

**PERIODONTAL YIKIM ALANLARINDAN ELDE EDİLEN DİŞETİ
CEBİ SIVISI ÖRNEKLERİNDE PROTEOGLIKAN
DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ**

**Doç. Dr. Nermin YAMALIK*, Dr. Hakan AKINCIBAY*,
Doç. Dr. Feriha ÇAĞLAYAN*, Prof. Dr. Ferhan TEZCAN, Dt. Nur KILIÇ***

ÖZET

Periodontal yıkım bölgelerinden elde edilen dişeti cep sıvısı (DCS) örneklerinde proteoglikan (PG) düzeylerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada periodontitisli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında PG içeriği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Periodontitisli alanlardaki DCS örneklerinde belirlenen PG artışının doku yıkımı sonucu PG'ların DCS'ye geçişi yanısıra dokuda yeni PG sentezine bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : DCS, Periodontitis, Proteoglikan.

SUMMARY

**DETERMINATION OF PROTEOGLYCAN LEVELS IN GINGIVAL
CREVICULAR FLUID SAMPLES FROM PERIODONTAL
DESTRUCTION AREAS**

In the present study, the PG levels in gingival crevicular fluid (GCF) samples from patients with periodontal destruction were observed. GCF samples from the patient group contained significantly increased levels of PG when compared to the healthy

(*) H.Ü. Dişhekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Ankara.

(**) H.Ü. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

subjects. This increase in GCF PG levels was attributed to both the breakdown of PG during periodontal destruction, and the new synthesis of PG in tissue.

Key Words : GCF, Periodontitis, Proteoglycan.

GİRİŞ

Boğ dokusunun matriksi, mast hücrelerinin de bir miktar katkısı bulunmakla beraber, öncelikle fibroblastlar tarafından üretilir. Bazı komponentleri ise kan kaynaklı olan bu matriks içinde bağ dokusu hücreleri yer alır. Bu matriksin ana bileşenleri ise protein-polisakkarit makromolekülleri olup, normal olarak bu bileşenler proteoglikan (PG)'lar ve glikoproteinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (16).

PG'lar bağ dokusunun ara maddesinin ekstrasellüler matriksini oluştururlar (1, 21, 25). Yüksek molekül ağırlığına sahiptirler ve basit glikoproteinlerin tersine PG'lar % 95 veya daha fazla miktarda karbonhidrat içerirler. Bir çok dokuda yaygın olarak bulunmakla birlikte kıkırdak, deri, tendon, kemik ve kornea gibi dokularda PG'lar yoğun olarak bulunurlar (25). PG'lar içinde glikozaminoglikan (GAG)'lar olarak isimlendirilen hyaluronik asid, kondroitin 4 ve 6 sülfat, dermatan, heparan ve keratan sülfat bulunur. PG'larda GAG'lar dışında ayrıca küçük oligosakkarit zincirleri de yer alır (1, 25). GAG'lar PG'ların majör karbonhidrat komponentleridir ve bu komponentler dokuda serbest olarak bulunmaktan çok kovalen bağlarla protein zincirlerine bağlanmış olarak bulunurlar (1,16,21,25).

PG'lar bugün artık yalnızca hücreleri bir arada tutan yapıştırıcı ve inert bir madde olarak değil, doku ve hücre düzeyinde etkileşimler katılan makromoleküller olarak kabul edilmektedir (24). Gerçekten de PG'lar karbonhidrat-karbonhidrat, PG-hücre yüzeyi, PG-kollagen etkileşimleri yoluyla biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirirler (1). Bu etkileşimler ise normal doku fonksiyonlarının sürdürülmesinde çok büyük önem taşır (24). Bağ dokusunun normal fonksiyonları PG ve GAG varlığı ile yakından ilişkilidir (16). PG'lar diffüzyon ve sıvı akışını düzenler, ayrıca osmotik basıncın korunmasını sağlarlar. PG'ların fonksiyonları arasında dokunun bü-

tünlüğünün korunması, basınca karşı direnç oluşturulması ve dokunun elastisitesinin sağlanması sayılabilir. Bir molekül fitresi olarak tanımlanan PG'lar deformasyona karşı dirençte rol oynarlar, ayrıca hücre morfogenezi de katılırlar (1, 16, 25).

Bu özellikleri ile oral ve periodontal dokularda PG ve GAG varlığı birçok çalışmaya konu olmuştur (3, 4, 19, 20, 26). Dişeti epiteli ve bağ dokusunun moleküler ağırlık yanısıra GAG kompozisyonu açısından da farklı PG'lardan oluştuğu gösterilmiştir (3). İltihabi dişeti dokusu bölgelerinde nötral mukopolisakkaritler daha az reaktif iken, GAG'lar iltihabi odak çevresinde daha az yoğun olarak bulunmaktadır (18). Total GAG miktarının iltihaplı dişetinde azaldığını gösteren çalışmalar yanısıra, sağlıklı ve iltihaplı dişeti dokuları arasında GAG içeriği açısından farklılık bulunmadığını gösteren çalışmalar da vardır. PG'ların iltihaplı dokuda yıkılmalarına bağlı olarak miktarlarının azaldığı da ileri sürülmektedir (5, 14, 22). Dişeti gibi sürekli mekanik ve kimyasal irritasyonlara açık dokularda bütünlüğün korunmasının, hücresel aktivite için uygun bir ortamın oluşması yanısıra ekstraselüler matriks ile de ilişkisinin fazla olduğu ileri sürülmekte (3) ve bu özellikleri ile PG'lar ve periodontal hastalık gelişimi arasında bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir (1).

Dişeti cebi sıvısı (DCS), dişeti cebi içinde yer alan serum kaynaklı iltihabi bir eksudadır. İltihabi yanıt ile DCS içeriğinde değişiklikler olduğu bunların ise iltihap ile oluşan dejeneratif değişiklikleri yansıtılabileceği önerilmektedir (14). DCS içinde periodontal hastalıklı bölgelerde GAG profilinin aktif periodontal yıkımın göstergesi olabileceği önceki çalışmalarda ileri sürülmüştür (12, 15).

Böylece DCS içeriğindeki PG ve GAG varlığı ve miktarı ile periodontal hastalık arasındaki ilişkinin incelenmesi yararlı olabilir. Bu görüşten yola çıkılarak, bu çalışmanın amacı periodontal yıkımın görüldüğü bölgelerden elde edilen DCS örneklerinde total PG düzeylerinin belirlenmesidir.

MATERYAL VE METHOD

Bu amaçla H.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalma periodontal tedavi gereksinimi ile başvuran sistemik açıdan sağlıklı 10'u kadın, 10'u erkek 20 hasta deney grubunu oluşturdu.

DİŞETİ CEBİ SIVISI, PROTEOGLIKAN DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Son 6 ayda antibiotik ve/veya antienflamatuar ilaç kullanım öyküsüne sahip hastalar çalışma kapsamına alınmadı. Hasta seçiminde DCS örneklerinin elde edileceği üst çene keser ve kanin dişlerinin ağızda mevcut olmasına ve bu dişlerde radyografik olarak alveoler kemik kaybı, klinik olarak ise patolojik periodontal cepelerin bulunmasına özen gösterildi. Yine son 6 ayda periodontal tedavi uygulanmış hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Bu grup yaş ortalaması 35.8 olan 20 hastadan oluşuyordu.

Kontrol grubunu ise sistemik ve periodontal açıdan sağlıklı 7'si kadın 8'i erkek 15 birey oluşturdu. Bu bireyler Dişhekimliği Fakültesi öğrenci ve personeli arasından seçildi. Bu grubun yaş ortalaması ise 26.3 idi.

Klinik çalışmalar : Deney ve kontrol grubunu oluşturan tüm bireylerde Plak indeksi ve Gingival indeks (17) değerleri saptandı. Ayrıca cep derinlikleri ölçüldü. Tüm değerlendirmeler tüm ağızdaki dişler ve örnekleme bölgelerindeki dişler için ayrı ayrı yapıldı. DCS akış hızını etkilememek için DCS örnekleri klinik indekslerin belirlenmesi ve cep derinliklerinin ölçülmesinden önce gerçekleştirildi. DCS örnekleri salya ile kontaminasyonu önleyebilmek amacıyla üst çene kanin-kanin dişleri arasındaki bölgeden elde edildi. Standardize boyutlarda, ağırlıkları önceden tespit edilmiş kağıt şeritleri tamponlar ile izole edilmiş ve kurutulmuş örnekleme bölgesindeki dişlerin sulkuslarma yerleştirildi. DCS örnekleri Rudln ve ark. yöntemi (23) uyarınca toplandıktan sonra yeniden ağırlıkları tartılarak elde edilen DCS miktarı mg cinsinden not edildi. DCS içeren kağıt şeritler alimünyum folilere sarılarak plastik tüpler içinde deep-freezde deney gününe değin saklandı.

Laboratuvar çalışmaları : Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerden elde edilen DCS örneklerindeki total PG miktarları Bitter ve Murin'in (6) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla DCS içeren kağıt şeritler 0.5 ml Tris-HCl içeren tüplerde vortekslendi. Daha sonra 0.02 ml setilpridinyum klorür ilave edilerek çöktürme işlemi yapıldı ve 24 saat beklendi. 30 dakika 2500 rpm. de santrifüjü takiben yabancı maddelerin uzaklaştırılması için % 1'lik 0.02 ml potasyum asetat ilave edildi ve yine 24 saat beklendi. Yeniden santrifüjlendi. Süpernatanda heksuronik asit ölçümü yapıldı. Değerler 525 nm dalgaboyunda spektrofotometrede okundu.

İstatistiksel çalışmalar : Gruplar arasındaki DCS PG düzeylerine ilişkin farklılıklar T-testi ile değerlendirildi. Klinik parametreler ile DCS PG düzeyleri arasındaki ilişkiler ise korelasyon analizi ile değerlendirildi (9).

BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarında elde edilen klinik ölçümlerin ortalama değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Hasta grubunda DCS ortalama total PG miktarları 21.3 ± 9.17 h.asit/mg olarak saptanırken bu değer kontrol grubunda 4.58 ± 1.83 h.asit/mg olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonrasında DCS ortalama PG miktarları açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). (Tablo 2).

Tablo 1 : Klinik Parametrelerin Ortalama Değerleri

		Plak İndeksi	Gingival İndeks	Cep Derinliği (mm)	Cep Sıvısı Akış Hızı (mg/dak)
Periodontitis grubu	Tüm ağız	1.87	1.97	3.5	
	Örnekleme bölgesi	1.74	1.99	3.61	1.05
Kontrol grubu	Tüm ağız	0.51	0.48	1.32	
	Örnekleme bölgesi	0.32	0.23	1.28	0.46

Tablo 2 : Dişeti Cebi Sıvısı Örneklerindeki Proteoglikan Miktarları (h. asit/mg).

	Min.	Max.	X	SD	P
Periodontitis grubu	11.46	45.9	21.3	9.17	$p < 0.0001$
Kontrol grubu	1.23	6.97	4.58	1.83	

Klinik parametreler ile DCS PG miktarları arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Bağ dokusunun ekstraselüler ara maddesini oluşturan heksuranat-içeren heteropolisakkaritler (GAG) ve bunların proteine bağlanmasıyla oluşan PG'ların periodontal dokulardaki varlığı gösterilmiştir (3, 4, 19, 20, 26). Bu bileşiklerin yapısal ve metabolik özellikleri ile mineralize ve non-mineralize bağ dokularının bütünlüğünün korunmasındaki önemleri ise birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir. Dişin destek dokularının yıkımı ile karakterize periodontal hastalıkların varlığında DCS örneklerinde GAG profili de incelenmiştir (12, 15). DCS örneklerinde hyaluronik asite ek olarak sülfate GAG'larının görülmesi şiddetli yıkım bölgelerinde mümkün olmuştur (12). Sülfate GAG'ların özellikle kondroitin-4-sülfatın DCS'deki varlıkları derin periodontal dokularda oluşan yıkım olaylarıyla ilişkili bulunmuş ve aktif yıkım evrelerinin bir biyokimyasal indiktörü olarak değerlendirilmiştir. Başarılı periodontal tedavi ve chlorhexidin uygulamasını takiben ise klinik parametrelerde düzelmeye birlikte sülfate GAG varlığı izlenememiştir. Böylece bu komponentin derin periodontal dokulardaki aktif yıkım ile ilişkili olabileceği önerilmiştir (15).

Bizim çalışmamızda DCS'nin spesifik GAG profili değil, GAG'ların protein zincirlerine tutunmasıyla oluşan PG varlığı ve miktarları periodontitisli hastalarda ve sağlıklı bireylerde incelenmiştir. Elde edilen bulgularda yıkımın görüldüğü periodontitisli alanlardaki DCS örneklerinde total PG miktarı 21.3 ± 9.17 , kontrol grubundaki DCS örneklerinde ise 4.58 ± 1.83 olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Bu bulgularımız DCS total PG varlığının periodontal hastalık varlığında belirgin olarak arttığını göstermektedir. Bu sonuçtan yola çıkılarak periodontal hastalık oluşumu ile PG'lar arasında bir ilişki varlığından söz edilebilir. DCS gerek içeriği gerekse de varlığı ile periodontal hastalık aktivitesi ile ilişkisi açısından bir çok araştırmaya konu olmuş iltihabi bir eksudadır (8). Enzimler, savunma faktörleri ve bakteriyel kaynaklı ürünleri yanısıra DCS'nin PG ve

GAG içeriğinin ve profilinin de aktif yıkım ile ilişkili olabileceği öne- rilmektedir (12, 15). Gerçekten de bizim çalışmamızın bulguları pe- riodontal yıkımın görüldüğü alanlardan elde edilen DCS örnekle- rinde belirgin olarak artmış PG varlığını göstermektedir.

Ancak GAG'larda olduğu gibi DCS'de artan total PG miktarla- rının kaynağı tam olarak bilinmemektedir. Bu artış mevcut doku komponentlerinin yıkımının yanısıra (5, 11, 22), yeni sentezlenme- ye de bağlı olabilir. Zira Last ve ark. (15) değişen DCS GAG pro- filinde yeni sentezlenen GAG'ların rolü olabileceğini belirtmişler- dir. Ayrıca kemik resorpsiyonu stimüle edildiğinde, GAG'ların kl- tür ortamında daha fazla üretim ve serbestlenme olduğu, ayrıca enflamasyonlu yumuşak dokularda sülfat GAG sentezinde artma olduğu belirtilmiştir (15). Böylece GAG'lar gibi onların protein zin- cirlerine bağlanmasıyla oluşan PG'lar da ya yeni sentezin sonucu olacak ya da doku yıkımı sonucu serbestlenmeyi (5, 11, 22) takiben DCS'ye geçebilir.

Daha önce gerçekleştirilen bu çalışmada, iltihaplı dişeti doku- sunda total PG varlığı belirlenmiş ancak, sağlıklı dişetine oranla periodontitisli alanlardan elde edilen dişeti örneklerinde bir mik- tar daha az PG belirlenmesine rağmen aradaki farkın anlamlı ol- madığı sonucuna varılmıştır (27). Oysa bu çalışmada periodontitisli alanlardan elde edilen DCS rneklerinin, artmış PG düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki çalışmanın bulgularına daya- narak iltihap varlığında artan doku bütünlüğünün bozulması ve büyük moleküllerin hareketlerinin kolaylaşması sonucu PG'ların DCS'ye iltihaplı dokularda daha kolay geçtiği düşünülebilir. Yine artan PG sentezi de DCS'deki total PG artışına neden olabilir.

Klinik parametreler ile DCS total PG miktarları arasında bir korelasyon varlığının belirlenememiş olması, PG'ların daha çok de- rin periodontal dokulardaki yıkım ile ilişkili olabileceğini (15), kli- nik parametrelerin ise her zaman derin dokulardaki değişimleri hassas biçimde yansıtamaması ile bağlantılı olabilir.

DCS'deki total PG içeriği ister doku yıkımına bağlı isterse de yeni senteze bağlı olsun, periodontitisli alanlardaki DCS örnekle- rinde anlamlı bir artış göstermektedir. PG ve GAG'ların periodon- tal doku yıkımına hangi mekanizmalar ile katıldıkları tam olarak bilinmemektedir ancak PG ve GAG'lar dişeti dokusunun majör non-kollagenz makromolekül guruplarındandır (10) ve bu mole-

DİŞETİ CEBİ SIVISI, PROTEOGLIKAN DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

küllerin yıkımında rol oynayan proteolitik enzimler gingival ortamda mevcuttur (21). Bu enzimler kollagen yıkımı yanısıra, PG'ların da yıkımına katılabilirler (11). Ayrıca bu makromoleküllerin kollagen fibrillerin yapısal bütünlüklerinin korunmasında da rol oynadıkları, dolayısıyla da yıkıma uğramalarının periodontal hastalık varlığında kollagen fibrillerinin kollagenolitik enzimler yardımıyla yıkımını da kolaylaştırabileceği önerilmektedir (3, 7). Periodontal hastalık varlığında bağ dokusu ara maddesini oluşturan makromoleküllerin de yıkıma uğradığı, bunu takiben ise yıkım faktörlerinin dokuyu daha kolay etkileyerek, yıkımı çabuklaştırdıkları ileri sürülmektedir (1, 7, 11). Tüm bu bilgiler ışığında, PG ve GAG'ların biyolojik rollerinin belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmaların yararlı olabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Bartold, P.M. : Proteoglycans of the periodontium: Structure, role and function. *J. Periodont Res.*, 22 : 431-444, 1987.
2. Bartold, P.M.; Page, R.C. : Isolation, identification and quantitation of glycosaminoglycans synthesized by human gingival fibroblasts in vitro. *J. Periodont Res.*, 20 : 234-292, 1985.
3. Bartold, P.M.; Wiebkin, O.W.; Thonard, J.C. : Proteoglycans of human gingival epithelium and connective tissue. *Biochem J.*, 211 : 119-127, 1983.
4. Bartold, P.M.; Wiebkin, O.W.; Thonard, J.C.: Proteoglycans in human gingiva. 1. Distribution of molecular size. *Arch Oral Biol.*, 27 : 1-7, 1982.
5. Bartold, P.M.; Page, R.C. : The effect of chronic inflammation on gingival connective tissue proteoglycans and hyaluronic acid. *J. Oral Pathol.*, 15 : 367-370, 1986.
6. Bitter, T.; Muir, H.M. : A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem.*, 4 : 330-334, 1962.
7. Ciancio, S.G.; Mather, M.L. : Acid mucopolisaccharides in gingivitis and periodontitis. *J. Periodont Res.*, 6 : 188-193, 1971.
8. Cimasoni, C. : The Crevicular Fluid. *Monographs in Oral Science*. Vol. 3., Howard M. Myers, San Francisco, California, 21, 65, 92, 1974.

9. Cohen, L.; Holliday. M. : Statistics for social scientists, London : Harper and Row, 1983.
10. Dahlöf, G.; Moder, T.; Reinholt, P.P.; Wikström, B.; Hjerpe, A. : Proteoglycans and glycosaminoglycans in phenytoin-induced gingival overgrowth. *J. Periodont Res.*; 21 : 13-21, 1986.
11. Embery, G.; Oliver, W.M.; Stanbury, J.B. : The metabolism of proteoglycans and glycosaminoglycans in inflamed human gingiva. *J. Periodont Res.*, 14 : 512-519, 1979.
12. Embery, G.; Oliver, W.M.; Stanbury, J.B.; Purvis, J.A. : The electrophoretic detection of acidic glycosaminoglycans in human gingival sulcusfluid. *Arch Oral Biol.*, 27 : 177-179, 1982.
13. Hiramatsu, M.; Abe, I.; Minami, N. : Acid mucopolisaccharides in porcine gingiva. *J. Periodont Res.*, 13: 224-231, 1978.
14. Kleinberg, I.; Golub, L.M. : Gingival crevicular fluid and its use in diagnosis of disease. *Int. J. Dermatol.*, 24 : 37-40, 1985.
15. Last, K.S.; Stanbury, J.B.; Embery. G. : Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid as indicators of active periodontal disease. *Arch Oral Biol.*, 30 : 275-281, 1985.
16. Lindhe, J. : Textbook of Clinical Periodontology, Munksgaard, 1st ed., 39, 40, 1983.
17. Löe, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, 38 : 610-616, 1967.
18. Melcher, A.H. : Some histological and histochemical observations of chronically inflamed gingiva. *J. Periodont Res.*, 2 : 127-146, 1967.
19. Pearson, C.H.; Gibson, G.J. : Proteglycans of bovine periodontal ligament and skin : Occurance of different hybridsulphated galactosaminoglycans in distinct proteoglycans. *Biochem J.*, 201 : 27-37, 1982.
20. Pedlar, J. : Histological localization of myxoid tissue in normal human palatal mucosa and its glycosaminoglycans. *Arch Oral Biol.*, 32 : 195-199, 1987.
21. Purvis, J.A.; Embery, G. : The breakdown of gingival proteoglycans by a polymorphonuclear leukocyte protease. *J. Dent Res.*, 1185 (abst 182), 1981.
22. Purvis, J.A.; Embery, G., Oliver, W.M. : Molecular size distribution of proteglycans in human inflamed gingival tissue. *Arch Oral Biol.*, 29 : 513-519, 1984.
23. Rüdín, H.J.; Overdiek, H.F.; Rateitschak, K.H. : Correlation between sulcus fluid rate and clinical and histological inflammation of the marginal] gingiva. *Helv Odont Acta.*, 14 : 21-26, 1970.

DİŞETİ CEBİ SIVISI, PROTEOGLİKAN DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

24. Schluger, S.; Yuodelis, R.; Page, R.C.; Johnson, R.H. : Periodontal Diseases. Basic Phenomena, Clinical Management and Occlusal and Restorative Interrelationships. Lea and Febiger, Philadelphia, London, 27, 30, 1990.
25. Smith, E.L.; Hill, R.L.; Lehman, I.R.; Lefkowitz, R.J.; Handler, P.; White, A. : Principles of Biochemistry : Mammalian Biochemistry, McGraw-Hill International Book Company, 7th ed., Tokyo : 228-239, 1983.
26. Wiebkin, O.W.; Bartold, P.M.; Thonard, J.C. : Proteoglycans from adult human gingival epithelium. Biochem J., 183 : 467-470, 1979.
27. Yamalık, N.; Çağlayan, F.; Tezcan, F.; Kılıç, N.; Akın, F. : Periodontitisli hastalarda dişeti dokusunun total proteoglikan içeriğinin İncelenmesi. G.Ü. Dişhekimliği Dergisi 9 (1); 57-67, 1992.