

ÇÜRÜKLÜ VE ÇÜRÜKSÜZ BİREYLERDE TÜKÜRÜK KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Yrd.Doç.Dr.Mehmet YILDIZ *

Barbaros NALBANTOĞLU **

THE COMPARISON OF SALIVA CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITIES IN CARRIOUS AND NONCARRIOUS SUBJECTS

ÖZET

Tükürüğün fiziksel ve biyolojik özelliklerinin diş çürüğünde rol oynadığı bilinmektedir. Tükürükteki karbonik anhidraz, karbonik asiti katalizleyerek bikarbonat tamponunu üretmektedir. Bu çalışmada, çürüklü ve çürüksüz bireylerde tükürük karbonik anhidraz aktivite düzeyleri incelenmiştir. 20-25 yaş grubundaki 15 çürüklü ve 15 çürüksüz bireyden tükürük örnekleri alınmıştır. Mg total protein başına düşen karbonik anhidraz aktivitesi, substrat olarak CO₂'in kullanılmasıyla belirlenmiştir. Çürüksüz bireylerde karbonik anhidraz aktivitesi yüksek düzeyde belirlenmiştir. Bu iki grubun karbonik anhidraz aktivite değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, anlamlı fark bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz, Diş çürüğü.

SUMMARY

It is known that physical and biological properties of saliva play a role in dental caries. Carbonic anhydrase in saliva produces bicarbonate buffer by catalyzing carbonic acid. In this study, saliva carbonic anhydrase activity levels were investigated in carious and noncarious subjects. Saliva samples were collected from 15 carious and 15 noncarious subjects which are 20-25 years of age. Carbonic anhydrase activity per mg total protein was determined by using CO₂ as substrate. In noncarious subjects, carbonic anhydrase activity was determined in high level. When carbonic anhydrase activity levels of this two groups were statistically compared, significant difference was found.

Key words: Carbonic anhydrase, Dental caries.

GİRİŞ

Çürük, dental plak altında asit oluşumu nedeniyle diş sert dokularının çözülmesi sonucu oluşur. Dişin etiolojisi, diyet ve enfeksiyon gibi çevresel faktörler ve tükürük ve dişin genetik özelliklerinden ibarettir.^{6,24} Tükürük çürük ilişkisi en iyi bir şekilde, yaygın rampant çürüklere sahip tükürük hipofonksiyonlu hastalarda gözlenmektedir.¹¹ Tükürük, oral kavite ve diş yüzeylerini etkileyen inorganik bileşikleri ve çeşitli proteinleri ihtiva etmektedir.^{10,9} Bir çok klinik çalışmalara rağmen, tükürük proteinlerinin konsantrasyonu ile çürük prevalansı arasında fazla bir ilişki bulunamamıştır.²⁰

Yapılan çalışmalarda, karbonik anhidraz'ın (CA; EC 4.2.1.1) tükürüğün önemli enzimlerinden biri olduğu bulunmuştur.^{3,14,16,19} Bu enzim, insan vücudunun çoğu dokularında üretilerek pH düzenlenmesine, CO₂ ve bikarbonat taşınmasına dönüşümlü CO₂ + H₂O ↔ HCO₃⁻ + H⁺ reaksiyonunu katalizleyerek katkıda bulunmaktadır.^{22,23} Günümüze kadar, memelilerde bu enzimin yedi izoenzimi belirlenmiştir.^{5,15} Tükürükde salınan CA VI izoenzimi, tükürük bikarbonat tampon sisteminde rol oynayarak tükürük pH'sını düzenlemektedir.^{3,14,16,19}

Tükürükte yapılan bir çalışmada, uyku esnasında CA VI konsantrasyonunun düşük olduğu, gündüz periyodunda ise hızlıca yükseldiği bulunmuştur.^{8,18} Başka bir çalışmada ise, çürüklü bireylerin tükürüklerinde CA VI konsantrasyonu düşük bulunmuştur.⁷ Bu çalışmada ise, çürüklü ve çürüksüz bireylerdeki tükürük CA aktivitesinin düzeyi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Ağızında çürük veya sonucunu (DMF-T= 6.76) bulunduran 15 ve bulundurmayan 15 gönüllü Diş Hekimliği Fakültesi öğrencisinden, tükürük örnekleri toplandı. Yaşları 20 ile 25 arasında değişen bu öğrencilerin, sağlıklı ve dolayısıyla herhangi bir ilaç tedavisi almıyor olmalarına dikkat edildi. Örnekler, tükürük miktarını arttıran bir uyarıcı kullanılmadan 1 ml 0.1 M Tris-SO₄ 0.2 M Na₂SO₄ pH 8.7 tamponu içeren 20 ml'lik kaplarda toplandı. Tükürük örnekleri 16 000 x g ve 4°C'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatantlar protein miktarı ve CA aktivitesi belirleninceye kadar 4°C'de saklandı.¹³

*Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı

**Atatürk Üniv. Tıp Fak. Fen-Edebiyat Fak. Biyokimya ABD.

Tükürük örneklerindeki protein miktarları Bradford yöntemine göre belirlendi.¹ Bu yöntem, fosforik asitli ortamda coomassie brilliant blue G-250 reaktifinin proteinlerle kompleks oluşturması ve oluşan kompleksin 595 nm'de absorbanasının ölçümü esasına dayanmaktadır. Örneklerdeki protein miktarları, önceden hazırlanan standart grafik yardımıyla mg cinsinden belirlendi.

Tükürük örneklerindeki CA aktivite düzeyleri Maren yöntemine göre belirlendi.¹² Bu yöntemde, substrat olarak CO₂'in katılmasıyla oluşan H⁺ iyonunun, ortamın pH'sını düşürmesinden yararlanılmaktadır. Bu esnada, pH 8.2'den (mavi renk) 6.3'e (sarı renk) düşüncüye kadar geçen süre (t_c), aktivite biriminin hesaplanmasında kullanılmak amacıyla ölçüldü. Aynı işlem enzimsiz olarak da yapılarak enzimsiz reaksiyon süresi (t₀) belirlendi. Aktivite birimi; 1 Wilbur-Anderson Birimi = t₀ - t_c / t_c formülünden bulundu.

Tükürük örneklerindeki aktiviteler, Enzim ünitesi/mg total protein şeklinde hesaplandı. Daha sonra, ölçümlerimiz istatistiksel olarak t testi analizi ile değerlendirildi.

BULGULAR

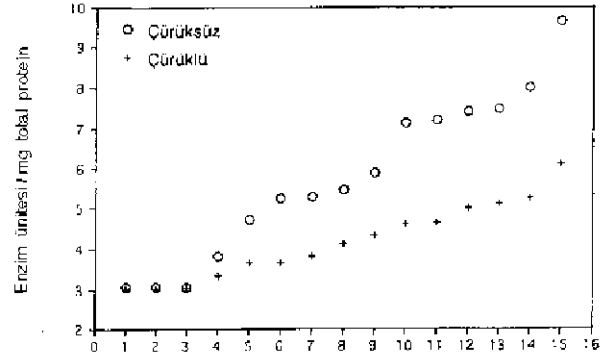
Bu çalışmada, 15 çürüklü ve 15 çürüksüz bireye ait tükürük örneklerindeki karbonik anhidraz aktiviteleri Enzim ünitesi / mg total protein cinsinden hesaplanarak, elde edilen değerler küçükten büyüğe doğru grafik şeklinde gösterildi (Şekil 1).

Çürüklü ve çürüksüz ağızlardaki tükürük karbonik anhidraz izoenzimi aktivite verileri t testi ile karşılaştırıldı (Tablo 1). Sonuç olarak, bu aktivitelerle göre çürüklü (4.19) ve çürüksüz (5.76) ortalamaları birbirinden önemli derecede farklı bulunmuştur (p<0.05).

Tablo 1. Çürüklü ve çürüksüz bireylere ait tükürük karbonik anhidraz aktivite değerlerinin t testi sonuçları.

Çürük Durumu	n	\bar{x}	SD	t
Çürüklü	15	4.19	0.93	2.753 *
Çürüksüz	15	5.76	2.01	

* P < 0.05 de önemli



Şekil 1. Çürüklü ve çürüksüz bireylere ait tükürük karbonik anhidraz aktivite değerleri.

TARTIŞMA

Karbonik anhidraz izoenzimleri dönüşümlü CO₂ + H₂O \leftrightarrow HCO₃⁻ + H⁺ reaksiyonunu katalizleyerek insan vücudunun farklı dokularında pH dengesini düzenlerler. Karbonik anhidraz VI izoenzimi (CA VI) parotis ve submandibular tükürük bezlerinin salgı hücrelerinden tükürüğe salgılanır.^{3,4,14} CA VI tükürükteki total proteinin yaklaşık % 3'ünü oluşturmasına rağmen, onun tükürükteki gerçek fizyolojik önemi ortaya konulamamıştır.⁷

Diş çürüğü, diş sert dokuların bakteriyel metabolizma tarafından üretilen asidik çevrede demineralize edilmesiyle oluşur. Tükürük pH'sı ve tamponlama kapasitesi dişin çürükten korunmasında ana faktör olarak bilinir.²¹ Daha önceden yapılan bir çalışmada, CA VI'nın tükürükteki bikarbonat seviyelerini düzenlediği belirtilmiştir.² Ağızdaki asit oluşumu ile diş çürüğü arasındaki ilişki, karbonik anhidrazın bikarbonat tampon sistemini katalizlemesiyle bozulmaktadır. Karbonik anhidrazın ağız ortamında işlev görmesi, bu enzimin asitli ortamlarda (pH 2.2) dahi aktivitesini devam ettirmesindedir.¹⁷ Bu görüşü destekleyen bir çalışmada ise, tükürük CA VI konsantrasyonu ile çürük oluşumu (DMF-T) arasında negatif bir ilişkinin olduğu bulunmuştur.⁷

Bu çalışmada ise, tükürük karbonik anhidraz aktivitesine göre çürüklü ve çürüksüz ortalamaları birbirinden önemli derecede farklı bulunmuştur (p<0.05). Tükürükte CA aktivitesi düşük olduğunda, dişin demineralize olabileceği asidik çevre olduğundan dişlerde çürük oluşma riski artmaktadır. Bu sonuçlar, tükürükteki CA aktivitesinin çürük oluşumunu engelleyen bikarbonat tampon sistemine katkısını vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-51.
2. Feltstein JB, Silverman DN. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J Biol Chem* 1984; 259: 5447-53.
3. Fernley RT, Darling P, Aldred P, Wright RD, Coghlan JP. Tissue and species distribution of the secreted carbonic anhydrase isoenzyme. *Biochem J* 1989; 259: 91-6.
4. Fernley RT, Farthing J, Cooper EJ. Radioimmunoassay for salivary carbonic anhydrase in human parotid saliva. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 567-9.
5. Fleming RE, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H, Waheed A, Sly WS. Carbonic anhydrase IV in rat and human gastrointestinal tract: Regional cellular and subcellular localization. *J Clin Invest* 1995; 96: 2907-13.
6. Holbrook WP. Dental caries and cariogenic factors in pre-school urban Icelandic children. *Caries Res* 1993; 27: 431-7.
7. Kivela J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. 1999; 33: 178-84.
8. Kivela J, Parkkila S, Waheed A, Parkkila A-K, Sly WS, Rajaniemi H. Secretory carbonic anhydrase isoenzyme (CA VI) in human serum. *Clin Chem* 1997; 43: 2318-22.
9. Lagerlöf F, Oliveby A. Caries protective factors in saliva. *Adv Dent Res* 1994; 8: 229-38.
10. Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. *Crit Rev Biol Med* 1993; 4: 251-9.
11. Mandel ID. Role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* 1989; 119: 298-304.
12. Maren TH. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1960; 160: 26-30.
13. Murakami H, Sly WS. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. 1987; 262: 1382-88.
14. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi I, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 941-7.
15. Parkkila S, Parkkila A-K. Carbonic anhydrase in the alimentary tract: Roles of the different isoenzymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 305-17.
16. Parkkila S, Parkkila A-K, Juvonen T, Rajaniemi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and IV in the human alimentary tract. *Gut* 1994; 35: 646-50.
17. Parkkila S, Parkkila A-K, Lehtola J, Reinila A, Södervig H-J, Rannisto M, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1013-19.
18. Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration. *Acta Physiol Scand* 1995; 154: 205-11.
19. Parkkila S, Parkkila A-K, Vierjoki T, Stahlberg T, Rajaniemi H. Competitive time-resolved immunofluorometric assay for quantifying carbonic anhydrase VI in saliva. *Clin Chem* 1993; 39: 2154-7.
20. Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 343-67.
21. Russell JJ, MacFarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. Caries prevalence and microbiological and salivary caries activity test in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol* 1990; 18: 120-25.
22. Tashian RE. The carbonic anhydrases: Widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioassays* 1989; 10: 186-92.
23. Tashian RE. Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. *Adv Genet* 1992; 30: 321-56.
24. Watson GE, Davis BA, Raubertas RF, Pearson SK, Bowen WH. Influence of maternal lead ingestion on carries in rat pups. *Nat Med* 1997; 3: 1024-5.