

İNSAN TÜKÜRÜĞÜNDEKİ PEROKSİDAZ VE TİOSİYANATIN DIŞ ÇÜRÜĞÜ VE ÇÜRÜĞE NEDEN OLAN BAKTERİLERLE İLİŞKİSİ

Dr.Serpil KARAOĞLANOĞLU*

Dr.Şükrü BEYDEMİR**

PEROXIDASE AND THIOCYANATE OF HUMAN WHOLE SALIVA IN RELATION TO DENTAL CARIES AND CARIOGENIC BACTERIA

SUMMARY

Human saliva contains an antimicrobial system comprised of salivary peroxidase, thiocyanate and hydrogen peroxidase. The oxidation of thiocyanate by hydrogen peroxidase catalyzed by salivary peroxidase, yielding the antimicrobial agent hypothiocyanite. Several studies have suggested that the peroxidation reaction serves at least two important functions in the human mouth. The products of the reaction inhibit bacterial growth and metabolism and reaction prevents the accumulation by hydrogen peroxide excreted by many strain of oral streptococci .

Twenty four male and twenty six women examined and analyzed the stimulated flow rate, pH, buffer capacity, peroxidase and thiocyanate and number of mutans streptococci (S.mutans) and lactobacilli. Statistically analyses showed correlations between peroxidase and stimulated flow rate (>0.05) but no correlation found between peroxidase, and DMF, buffer capacity, number of S.mutans and lactobacilli (>0.05). On the other hand, statistically analyses showed no correlation found between thiocyanate and DMF, stimulated flow rate, buffer capacity and lactobacil (>0.05).

ÖZET

İnsan tükürüğü hidrojen peroksit, tiosiyanat ve peroksidi içeren bir antimikrobiyal sisteme sahiptir. Tükürük peroksitazı, tiosiyanatın hidrojen peroksit tarafından bir antimikrobiyal ajan olan hipotiosiyanata dönüşmesini katalizler. Yapılan çalışmalar peroksitaz reaksiyonunun oral kavitede en az iki büyük role sahip olduğunu desteklemektedir. Reaksiyon ürünleri bakterilerin büyümesini ve metabolizmasını inhibe eder ve oral streptokoklarının ürettiği hidrojen peroksitin akümülyasyonunu önler.

Çalışmamızda 24 erkek ve 26 kadın muayene edilerek uyarılmış tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi, peroksitaz, tiosiyanat ve streptokok mutans (S.mutans), laktobasil düzeyi analiz edildi. Peroksitaz ile uyarılmış akış hızı arasında istatistiksel bir ilişki tesbit edildi (>0.05), ancak peroksitaz ile DMF, tamponlama kapasitesi, S.mutans ve laktobasil düzeyi arasında bir ilişki tespit edilemedi (>0.05). Aynı şekilde tiosiyanat ile DMF, S.mutans, uyarılmış tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi ve laktobasil düzeyi arasında bir ilişki saptanamadı (>0.05).

GİRİŞ

Tükürük, nonimmunglobulin ajanlar ve immunglobülinler gibi antimikrobiyal faktörleri içermektedir. Nonimmunglobulin ajanlar arasında peroksitaz sistemin önemli bir yeri vardır.¹ Tükürük peroksitaz sistemi, miyeloperoksitaz ve tükürük peroksitazı olmak üzere iki enzimi kapsamaktadır. Bununla birlikte tiosiyanat iyonu (SCN-) ve hidrojen peroksiti (H₂O₂) de içerir.^{2,3} Peroksitaz enzimi, H₂O₂'nin hipotiosiyanata (OSCN) dönüşmesinde tiosiyanatın oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir.^{2,4} Çeşitli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermek ve H₂O₂ toksitesinden protein ve hücreleri korumak gibi iki büyük fonksiyona sahiptir.⁵ Tiosiyanat iyonunun ise fizyolojik konsantrasyonda ve nötral pH'da bakterilerin glikolizini inhibe ederek ekolojik dengenin sağlanmasında ve antibakteriyel savunma mekanizmalarında önemli rolü vardır.⁶

Peroksitaz sisteminin invivo olarak çeşitli mikroorganizmalara (S.mutans, laktobasil, maya) bazı periodontopatojenlerle virüslere (H.simplex tip 1, HIV) karşı etkili olduğu tespit edilmiştir.⁷ Manson ve arkadaşları tükürük peroksitaz sisteminin mikroorganizmaların glikoz alımında pH'ya dayanan bir inhibisyona yol açtığını ifade etmişlerdir. Bu etki bakteriostatiktir.⁸

Bu çalışmada peroksitaz ve tiosiyanat iyonlarının tükürük akış hızı, tamponlama kapasitesi, DMF indeksi, S.mutans ve laktobasil düzeyiyle ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Üniversitemiz öğretim üyeleri ve öğrencileri arasından 20-35 yaşlarındaki 50 gönüllü birey çalışma kapsamına alındı. Bireylerin sistemik rahatsızlığı olmamasına ve en az 2 hafta öncesine kadar herhangi bir ilaç kullanmamış olmasına

*Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Konservatif Tedavi ABD,

**Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biokimya ABD

dikkat edildi. Seçilen kişilere sabah kahvaltısından sonra dişlerini fırçalayıp herhangi bir katı veya sıvı gıda almamaları söylendi. Muayeneleri bir hekim tarafından ayna ve sond kullanılarak yapıldı ve WHO kriterlerine uygun olarak çürük, eksik ve dolgulu dişler (DMF) tespit edildi. 9 Sabah 9-11 saatleri arasında parafin çiğnetilerek beş dakika boyunca tükürükler dereceli steril tüplerde toplandı. Uyarılmış tükürük akış hızı, dakikadaki tükürük miktarı olarak saptandı. Tükürük toplanmasından hemen sonra kolimetric metodla (viva dent) tamponlama kapasitesi ölçüldü. Bu metotta düşük 4.0 (sarı), orta 4.5-5.5 (yeşil) ve yüksek 6.0 değerleri (mavi) değerlerini temsil etmektedir.

Mikrobial analiz CRT bacteria (vivadent) kiti kullanılarak yapıldı. Steril kaba alınan tükürüğün pipet yardımıyla ekimi yapıldı. Tüpler etüvde (37°C) 48 saat bekletildi. Koloni densiteleri skaladaki densitelerle karşılaştırılarak S.mutans ve laktobasil kolonileri $<10^5$ ve $>10^5$ olarak sınıflandırıldı.

Peroksidaz aktivitesi ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid) kullanılarak,¹⁰ tiosiyanat konsantrasyonu ise tiosiyanatın kantitatif tayin yöntemi ile belirlendi.¹¹

Elde edilen verilerin SPSS 10.0 programında student T testi ve korelasyon analizleri yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamız 24 erkek ve 26 bayan 50 kişi arasında yapıldı. Bireylerin peroksidaz ortalama değeri 226 ± 94.6 mU, tiosiyanat ortalama değeri ise 0.52 ± 0.31 mM olarak bulundu (Tablo 1).

Çalışmaya katılan bireyler arasında tükürük tamponlama kapasitesi düşük olan kişi tespit edilmedi. Sekiz kişinin orta, kırk iki kişinin ise yüksek tamponlama kapasitesine sahip olduğu saptandı. 50 bireyden 16'sının $\leq 10^5$, 34'ünün $>10^5$ S.mutans düzeyine sahip olduğu saptanırken, 5'inin $\leq 10^5$, 45'inin $<10^5$ laktobasil düzeyine sahip olduğu belirlendi (Tablo 2).

Peroksidaz düzeyi ile uyarılmış akış hızı arasında bir ilişki belirlenirken ($p < 0.05$), peroksidaz ve tiosiyanat düzeyi ile DMF indeksi, tükürük tamponlama kapasitesi, S.mutans ve laktobasil düzeyi arasında bir ilişki saptanamadı ($p > 0.05$) (Tablo 3-4).

Tablo 1. Tükürüğün çeşitli parametrelerinin ve DMF indeksinin veri ortalamaları.

	N	Min	Maks	Ort	S.S.
Peroksidaz	50	24.90	629.2	226.3	94.60
Tiosiyanat	50	0.7	1.40	0.53	0.33
Akış hızı	50	0.90	4.8	1.84	0.75
DMF	50	0.00	17.0	6.22	3.52

Tablo 2. Elli bireyin tükürük tamponlama kapasitesi, streptokok ve laktobasil düzeyinin dağılımı.

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

Tablo 3. Peroksidaz ve tiosiyanatın uyarılmış tükürük akış hızı ve DMF indeksiyle ilişkisinin incelenmesi.

	DMF	Akış hızı
Peroksidaz	0.02	-0.32*
Tiosiyanat	0.18	0.04

$p < 0.05$

Tablo 4. Peroksidaz ve tiosiyanatın tükürük tamponlama kapasitesi, S.mutans ve laktobasil düzeyi gruplarıyla olan istatistiksel karşılaştırması

	Tamponlama kapasitesi	S.mutans	laktobasil
Peroksidaz	1.178	-0.469	1.056
Tiosiyanat	0.178	0.101	0.046

TARTIŞMA

İnsan tükürüğü yutkunma, konuşma, dokuları kayganlaştırma gibi fonksiyonların yanında, içerisinde bulunan fiziksel, fizikokimyasal ve kimyasal maddeler sayesinde birçoğu çeşitli mikroorganizmalar tarafından yapılan zararlı maddelere karşı ağız dokularını koruma görevini de üstlenir. Bu maddeler immunolojik ve nonimmunolojik maddelerdir. Tükürük peroksidaz sistemi de nonimmunolojik maddeler arasında yer alan çok fonksiyonlu bir savunma sistemidir.¹² Çalışmamızda peroksidaz enziminin aktivitesini ve tiosiyanat iyonunun miktarını tespit edildi. Peroksidaz enzimi aktivitesinin tespiti, substrat olarak kullanılan maddenin oksitlenmesinden kaynaklanan absorbanın artışı ya da azalışının oranının spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.¹⁰

Tenavuo ve arkadaşları¹³ peroksidaz enziminin süt dişlerinin çıkmasıyla erişkin seviyesine ulaştığını, tiosiyanatın ise diş çıkarmış olan çocuklarda çıkarmamış olanlara oranla daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Son zamanlarda çürük ile peroksidaz ve tiosiyanat düzeyini araştıran çalışmalar yoğunlaşmıştır. Lambert ve arkadaşları¹⁴ ABTS kullanarak yaptıkları çalışmada peroksidaz aktivitesini diş çürüğü bulunmayan ve diş çürüğü bulunan kişilerde sırasıyla 10.1-28.5 mU/ml, 72.4-566.5 mU/ml olarak tespit etmişlerdir. Ferric-nitrat metodunu kullanarak yaptıkları tiosiyanat iyonlarının miktarının belirlenmesinde ise diş çürüğü olmayan ve çürüğü bulunan bireylerde sırasıyla 0.41±3.57mM, 0.30 ± 2.67 mM olarak saptamışlardır. İstatistiksel olarak çürük indeksi ile tükürük peroksidaz sistemi arasında bir ilişki tespit edememişlerdir. Bu çalışmaların sonucunda tükürüğün değişmeyen niteliklerinin tek olarak ölçümünün çürük ile kurulacak ilişkiyi yansıtmadığını vurgulamışlardır.

Martinez ve arkadaşları¹⁵da ratlarda yaptıkları deneylerde laktoperoksidaz enziminin çürük sıklığı üzerinde belirgin bir azalmaya yol açmadığını rapor etmişlerdir.

Diğer bir çalışmada ise Mandel ve arkadaşları¹⁶ çürüksüz (DMFS=0) ve çürüklü (DMFS en az 20) olan bireyler arasında laktoperoksidaz enzimi ve tiosiyanat değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulamamışlardır.

Çalışmamızda peroksidaz miktarını 226.34±94.68 mU/ml, tiosiyanat miktarı 0.5± 0.31mM olarak tespit edildi. Bulunan bu değerler ile DMF indeksi arasında bir ilişki saptanamadı. Elde edilen bu veriler araştırmacıların sonuçları ile uyumludur.¹⁴⁻¹⁶

Araştırmacıların bir kısmı ise peroksidaz ve tiosiyanat düzeyinin S.mutans ve laktobasil düzeyleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Diş çürüğünün etyolojisinde temel role sahip olduğu düşünüldüğü için test organizması olarak sıklıkla kullanılan S.mutans'ın gelişmesinin, glikoz alımı ve asit üretmesinin peroksidaz sistem tarafından kuvvetlice inhibe edileceği belirtilmektedir.¹⁷⁻¹⁹ OHSCN/OSCN'nin, pH'nın 5 olduğu tükürükte yeterli miktarda bulunduğu takdirde bakterilerin büyümesini inhibe ettiği ve peroksidaz sistemin fosfat sisteminden daha kuvvetli bir antistrep-tokokal etkiye sahip olduğu, pH'nın 7 olduğu ortamda ise herhangi bir inhibisyonun gözlenmediği bildirilmiştir.²⁰

Gothefors²¹ çocuk tükürüğünde bulunan laktoperoksidaz miktarının in vitro olarak bakteri gelişiminin inhibisyonu için yeterli olduğunu, in vivo olarak ise bunun ispatlanmadığını belirtmiştir. Lenander-Lumikari ve arkadaşları²² laktoperoksidaz sistemi içeren diş macunlarının bir aylık kullanımında tükürük peroksidaz seviyesinin yükselmesine rağmen S.mutans ve laktobasil sayılarında bir değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir. Araştırmamızda elde edilen verilerden S.mutans ve laktobasil düzeyiyle peroksidaz aktivitesi arasında ilişki bulunmadığı saptandı.

Peroksidaz ve tiosiyanat düzeyiyle uyarılmış tükürük akış hızı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda ise; Grahan ve arkadaşları²³ 19-21 yaşları arasındaki erkeklerde yaptıkları çalışmada uyarılmış tükürük akış hızı ve tükürük peroksidaz aktivitesi arasında pozitif bir ilişki tespit ederken, tiosiyanat miktarı ile uyarılmış tükürük akış hızı arasında negatif ilişki bulmuşlardır. Tenavuo ve arkadaşları²⁴ peroksidaz sistemin antimikrobiyal aktivitesinin uyarılmış tükürükte uyarılmamış tükürüğe oranla daha düşük olduğunu, bu nedenle uyku sırasında antimikrobiyal aktivitenin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da uyarılmış tükürük akış hızı ile peroksidaz enzimi arasında ilişki tespit edilirken, tiosiyanat düzeyi ile uyarılmış tükürük akış hızı arasında bir ilişki saptanamadı. Bulgularımız Grahan ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumludur. Kristilla ve arkadaşları²⁵ peroksidaz ve tiosiyanat dahil hiçbir antimikrobiyal maddenin gelecekte oluşabilecek çürüğün önceden tespitinde güvenli bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalarda tek proteinin tespitinin tükürük antimikrobiyal maddelerinin ağız sağlığı ve ekolojisi üzerine etkisini yeterince yansıtmadığı saptanmıştır.²⁶

Biz de bu yöndeki çalışmaların birden fazla enzimi ve antimikrobal maddeyi içerecek şekilde geliştirilip devam ettirilmesi kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Tenovou J, Valtakoski J. The correlation between salivary peroxidase activity salivary flow. JFDL. Saliva: Its role in health and disease. Int Dent J 1992; 42: 291-304
2. Thystrup A and Fejerskov O. Textbook of clinical cariology 2nd ed. Copenhagen Munsgaard 1994;38-39.
3. Tenovou J. Non immunoglobulin defense factor in human saliva clinical chemistry and microbiology, Vol1 Tenovou J, editör Boca Raton, FL: CRC press inc 1989:55-91.
4. Edwin LT, Pera BK, Jefferson MM. Hypothiocyanite ion: Detection of the antimicrobial agent in human saliva. J Dent Res 1980;59(9):1466-1472.
5. Tenovou J, Larjava H. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of (3H)-Thymidine by human gingival fibroblasts culture in vitro. Arch Oral Biol 1984;29(6):445-451.
6. Kersten HW, Moorer WR, Wewer R. Thiocyanate as a cofactor in myeloperoxidase activity against streptococcus mutans. J Dent Res 1981 ;60(4):831-837.
7. Roth GI, Calmes R. Oral Biology. The C.V. Mosby Company 1981;196-236.
8. Rahemtulla MB, Baldone DC, Pruitt KM, Rahamtulla F. Effect of variations in pH and hypothiocyanite concentrations on S.mutans glucose metabolism. J Dent Res 1987;66(2):486-491
9. Oral Health Surveys Basic Methods (WHO publication).fourth ed. Geneve World Health Organization 1997.
10. Rahemtulla MB, Baldone DC, Pruitt KM, Rahamtulla F. Specific assays for peroxidase in human saliva. Arch Oral Biol 1986 ;31(10):661-668.
11. Merck. Testing of water. Germany: Merck publication 9. edition, 1974.202-203
12. Tenovou J. Antimicrobial function of human saliva. How important is it for oral health? Acta Odontol Scand 1998 ;56 :250-256.
13. Tenovou J, Graham E, Lahtonen OP et al. Antimicrobial factors in saliva: Ontogeny and relation to oral health. J Dent Res 1987;66(2):475-479.
14. Lamberts BL, Pruitt KM, Pederson ED et al. Comparison of salivary peroxidase system components in caries-free and caries-active naval recruits. Caries Res 1984;18:488-494.
15. Martinez-Gomis J, Fernandez-Sofanas A, Vinas M et al. Effect of topical application of free and liposome encapsulated lactoferrin and lactoperoxidase on oral microbiota and dental caries in rats. Arch Oral Biol 1999;44:901-906.
16. Mandel D, Behrman J, Levy R, Weingtein D. The salivary lactoperoxidase system in caries resistant and susceptible adults. J Dent Res 1983 ;62(8):922-925
17. Germanine RG, Tellefson ML. Glucose uptake by streptococcus mutans, streptococcus mitis and actinomyces viscosus in the presence of human saliva. Infect and Immun 1982;38(3):1069-1067.
18. Germanine RG, Tellefson ML. Effect of human saliva on glucose uptake by streptococcus mutans and other oral microorganisms. Infect and Immun 1981;31(2):597-607.
19. Pruitt MK, Adamson M, Arnold R. Lactoperoxidase binding to streptococci. Infect and Immunity 1979;25(1):304-309.
20. Lumikari M, Soukka T, Nurnio S, Tenovou J. Inhibition of the growth of streptococcus mutans, streptococcus salivarius and lactobacillus casei by oral peroxidase systems in human saliva. Arch Oral Biol 1991;3(2):155-160.
21. Gothefors I, Marklund S. Lactoperoxidase rate and the oxidation-reduction potentials of human saliva and dental plaque suspensions. Acta Odontol Scand 1976 (3):169-176.
22. Lenander, Lumikari M, Tenovou J, Mikola H. Effect of lactoperoxidase system-containing tooth paste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva. Caries Res 1993;27:285-191.
23. Grahn E, Tenovou J, Lehtonen O et al. Antimicrobial systems of human saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria and gingival inflammation in young adults. Acta Odontol Scand 1988;46:67-74.
24. Tenovou J, Pruitt KM, Thomas EL. Peroxidase antimicrobial system of human saliva: Hypothiocyanite levels in resting and stimulated saliva. J Dent Res 1982;61(8):982-985.
25. Kristila V, P Hakkinen, H Jentsch et al. Longutinal analysis of the association of the human salivary antimicrobial agent with caries increment and cariogenic microorganisms. A two year cohort study. J Dent Res 1998;77(1):73-80.
26. Rudney JD, Kajander KC, Smith QT. Correlations between human salivary levels of lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin a with different stimulatory states and overtime. Arch Oral Biol 1985 ;30(11):765-771.

Yazışma Adresi:

Atatürk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
Konservatif Tedavi ABD, ERZURUM
Tlf: 04422311790
e-mail: nkaraoglanoglu@hotmail.com