβιακών ενζύμων*. Η sIgA αδρανοποιεί διάφορες τοξίνες παρεμποδίζοντας την αντίδρασή τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς των κυττάρων⁵⁹. Η αναστολή της δράσης των μικροβιακών ενζύμων επιτυγχάνεται είτε με τον αποκλεισμό της σύνδεσής τους στο υπόστρωμα, είτε με την αποσταθεροποίηση του συμπλέγματος ενζύμου-υποστρώματος⁶². Η sIgA μπορεί να αναστείλει το σχηματισμό εξωκυττάρων πολυσακχαριτών (γλυκανών) από τη γλυκοσυλτρανσφεράση των στρεπτόκοκκων³¹.

γ) *Εξουδετέρωση ιών*. Η δράση της

sIgA κατά των ιών δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Η προσκόλληση της sIgA στην επιφάνεια των ιών παρεμποδίζει την είσοδό τους σε κύτταρα του ξενιστή και επιπλέον, φαίνεται να προκαλεί διατάραξη σε σημαντικούς μοριακούς μηχανισμούς στο εσωτερικό του ιού⁶².

δ) *Αποκλεισμός αντιγόνων*. Η αντίδραση της sIgA με διάφορα αντιγόνα περιορίζει τη διείσδυσή τους στο βλεννογόνο. Με τον τρόπο αυτό θεωρείται ότι ελέγχεται η πυροδότηση φλεγμονωδών αντιδράσεων στους βλεννογόνους⁶².

ε) *Συnergική δράση με άλλους αμυντικούς μηχανισμούς*. Η sIgA μπορεί να δράσει σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες, π.χ. τη λακτοϋπεροξειδάση, τη λακτοφερίνη, τις βλεννίνες και τις συγκολλητίνες, όπως έχει ήδη αναφερθεί⁶².

Κυστατίνες (Cystatins)

Η υπερ-οικογένεια των κυστατινών αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που εμφανίζουν έντονη δραστηριότητα ως αναστολείς των πεπτιδασών κυστεΐνης⁶⁶.

Οι κυστατίνες του σάλιου είναι μακρομόρια με 120-125 αμινοξέα, και τρισδιάστατη δομή που σταθεροποιείται με δυο δισουλφιδικούς δεσμούς⁶⁷. Στο ανθρώπινο σάλιο, έχουν ανακαλυφθεί οι κυστατίνες C, S, SN, SA και D^{68,69}. Οι S, SN και SA παρουσιάζουν 80% ομολογία στην αλληλουχία αμινοξέων με την κυστατίνη C, ενώ η D παρουσιάζει ομολογία 60%. Οι κυστατίνες S, SN, SA και D αναφέρονται και ως τύπου SD⁶⁹.

Οι κυστατίνες παράγονται από τα

ορογόνα, τα βλεννογόνα και τα κύτταρα των εκφορητικών πόρων της παρωτίδας και των υπογναθίων σιελογόνων αδένων. Οι κυστατίνες C, SA και D παράγονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (μM), σε αντίθεση με τις κυστατίνες SN και S⁷⁰. Κάθε μια κυστατίνη κωδικοποιείται από διαφορετικό γονίδιο. Η κυστατίνη C από το γονίδιο CST₃, η κυστατίνη S από το γονίδιο CST₄, η κυστατίνη SN από το γονίδιο CST₁, η κυστατίνη SA από το γονίδιο CST₂ και η κυστατίνη D από το γονίδιο CST₅⁷¹. Όλα τα παραπάνω γονίδια βρίσκονται στο χρωμόσωμα 20q11.2⁷².

Τα μακρομόρια των κυστατινών τυπου SD δεν εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια^{73,74,75}. Επιπλέον, οι κυστατίνες C και SN δεν φωσφορυλιώνονται, ενώ οι S και SA είναι μερικώς φωσφορυλιωμένες⁷³.

Οι κυστατίνες έχουν πολλές λειτουργίες και η δράση τους εμφανίζεται ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι κύριες λειτουργίες τους είναι α) η άμεση αναστολή των πεπτιδασών του ξενιστή και των μικροβίων, β) η αντι-μικροβιακή και η αντι-ιική δράση, γ) ο έλεγχος της ενασβεστίωσης των σκληρών οδοντικών ιστών και δ) η επίδραση στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος⁷⁰.

Ως αντιμικροβιακές ουσίες οι κυστατίνες αναστέλλουν πρωτεάσες μικροβίων και πρωτόζωων όπως των *Porphyromonas gingivalis*⁷⁶, *Trichomonas tenax* και *Entamoeba gingivalis*⁷⁰, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την ικανότητά τους να διασπούν πρωτεΐνες στο περιβάλλον τους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει

σε: (α) μειωμένη ικανότητα πρόσληψης θρεπτικών συστατικών και (β) αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Η δράση ενάντια στους ιούς σχετίζεται με την ικανότητα τους να δεσμεύουν πρωτεάσες απαραίτητες για το μεταβολισμό των ιών ενδοκυττάρια. Είναι ικανές να αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του HSV-I⁷⁷, διαφόρων ιών *Corona*, υπεύθυνων για οξείες γαστρεντερίτιδες καθώς και αδενοϊών⁷⁸. Κάποιες μικροβιακές πρωτεάσες, όπως οι *gingipains* του περιοπαθογόνου *P. gingivalis*, διασπούν τις κυστατίνες σε μικρότερα πεπτίδια που διατηρούν την αντιμικροβιακή τους δράση^{76, 79}.

Οι κυστατίνες τέλος, εμφανίζουν έμμεση αντιμικροβιακή δράση είτε παρεμποδίζοντας την αποδόμηση αμυντικών πρωτεϊνών του ξενιστή, π.χ. τη λακτοφερρίνη⁸⁰, είτε ενεργοποιώντας μηχανισμούς του αμυντικού συστήματος, π.χ. την λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κύτταρων και την κινητοποίηση των ουδετερόφιλων^{81,82}.

Πρωτεΐνη των αδενών Von Ebner (VEGh)

Η VEGh εκκρίνεται από τους αδένες Von Ebner, οι οποίοι τοποθετούνται γύρω από τις περιχαρακωμένες θηλές της γλώσσας. Ανήκει στην οικογένεια των λιποκαλινών, οι οποίες δρουν ως μεταφορείς υδρόφοβων μορίων⁸³. Έχει προταθεί ότι οι λιποκαλίνες μπορεί να εμπλέκονται στη μεσολάβηση της κυτταρικής ρύθμισης και ότι ενδέχεται να

λειτουργούν ως μεταφορείς βιολογικά επικίνδυνων μορίων, όπως τα ρετινοειδή και τα στεροειδή, με ασφαλή και ελεγχόμενο τρόπο μεταξύ των κυττάρων⁸⁴. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος τους δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί.

Η VEGh είναι μία όξινη πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους (18 - 20 kDa). Είναι πανομοιότυπη, όπως προκύπτει από την αλληλουχία των αμινοξέων τους, με την πρωτεΐνη TSPA (tear-specific pre-albumin) που απομονώθηκε από τα δάκρυα πολύ νωρίτερα από τη VEGh^{85,86}.

Οι βιολογικές λειτουργίες της VEGh δεν είναι επί του παρόντος γνωστές. Αρχικά είχε υποθεθεί ότι η VEGh συμμετέχει στην αντίληψη της πικρής γεύσης δεσμεύοντας λιπόφιλα μόρια και μεταφέροντάς τα στις γευστικές κάλυκες⁴⁹. Η πρωτεΐνη TSPA στα δάκρυα μπορεί να δεσμεύσει τη βιταμίνη A (ρετινόλη). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η TSPA έχει δράση ενδονουκλεάσης και εικάζεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές ίσως λειτουργούν ως αντιικοί παράγοντες, καθώς οι νουκλεάσες μπορούν να εμποδίσουν τη μεταγραφή του DNA ή του RNA των ιών⁸⁷.

Σε *in vitro* μελέτες διαπιστώθηκε ότι η VEGh αναστέλλει τη δράση της παπαΐνης, μιας πρωτεϊνάσης κυστεΐνης. Στο μόριο της VEGh υπάρχουν τρεις περιοχές με αλληλουχία αμινοξέων ανάλογη των περιοχών της κυστατίνης του σάλιου που ευθύνονται για την αναστολή της παπαΐνης^{83,88}. Με βάση αυτά τα δεδομένα, διατυπώθηκε η άποψη ότι η VEGh μπορεί να δράσει ως κυστατίνη. Δεδομένης της αντιμικροβιακής και α-

ντιϊκής δράσης των κυστατινών, εικάζεται ότι η VEGh ενδεχομένως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη άμυνα εναντίον των μικροβίων^{83, 59}. Είναι πιθανό η ανασταλτική της δράση έναντι των πρωτεϊνών να λειτουργεί προστατευτικά στην πρωτεολυτική αδρανοποίηση του μορίου της, ωστόσο δε θεωρείται ότι αυτή η ιδιότητα συνδέεται με την κύρια φυσιολογική της λειτουργία⁷.

Αναστολέας των πρωτεϊνών σερίνης (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, SLPI)

Πρόκειται για πρωτεΐνη με ικανότητα να αναστέλλει τις πρωτεϊνάσες σερίνης συμπεριλαμβανομένων της ελαστάσης των ουδετερόφιλων, της χυμοτροψίνης και της καθεψίνης G. Ο αναστολέας SLPI απομονώθηκε αρχικά από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος και ανιχνεύεται στις εκκρίσεις διάφορων αδένων⁷.

In vitro, ο SLPI αναστέλλει τη μόλυνση ανθρώπινων μακροφάγων και CD4⁺ T- λεμφοκυττάρων από τον HIV-1, σε συγκεντρώσεις που ανευρίσκονται στο σάλιο σε φυσιολογικές συνθήκες. Η ανασταλτική δράση του SLPI εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του, το pH και τη θερμοκρασία. Μερική εξάλειψη του SLPI από το σάλιο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντι-HIV-1 δράσης του. Επιπλέον, η αναστολή της εισόδου του HIV-1 στα κύτταρα από τον SLPI φαίνεται να οφείλεται στην αλληλεπίδραση με κάποιο μόριο της επιφάνειας των

κυττάρων του ξενιστή παρά σε απευθείας αλληλεπίδραση με τον ιό⁸⁹. Σε μία άλλη *in vitro* μελέτη βρέθηκε επίσης ότι ο SLPI παρουσιάζει δοσο-εξαρτώμενη ανασταλτική δράση κατά του HIV-1 αλλά δεν ήταν αποτελεσματική έναντι των στελεχών HIV-2 και SIV. Τα στελέχη αυτά εμφανίζουν πολυτροπισμό και διαθέτουν πολλούς υποδοχείς σύνδεσης (co-receptor) με τα κύτταρα του ξενιστή, γεγονός που πιθανώς εξηγεί την ανθεκτικότητά τους στον SLPI⁹⁰. Πρόσφατα, διαπιστώθηκε *in vitro* ότι γλυκοπρωτεΐνες του εξωτερικού περιβλήματος των HIV-1 και SIV διεγείρουν την παραγωγή SLPI mRNA και πρωτεΐνης σε κύτταρα του στοματικού επιθηλίου. Η αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο και σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την έκθεση στον ιό, ήταν δοσο-εξαρτώμενη και δεν απαιτούσε μολυσματικά στελέχη⁹¹, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο SLPI έχει πιθανό προστατευτικό ρόλο έναντι ιικής μόλυνσης.

Ο SLPI εμφανίζει *in vitro* αντιμικροβιακή δράση κατά των *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* και *Candida albicans*^{92,93}.

Λυσοζύμη (Lysozyme)

Η λυσοζύμη είναι μια ουσία, η οποία ανιχνεύεται στα υγρά του σώματος όπως στο σάλιο, στα δάκρυα, στα ούρα, στο μητρικό γάλα, στο βρογχικό βλεννογόνο και στον ιδρώτα⁹⁴. Είναι ένα σχετικά μικρό μόριο και αποτελεί-

ται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα 129 αμινοξέων με μοριακό βάρος 14,6kDa⁹⁵.

Η αντιμικροβιακή δράση της λυσοζύμης έχει μελετηθεί εκτενώς. Με την υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος καθιστά τα μικρόβια ευαίσθητα για κυτταρική λύση όταν οι συνθήκες ώσμωσης του περιβάλλοντος το επιτρέπουν. Η λυσοζύμη επιδεικνύει βακτηριοκτόνο δράση ακόμη και μετά από θερμική επεξεργασία που απενεργοποιεί την ενζυματική της δράση, πιθανόν εξαιτίας του κατιονικού χαρακτήρα της. Αρχικά, το απενεργοποιημένο ένζυμο προσκολλάται στο κυτταρικό τοίχωμα του μικροβίου και στη συνέχεια επιφέρει φυσικοχημικές μεταβολές στην κυτταρική μεμβράνη, που οδηγούν στην καταστροφή του⁵². Έχουν επίσης προταθεί και άλλοι αντιμικροβιακοί μηχανισμοί για τη λυσοζύμη⁷. Σε γενικές γραμμές, οι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης της λυσοζύμης συνοψίζονται ως εξής:

α) *Λυσοζυμική δράση*. Προκαλεί λύση της πεπτιδογλυκανικής στοιβάδας του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος

β) *Μηχανισμοί σχετιζόμενοι με τον κατιονικό χαρακτήρα του μορίου*. Πρόκειται για μη ενζυμική δράση που συνδέεται με την ενεργοποίηση των μικροβιακών αυτολυσινών από την αντίδραση της λυσοζύμης με την κυτταρική μεμβράνη.

γ) *Συσσωμάτωση μικροβίων*, κυρίως σε συνέργια και με άλλες πρωτεΐνες του σάλιου, που θεωρείται ότι βοη-

θά στην ταχύτερη απομάκρυνση των μικροβίων από τη στοματική κοιλότητα.

δ) *Παρεμπόδιση της μικροβιακής προσκόλλησης στην οδοντική επιφάνεια.*

Η ευαισθησία των διαφόρων μικροβίων της στοματικής κοιλότητας στη λυσοζύμη διαφέρει. Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας *mutans* παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ευαισθησίας στη λυσοζύμη. Συγκεκριμένα, οι *S. criceti* και *S. rattii* είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αντίθεση με τους *S. mutans* (ορότυποι c, e και f) που είναι πιο ανθεκτικοί⁹⁶. Επίσης, οι γαλακτοβάκιλλοι *L. casei* και *L. plantarum* είναι ευαίσθητοι, όμως η λύση τους πραγματοποιείται παρουσία λυσοζύμης και ανοργάνων στοιχείων⁹⁶. Τέλος, ανάμεσα στα είδη των ζυμομυκήτων του γένους *Candida*, οι *C. krusei* και *C. parapsilosis* παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη λυσοζύμη, ενώ οι *C. albicans* και *C. glabrata* τη μικρότερη. Οι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης της λυσοζύμης στους μύκητες παραμένουν ακόμα άγνωστοι⁹⁷.

Από τα μέχρι σήμερα ερευνητικά δεδομένα δεν προκύπτει σαφής συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στο υγρό περιβάλλον του στόματος (σάλιο, πλάκα, περιοδοντική σχισμή) και την τερηδονική δραστηριότητα^{98,99}.

Λακτοφερρίνη (Lactoferrin)

Η λακτοφερρίνη ανήκει στην ομάδα των βασικών πρωτεϊνών του σάλιου.

Έχει σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος (περίπου 80kDa) και περιέχει στο μόριό της ομάδα πορφυρίνης, παρουσιάζει δε μεγάλη ικανότητα δέσμευσης ιόντων σιδήρου⁷.

Η παρουσία της λακτοφερρίνης στις διάφορες εκκρίσεις όπως στα δάκρυα, στο γάλα και στο σάλιο συνδέθηκε κυρίως με τη ιδιότητά της να δεσμεύει σίδηρο. Άλλωστε, η βακτηριοστατική δράση της λακτοφερρίνης που οφείλεται στη δέσμευση του σιδήρου, έχει μελετηθεί εκτενώς. Στη δεκαετία του 90, βρέθηκε ότι η ανθρώπινη και η βόεια λακτοφερρίνη περιέχουν στο μόριό τους μια περιοχή που παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση ανεξάρτητη από τη δέσμευση του σιδήρου. Η περιοχή αυτή είναι φυσιολογικά κρυμμένη στο εσωτερικό του μορίου και εκτίθεται όταν πρωτεολυθεί η λακτοφερρίνη με πεψίνη⁷. Η αντιμικροβιακή δράση της λακτοφερρίνης βόας φαίνεται να είναι ισχυρότερη από αυτή της ανθρώπινης λακτοφερρίνης¹⁰⁰.

Γενικά, οι ακόλουθοι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης έχουν προταθεί για τη λακτοφερρίνη⁷:

α) *Δέσμευση του τρισθενούς σιδήρου.* Η έλλειψη σιδήρου στο περιβάλλον δρα μικροβιοστατικά για τα μικρόβια. Ορισμένα μικρόβια έχουν αναπτύξει σιδεροφόρες (μικροβιακές πρωτεΐνες για δέσμευση σιδήρου) με μεγαλύτερη χημική συγγένεια για το σίδηρο από ότι η λακτοφερρίνη, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζονται από τη παρουσία της στο περιβάλλον. Το σθένος του ιόντος του σιδήρου εξαρτάται από το οξειδοανα-

γωγικό δυναμικό του περιβάλλοντος. Σε περιβάλλον με χαμηλό δυναμικό όπως στο αναερόβιο περιβάλλον του ενεργού περιοδοντικού θυλάκου, ο σίδηρος εμφανίζεται κυρίως ως δισθενές ιόν και δε δεσμεύεται από τη λακτοφερρίνη.

β) *Βακτηριοκτόνος δράση της απολακτοφερρίνης*. Η απολακτοφερρίνη (λακτοφερρίνη χωρίς δεσμευμένο σίδηρο) έχει βακτηριοκτόνο δράση έναντι ορισμένων μικροοργανισμών. Αυτή η δράση δεν αναχαιτίζεται από την ύπαρξη σιδήρου στο περιβάλλον.

γ) *Αναστολή της προσκόλλησης των μικροβίων*. Όπως αναφέρθηκε και για άλλες πρωτεΐνες του σάλιου, η λακτοφερρίνη μόνη της ή σε συνέργια με άλλες πρωτεΐνες, π.χ. τη συγκολλητίνη και την MG2^{15,101}, μπορεί να παρεμποδίζει την προσκόλληση μικροβίων σε επιφάνειες. In vitro, αναχαιτίζει την προσκόλληση μικροβίων σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, και εμποδίζει τις αντιδράσεις σύνδεσης διάφορων πρωτεϊνών του ξενιστή (κολλαγόνο, ινονεκτίνη, ινωδογόνο, λαμινίνη, κ.ά.) με υποδοχείς στην επιφάνεια ορισμένων παθογόνων μικροβίων^{102,103}.

δ) *Συσσωμάτωση μικροβίων*. Η λακτοφερρίνη μπορεί σε συμπλέγματα με άλλες πρωτεΐνες, π.χ. συγκολλητίνη, να συμμετέχει, μέσω αντιδράσεων σύνδεσης/προσκόλλησης σε μικροβιακούς υποδοχείς, στη συσσωμάτωση μικροβιακών κυττάρων και στη δημιουργία μικροβιακών μαζών, γεγονός που μπορεί να διευκολύνει τη μηχανική απομάκρυνση των μικροβίων αυτών από το στόμα.

ε) *Επίδραση σε αμυντικούς μηχανισμούς*. Η λακτοφερρίνη έχει πληθώρα βιολογικών λειτουργιών και αλληλεπιδρά με κύτταρα και ιστούς του αμυντικού συστήματος¹⁰⁴. Έμμεσα, μερικοί από τους αμυντικούς μηχανισμούς που επηρεάζονται, μπορούν να χαρακτηρισθούν ως αντιμικροβιακοί, καθόσον οδηγούν στην καταστροφή και απομάκρυνση των μικροβίων από την πάσχουσα περιοχή.

Ός γλυκοπρωτεΐνη, η λακτοφερρίνη είναι ευάλωτη στη δράση διάφορων ενζύμων. Στο περιβάλλον του στόματος υπάρχουν πολλά ένζυμα μικροβιακής προέλευσης που θα μπορούσαν να καταστρέψουν το μόριο της λακτοφερρίνης. Έχουν αναφερθεί δύο διαφορετικοί τρόποι διάσπασης της λακτοφερρίνης⁸⁰. Ο πρώτος τρόπος είναι πρωτεόλυση των πεπτιδικών δεσμών από πρωτεϊνάσες και έχει παρατηρηθεί παρουσία περιοπαθογόνων μικροβίων, εντονότερα δε παρουσία του *Porphyromonas gingivalis*. Ο δεύτερος τρόπος είναι υδρόλυση των υδατανθρακικών τμημάτων με αποτέλεσμα την απογλυκοσυλίωση του μορίου όπως παρατηρήθηκε με το επίσης περιοπαθογόνο *Carnocytophaga sputigena*.

Αν και δεν υπάρχουν αποτελέσματα κλινικών μελετών που να διευκρινίζουν τον προστατευτικό ρόλο της λακτοφερρίνης στο στόμα, παρατηρήσεις σε άτομα με συγγενές ή επίκτητο νόσημα, που συνοδεύεται από ανεπάρκεια παραγωγής λακτοφερρίνης, δείχνουν ότι οι ασθενείς αυτοί είναι πιο ευάλωτοι και παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα νόσησης από διάφορες λοιμώξεις. Ση-

μολογία. Η λακτοφερρίνη έχει πληθώρα βιολογικών λειτουργιών και αλληλεπιδρά με κύτταρα και ιστούς του αμυντικού συστήματος¹⁰⁴. Έμμεσα, μερικοί από τους αμυντικούς μηχανισμούς που επηρεάζονται, μπορούν να χαρακτηρισθούν ως αντιμικροβιακοί, καθόσον οδηγούν στην καταστροφή και απομάκρυνση των μικροβίων από την πάσχουσα περιοχή.

μαντικό όμως είναι το γεγονός, ότι οι εν λόγω ασθενείς παρουσιάζουν και άλλες δυσλειτουργίες σε αμυντικούς μηχανισμούς και συνεπώς η ευαισθησία τους στις λοιμώξεις δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στη έλλειψη λακτοφερρίνης.

Υπεροξειδάση του σάλιου (Salivary Peroxidase)

Η δράση της υπεροξειδάσης στο σάλιο οφείλεται στην ανθρώπινη γαλακτοϋπεροξειδάση του σάλιου (HS-LPO), η οποία συντίθεται και εκκρίνεται από σιαλογόνους αδένες και στην μυελοϋπεροξειδάση (MPO), η οποία βρίσκεται στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα που μεταναστεύουν στη στοματική κοιλότητα μέσω της ουλοδοντικής σχισμής. Η συνεισφορά της MPO στη συνολική υπεροξειδάση του σάλιου μπορεί να κυμανθεί από 30 έως 75%, γεγονός που εξαρτάται και από την κατάσταση του περιοδοντίου. Εκτεταμένη περιοδοντική φλεγμονή αυξάνει τη μετανάστευση των πολυμορφοπύρρηνων και κατά συνέπεια την ποσότητα MPO στο σάλιο.

Οι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης του συστήματος της σιαλικής υπεροξειδάσης περιλαμβάνουν αδρανοποίηση μικροβιακών γλυκολυτικών ενζύμων και μείωση της καταβολικής δραστηριότητας, αναστολή της μεταφοράς αμινοξέων, καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων, και παρεμπόδιση της προσκόλλησης των μικροβίων στον επίκτητο υμένα⁷. Η γαλακτοϋπε-

ροξειδάση καταλύει την οξειδωση του SCN⁻ σχηματίζοντας OSCN⁻ που είναι μικροβιοκτόνος ουσία⁵². Η αντίδραση εξαρτάται από την παρουσία H₂O₂.

Η αντιμικροβιακή δράση του συστήματος της γαλακτοϋπεροξειδάσης (LPO) έναντι του *Streptococcus mutans* ενισχύεται από την sIgA¹⁰⁵. Το σύμπλοκο sIgA-LPO έχει μια εξισορροπιστική δράση στην ενζυμική λειτουργία της LPO, ενώ πιστεύεται ότι η επαφή του συμπλόκου με την βακτηριακή κυτταρική επιφάνεια μπορεί να οδηγήσει στην τοποθέτηση του LPO πιο κοντά στα ευαίσθητα κυτταρικά τμήματα. Μεταξύ της λυσοζύμης, της λακτοφερρίνης, της υπεροξειδάσης και της sIgA μπορεί να υπάρξει συνεργική αλλά και ανταγωνιστική αλληλεπίδραση¹⁰⁶

Χιτινάση (Chitinase)

Η χιτινάση είναι ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της χιτίνης, μιας δομικής ουσίας, του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος. Η χιτινάση ανιχνεύεται στον ορό και πρόσφατα βρέθηκε ότι παράγεται και εκκρίνεται και από τους σιελογόνους αδένες¹⁰⁷. Πιστεύεται ότι η χιτινάση συμβάλλει στην προστασία του στοματικού βλεννογόνου από μύκητες. Υπάρχουν δύο κατηγορίες χιτινασών που παρουσιάζουν διαφορές σχετικά με τον αντιμυκητιασικό μηχανισμό δράσης¹⁰⁸. Οι γνώσεις μας για τα ένζυμα αυτά είναι πολύ περιορισμένες και δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να διευκρινίζουν τον προστατευτικό τους ρόλο στη στοματική κοιλότητα. Έχει

παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα της χιτινάσης στο σάλιο περιοδοντικών ασθενών είναι σημαντικά αυξημένα, συγκρινόμενα με αυτά σε φυσιολογικά άτομα¹⁰⁹. Η σημασία αυτού του ευρήματος παραμένει άγνωστη και το φαινόμενο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Ντεφενσίνες (Defensins)

Οι ντεφενσίνες είναι πεπτίδια με μονή αλυσίδα, ισχυρώς κατιονικά, με μοριακό βάρος 3-4kDa¹¹⁰. Διαιρούνται σε α- και β-ντεφενσίνες σύμφωνα με τη θέση των τριών ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών στο μόριό τους¹¹¹. Η παραγωγή ντεφενσινών από τα ανθρώπινα κύτταρα ανήκει στη φυσική (έμφυτη) ανοσία. Οι ντεφενσίνες μπορούν να καταστρέψουν τα μικρόβια, γιατί οδηγούν σε εκπόλωση της κυτταρικής τους μεμβράνης¹¹².

Οι α-ντεφενσίνες (HNPs) εκκρίνονται από τα ουδετερόφιλα και τον εντερικό βλεννογόνο¹¹³. Αποτελούνται από 29-35 αμινοξέα. Στους ανθρώπους έχουν απομονωθεί τέσσερα ομόλογα α-ντεφενσίνης από τα ουδετερόφιλα (HNP1-4). Και οι τέσσερις α-ντεφενσίνες βρίσκονται στα αζουρόφιλα κοκκία των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων¹¹⁴. Οι HNP1-3 απαντώνται επίσης στα Βλεμφοκύτταρα και στα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα. Δύο α-ντεφενσίνες (HD-5 και HD-6) είναι γνωστές σαν εντερικές ντεφενσίνες και απαντώνται στα κοκκία των κυττάρων Paneth στο λεπτό έντερο και στα επιθηλιακά κύτταρα του θηλυκού ουρο-

γεννητικού συστήματος¹¹⁵. Οι α-ντεφενσίνες εκδηλώνουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα κατά Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων¹¹⁶, της *Candida albicans*¹¹⁷, *Cryptococcus neoformans*¹¹⁸, *Treponema pallidum*¹¹⁹, *Mycobacterium avium*¹²⁰ και κατά συγκεκριμένων ιών¹²¹. Η HNP-1 έχει ανιχνευτεί σε δείγματα σάλιου από ασθενείς με καρκίνο του στόματος¹²² καθώς επίσης και στο σάλιο ασθενών με φλεγμονώδεις καταστάσεις του στόματος¹²³. Οι HNPs έχουν ανιχνευτεί σε επιθηλιακά κύτταρα του Langerhans παρακείμενα σε καρκινώματα του στόματος¹²⁴ και στους υπογνάθιους σιελογόνους αδένες ασθενών με καρκίνο του στόματος¹²⁵. Συγκεκριμένα HNPs έχουν ανιχνευτεί στα γραμμωτά κύτταρα των πόρων των υπογνάθιων σιαλογόνων αδένων σε ασθενείς με καρκίνο του στόματος, στα ουδετερόφιλα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων¹²⁵. Οι HNPs έχουν ανιχνευτεί στο κυτταρόπλασμα και στην παρακείμενη εξωκυττάρια ουσία των ουδετεροφίλων και των επιθηλιακών κυττάρων σε περιπτώσεις καντιντίασης του παρειαικού βλεννογόνου¹²⁶.

Οι β-ντεφενσίνες είναι ελαφρώς μεγαλύτερες από τις α-ντεφενσίνες¹²⁷. Εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, των πνευμόνων, της τραχείας, των νεφρών και των σιελογόνων αδένων¹¹³.

Η β-ντεφενσίνη-1 (hBD-1) εκφράζεται συνεχώς στα επιθηλιακά κύτταρα που έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον και τη μικροβιακή χλωρίδα (πνεύμο-

νες, μαζικοί αδένες, σιαλογόνοι αδένες, νεφρά, πάγκρεας, προστάτης)¹²⁸. Η β-ντεφενσίνη-2 (hBD-2) εκφράζεται σε επιθήλια (πνεύμονες, έντερο, ουρογεννητικό σύστημα, πάγκρεας, δέρμα), στα λεμφοκύτταρα και στο μυελό των οστών¹¹⁰. Παράγεται μετά από διέγερση από βακτήρια, ιούς και φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF- α) και η ιντερλευκίνη-1 β ¹²⁹. Η β-ντεφενσίνη-1 και η β-ντεφενσίνη-2 εκδηλώνουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα κατά των *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Candida albicans*. Φαίνεται ότι είναι μάλλον εκλεκτικές για τα Gram-αρνητικά βακτήρια και για τους ζυμομήκυτες¹³⁰.

Η hBD-2 έχει βρεθεί σε καρκινώματα του στόματος¹³¹, καθώς και μέσα στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων της άνω ακανθωτής στιβάδας στο παρειακό επιθήλιο ασθενών με καντιντίαση¹²⁶. Οι Tanida και συν.¹³² αναφέρουν ότι η καντιντίαση του στόματος σχετίζεται με υπολειτουργία των σιελογόνων αδένων και ότι η μείωση των αντιβακτηριακών πρωτεϊνών του σάλιου οδηγεί σε πολλαπλασιασμό της *Candida*. Συγκεκριμένα η β-ντεφενσίνη-1 και η β-ντεφενσίνη-2 βρέθηκαν μειωμένες στο σάλιο ασθενών με καντιντίαση. Η μείωση αυτών των πεπτιδίων υποδηλώνει υπολειτουργία των σιαλογόνων αδένων.

Η β-ντεφενσίνη-3 (hBD-3) αποτελεί ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό πεπτιδίο, το οποίο εκδηλώνει αντιμικροβιακή δραστηριότητα κατά πολλών δυνητικά παθογόνων βακτηρίων και κατά

του ζυμομύκητα, *Candida albicans*. Όπως και η β-ντεφενσίνη-2, η hBD-3 παράγεται μετά από διέγερση από βακτήρια και φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως ο TNF- α . Το δέρμα και οι αμυγδαλές είναι οι κύριοι ιστοί που εκφράζουν το mRNA της hBD-3¹³³.

Ιστατίνες (Histatins)

Οι ιστατίνες αποτελούν μια ομάδα φωσφοπρωτεϊνών του σάλιου, οι οποίες είναι πλούσιες σε αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη. Είναι μια ομάδα μικρών, κατιονικών αντιμυκητιασικών πεπτιδίων, που έχουν μοριακό βάρος 3-4 kDa. Υπάρχουν στο ανθρώπινο σάλιο¹³⁴, ενώ έχουν ανιχνευτεί και στον ορό του αίματος¹³⁵. Οι ιστατίνες ανιχνεύονται στο σάλιο των υγιών ενηλίκων σε συγκεντρώσεις από 50 μέχρι 425 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹³⁶. Συντίθενται στην παρωτίδα και στους υπογνάθιους σιαλογόνους αδένες¹³⁷, και η σύνθεσή τους ρυθμίζεται από 2 γονίδια, το HIS1 και το HIS2¹³⁸. Οι ιστατίνες είναι οι πλέον υπεύθυνες για την εκδήλωση αντιμυκητιασικής δραστηριότητας κατά της *Candida albicans* in vitro¹³⁹, σε σύγκριση με άλλα μόρια του σάλιου, όπως την sIgA, την λακτοφερρίνη και την λυσοζύμη. Τα πεπτιδία, που προέρχονται από την ιστατίνη μπορούν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή νέων αντιμυκητιασικών φαρμάκων¹⁴⁰ επειδή είναι αποτελεσματικά στην καταστροφή ειδών *Candida*, που παρουσιάζουν αντίσταση στα αζόλια.

Στο ανθρώπινο σάλιο έχουν προσδιορισθεί 12 πεπτίδια όμοια με την ιστατίνη, τα περισσότερα από τα οποία προέρχονται από τη διάσπαση δύο μητρικών μορίων, της ιστατίνης-1 και της ιστατίνης-3^{141,142}. Θεωρείται ότι οι ιστατίνες 4-6 προέρχονται από την πρωτεολυτική διάσπαση της ιστατίνης 3 και ότι η ιστατίνη 1 αποτελεί μια φωσφορυλιωμένη μορφή της ιστατίνης 2. Από όλες τις ιστατίνες, η ιστατίνη-1, η ιστατίνη-3 και η ιστατίνη-5 είναι πιο άφθονες στο παρωτιδικό σάλιο, και αποτελούνται από 38, 32 και 24 αμινοξέα αντίστοιχα^{134,142}. Η ιστατίνη-1 ή ουδέτερη HRP (Histidine Rich Protein) προσροφάται στον υδροξυαπατίτη και αναστέλλει την αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων του. Η ιστατίνη-5 ήταν αντικείμενο πολλών ερευνών, πιθανώς εξαιτίας της ισχυρής αντιμυκητιασικής δράσης της. Εκτός του ότι καταστρέφει βακτήρια όπως τον *S. mutans* και τους Ακτινομύκητες^{143,144} η ιστατίνη-5 εμπλέκεται σε μια ποικιλία διαδικασιών, όπως στον σχηματισμό υμενίων¹⁴⁵, στην εξουδετέρωση βλαβερών ουσιών¹⁴⁶, στο σχηματισμό χηλικών ενώσεων με μεταλλικά ιόντα¹⁴⁷, στην αναστολή της φλεγμονώδους διαδικασίας που προκαλείται από κυτοκίνες¹⁴⁸, και στην αναστολή των πρωτεϊνών του ξενιστή και των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων και των μεταλλοπρωτεϊνών^{147,149}. Ανάμεσα στις 3 κύριες ιστατίνες (ιστατίνη-1, ιστατίνη-3, ιστατίνη-5), έχει αναφερθεί ότι η ιστατίνη-5 είναι το πιο δραστικό πεπτίδιο κατά της *C. albicans*¹⁵⁰. Πιστεύεται ότι η ιστατίνη-5 παί-

ζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία από την στοματική καντιντίαση, ειδικά στους ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές. Η μειωμένη συγκέντρωση της ιστατίνης 5 στο σάλιο ασθενών με AIDS και γενικά η μειωμένη έκκριση όλων των αντιμικροβιακών πεπτιδίων μπορεί εν μέρει να εξηγήσει γιατί πάνω από το 70% αυτών των ασθενών παρουσιάζει καντιντίαση του στοματικού βλεννογόνου¹⁵¹. Οι Tanida και συν.¹³², αναφέρουν ότι η καντιντίαση του στοματικού βλεννογόνου σε ασθενείς με AIDS συνδέεται με υπολειτουργία των σιελογόνων αδένων και μειωμένη έκκριση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Επίσης η αλλαγή στο βαθμό ευαισθησίας στελεχών της *C. albicans* συμβάλλει στην εκδήλωση αυτού του φαινομένου. Έτσι, η ιστατίνη-5 έχει λιγότερο αποτελεσματικό αντιμυκητιασικό αποτέλεσμα σε στελέχη *C. albicans* από HIV-θετικούς ασθενείς.

Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο τα κατιονικά πεπτίδια καταστρέφουν μικροοργανισμούς θεωρείται ότι είναι ο σχηματισμός πόρων στην κυτταρική τους μεμβράνη¹⁵². Υπάρχουν όμως πολλά στοιχεία που δείχνουν ότι τα ποικίλα κατιονικά πεπτίδια μπορούν να έχουν και άλλους μηχανισμούς καταστροφής¹⁵³. Έχει αναφερθεί ότι το μεσαίο τμήμα του μορίου της ιστατίνης-3 παρουσιάζει συγκρίσιμη ή μεγαλύτερη αντικαντιντιασική δράση από ολόκληρο το μόριο, πράγμα που οδηγεί στην υπόθεση της ύπαρξης ενός λειτουργικού τμήματος στο μόριο της ιστατίνης-3, που είναι υπεύθυνο για την αντικαντιντιασική λειτουργία. Επίσης, πολλές ανασυνδυα-

σμένες ή συνθετικές ιστατίνες έχουν παραχθεί και έχει αποδειχθεί ότι οι ομάδες ιστιδίνης, λυσίνης και αργινίνης εμπλέκονται στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα¹⁵⁴. Ένας από τους στόχους της ιστατίνης-5 κατά την καταστροφή των μικροβίων είναι η κυτταρική τους μεμβράνη. Αυτό αποδεικνύεται εξαιτίας της απώλειας κυτταροπλασματικών συστατικών¹⁵⁵ και από την εισροή στα κύτταρα χρωστικών¹⁵⁶. Από την άλλη πλευρά, η ιστατίνη 5 μεταφέρεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης της *C. albicans* στο εσωτερικό του κυττάρου και αλληλεπιδρά με ενδοκυτταρικές μεμβράνες, όπως αυτές που περιβάλλουν τα μιτοχόνδρια και τα κενοτόπια¹⁵⁶. Μελέτες σε απομονωμένα μιτοχόνδρια έχουν δείξει ότι η ιστατίνη 5 είναι ικανή να αναστείλει τη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων¹⁵⁷. Επίσης, η απώλεια της μιτοχονδριακής διαμεμβράνης στην περίπτωση έκθεσης στην ιστατίνη 5 οδηγεί στην υπόθεση ότι τα οργανίδια του κυττάρου μπορεί να είναι ο αντιμυκητιασικός στόχος¹⁵⁶. Έχει προταθεί ότι τα βασικά αμινοξέα στα αντιμικροβιακά πεπτιδία, η αργινίνη και η λυσίνη, αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και αυτό οδηγεί σε διάσπαση της ακεραιότητας της μεμβράνης και στον κυτταρικό θάνατο¹¹². Στην μελέτη των Gyurko και συν.¹⁵⁸ βρέθηκε ότι η ιστατίνη 5 μπορεί να καταστρέψει στους 37° C και τα βλαστοσπόρια και τις βλαστικές μορφές της *C. albicans* με τρόπο που εξαρτάται από τον χρόνο και από την συγκέ-

ντρωση, ενώ στους 4° C δεν παρατηρήθηκε καταστροφική δραστηριότητα. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε διαφοροποίηση της μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου, που πιθανόν να συνδέεται με τον μικροβιοκτόνο μηχανισμό και τον κυτταρικό θάνατο. Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η ιστατίνη-3, ένα πρόδρομο μόριο της ιστατίνης-5 που αποτελείται από 32 αμινοξέα, προσλαμβάνεται επίσης από το κύτταρο με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο και τη θερμοκρασία, γεγονός που παρέχει περισσότερα στοιχεία ότι οι ιστατίνες προσλαμβάνονται από τους μύκητες και αυτή η πρόσληψη και η εισαγωγή τους στο εσωτερικό του κυττάρου οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο¹⁵⁵. Είναι γνωστό ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος καταργεί την ικανότητα της ιστατίνης 5 να δεσμεύεται στα κύτταρα και να τα καταστρέφει, γεγονός που δείχνει ότι οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις παίζουν σημαντικό ρόλο¹⁵⁵. Οι διακυτταρικές διεργασίες, οι οποίες προκαλούνται κατά την ένωση των ιστατινών με τους κυτταρικούς υποδοχείς τους δεν είναι γνωστές¹³⁶, αλλά η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με την κυτταρική μεμβράνη ακολουθείται από απελευθέρωση ενδοκυτταρικού λάλιου, μαγνήσιου και ATP¹⁵⁵. Παρόλο που συμβαίνει απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών από την *C. albicans*, έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα στα οποία έχει επιδράσει η ιστατίνη 5 δεν είναι διαπερατά για τη χρωστική καλσεινη¹³⁶. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι το αποτέλεσμα της δράσης της ιστατίνης 5 στη

διαπερατότητα των κυττάρων είναι πιο σύνθετο από μια απλή λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η πρόσληψη από το κύτταρο της ιστατίνης 5, η καταστροφή του κυττάρου καθώς επίσης και η απελευθέρωση ενδοκυτταρικών συστατικών από το κύτταρο που προκαλούνται από αυτό το μόριο είναι ενεργειακά εξαρτώμενες¹⁵⁹.

Η ευαισθησία της *C. albicans* στην ιστατίνη 5 επηρεάζεται από την μεταβολική κατάσταση του μύκητα. Παράγοντες που επηρεάζουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως το αζίδιο και ο αναστολέας της αναπνοής CCCP προστατεύουν την *C. albicans* από τη δραστηριότητα της ιστατίνης 5^{158, 159}. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε μειωμένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα κάνουν τον μύκητα πιο ανθεκτικό στην ιστατίνη 5¹⁵⁷. Επομένως, όπως φαίνεται από τα ενδοκυτταρικά αποτελέσματα της ιστατίνης 5 και από το γεγονός ότι για να εκδηλωθεί η δράση της χρειάζεται ο μεταβολισμός του κυττάρου να είναι ενεργός, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η ιστατίνη 5 μπορεί να έχει ένα διαφορετικό μοντέλο δράσης από το σχηματισμό πόρων στην κυτταρική μεμβράνη¹⁵⁷.

Καθελισιδίνη (Cathelicidin)

Οι καθελισιδίνες είναι μία οικογένεια κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων με 12 ως 80 αμινοξέα και θετικό φορτίο +2 ως +7 που οφείλεται σε αυξημένη παρουσία των βασικών αμινοξέων (αργινίνη, λυσίνη, ιστιδίνη) στο μόριό τους. Κατηγοριοποιούνται μαζί γιατί τα προ-

πεπτιδιά τους περιέχουν μία όμοια περιοχή καθελίνης. Έχουν βρεθεί στα πρωτεύοντα θηλαστικά, στα τρωκτικά και στα κουνέλια¹⁶⁰⁻¹⁶². Οι καθελισιδίνες αποθηκεύονται σε ενδοκυττάρια κυστίδια ως ανενεργά προπεπτιδία και ενεργοποιούνται μετά από κάποιο ερέθισμα. Το ανενεργό προπεπτιδίο χρειάζεται να πρωτεολυθεί ώστε να προκύψει ο ενεργός αντιμικροβιακός παράγοντας¹⁶³. Οι καθελισιδίνες κωδικοποιούνται από γονίδια με τέσσερα εξόνια. Το τέταρτο εξόνιο κωδικοποιεί το ενεργό πεπτιδίο. Τα γονίδια των καθελισιδινών περιέχουν ένα ισχυρό ομόλογο 5'-τμήμα που κωδικοποιεί την περιοχή της καθελίνης. Στον άνθρωπο μόνο μία καθελίνη έχει βρεθεί μέχρι σήμερα, η LL-37/hCAP18. Το αντίστοιχο γονίδιο (CAMP) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3. Το πεπτιδίο LL-37 δεν έχει τριτοταγή δομή και σχηματίζει α-έλικα¹⁶⁴.

Οι καθελισιδίνες φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της φυσικής άμυνας και της φλεγμονώδους αντίδρασης. Σε ότι αφορά στην αντιμικροβιακή τους δράση, δρουν στις μικροβιακές κυτταροπλασματικές μεμβράνες. Η μικροβιακή λύση είναι ο τρόπος καταστροφής των μικροβίων, με τον σχηματισμό πόρων και την αποσταθεροποίηση της μεμβράνης^{160,162}. Οι καθελισιδίνες παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση ευρέως φάσματος σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, μύκητες και ιούς με έλυτρο^{165,166}. Όσον αφορά την ευαισθησία των μικροβίων της στοματικής κοιλότητας στο LL-37 λίγα μόνο μικρόβια έχουν εξεταστεί, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, και α-

παιτείται περαιτέρω διερεύνηση^{167,168}. Ο ρόλος του πεπτιδίου στη στοματική κοιλότητα μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς αυτή εκτίθεται διαρκώς σε μικροβιακές προκλήσεις. Σε αντίθεση με την έκφραση των β-ντεφενσινών που εντοπίζεται στα ούλα, το LL-37 έχει βρεθεί κυρίως σε ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα¹⁶⁹. Οι καθελιδίνες και οι β-ντεφενσίνες δρουν συνεργικά στην καταστροφή των βακτηρίων. Οι καθελιδίνες παράγονται στους σιελογόνους αδένες και η παραγωγή αυτή θεωρείται σημαντική για την έκκριση τους στην στοματική κοιλότητα κάτω από μη φλεγμονώδεις συνθήκες^{161,168}. Η έλλειψη του LL-37 στο σάλιο σχετίστηκε με προχωρημένη περιοδοντική νόσο σε ασθενείς με σύνδρομο Kostmann¹⁶². Η σημασία τέτοιων παρατηρήσεων για την έκφραση του LL-37 στη στοματική κοιλότητα είναι μεγάλη, καθώς μέχρι τώρα ήταν γνωστή μόνο η δράση του στην άμυνα του δέρματος. Το πεπτίδιο μπορεί να παίζει ρόλο στην προστασία της στοματικής κοιλότητας.

Πέραν της αντιμικροβιακής δράσης του, το LL-37 φαίνεται ότι έχει πολλούς ρόλους ως μεσολαβητής της φλεγμονής με δράσεις στα επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα της φλεγμονής^{170,171}. Επηρεάζει διάφορες διαδικασίες όπως την ανοσιακή απάντηση, την αγγειογένεση, την επούλωση των τραυμάτων και την ιστική αναγέννηση, αποτελώντας πιθανό σημαντικό κομμάτι της πρώιμης άμυνας του οργανισμού^{160,170,172}. Η έκφραση του πεπτιδίου LL-37 στα μυελικά κύτταρα, στα

φαγοκύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα οργάνων όπως οι όρχεις, οι πνεύμονες, ο οισοφάγος, ο γαστρεντερικός σωλήνας και το δέρμα υποδεικνύει δράσεις πέρα από την άμεση μικροβιακή καταστροφή. Αυτή ακριβώς η παρουσία του στο επιθήλιο πολλών οργάνων επεκτείνει τον πιθανό του ρόλο στην υγεία αλλά και τη νόσο^{165,173}.

Συμπεράσματα

Την τελευταία δεκαετία έχει πραγματοποιηθεί σημαντική πρόοδος στην διερεύνηση της δομής, της λειτουργίας και του τρόπου δράσης πεπτιδίων και πρωτεϊνών του σάλιου με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι μηχανισμοί δράσης των ουσιών αυτών κατά των μικροβίων περιλαμβάνουν: (α) παρεμπόδιση μεταβολικών δραστηριοτήτων, (β) αποδόμηση κυτταρικών στοιχείων, (γ) αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και (δ) παρεμπόδιση προσκόλλησης σε ιστούς του ξενιστή. Παρά το γεγονός ότι τα εργαστηριακά αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της αντιμικροβιακής δράσης έναντι συγκεκριμένων παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μικροβίων της στοματικής κοιλότητας, δεν υπάρχουν αποτελέσματα κλινικών ερευνών που να αποδεικνύουν τον προστατευτικό ρόλο των ουσιών αυτών *in vivo*. Σε πολλές μάλιστα περιπτώσεις η κλινική διερεύνηση είναι ιδιαίτερα δύσκολη, αφού η αποίκιση του ξενιστή από συγκεκριμένο μικρόβιο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που χρειάζεται να συνυπάρχουν και που δεν είναι δυνατόν να απομονωθούν για ερευ-

νητικούς σκοπούς. Ταυτόχρονα, οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια του σάλιου με αντιμικροβιακή δράση έχουν και άλλες βιολογικές λειτουργίες που πιθανόν να επηρεάζουν έμμεσα το οικοσύστημα του στόματος, γεγονός που δυσκολεύει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την αντιμικροβιακή τους δράση. Συνεπώς, εξακολουθούν να υπάρχουν τομείς που απαιτούν επιπλέον διερεύνηση, η δε χρήση σύγχρονων μεθόδων γενετικής και μοριακής βιολογίας μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην αξιολόγηση του ρόλου των ουσιών αυτών ως μέρος της φυσικής

άμυνας του οργανισμού.

Οι νέες γνώσεις που αποκτήθηκαν από τη μελέτη της χημικής δομής των ουσιών αυτών άνοιξαν νέους δρόμους για το σχεδιασμό και την παραγωγή βιολογικά ενεργών πεπτιδίων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυσικά αντιμικροβιακά. Η προοπτική αυτή μπορεί να δώσει νέες κατευθύνσεις στην αντιμετώπιση παθογόνων μικροβίων με ουσίες καλύτερα ανεκτές από τον ανθρώπινο οργανισμό και δραστικές έναντι μικροβιακών στελεχών που είναι ανθεκτικά στα υπάρχοντα αντιβιοτικά.

Salivary proteins and peptides with antimicrobial activity

G. Varagkas, M. Kourtidou, D. Tegou, F. Karvouni, S. Davidopoulou, S. Kalfas

Abstract

Saliva is essential for the homeostasis of the oral ecosystem. Saliva contains several components that can interact with microbes in various ways and that may control the composition of the oral microflora. A number of salivary proteins and peptides, such as mucins, immunoglobulins, proline-rich proteins, agglutinins, lactoferrin, cystatins, lysozyme, defensins, cathelinsidins, and histatins, exert antimicrobial activity and are thought to contribute to the defence system of the oral cavity. The precise biological

role is yet unclear for many of these peptides and proteins, since it has been proven extremely difficult to elucidate the biological function of the compounds, based on their biochemical properties. Especially for the antimicrobial peptides, the complete understanding of their biological role is of great importance, since they might serve as the basic material for designing a new generation of antibiotics with a broad antimicrobial spectrum. This review focuses on the secretion, gene location, structure and antimicrobial properties of the above mentioned salivary peptides and proteins.

Βιβλιογραφία

- Zalewska A, Zwierz K, Zolkowski K, Gindzienski A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Bioch Pol* 47, No 4/2000.
- Sharma P, Dudus L, Nielsen PA et al. MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1998;19:30-37.
- Veerman ECI, Van den Keybus PAM, Valentin-Benz M, Nieuw Amerongen AV. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Eur J Oral Sci* 1996;104: 346-352.
- Veerman ECI, Van den Keybus PAM, Valentin-Benz M, Nieuw Amerongen AV. Isolation of different high-Mr mucin species from human whole saliva. *Biochem J* 1992;283:807-811.
- Desseyn JL, Guyonnet Duperat V, Porchet N, Aubert JP, Laine A. Human gene MUC5B, the 10.7-kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat - structural evidence for a 11p15.5 gene family. *J Biol Chem* 1997;272: 3168-3178.
- Thornton DJ, Khan N, Mehrotra R et al. Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology* 1999: 9:293-302.
- Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI. Salivary glands and saliva, Number 2, Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Diseases* 2002;8:12-22.
- Milne RW, Daves C. The relative contribution of different salivary glands to the blood group activity of whole saliva in humans. *Vox Sanguis* 1973;25:298-307.
- Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. *Caries Res* 1987;21:297-309 10.
- Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ. Adherence of oral Streptococci to salivary glycoproteins. *Infect Immun* 1992: 60:31-38.
- Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 1993;268:20563-20569.
- Bolscher JGM, Groenink J, Van der Kwaak JS et al. Detection and quantification of MUC7 in submandibular, sublingual, palatine and labial saliva by anti-peptide serum. *J Dent Res* 1999;78:1362-1369.
- Mehrotra R, Thornton DJ, Sheehan JK. Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva: evidence for self association. *Biochem J* 1998;334: 415-422.
- Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochem J* 2000;345:557-564.

15. Soares RV, Thomas Lin, Camillec Siqueira, Lucila S. Bruno, Xiaojing Li, Frank G. Oppenheim, Gwynneth Ottner, Robert F. Troxler. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Archives of Oral Biology* 2004;49:337-343.
16. Tabak LA. In defence of the oral cavity: structure, biosynthesis and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol* 1995;57: 547-564.
17. Biesbrok AR, Reddy MS, Levine MJ. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect Immun* 1991;59:3492-3497.
18. Holmskov U, Mollenhauer J, Madsen J et al. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10794-10799.
19. Gough PJ, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000;2:305-311.
20. Bikker FJ, Ligtenberg AJM, van der Wal JE et al. Immunohistochemical detection of salivary Agglutinin/gp-340 in human parotid, submandibular and labial salivary glands. *J Dent Res* 2002;81(2):134-139.
21. Prakobphol A, Xu F, Hoang VM, Larsson T et al. Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine rich protein gp-340. *J Biol Chem* 2000;275: 39860-39866.
22. Bolscher JGM, Nazmi K, Ran LJ et al. Inhibition of HIV-1 IIIB and clinical isolates by human parotid, submandibular and palatine saliva. *Eur J Oral Sci* 2002;110:149-156
23. Demuth DR, Lammey MS, Huck M et al. Comparisson of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. *Microb Pathog* 1990;9: 199-211.
24. Carlen A, Olsson J, Borjesson AC. Saliva mediated binding in vitro and prevalence in vivo of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1996;41:35-39.
25. Magnusson I et al. *Caries Res* 10, 113-122 (1976).
26. Rosan B et al. *Infect Immun* 38, 1056-1059 (1982).
27. Lenander-Lumikari M et al. *Caries Res* 26, 371-378 (1992).
28. Tenovou et al. *J Biol Buccale* 20, 85-90
29. Ligtenberg A, Bikker FJ, Veerman ECI et al. Binding of salivary agglutinin to IgA. *Biochem J* 2004;383:159-164.
30. Holmskov U, Mollenhauer J, Madsen J et al. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:10794-10799.
31. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic Mutans *Streptococci*. *Carries Res* 1999;33:4-15.
32. Prakobphol A, Thomsson KA, Hansson GC et al. Human low-molecular weight salivary mucin expressed the sialyl Lewis (x) determinant and has L-selectin ligand activity. *Biochemistry* 1998;37:59-67.
33. Beely JA. Basic proline-rich proteins: multifunctional defence molecules? *Oral Dis* 2001;7:69-70.
34. Kim HS, Smithies O, Maeda N. A physical map of the human salivary proline-rich protein gene cluster covers over 700 kbp of DNA. *Genomics* 1990;6:260-267.
35. Azen EA, Latreille P, Niece RL. PRBI gene variants coding for length and null polymorphisms among human salivary Ps, Pmf, Pms amd Pe proline-rich proteins (PRPs). *Am J Hum Genet* 1993; 53:264-278.
36. Αποστολόπουλος ΞΑ. Προληπτική Οδοντιατρική 1996. Εκδόσεις "Συμμετρία", Αθήνα.
37. Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB. Absorbed salivary Proline-Rich Protein and statherin: Receptors for type I fibrillae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun* 1988;56(11):2990-2993.
38. Gibbons RJ, Hay DI. Absorbed salivary Proline-Rich Proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces, p.143-169. In L.M. Switalski, M. Hook, and E. Beachy(ed). *Molecular mechanisms of microbial adhesion* 1988. Springer-Verlag, NY.
39. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989;68:750-760.

40. Gibbons RJ, Hay DI, Childs WCI, Davis G. Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch Oral Biol* 1990; 35:107-114.
41. Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH. Delineation of a segment of absorbed salivary proline rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun* 1991;59:2948-2954.
42. Ruhl S, Sandberg AL, Cisar JO. Salivary receptors for the proline-rich protein binding and lectin-like adhesins of oral *Actinomyces* and *Streptococci*. *J Dent Res* 2004;83(6): 505-510.
43. Newman F, Beely JA, Mac Farlane TW. Adherence of oral micro-organisms to human parotid salivary proteins. *Electrophoresis* 1996;17:266-270.
44. Newman F, Beely JA, Mac Farlane TW et al. Salivary protein interactions with oral bacteria: an electrophoretic study. *Electrophoresis* 1993;14:1322-1327.
45. Robinovitch MR, Ashley RL, Iversen JM, Vigoren EM, Oppenmeim FG, Lamkin M. Parotid salivary basic proline-rich proteins inhibit HIV-1 infectivity. *Oral Dis* 2001;7: 86-93.
46. Gu M, Haraszthy GG, Collins AR et al. Identification of salivary proteins inhibiting herpes-simplex virus-1 replication. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:54-59.
47. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: Oral bacteria adherence. *J Bacteriol* 1993;175:3247-3252.
48. Ayad M, Wuyckhuysse BC, Minaguchi K et al. The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with carries experience. *J Dent Res* 2000; 79:976-982.
49. Schenkels LCPM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. EP-GP and the lipocalin VEGh, two different human salivary 20-kDa proteins. *J Dent res* 1995a;74:1543-1550.
50. Schenkels LCPM, Schaller J, Walgreen-Weterings E, Schadee-Eestermans IL, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Identity of human extra parotid glycoprotein (EP-GP) with secretory actin binding protein (SABP) and its biological properties. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1994;375:609-615.
51. Schenkels LCPM, Rathman WM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Detection of proteins related to a salivary glycoprotein (EP-GP). Concentrations in human secretions (saliva, sweat, tears, nasal mucus, cerumen, seminal plasma). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991;372:325-329.
52. Schaller J, Akiyama K, Kimura H, Hess D, Affolter M, Rickle EE. Primary structure of a new actin-binding protein from human seminal plasma. *Eur J Biochem* 1991;196: 743-750.
53. Haagensen DE, Dilley WG, Mazoujian G, Wells SA. Review of GCDPF-15, an apocrine marker protein. *Ann NY Acad Sci* 1990;586: 161-177.
54. Schenkels LCPM, Ligtenbegr AJM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Interaction of the salivary glycoprotein EP-GP with the bacterium *Streptococcus salivarius* HB. *J Dent Res* 1993;72(12) :1559-1565.
55. Schenkels LCPM, Walgreen-Weterings E, Oomen LCJM, Bolscher JGM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. In vivo binding of the salivary glycoprotein EP-GP (identical to GCDPF-15) to oral and non-oral bacteria detection and identification of EP-GP binding species. *Biol Chem* 1997;378:83-88.
56. Autiero M, Bouchier C, Basmaciogullari S et al. Isolation from a human seminal vesicle library of the cDNA for gp17, a CD4 binding factor. *Immunogenetics* 1997;46:345-348.
57. Gaubin M, Autiero M, Basmaciogullari S et al. Potent inhibition of CD4/TCR- mediated cell apoptosis by a CD-4 binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. *J Immunol* 1999;162: 2631-2638.
58. Caputo E, Manco G, Mandrich L, Guardiola J. A novel aspartyl proteinase from apocrine epithelia and breast tumors. *J Biol Chem* 2000;275:7935-7941.
59. Καγιάρβης ΙΓ, Challacombe SJ. Γενική και κλινική ανοσολογία για τις παθήσεις του στόματος. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1998.
60. Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries*

- Research 2004;38:247-253.
61. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992;10:75-88.
 62. Marcotte H, Lavioe MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;71:1-109.
 63. Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (s-IgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA1 protease cleavage. *Infect Immun* 1992;60:5057-5064.
 64. Maza JL, Elguezabal N, Prado C et al. *Candida Albicans* adherence to resin-composite restorative dental material: influence of whole human saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002;94:589-592.
 65. Elguezabal N, Maza JL, Ponton J. Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Diseases* 2004;10:81-86.
 66. Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996c: 377:71-86.
 67. Dieckmann T, Mitschang L, Hofmann et al. The structure of native phosphorylated chicken cystatin and of a recombinant unphosphorylated variant in solution. *J Mol Biol* 1993;234:1048-1059.
 68. Barrett AJ, Rawlings ND, Davies ME et al. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In *Proteinase Inhibitors*. Barrett AJ, Salvesen G editors. New York: Elsevier, 1986: 515-569.
 69. Bobek LA, Aguirre A, Levine MJ. Human salivary cystatin S. Cloning, sequence analysis, hybridization in situ and immunocytochemistry. *Biochem J* 1991;278 :627-635.
 70. Dickinson DP. Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making-but to what purpose? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(6):485-508.
 71. Dickinson DP, Thiesse M, Dempsey LD, Millar SJ. Genomic cloning, physical mapping and expression of human type 2 cystatin genes. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:573-580.
 72. Morita M, Hara Y, Tamai Y et al. Genomic construct and mapping of the gene for CMAP and identification of a proximal novel gene, BSCv. *Genomics* 2000;67:87-91.
 73. Shintani M, Minaguchi K, Isemura S et al. Genetic polymorphisms of the CST2 locus coding for cystatin SA. *Hum Genet* 1994;94: 45-49.
 74. Shaiton E, Isemura S, Sanada K et al. Cystatin superfamily. Evidence that family II cystatin genes are evolutionary related to family III cystatin genes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1998;369 (suppl): 191-197.
 75. Ni J, Abrahamson M, Zhang M et al. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 1997;272:10853-10858.
 76. Blankenvoorde MF, Henskens YM, Van't Hof W et al. Inhibition of the growth and cysteine proteinases activity of *P. gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. *Biol Chem* 1996;377:847-850
 77. Bjorck L. Proteinase inhibitors, immunoglobulin-binding proteins and a novel antimicrobial principle. *Mol Microbiol* 1990: 4:1439-1442.
 78. Collins AR, Grubb A. Cystatin D, a natural salivary cystatin, inhibits coronavirus replication at its physiologic concentration. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:59-61.
 79. Blankenvoorde MF, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, van Steenberg TJ, Brand HS, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem.* 1998 Nov;379 (11):1371-5.
 80. Alugupalli KR and Kalfas S. Degradation of lactoferrin by periodontitis- associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1996: 1: 145(2) : 209-14.
 81. Das L, Datta N, Das PK et al. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatins involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J Immunol* 2001;166:4020-4028.
 82. Leung-Tack J, Tavera C, Gensac MC et al.

- Modulation of phagocytosis-associated respiratory burst by human cystatin C : role of the N-terminal tetrapeptide Lys-Pro-Pro-Arg. *Exp Cell Res* 1990c:188:16-22.
83. Van't Hoff W, Blankenvoorde MFJ, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. The salivary lipocalin Von Ebner's gland protein is a cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1997:272:1837-1841.
 84. Flower DR. The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Letts* 1994:354: 7-11.
 85. Bonavida B, Saspe AT, Sercarz EE. Specific tear prealbumin: a unique lachrymal protein absent from serum and other secretions. *Nature* 1969:221:375-376.
 86. Blaker M, Kock K, Ahlers C, Buck F, Schmale H. Molecular cloning of human Von Ebner's gland protein, a member of the lipocalin superfamily highly expressed in lingual salivary glands. *Biochim Biophys Acta* 1993: 1172:131-137.
 87. Yusifov TN, Abduragimov AR, Gasymov OK, Glasgow BJ. Endonuclease activity in lipocalins. *Biochem J* 2000:347:815-819.
 88. Wojnar P, vant'Hoff W, Merschak P, Lechner M, RedL B. The N-terminal part of recombinant human tear lipocalin/von Ebner's gland protein confers cysteine proteinase inhibition depending on the presence of the entire cystatin-like sequence motifs. *Biol Chem* 2004:382(10):1515-1520
 89. Mc Neely TB, Dealy M, Drippw DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory Leucocyte Protease Inhibitor: A human saliva protein exhibiting anti-Human Immunodeficiency Virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 1995:96:456-464
 90. Scott P, Lucht E, Ehnlund M, Bjorling E. Inhibitory function of secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) in human saliva is HIV-1 specific and varies with virus tropism. *Oral Dis* 2002:8:160-167
 91. Jana NK, Gray LR, Shugars DC. Human Immunodeficiency Virus type1 stimulates the expression and production of Secretory Leucocyte Protease Inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity. *J Virology* 2005:79(10): 6432-6440.
 92. Hiemstra PS, Maasen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileucoprotease. *Infect Immun* 1996:64(11):4520-4524.
 93. Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF. Antileucoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis* 1997:176(3): 740-747.
 94. Schenkels LCPM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995b:6: 161-175.
 95. Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry* 1984: 63: 165-189.
 96. Pollock JJ, Lotardo S, Gavai R, Grossbard BL. Lysozyme- protease- inorganic monovalent anion lysis of oral bacterial strains in buffers and stimulated whole saliva. *J. Dent. Res.* 1987: 66: 467-474.
 97. MacFarlane TW. Ecology and epidemiology of *Candida*. In: Samaranyake LP and MacFarlane TW, eds. *Oral candidosis*. Butterworth and Co Ltd., University Press, Cambridge, Great Britain, 1990: 21-46.
 98. Gråhn E, Tenovuo J, Lehtonen O-P, Eerola E, Vilja P. Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in young adults. *Acta Odontol. Scand.* 1988: 46:67-74.
 99. Jalil RA, Ashley FP, Wilson RF. The relationship between 48-h dental plaque accumulation in young human adults and the concentrations of hypothiocyanite, "free"and "total"lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A in saliva. *Archs. Oral Biol.* 1992: 37: 23-28.
 100. Groenink J, Walgreen - Weterings E, Nazmik et al. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - associated periodontitis. *J. Clin Periodontol* 1999:26:269-275.
 101. Van der Kraan MIA, Groenink J, Nazmi K., Veerman ECI, Bolscher JGM, Nieuw Amerongen AV. Lactoferrin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin – Peptides 2004, in press.

102. Alugupalli KR, Kalfas S, Edwardsson S, Naidu AS. Lactoferrin interaction with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 35-41.
103. Alugupalli KR and Kalfas S. Characterization of the lactoferrin- dependent inhibition of the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* to fibroblasts and to a reconstituted basement membrane. *APMIS* 1997; 105: 680-688.
104. Alugupalli K. Lactoferrin interactions with periodontitis-associated bacteria. Aspects of adhesion-counteracting mechanisms. Thesis, Lund, Sweden, 1996.
105. Tenovuo J, Moldoveanu Z, Mestecky J, Pruitt KM, Rahemtulla BM. Interaction of specific and innate factors of immunity: IgA enhances the antimicrobial effect of the lactoperoxidase system against *Streptococcus mutans*. *J Immunol* 1982;128:726-31.
106. Kuwana R, Okumura T, Ytakamatsu H, Watabe K. The *ylb* gene product of *Bacillus subtilis* is involved in the coat development and lysozyme resistance of spore. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242 (1):51-7.
107. Van Steijn GJ, Nieuw Amerongen AV, Veerman GCI, Kasanmoentalib S, Overdijk B. Chitinase in whole human salivas and in whole saliva of patients with periodontal inflammation. *Eur J Oral Sci* 1999;107: 328-337.
108. Theis T and Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 2004: 61: 437-455.
109. Van Steijn CJ, Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI, Kasanmoentalib S, Overdijk B. Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients *J Periodont Res* 2002, in press.
110. Harder J, Bartels J, Christophers E. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.
111. Ganz Y, Lehrer RI. Defensins. *Pharmacol Ther* 1995;66:191-205.
112. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins, antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Ann Rev Immunol* 1993;11:105-125.
113. Ali RS, Falconer A, Ikam M, Bisset CE, Cerio R, Quinn AG. Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001;117:106-11.
114. Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. Defensins. *Eur J Haematol* 1990;44:1-8.
115. Jones DE, Bevins CL. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett*1993;315:187-192.
116. Kohashi O, Ono T, Ohki K et al. Bactericidal activities of rat defensins and synthetic rabbit defensins of *Staphylococci*, *Klebsiella pneumoniae*(Chedid,277 and 8N3), *Pseudomonas aeruginosa* (mucoid and nonmucoid strains), *Salmonella typhimurium*(Ra, Rc, rd and re of LPS mutants) and *Escherichia coli*. *Microbial Immunol* 1992: 36:369-380.
117. Selsted ME, Szklarek D, Ganz T et al. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985;49: 202-206.
118. Eisenhauer PB, Harwig SSL, Skzlarek D et al. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect Immun* 1989;57:2021-2027.
119. Borenstein LA, Selsted ME, Lehrer RI et al. Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum*. *Infect Immun* 1991;59: 1359-1367.
120. Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI et al. Activity defensins from human neutrophilic granulocyte against *Mycobacterium Avium - Mycobacterium Tracellulare*. *Infect Immun* 1992;60:4720-4725.
121. Daher KE, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 1986;60:1068-1074.
122. Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J et al. Defensin-1, a peptide detected in saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 1998;18:4645-4650
123. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T et al. Defensin-1, an antimicrobial peptide present in saliva with oral diseases. *Oral Dis* 1999a;5:139-142
124. Mizukawa N, Sugiyama K, Yamachika E et al.

- Presence of defensin in epithelial langerhans cells adjacent to oral carcinomas and precancerous lesions. *Anticancer Res* 1999 b:19:2969-2972.
125. Mizukawa N, Sawaki K, Yamachika E et al. Presence of human b-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000a:20:2005-2008.
 126. Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Fukunaga J, Sugahara T. Immuno histochemical study on expression of a-defensin and b-defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis. *Oral Diseases* 2002:8:37-41.
 127. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004:2:727-738.
 128. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schultz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995:368:331-335.
 129. Schroder JM, Harder J. Molecules in focus human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999:31:645-651
 130. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998:9:299-314.
 131. Mizukawa N, Sugiyama K, Kamio M et al. Immunohistochemical staining of human a-defensin-1, in submandibular glands of patients with oral carcinomas. *Anticancer Res* 2000b:19:1125-1128.
 132. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med* 2003:32: 586-94.
 133. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001:276: 5707-5713 .
 134. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungicidal effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988:263:7472-7477.
 135. Murakami Y, Nagata H, Shizukuishi S, Nakashima K, Okawa T, Takigawa M et al. Histatin as a synergistic stimulator with epidermal growth factor of rabbit chondrocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994:198:274-280.
 136. Edgerton M, Koshlukova SE, Lo TE, Chrzan BG, Straubinger RM, Raj PA. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5- binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998:273:20438-47.
 137. Sherestha P, Hashimoto J, Takagi H, Yamada K, Mori M, Kanehira T et al. Immunoreactive histatin 5 in salivary gland tumors. *Acta Histochem Cytochem* 1994:27:527-34.
 138. Sabatini LM, Azen EA. Histatins , a family of salivary histidine-rich proteins are encoded by at least two loci HIS1 and HIS2. *Biochem Biophys Res Commun* 1989:160:495-502.
 139. Lal K, Santarpia RP 3 rd, Xu L, Manssuri F, Pollock JJ. One-step purification of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva and determination of anti-candidal activity. *Oral Microbiol Immunol* 1992:7:44-50
 140. Oppenheim FG, Xu T and Roberts FD. Anti-fungal and anti-bacterial histatin- based peptides. Periodontix, Inc. The Trustees of Boston University, United States 1997.
 141. Troxler RF, Offner GD, Xu T, Vanderspek JC, Oppenheim FG. Structural relationships between human salivary histatins. *J Dent Res* 1990:69:2-6.
 142. Καλπίδης Χ, Oppenheim FG. Ιστατίνες; Βιοχημεία και φυσιολογία μιας αξιόλογης οικογένειας ανθρώπινων αντιμικροβιακών σιαλικών πρωτεϊνών. *Οδοντοστοματολογική Πρόοδος* 1997:51:216-227.
 143. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth- inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1984:44: 695-701.
 144. Kalpidis CD. Multidimensional antimicrobial profiles of human salivary histatins. Doctorate Thesis, Department of Periodontology and Oral Biology, Boston University School of Dental Medicine, Boston; 1994.
 145. Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite- a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 1992:71:1569-1576.
 146. Yan QY, Bennick A. Identification of histatins

- as tanning-binding proteins in human saliva. *Biochem J* 1995;311:341-347.
147. Gusman H, Travis J, Helmerhorst HJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun* 2001a;69:1402-1408.
 148. Imatani T, Kato T, Minaguchi K, Okuda K. Histatin 5 inhibits inflammatory cytokine induction from human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:378-382.
 149. Gusman H, Lendenmann U, Grogan J, Troxler RF, Oppenheim FG. Is salivary histatin 5 a metalloprotein? *Biochim Biophys Acta* 2001b;1545:86-95.
 150. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun* 1991;59:2549-54.
 151. Mandel ID, Barr CE, Turgeon L. Longitudinal study of parotid saliva in HIV-1 infection. *J Oral Pathol Med* 1992;21:209-13.
 152. Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997;349:418-422.
 153. Van't Hoff W, Veerman ECI, Helmerhorst EJ, Nieuw Amerongen AV. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 2001;382:597-619.
 154. Tsai H, Bobek LA. Studies of the mechanism of human salivary histatin-5 candidacidal activity with histatin 5 variants and azole-sensitive and resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997;41:2224-2228.
 155. Xu Y, Ambudkar I, Yamagishi H, Swaim W, Walsh TJ, O'Connell B. Histatin 3-mediated killing of *C. albicans*: Effect of extracellular salt concentration on binding and internalization. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2256-2262.
 156. Helmerhorst EJ, Breeuwew P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LCJM, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV, Abee T. The cellular target of histatin 5 on *C. albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 1999;274:7286-7291.
 157. Helmerhorst EJ, Van't Hof W, Breeuwer P, Veerman ECI, Abee T, Troxler RF et al. Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. *J Biol Chem* 2001;276:5643-9.
 158. Gyurko C, Lendenmann U, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Killing of *C. albicans* by Histatin 5: Cellular uptake and energy requirement. *Antonie van Leeuwenhoek* 2001;79:297-309
 159. Gyurko C, Lendenmann U, Troxler RF, Oppenheim FG. *Candida albicans* mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:348-354.
 160. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 2000;1:141-150.
 161. Woo JS, Jeong JY, Hwang YJ, Chae SW, Hwang SJ, Lee HM. Expression of cathelicidin in human salivary glands. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:211-214.
 162. Putsep K, Carlsson G, Boman HG, Anderson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostman: an observation study. *Lancet* 2002;360:1144-1149.
 163. Sorensen OE, Follin P, Johnson AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP18, is processed to the antimicrobial peptide LL37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001;97:3951-3959.
 164. Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 2000;8(9):402-410.
 165. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9541-9546.
 166. Guthmiller JM, Vargas KG, Srikantha R, Schomberg LL, Weistroffer PL, McCray PB Jr et al. Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 3216-3219.

167. Tanaka D, Miyasaki KT, Lehrer RI. Sensitivity of *A.actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:226-231.
168. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 2002;81(12):845-850.
169. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Nea R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingival. *J Periodont Res* 2001; 36:285-294l.
170. Elsbach P. What is the real role of antimicrobial peptides that can mediate several other inflammatory responses? *J Clin Invest* 2003;111:1643-1645.
171. Frohm Nilsson M, Sandsedt B, Sorensen O, Weber G, Borregaard N, Stahle-Backdal M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun* 1999;67:2561-2566.
172. Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J Invest Dermatol* 2001;117:91-97.
173. Agerberth B, Charo J Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jornvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086-3093.

Διεύθυνση επικοινωνίας:

Σωτήρης Κάλφας
Πιπτακού 1, 546 45, Θεσσαλονίκη,