

STREPTOCOCCUS MUTANS'IN SAKKAROZLU ORTAMDA TİTANYUM YÜZEYİNE ADHEZYONUNUN IN VITRO İNCELENMESİ

Ayfer Kaynar*, Güven Külekçi**

Yayın kuruluna teslim tarihi: 31. 3. 1993

ÖZET

Streptococcus mutans'ın Ti yüzeydeki adhezyonu in vitro koşullarda ATCC 13419 numaralı S.mutans suşu ile %5 sakkarozlu triptik soy buyyonda incelendi. Deneyin sonunda yüzeylerde biriken bakteri plağının ortalama CFU değeri 1.42×10^7 olarak saptandı. Böylece tükürüğün bulunmadığı ortamda S. mutansın Ti yüzeylerdeki adhezyonunun sakkarozla sağlanan özel bir etkileşim olduğu doğrulandı. Ayrıca, Ti metalinin S. mutans üzerine antibakteriyal etkisi olmadığı gösterildi.

Anahtar sözcükler: Titanyum, adhezyon, Streptococcus mutans.

ABSTRACT

ADHERENCE OF STREPTOCOCCUS MUTANS TO TITANIUM SURFACES: IN VITRO

The adherence of Streptococcus mutans to titanium surfaces was studied in an in vitro model using ATCC#13419 strain of the bacteria incubated in %5 sucrose tryptic soy broth. Mean values of CFU was 1.42×10^7 . Thus, adhesion of the S. mutans occurred via sucrose to Ti without saliva. It was also shown that Ti has no antibacterial effect on S. mutans species

Key words: Titanium, adhesion, Streptococcus mutans.

GİRİŞ

Dental implantların önde gelen başarısızlık nedenlerinden biri, yüzeylerinde biriken bakteri plağına bağlı gelişen infeksiyondur. İnfeksiyon, implanta destek olan dokuların yıkımına neden olur (17). Kaynağını ağız florasındaki öncü mikroorganizmalardan alan plak, temelde bakterilerin katı yüzeylere adhezyon (yapışma) özelliği ile oluşur. Bakteri hücrelerinin herhangi bir yüzey ya da dokudaki kolonizasyonu hücrenin adhezyon kapasitesiyle ilgili olmakla beraber, adhezyonun gerçekleştiği yüzeyin moleküler yapısı, hidrofilik veya hidrofobik oluşu, serbest yüzey enerjisi, yüzey gerilimi gibi parametrelere, ayrıca bakteri duvarı ile sözkonusu yüzey arasındaki alanı (interface) dolduran oksit tabakanın ve protein filmin yapısı ile de yakından ilgilidir (1).

Adhezyon fenomeni bakteri hücresi yönünden incelendiğinde, herhangi bir yüzeye kolonizasyonun aşağıdaki faktörlerden etkilendiği görülür:

- 1) Bakteri ile yüzey arasında stereokimyasal bir etkileşimin olması (7)
- 2) Bakteriler arası aggregasyon görülmesi (15)
- 3) Kommensal ilişki (16)
- 4) Antagonist etkileşim (20)
- 5) Tükürükteki spesifik ve nonspesifik immünolojik savunma (14)
- 6) Selektif büyüme (27).

Bakteri hücrelerinin cam, sement, mine gibi yüzeylerdeki kolonizasyon özellikleri birçok araştırmacı tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir (3,19,23,25). Buna karşılık, diş hekimliğinde henüz "yeni" sayılabilecek titanyum (Ti) metali ve yüzeyindeki bakteri adhezyonu konusundaki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Biz bu çalışmada implantolojideki yaygın kullanımı nedeniyle, Ti yüzeylerdeki bakteri plağı oluşumunu incelemeyi amaçladık. Bu amaçla, ağız boşluğundaki öncü bakterilerden olan Streptococcus mutans'ın açık havada okside olmuş düzgün Ti yüzeyinde yapışma özelliğini in vitro olarak değerlendirdik.

* Dr. İ. Ü. Diş Hek. Fak. Ağz, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı

** Doç. Dr. İ. Ü. Diş Hek. Fak. Mikrobiyoloji Bilim Dalı

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyde, saf Ti parçasından 1.2x0.95 cm. boyutlarında kesilen 8 düzgün yüzey kullanıldı. Bu yüzeyler deney tübü (1.5 cm. çapında ve 16 cm yüksekliğinde) içinde asılı kalmalarını sağlamak amacıyla ortodontik teller üzerine, birbirinden yaklaşık 2 cm. aralıklı olacak şekilde -toksik etkisi olmayan- 404 yapıştırıcısıyla sabitlendi.

Mc Cabe ve Mc Dummer'e (4) göre in vitro bakteri plağını hazırlamak için ATCC 13419 numaralı Streptococcus mutans suşu öncelikle %5 sakkaroz katılmış triptik soybuyyon (TBS) besiyerinde 37°C de 24 saat üretildi. 5 gün süreyle yeni besiyerine transfer edilerek sakkarozlu ortama alıştırdı. Elde edilen saf kültürün 1 ml'si içinde 15 ml. %5 sakkarozlu TBS bulunan deney tüplerine ekildi (4). Her deney tüpüne iki Ti yüzeyi taşıyan bir ortodontik tel yerleştirilerek 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon işlemi aynı şartlar altında, 5 gün süreyle, 5 yeni besiyerine tekrarlandı. Beşinci gün sonunda deneyde kullanılan yüzeylerden biri, bakteri plağının yaş ve kuru ağırlığının saptanmasında; diğeri, plak oluşturma derecesi ve koloni sayımı için kullanıldı. Plak oluşturma derecesi Ti yüzeyi üzerinde görülen koloni sayısına göre:

0---	Koloni yok	
1---	Koloni sayısı	25'den az
2---	"	25-50
3---	"	50-75
4---	"	75-100
5---	"	100-125
6---	"	125'den fazla olarak

değerlendirildi.

Her bir yüzey üzerinde oluşan plağın yaş ve kuru ağırlığını saptamak için, steril bir bistüri ucu ile kaldırılan tüm birikintiler önceden darası alınmış lamellere yerleştirildi ve tartıldı. Lameller daha sonra pastör fırınında 60°C'de 5 dak. bekletildikten sonra ikinci kez tartıldı. Bulunan değerlerden lamellerin ağırlıkları çıkartılarak plakların yaş ve kuru ağırlıkları bulunmuş oldu.

Koloni sayımı için, yüzeyden elde edilen birikinti ayrı ayrı 4.5 ml. %0.85 NaCl çözeltisinde süspanse edildi. Daha sonra bu süspanسیونun 10⁻¹ ile 10⁻⁸ arasında 10 katlı seri dilüsyonu yapıldı. Elde edilen süspanسیونların 0.1 ml.si %5 koyun kanlı jeloz besiyerlerine yayıldı ve %10 CO₂ li ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda oluşan koloniler sayıldı. Bakteri sayısı (cfu)= Koloni sayısı/Sulandırma oranı x İnokulum miktarı ile elde edildi.

Ti metalinin S. mutans üzerine antibakteriyel etkisi agar diffüzyon deneyi ile yapıldı (11).

BULGULAR

Bakteri adhezyonunun denendiği toplam 8 titanyum(Ti) yüzeyde biriken bakteri plağının ortalama yaş ve kuru ağırlıkları, cfu değeri ve derecesi tablo 1'de gösterilmiştir.

TABLO 1: S. Mutans'ın Titanyum Yüzeylerdeki Adhezyonu

Alan cm ²	Yaş Ağ. mg.	Kuru Ağ. mg.	CFU / mm ²	Derecesi
1.14	5.1	3	1.42 x 10 ⁷	3

Agar diffüzyon deneyine göre, Ti metalinin S. mutans üzerine antibakteriyel etkisi olmadığı görülmüştür.

TARTIŞMA

S. mutans, diş ve katı yüzeyler üzerinde kolonize olabilen bir bakteridir (6). Bakteri plağının öncü bakterilerinden olan S.mutans'ın farklı diş yüzeylerine adhezyonu İkedo ve arkadaşları (9) tarafından ve karijenik özelliği, Ranke ve arkadaşları tarafından (21) incelenmiştir.S. mutans'ın selektif olarak hidroksilapatit (HA) yüzeylere yapıştığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (13,18,24). Söz konusu yapışmanın ilk aşamada elektrostatik etkileşimle, daha sonra ise bakteri hücrelerinin duvarını oluşturan karbonhidrat birimlerle sağlandığı, ancak tükürüğün bu selektif affiniteyi az da olsa inhibe ettiği bildirilmiştir (14,15). Bu bilgilerin ışığı altında, bizim çalışmamızda Ti yüzeylerde meydana gelen adhezyonun tükürüğün bulunmadığı sakkarozlu bir ortamda meydana geldiği göz önüne alınmalıdır. Tükürüğün Ti yüzeylerdeki S. mutans adhezyonundaki fonksiyonu, başka çalışmanın konusu olabilir.

Yüzeylerde meydana gelen kolonizasyon bakterilerin sürekli adhezyonu ve oluşan koloninin ekspansiyonu ile sağlanır (10). Doğal olarak bakteriler arasındaki bu yapışma bir çeşit intrasellüler etkileşimi gerektirir. Bu etkileşim, hücre duvarını oluşturan karbonhidrat yapının bir fonksiyonudur (1). Adhezyon özelliği ve kolonizasyondaki öncülüğü nedeniyle incelediğimiz S. mutans, hücre duvarı ile ilgili ve orada lokalize olmuş çeşitli antijenik strüktürel komponentlere sahiptir. Bu komponentler: 1) Hücrenin en dış tabakasındaki glikoproteinler, 2) Peptidoglikan, 3) Serotip özel karbonhidrat, 4) Lipoteikoik asit (LTA)dır. Bu komponentler bakteri hücrelerinin adhezyonunda rol oynarlar. Rölla ve arkadaşları S. mutans'ın kolonizasyonu için özel bir etkileşimin olması gerektiğini savundular (22). Rölla'ya göre; S. mutans'ın adhezyonu, bu bakteri tarafından GTF (glikozil transferaz) yapımı ile olur. GTF adhesivdir ve sakkarozla karşılaştığında gıkanların yapımı ile diş yüzeylerine ya-

pıştır. Böylece sert α -1-3 glukanlar ve yüzeye adsorbe olan GTF arasındaki etkileşim *S. mutans*'in sakkarozaya bağlı özel adhezyonuna neden olur (22). Glukanlardan insolubl olan mutan, bilinen en kuvvetli biyolojik yapışkandır(24).

Çalışmamızda *S. mutans*'in in vitro koşullarda Ti yüzeylere kolonize olduğunu saptadık. Elde edilen değerler Pratt-Terpstra ve arkadaşlarının tükürükle kaplanmamış mine yüzeylerdeki *S. mutans* adhezyonunu inceleyen çalışmasıyla uygunluk göstermektedir (19). Imedorf (10) ise tükürüğün bulunmadığı Ti ve mine yüzeylerdeki *S. mutans* kolonizasyonunu karşılaştırdığı çalışmasında, sözü edilen bakterinin adhezyonu yönünden her iki yüzey arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda Ti yüzeylerde elde edilen CFU değerleri bildirilen sonuçlara uygunluk göstermekte ve *S. mutans* adhezyonunun, yüzeyin atomik doygunluk kapasitesi, serbest yüzey enerjisi, elektrostatik alan, gibi fiziksel parametreler yanında, yukarıda belirtildiği gibi sakkarozaya bağlı ve *S. mutans*'a özel etkileşim sonucu (8) meydana geldiğini doğrulamaktadır.

Ti metalinin antimikrobiyal etkisi de incelenmiş ve bu konuda farklı görüşler ileri sürülmüştür (2,5). Buindy ve arkadaşları (2) saf titanyumun bakteriostatik etkisi olduğunu bildirmelerine rağmen bu etkinin metale ait bazı korozyon ürünlerine bağlı olarak meydana geldiği ve Ti gibi inert bir metalin, bulunduğu ortama iyon serbestleyerek bakteriostatik bir etki göstermesinin ise beklenemeyeceği düşünülmüştür (11). Elagi ve Simonson'un çalışmalarında ise, *Streptococcus sanguis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Veillonella sp.*, *Niesseria mucosa*, *Lactobacillus sp.*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* türleri üzerinde Ti metalinin kolonizasyonu stimüle edici bir etkisi olmadığı gibi, bakteriostatik bir etkisinin de olmadığını bildirmiştir (5). Bu sonuçlara paralellik gös-

terecek biçimde, çalışmamızda da, *S. mutans*'in bakteriostatik bir etkisi olmadığı agar diffüzyon deneyinde, Ti yüzey çevresinde inhibisyon zonu görülmemesi ile doğrulanmıştır.

Çalışmada kullanılan yüzeyler düzgün cilalı yüzeyler olmakla birlikte kesilmeleri sırasında oluştuğu düşünülen çizgiler içermekteydi. Ti yüzeylerdeki 10-100 μ daki düzensizliklerin elektrostatik alanı etkilediği bildirilmiştir (1). Kullandığımız Ti yüzeylerin pütürlü olan kısımlarındaki göreceli olarak fazla sayılabilecek bakteri tutunması, elektriksel alan değişikliklerinin *S. mutans*'in adhezyonunda etkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda invitro koşullarda *S. mutans*'in Ti yüzeyine adhezyonu gösterilmiş olmakla birlikte, tükürüğün bulunduğu in vivo modellerde sözkonusu yapışmanın minimal düzeyde olduğu bildirilmiştir (10). Adhezyonda meydana gelen bu farklılık, tükürüğün koruyucu etkisini vurgulamaktadır (15,26).

Ti metalinin bakteriostatik ve kolonizasyonu stimüle edici etkilerinin olmaması, metalin inert kalitesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Bu çalışma, Ti yüzeyinde protein bir örtü olmaksızın (pelikül yokluğunda) *S. mutans* kolonizasyonunu fiziksel kuvvetler ve sakkarozun varlığı ile sağlandığını göstermiştir.

Bir Ti implant çivisinin ağız ortamındaki kısmının öncü bakterilerin kolonizasyonundan olabildiğince az etkilenmesini sağlamak amacıyla ağız hijyenine ve implant metalinin temizliğine özen gösterilmelidir. Ancak bunu yaparken metalin herhangi bir şekilde çizilmesine olanak vermeyecek yöntemler kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1- Baier R.E. Comments on Cell Adhesion to Biomaterial Surfaces. Conflicts and concerns. *J. Biomed. Mat. Res.* 1982 **16**:173-175.
- 2- Bundy K.J., Butler M.F., Hochman R.F. An Investigation of the bacteriostatic properties of pure metals. *J. Biomed. Mat. Res.* 1980, **14**:653-663.
- 3- Cowman R.A., Baron S.J., Fitzgerald R.J. Utilization of Hydroxyapatite Adsorbable Salivary proteins as Growth Substrates for Plaque-forming Oral Streptococci *J.Dent.Res.* 1981 **60** (10): 1803-1808.
- 4- Dummer P.M.H., Harrison K.A. In vitro Plaque Formation on Commonly Used Dental Materials. *J.Oral Rehabil.* 1984, **11**: 539-545.
- 5- Elaglı K., Neut C., Romond C., Hildebrand H.F. İn Vitro Effects of Titanium Powder on Oral Bacteria. *Biomaterials* 1990, **13**(1): 25-27.
- 6- Fujioka-Hirai Y., Akagawa Y., Minagi S., Tsuru H., Miyake Y., Suginaka H. Adherence of Streptococcus mutans to Implant Materials. *J. Biomed. Mat. Res.* 1987, **21**: 913-920.
- 7- Gibbons R.J., Moreno E.C., Spinell D.M.A Model Delineating Effects of a Salivary Pellicle on the Adsorption of S. Mitior on to HA. *Infect. Immun* 1976, **14**: 1109-112.
- 8- Hogg S.D., Embery G. The Isolation and partial Characterization of a Sulphated Glycoprotein from Human Whole Saliva which Aggregates Strains of Streptococcus sanguis but not Streptococcus mutans. *Archs. Oral Biol.* 1979, **24**: 791-797.
- 9- Ikeda T., Sandham H.J. Prevalans of Stertococcus mutans of Various Tooth Surfaces in Negro Children, *Archs. Oral Biol.* 1971, **17**: 1237-1240.
- 10- Imbedorf M. Factors That Influence the Attachment of Colonizing Bacteria to Ti Surfaces. *Thesis.* 1988, Colombia Univ.
- 11- Joshi R., Eley A. The İn-Vitro Effect of Titanium İmplant on Oral Microflora: Comparison with other metallic compounds. *J.Med. Microbiol* 1988, **27**: 105-107.
- 12- Külekçi G. Bakteriler ağız boşluğuna nasıl yerleşirler? *Türk Diş Tabipleri Cem. Bül.* 1985, **4**: 21-34.
- 13- Mandel I.D. Non-immunologic Aspects of Caries Resistance. *J.Dent. Res.* 1976, **55**: Special Issue C8 C22-C31.
- 14- Mc Bride B.C., Gisslow M.T. Role of Sialic Acid in Saliva Induced Aggregation of S. sanguis. *Infect. Immun.* 1977 **18**:35-40.
- 15- Mikxy F., Van Der Hoeven J.S. Symbiosis of S. mutans an Veilonella in Mixed Continous cultures. *Archs. Oral Biol.* 1975, **20**:407-410.
- 16- Newman M.G., Flemming T.F. Periodontal considerations at implants and implant associated microbiota, *J.Dent. Educat.* 1988, **52**:737-743.
- 17- Orstavik D. Initial Bacterial Adhesion to Surfaceces. İn Bacterial Adhesion and Preventive Dentistry ed. CATE J.M., LE-ACH S.A., ARENDS J. IRL. Press Ltd., Oxford England 1984: 153-166.
- 18- Pratt-Terpstra İ.H., Weerkamp A.H., Busscher H.J. The Effect of Pellicle Formation on Streptococcal Adhesion to Human Enamel and Artificial Substrata with Various Surface Free Energies. *J.Dent.Res* 1989, **68**(3): 463-467.
- 19- Ranke B., Ranke E., Suhrbier W. Bleibtreu G., Burmeister H. Aberden Einfluss professioneller Plaqueentfernung auf die Wiederbesiedelung der Zahnflächen durch glukobildene Streptokokken. *Dtsch. Zahnarztl. Z.* 1984, **39**: 524-528.
- 20- Rölla G. Formation of dental integuments - some basic chemical considerations. *Swed. Dent. J.* 1977, **1**: 241-244.
- 21- Rölla G., Robrish S., Bowen W.H. Interaction between HA and protein coated HA with Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis. *Acta. Pathol Microbiol. Scand.* 1977, sec. B **85**:341-356.
- 22- Sanz M., Newman M.G. Dental Plaque and Calculus, in Oral Microbiology and Immunology eds. Newman M.G., Niesengard R., London: W.B. Saunders comp. 1988: 367-388.
- 23- Saxton C.A. Scannig Electron Microscope Study of the Formation of Dental Plaque. *Caries Res.* 1973, **7**:102-119.
- 24- Simonson L.G., Reiher D.A. Effect of Human Saliva and Various Compounds on the Adsorption of the Bacterium Streptococcus mutans to Hydrox yapatite. *Archs Oral Biol.* 1981, **26**:143-146.
- 25- Takamori K., Mizumo F., Takahashie N., Horikava T. Distribution of Neisseria, rotia and Steptococci in Early Stages of Dental Plaque. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 1978, **25**: 189-196.

Yazışma adresi

Doç. Dr. Ayfer Kaynar

İ.Ü. Diş Hek. Fak.

Ağız, Diş, Çene Hastalıkları

ve Cerrahisi Anabilim Dalı

34390 Çapa - İstanbul