

ERİŞKİN PERİODONTİTİSLİ HASTALARIN DİŞETİ OLUĞU SIVISINDA GLİKOZAMİNOGLİKANLAR*

Yegane Güven¹ Salih Cengiz² Serdar Çintan³ Aslan Gökbuget³ Özen Tuncer⁴

Yayın kuruluna teslim tarihi : 11.01.1995
Yayına kabul tarihi : 18.07.1995

GLYCOSAMINOGLYCANS IN GINGIVAL CREVICULAR FLUID OF PATIENTS WITH ADULT PERIODONTITIS

Özet

Glikozaminoglikanlar (GAG) sert ve yumuşak bağ dokusunun temel maddelerinden biridir.

Bu çalışmada, yetişkin periodontitisli hastaların dişeti oluğu sıvısında (DOS), elektroforetik olarak GAG'lar tayin edilmiştir. Doku harabiyetine bağlı olarak DOS'a geçen GAG'lar standart GAG'ların verdiği lekelerle karşılaştırılmıştır. GAG'ların DOS'a geçişinin, aktif doku harabiyetinin biokimyasal belirteci olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Erişkin periodontitisi, glikozaminoglikanlar, dişeti oluğu sıvısı.

Abstract

Glycosaminoglycans (GAG's) are one of the basic substances of the hard and soft connective tissues.

In this research, GAG's in the crevicular fluid (CF) of the patients with adult periodontitis were determined electrophoretically. GAG's which appear in CF due to tissue destruction were compared with the spots of standard GAG's.

It was concluded that the appearance of GAG's in CF can be used as a biochemical marker of active destruction of the tissues.

Key words: Adult periodontitis, glycosaminoglycans, crevicular fluid.

GİRİŞ

Bağ dokusunun temel maddesinde bulunan glikozaminoglikanlar yüksek molekül ağırlıklı polianyonik karbonhidrat türevleridir (13). Bu yapıdaki kodroitin sülfatlar (A ve C), hyaluronik asit, heparan sülfat, keratan sülfatlar, bir protein öze bağlanarak, proteoglikan (PG) adı verilen agregatları oluşturur (15). PG'lar, kollajenle etkileşerek bağ dokusunun yapısal bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (18). PG'ların insan dişetinin en önemli ekstrasellüler makromolekülü olduğu bildirilmiştir (1). GAG'ları parçalayan β -Glikuronidaz, N-asetil heksosaminidaz gibi enzimlerin subgingival plaktaki bakteriler tarafından üretildiği bildirilmiştir. Böylece dişetinin hücrelerarası materyalinin harabiyetinin başlaması ile periodontal hastalığa zemin hazırlandığı ileri sürülmektedir (9,10).

Periodontal hastalıklar dişi destekleyen dokuların harabiyeti ile karakterizedir. Radyografi dahil kullanılan klinik yöntemler, periodontal hastalığın şiddetini tayin etmekle birlikte belirli bölgelerdeki aktiviteyi saptamak için yeterli olmadığı gibi, olabilecek hastalığı da önceden haber vermez (11,12). Oysa dişeti oluğu sıvısı, periodontal hastalıkların saptanmasında uygun bir ortam kabul edilmektedir (5).

DOS'da periodontal inflamasyon ile ilgili kimyasal ve biokimyasal bileşenler ayrıntılı olarak araştırılmıştır (4). DOS'da periodonsiyuma ait bağ dokusunun elemanları olan kollajen ve proteoglikanlar da tayin edilebilmektedir (7). Son yıllarda yapılan çalışmalar DOS'daki GAG'ların periodonsiyumda meydana gelen yıkılmayı gösterdiğini belirtmektedir (6,14).

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

1 Doç Dr İÜ Diş Hek Fak Biokimya Birimi

2 Doç Dr İÜ Adli Tıp Enstitüsü

3 Doç Dr İÜ Diş Hek Fak Periodontoloji Anabilim Dalı

4 Prof Dr İ Ü Diş Hek Fak Periodontoloji Anabilim Dalı

Bu çalışmada, sık görülen bir hastalık olan erişkin periodontitisinde, DOS'da GAG'lar incelenmiş ve bu testin bir laboratuvar belirteci olarak kullanılabilirliği tartışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, cep derinliği ortalama 5-7 mm'ye ulaşan erişkin periodontitisli 40 hastaya ait dişeti oluğu sıvısı, 5 µl'lik mikropipet (The Binding Site Ltd. Univ Birmingham Res Ins) yardımıyla alındı. Bu hastalara son 6 ay hiçbir periodontal tedavi uygulanmamıştı. DOS alındıktan sonra bir program dahilinde tedavilerine başlandı. Sıvının alınacağı bölgenin tükürükle teması kesildikten ve hava ile kurutulduktan sonra pipetin ucu cebe daldırıldı. Alınacak sıvıya kan karışmamasına mümkün olduğu kadar özen gösterildi. Bu örneklerde GAG'ları ayırmak için sellüloz asetat elektroforez yöntemi kullanıldı (14). Bunun için 95°C'lik su banyosunda 15 dak ısıtılarak inhibitör proteinler denatüre edildi. Daha sonra proteinleri ayırmak için proteaz etki ettirildi. Bu amaçla *Streptomyces griseus* (type VI, Sigma) adlı proteaz kullanıldı. 5 µl 0.2 M Tris HCl (pH 8) içinde bir spatül ucu proteaz ilave edildi. 16 saat 37°C'lik etüvde bekletildi. Bu süre sonunda, 5 µl'lik örnekler sellüloz asetat kağıdına uygulandı (CelloGel, MALTA, Milano). Tampon olarak 0.2M M kalsiyum asetat (pH 7.2) kullanıldı. 6 saat 0.6 mA akım geçirildi.

Bu süre sonunda % 0.5 alcian blue ile 20 dak boyandı. Boyanın fazlası % 1 asetik asitle uzaklaştırıldı. Kağıt şeritler oda sıcaklığında kurutuldu. Standart olarak kullanılan hyaluronik asit, kondroitin sülfat A, kondroitin sülfat C, heparan sülfat ve keratan sülfat (Sigma), 1mg/1 ml olacak şekilde distile suda çözüldü. 5 µl'lik örnekler halinde sellüloz asetat kağıdına uygulandı.

GAG'ların daha ayrıntılı olarak birbirlerinden ayrılması amacıyla; etüvde 37°C'de 16 saat bekleyen örneklerin bir kısmı kondroitinaz ABC (Sigma), bir kısmı da kondroitinaz AC (Sigma) ile muamele edilip 37°C'de 30 dak bekletildi. Daha sonra sellüloz asetat kağıdına tatbik edildi.

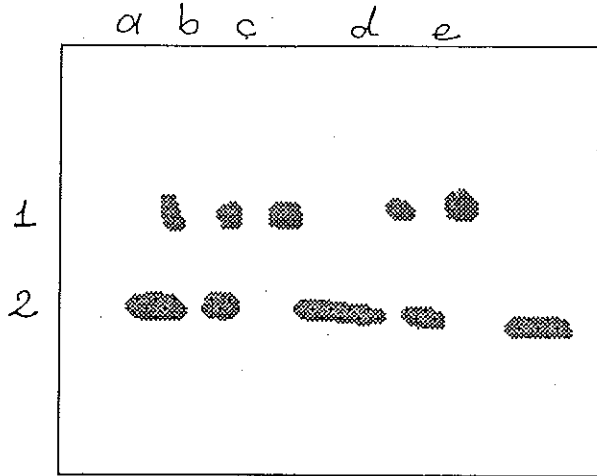
BULGULAR

Şekil 1'de elektroforetik yolla ayrılan GAG'lar görülmektedir. Boyandıktan sonra kurutulan asetat kağıtlarından çekilen fotoğrafta (Şekil 1

no ile belirtilen spotlar, sırasıyla hyaluronik asit, heparan sülfat, keratan sülfat, kondroitin sülfat A ve kondroitin sülfat C olan standart GAG'lara aittir. 2 no'da görülenler ise örnek DOS'larında bulunan GAG'ların verdiği lekelerdir. Bazı örneklerle ait lekeler tatbik noktasına yakın kalırken bazıları da orijinden hemen hemen hiç uzaklaşmadı. Kondroitinaz AC ve Kondroitinaz ABC etkisinden sonra meydana gelen lekeler çok silik olup, net fotoğraf vermediği için değerlendirmeye alınmadı.

Şekil 1. Dişeti oluğu sıvısındaki GAG'ların elektroforezle ayrılması

1. Standart GAG'lar: a- Hyaluronik asit, b- Heparan sülfat, c- Keratan Sülfat, d- Kondroitin sülfat A, e- Kondroitin sülfat C. 2. DOS örneğindeki GAG'lar.



TARTIŞMA

Erişkin periodontiti aşırı plak birikimi, dişeti iltihabı, renk değişikliği, bol eksüda ile karakterize bir hastalıktır. Lezyonlar plak miktarıyla ilişkili olarak, farklı bölgelere göre değişiklik gösterir (3). Periodontitiste doku harabiyetinin aktif fazını gösterebilmek için klinik bulguların yanısıra, başka parametrelere de ihtiyaç vardır (14). Hastadan kolaylıkla elde edilebilecek bir materyal olan DOS, periodontal hastalıkların risk grubunu oluşturan kişilerin saptanmasında uygun bir ortam olarak kabul edilmektedir (5,8). Belirli bölgelerden alınan DOS'da, GAG'ların tayin edilmesi, periodontal hastalık aktivitesinin tayini açısından klinik ve radyolojik yöntemlere yardımcı olmaktadır (11,12).

GAG'lar gerek mineralize, gerekse mineralize olmayan bağ dokusunun esas成分leri olup, doku yıkımında açığa çıkmaktadır (1,2,5,6).

Şekil 1'de görüldüğü gibi, çalışmamızda, yaygın doku hrabiyeti olan periodontitisli hastaların DOS'unda, hyaluronik asit, heparan sülfat, keratan sülfat, kondroitin sülfat A ve kondroitin sülfat C bulunduğunu gösteren lekeler tespit edilmiştir. Bu şekil, bu konuda yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi (7,14,18), elimizde bulunan pek çok fotoğraf arasından seçilen lekelerin en iyi görüldüğü fotoğraftan bilgisayar görüntüsü alınarak elde edilmiştir. Bulduğumuz sonuçlar, DOS'ndaki biokimyasal bileşenlerin (4,5), özellikle de GAG'ların (6,7,11,14) inflamasyonla ilişkisini bulan araştırmacıların bulguları ile uyumludur. Oluk sıvısının az miktarda oluşu [sağlıklı dişetinde sıfıra yakın (4)], ayrıntılı analiz yapılmasını zorlaştırılmaktadır. Nitekim çalışmamızda ikinci aşama olarak düşünülen Kondroitinaz AC ve Kondroitinaz ABC etkisiyle biyolojik parçalanmayı müteakip, örneklerdeki GAG'larla ilgili lekelerin çok siliği olduğu gözlemlendi. Bu güçlüğü rağmen, GAG'ların DOS'nda saptanması, hastalık aktivitesinin periyodlarının belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir (14).

Ayrıntılı incelemelerde ELISA gibi çok küçük miktarları saptayabilen tayin yöntemlerinin kullanılması daha uygundur (19). 1990 sonrası yıllarda üzerinde çok çalışılan bu yöntemle eser miktardaki DOS'da GAG'lar saptanabilmektedir. Bu yöntemin, kondroitin sülfat izomerlerini saptamak, ve aynı antikora GAG'ların histolojik olarak gözlemlenmesi gibi avantajları da vardır (16).

Embery ve ark (6), klinik olarak inflamasyon görülmeyen bölgeden elde edilen DOS'nın sadece hyaluronik asit kapsadığını bildirmişlerdir. Hyaluronik asit gibi sülfat kapsamayan GAG'ın yanısıra, yapısında sülfat bulunan kondroitin sül-

fatların da saptanması, hastalığın sadece yüzeyleki yumuşak dokuyu tutan kronik gingivitis olmayıp, daha derindeki periodontal dokuları etkileyen periodontitis olduğunu göstermektedir (7,14). Bu GAG'lar, bağ dokusunun altında bulunan düşük molekül ağırlıklı, enzimatik parçalanmaya müsait fraksiyonlardan kaynaklanmaktadır (6). GAG'ların periodontal dokulardan yeni sentezi veya degradasyonla serbestleşerek DOS'a geçmesi, dokunun geçirgenliğine de bağlıdır. Her ne kadar DOS, dişeti kan damarlarından kaynaklanıyorsa da (periodontal ligament ve alveol kemiği boyunca geçen damarlardan da destek alarak), hem bağ dokusunun hem de sulkus epitelinin geçirgenliği, diş yüzeyinde toplanan sıvının GAG bileşimini de etkileyebilir. İltihapsal durumda bu bağlantı epiteli bariyerindeki morfolojik değişikliklerin, geçirgenlik özelliklerini değiştirdiği düşünülmektedir (17).

Hastalarımızda uygulanacak tedavi sonrası, periodontal dokuların iyileşmesine bağlı olarak, özellikle sülfatlanmış GAG'ların elektroforezde verdiği, spotların kaybolması beklenmektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmanın konusu bu olacaktır.

Sonuç olarak, kolayca alınan az bir materyalle, DOS'da GAG'ların tayin edilmesinin, yaygın doku hrabiyetinin bir belirteci gibi rutin laboratuvar analizi olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Standart maddelerin uzun zaman kullanılabilmesi de göz önüne alınırsa elektroforez yönteminin maliyetinin de oldukça düşük olduğu görülür. Ancak, DOS'un çok azaldığı koşullarda GAG tayininin, eser miktardaki örneklerle uygulanabilen ELISA yöntemiyle yapılması daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bartold PM. Proteoglycans of the periodontium: Structure, role and function. *J Periodont Res* 1987; 22: 431-44.
2. Baylink D, Wergedal J, Thompson E. Loss of protein polysaccharides at sites where bone mineralisation is inhibited. *J Histochem Cytochem* 1972; 20: 279-92.
3. Carranza FA: *Glickman's Clinical Periodontology*. 7th ed. Philadelphia. WB Saunders Comp 1990: 202-9.
4. Cimasoni G. The crevicular fluid. IN: Myers HM eds. *Monographs in Oral Science*. Basel: S. Karger AG, 1974: 92-9.
5. Curtis MA, Gilett IR, Griffiths GS, Maiden MFJ, Sterne JAC, Wilson DT, Wilton JMA, Johnson NW. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: Laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 1-11.
6. Embery G, Oliver WM, Stunbury JB. The metabolism of proteoglycans and glycosaminoglycans in inflamed human gingiva. *J Periodontol Res* 1979; 14: 512-9.
7. Embery G, Oliver WM, Stunbury JB, Purvis JA. The electrophoretic detection of acidic glycosaminoglycans in human gingival sulcus fluid. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 177-9.

8. Fine DH, Mandel ID. Indicators of periodontal disease activity: an evaluation. *J Clin Periodontol* 1986; **13**: 533-46.
9. Gibbons RJ, Mc Donald JB. Degradation of collagenous substances by bacterioides melaninogenicus. *J Bact* 1961; **81**: 614-21.
10. Goggins JF, Bethesda MS. Studies of acid mucopolysaccharides metabolism in connective tissues. *Oral Surg* 1971; **33**: 824-34.
11. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodont* 1983; **10**: 257-65.
12. Hancock EB. Determination of periodontal disease activity. *J Periodont* 1981; **52**: 492-9.
13. Hascall VC, Sajdera SW. Protein-polysaccharide complex from the bovine nasal cartilage. The function of glycoproteins in the formation of aggregates. *J Biol Chem* 1969; **244**: 2384-96.
14. Last KS, Stanbury JB, Embery G. Glycosaminoglycans in human crevicular fluid as indicators of active periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1985; **30**: 275-81.
15. Lindahl U, Höök M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Rev biochem* 1978; **47**: 385-417.
16. Nishino W, Shibutani T., Murahashi Y. Elisa detection of proteoglycans in gingival crevicular fluid. *J Japan Ass Periodont* 1990; **32**: 615-22 (19 no'lu literatürden).
17. Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; **33**: 235-49.
18. Purvis JA, Embery G, Oliver WM. Molecular size distribution of proteoglycans in human inflamed gingival tissue. *Arch Oral Biol* 1984; **29**: 513-9.
19. Shibutani T, Nishino W, Shiraki M, Iwayama Y. ELISA detection of glycosaminoglycan - linked proteoglycans in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1993; **28**: 17-20.

Yazışma adresi:

*Doç Dr Yegane Güven
İstanbul Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
34390 Çapa - İstanbul*