

TÜKÜRÜK KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİNİN DIŞ ÇÜRÜĞÜ VE TAMPONLAMA KAPASİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Arş.Gör.Dt. Serpil KARAOĞLANOĞLU*
Prof.Dr. Nilgün SEVEN*

Arş.Gör.Şükrü BEYDEMİR**
Prof.Dr.Ö.İrfan KÜFREYOĞLU**

ÖZET

CA VI diş çürükleri karşısında doğal korunma sistemleri içinde spesifik bir rol oynar. Çürük; diş plağı ve asit ortam altında diş sert dokularının çözülmesinin bir sonucudur. Bu çalışmada, tükürük karbonik anhidraz aktivite seviyeleri çürüklü numunelerde araştırıldı. Tükürük numuneleri 20-35 yaşları arasındaki 50 örnekten toplandı. Aynı zamanda, tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi, laktobasil ve streptokokus mutans miktarları belirlendi ve sonuçlar örneklerin dental statüleriyle ilişkilendirildi. Tükürük CA VI aktivitesi ile çürük, eksik ve dolgu diş sayısı (DMFT indeksi) arasında istatistiksel olarak önemli ilişki bulundu ($p<0.05$). Bununla birlikte, tükürük CA VI aktivitesi ve laktobasil veya streptokokus mutans miktarları arasında ilişki bulunamadı. Bunun yanı sıra, tükürük CA VI aktivitesiyle tamponlama kapasitesi ve tükürük akış hızı arasında da ilişki bulunamadı.

Anahtar kelimeler: Karbonik anhidraz, diş çürüğü, tamponlama kapasitesi, tükürük akış hızı

GİRİŞ

Çürük; diş plağı ve asit ortam altında diş sert dokularının çözülmesidir. Çürüğün etiolojisinde çevresel faktörler, diyet, dişin ve tükürüğün genetik özellikleri önem taşır.¹⁻³

Karbonik anhidraz (CA) (EC 4.2.1.1.) tükürükte bulunan enzimlerden bir tanesidir ve tükürüğün %3'ünü oluşturmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi pek çok dokuda olduğu gibi tükürükte de pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Bu enzim canlılarda karbondioksitin hidrasyonu ve bikarbonatın dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.⁴⁻⁷



SUMMARY

CAVI plays a specific role in the natural defense systems against dental caries. Caries is a consequence of the dissolving of dental hard tissues under the acid conditions prevailing beneath dental plaque. In the present study, saliva carbonic anhydrase activity levels were investigated in carious subjects. Saliva samples were collected from 50 subjects which are 20-35 years of age. Salivary secretion rate, buffering capacity, lactobacillus and streptococcus mutans counts were also determined, and the results were correlated with the dental status of the subjects. The correlation was between salivary CAVI activity and the numbers of decayed missing and filled teeth (DMFT index). However, no correlation was found between salivary CAVI activity and lactobacillus or streptococcus mutans counts. Also, it was found no correlation between salivary CAVI activity and buffering capacity, salivary secretion rate.

Key words: Carbonic anhydrase, dental caries, buffer capacity, salivary flow rate

Bu güne kadar çeşitli memeli dokularında yedi tane CA izoenzimi belirlenmiştir. Bu izoenzimlerden CA II ve CA VI tükürük bezlerinde bulunmaktadır.⁸ CA II diğer bazı dokularda da bulunmasına rağmen, CA VI tükürüğe has ve tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir.⁹ CA VI'nın salgılandığı ilk olarak koyun tükürüğü üzerinde kanıtlanmıştır.¹⁰ Bununla birlikte yapılan bir çok çalışmada, bu enzimin tükürüğün önemli enzimlerinden biri olduğu belirlenmiştir.^{4,8,11,12}

Yapılan bir çalışmada artan çürük prevalensi ile tükürükteki CA VI konsantrasyonunun azaldığı ortaya konmuştur.¹⁰ Çalışmamızda tükürük karbonik anhidraz aktivitesi ile çürük, eksik ve dolgu diş sayısı (DMFT indeksi), streptokok ve laktobasili seviyesi, tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi arasındaki ilişki incelenmiştir.

*Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Konservatif Tedavi Anabilim Dalı

**Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı

MATERYAL VE METOD

Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde çalışan 20-35 yaşları arasında 50 gönüllü birey seçildi. Bu bireylerin hiçbir sistemik rahatsızlığının olmamasına ve en az iki haftalık süre boyunca herhangi bir ilaç kullanmamış olmasına dikkat edildi.

Klinik muayene

Klinik muayene bir hekim tarafından yapıldı. Yirmi yaş dişleri hariç bütün daimi dişler muayeneye dahil edildi. Ortodontik amaçla çekilen dişler sınıflandırmaya katılmadı. Dolgulu, çürük ve eksik dişler hazırlanan anamnez kartlarına kaydedilerek DMFT indeksleri hesaplandı.¹³

Tükürük toplanması

Tükürük numunesi alınacak kişilere sabah kahvaltılarını yaptıktan sonra dişlerini fırçalamaları ve hiçbir gıda maddesi almamaları söylendi. Tükürüğün stimülasyonu parafin tablet çiğnetilerek gerçekleştirildi ve bu şekilde beş dakika boyunca tükürük toplama işlemi yapıldı, daha sonra tükürüğün dakikadaki akış hızı hesaplandı. Tükürüğün tamponlama kapasitesi kolorimetrik yöntemle buffer strip (viva dent) kullanılarak gerçekleştirildi. Oluşan renkler üretici firmanın kartları ile karşılaştırılarak tamponlama kapasitesi tespit edildi.

Karbonik anhidraz aktivitesi için kullanılacak tükürük 1ml 0,1 M Tris-SO₄ 0,2 M Na₂SO₄ (pH=8.7) tamponu içeren kaplarda toplandı. Toplanan örnekler, depolama işlemi yapılmadan Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya laboratuvarında hemen analizleri yapıldı. Bu işlemler sırasında sıcaklığın +4 °C'de sabit tutulmasına dikkat edildi. Tükürük örneklerindeki CA VI aktivitesi Maren yöntemine göre belirlendi; aktivite birimi, enzim miktarını belirten Wilbur-Anderson birimi olarak ifade edildi.¹⁴

Mikrobiyolojik analiz

Tükürükteki streptokok mutans ve laktobasil miktarını belirlemek için CRT bacteria kiti kullanıldı. Viva dent 37 derecede 2 gün etüvide bekletildi ve oluşan koloniler üretici firmanın verdiği kartla karşılaştırılarak streptokok ve laktobasil düzeyleri mililitredeki koloni ünitesi olarak tanımlandı.

Elde edilen veriler SPS 10 programında t testi, korelasyon ve Ki kare analizleri ile değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamız 24 erkek ve 26 bayan 50 kişi arasında yapıldı. Bireylerin CA VI aktiviteleri $X \pm SD$ olarak 0.84 ± 0.51 olarak tespit edildi (Tablo 2).

Çalışmaya katılan bireylerden tükürük tamponlama kapasitesi düşük olan kişi tespit edilmedi. Sekiz kişinin orta, kırkiki kişinin ise yüksek tamponlama kapasitesine sahip olduğu saptandı. 50 bireyden 16'sının $\leq 10^6$, 34'ünün $>10^6$ streptokok düzeyine; yine 50 bireyden 5'inin $\leq 10^6$, 45'inin $>10^6$ laktobasil düzeyine sahip olduğu belirlendi (Tablo 3).

CA VI aktivitesi ile DMFT arasında bir ilişki tespit edilirken ($P < 0.05$), CA VI aktivitesi ile tükürük tamponlama kapasitesi, streptokok ve laktobasil düzeyi arasında bir ilişki saptanmadı ($P > 0.05$) (Tablo 4).

Tablo 1. Buffer strip kullanılarak renklere göre tükürüğün tamponlama kapasitesinin tespiti.

Renk	Tamponlama kapasitesi seviyesi
Sarı	Düşük
Yeşil	Orta
Mavi	Yüksek

Tablo 2. Tükürüğün çeşitli parametrelerinin ve DMFT indeksinin veri ortalamaları.

	n	Minimum	Maksimum	($\bar{X} \pm SD$)
Karbonik anhidraz (EU/ml)	50	0.11	2.10	0.84 ± 0.51
Akış hızı (ml/dk)	50	0.90	4.8	1.83 ± 7.5
DMFT	50	0.00	17.0	6.16 ± 3.5

Tablo 3. Elli bireyin tükürük tamponlama kapasitesi, streptokok ve laktobasil düzeyinin dağılımı.

Tükürük tamponlama kapasitesi			Streptokok		Laktobasil	
düşük	orta	yüksek	$\leq 10^6$	$>10^6$	$\leq 10^6$	$>10^6$
0	8	42	16	34	5	45

Tablo 4. Karbonik anhidraz aktivitesinin tükürük akış hızı ve DMFT indeksi ile ilişkisinin incelenmesi.

	DMFT	Akış hızı	Tamponlama kapasitesi	streptokok	laktobasil
CA VI	-0.303*	-0.106	-0.183	0.084	-0.056

* $P < 0.05$

TARTIŞMA

Çürük; diş plağı ve asit ortam altında diş sert dokularının çözülmesidir.^{1,2} Çürüğün etiolojisinde çevresel faktörler, diyet, dişin ve tükürüğün genetik özellikleri önem taşır. Tükürük, ağız kavitesini ve diş yüzeyini etkileyen bir çok protein ve inorganik bileşik içerir. Bu maddeler gıdaların ve debrisin temizlenmesi ve tükürükteki mikroorganizmaların oluşturduğu asidin nötralizasyonu için inorganik madde sağlama, minenin remineralizasyonu gibi görevler üstlenir.¹⁻³

Karbonik anhidraz tükürükte bulunan enzimlerden bir tanesidir ve tükürüğün %3'ünü oluşturmaktadır. İlk olarak koyun parotis bezinden izole edilen salgısal formda bir enzimdir.^{4,10} CA VI tükürükteki bikarbonat seviyesinin korunmasında ve pH'nın ayarlanmasında önemli bir role sahiptir^{15,16}; tükürükteki pH regülasyonu normal ağız fizyolojisi ve sağlığı için önemlidir.¹⁷

Çalışmamızda CA VI aktivitesi 50 şahısta $X \pm SD$ olarak 0.84 ± 0.51 değeri tespit edildi. DMFT indeksi ile CA VI aktivitesi arasında istatistiksel olarak bir ilişki tespit edilirken, streptokok ve laktobasil seviyesi, tamponlama kapasitesi ve tükürük akış hızı ile CA VI aktivitesi düzeyi arasında bir ilişki tespit edilemedi.

Kivela⁴ ve arkadaşları 18-24 yaşları arasındaki 209 sağlıklı erkek üzerinde yaptığı çalışmalarında DMFT indeksi ile CA VI konsantrasyonu arasında ilişki bulmuşlarken, streptokok ve laktobasil seviyesi ile CA VI arasında bulamamışlardır. Aynı zamanda CA VI konsantrasyonu ile pH ve tamponlama kapasitesi arasında da ilişki tespit edememişlerdir. Bu verilerden dolayı CA VI'nın direkt olarak tükürük pH'sının düzenlenmesinde rol oynamadığını belirtmişlerdir.¹⁸

Yıldız ve Nalbantoğlu¹⁹, yaşları 20-25 arasında değişen toplam 30 bireyde yaptıkları çalışmada, DMFT = 6.76 ve DMFT = 0 olan bireylerin CA VI aktivitelerini önemli derecede farklı bulmuşlardır.

Parkilla¹² ve arkadaşları tamponlama kapasitesi, pH ve tükürük hacmi ile CA VI konsantrasyonu arasında bir ilişki tespit edememişlerdir. Çalışmamızda tükürük tamponlama kapasitesi ile CA VI arasında bir ilişki bulamamız bu görüşü desteklemektedir.

In vitro çalışmalar; cilalanmış mine yüzeyine tükürük CA VI'sının yanı sıra saflaştırılmış CA VI enziminin de bağlandığını göstermiştir.²⁰ Leinonen²⁰ ve arkadaşları yaptıkları *in vitro* çalışmada mine pelikülünde CA VI bulunmasının diş çürüğü ve pelikül yüzeyinde lokal olarak fonksiyon görerek burada bulunan asidin

karbondioksit ve suya dönüştürmesini hızlandırdığını bildirmişlerdir.

Çalışmaların standardizasyonuna rağmen CA VI konsantrasyonu büyük oranda kişisel farklılıklar göstermektedir. Bu da enzimin herkeste çeşitli yoğunlukta bulunmasından kaynaklanmaktadır. Yine bu enzimin kişisel olarak yüksek oranda farklılık göstermesi klinik uygulamalarda CA VI ile diş tedavi ihtiyacı arasındaki ilişkiyi belirlemek için CA VI'nın kullanımının önemini gösterir.¹⁹ Bundan sonra yapılacak çalışmaların daha büyük popülasyonları kapsayacak şekilde bu konu üzerinde yoğunlaşması gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Birkhed D, Heintze U. Salivary secretion rate, buffer capacity and pH; in Tenavuo J (ed): Human saliva. Clinical Chemistry and Microbiology. Boca Raton. CRC press. 1989; 25-73.
2. Hofbrook WP. Dental caries and cariogenic factors in pre-school urban Icelandic children. Caries Res 1993; 27: 431-437.
3. Watson GE, Davis BA, RaubertasRF, Pearson SK, Boven WH. Influence of maternal lead ingestion on caries in rat pups. Nat Med 1997; 3: 1024-1025.
4. Kivela J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isozymes VI in whole saliva is associated with caries prevalence. Caries Res 1999; 33: 178-184.
5. Çoban TA, Nalbantoğlu B, Çil MY, Özdemir H, Küfrevioğlu ÖI. Investigation of the inhibition effects of some antibiotics on human erythrocyte carbonic anhydrase isozymes. Tr. J of Medical Sciences 1998; 28: 407-410
6. Carter MJ. Carbonic anhydrase: isoenzymes, properties, distribution, and functional significance. Biol Rev 1972; 47: 465.
7. Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. Physiol Rev 1967; 47: 595.
8. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II and I in human parotis and submandibular glands. J Histochem Cytochem 1990; 38: 941-947.
9. Ogawa Y, Tyosawa S, Inagaki T, Hong SS, Ijuhin N. Carbonic anhydrase isozymes VI in rat lacrimal gland. Histochem Cell Biol 1995; 103: 387-394.
10. Fernley RT, Wright RD, Coghlan JP. A novel carbonic anhydrase from the ovine parotis gland. FEBS Lett 1979; 105: 299-302.

11. Parkkila S, Parkkila A-K, Juvonen T, Rajaniemi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II and VI in the human alimentary tract. Gut 1994; 35: 646-650.
12. 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: 2154-2157.
13. World Health Organization(1987).Oral health surveys :Basic methods. 3rd ed.Geneva:WHO .
14. Marem TH: A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. J Pharm Exp Ther 1960;160:26-30.
15. Feldstein JB, Silverman DN. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J Biol Chem 1984; 259: 5447-5453.
16. Fernley RT. Non-cytoplasmic carbonic anhydrases. TIBS 1988; 13: 356-359.
17. Kivela J, Parkkila S, Metteri J, Parkkila A-K, Toivanen A, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. Acta Physiol Scand 1997; 161: 221-225.
18. Kivela J, Parkkila S, Metteri J, Parkkila A-K, Toivanen A, Rajaniemi H. Salivary Carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. Acta Physiol Scand 1997; 161: 221-225.
19. Yıldız M, Nalbantoğlu B. Çürüklü ve çürüksüz bireylerde tükürük karbonik anhidraz aktivitelerinin karşılaştırılması. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg 2000;10 (1):1-3.
20. Leinonen J, Kivela J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. Salivary Carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. Caries Res 1999;33:185-190.

Yazışma Adresi :

Dt.Serpil KARAOĞLANOĞLU
Atatürk Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı
ERZURUM