



## *Adult Periodontitisli ve Gingivitisli Hastaların Gingival Cep Sıvıları ve Tükürük Örneklerinde Psödokolinesteraz Aktivitesi*

### *Pseudocholinesterase Activity in the Gingival Crevicular Fluid and Saliva from Patients with Adult Periodontitis and Gingivitis*

Tamer YILMAZ<sup>1</sup>

#### Özet

Bu çalışmada adult periodontitisli ve gingivitisli hastalardan alınan cep sıvısı (GCF) ve stimule tükürük örneklerindeki pseudokolinesteraz aktivitelerinin tanı koydurucu değeri araştırıldı . Bu amaçla Ankara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı kliniğine başvuran adult periodontitis ve gingivitis teşhisi konmuş hastalardan tedaviye başlamadan önce Rudin yöntemi ile cep sıvısı örnekleri ve stimule tükürük toplanarak her iki örnekte kinetik spektrofotometrik yöntemle pseudokolinesteraz aktivitesi ölçüldü.

Bulunan değerler varyans analizi ile değerlendirilip sonuçlar tartışıldı .

**Anahtar kelimeler** : Pseudokolinesteraz , GCF , tükürük .

#### Abstract

In this study , the diagnostic value of pseudocholinesterase activity were determined in gingival crevicular fluids (GCF) and stimulated saliva collected from patients with adult periodontitis and gingivitis . The samples were collected from patients diagnosed with adult periodontitis and gingivitis who applied to the Department of Periodontology, Ankara University Faculty of Dentistry. Before starting to treatment gingival crevicular fluids were collected using Rudin's Method . The pseudocholinesterase

activity was determined spectrophotometrically in GCF and stimulated saliva .

The values obtained were analyzed using varians analysis and the results were discussed for their clinical significans .

**Keywords** : Pseudocholinesterase , GCF , saliva .

#### GİRİŞ

Enzimler, periodontal hastalıkların patogenezinde aldıkları rol nedeni ile uzun yıllardır büyük ilgi çekmişlerdir (1-4). Pekçok araştırmacı tarafından belirtildiği gibi periodontitisli hastaların gingival cep sıvıları (GCF), tükürükleri ve gingivaları pekçok enzim içermektedir (2, 5-7). Ancak enzimlerin ağız hastalıklarında oynadıkları rol henüz tam olarak açıklanmış değildir (7).

Psödokolinesteraz (PCE, EC 3.1.1.8), diğer adıyla serum kolinesterazı, esas olarak karaciğerde sentezlenerek kana verilen, substrat özgüllüğü ve tercihi ile gerçek kolinesterazdan (sinir dokusu, alyuvarlar) ayrılan bir enzimdir. Asetil-β-metil kolin dışında hemen tüm kolin esterlerini hızla parçalayabilen bu enzim, muhtemelen yabancı kaynaklı kimyasalları (ilaç, zehir v.b.) ortadan kaldırmakla görevlidir (8).

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Beşevler/ANKARA

PCE aktivite tayini, klinisyenler ve klinik biyokimyacılar tarafından karaciğer fonksiyonlarını belirlemek ve karaciğer hastalıklarını izlemek amacıyla kullanılmaktadır (9). Akut hepatit, siroz ve karaciğer metastazlarında kolinesteraz seviyeleri düşmektedir. PCE aynı zamanda organofosfat zehirlenmelerinin saptanması için önemli bir indikatördür (9).

Çeşitli vücut sıvılarında PCE aktiviteleri belirlenmiştir. Enzim aktivitesi; ter, gözyaşı sıvısı, idrar ve parotis bezin de tükürük bezi salgılarına oldukça yakın değerlerdedir. Ancak bu bölgelerdeki aktivite plazma aktivitesinin 1/1500'ü kadardır (6). PCE aktivitesinin periodontal ceplerdeki durumu ve enzimin periodontal hastalıklardaki rolü hakkında bilinenler ise çok azdır.

Bu çalışmanın amacı, adult periodontitis (AP) ve gingivitis hastalıklı kişilerin tükürük ve periodontal cep sıvısı (GCF) örneklerindeki psödokolinesteraz (PCE) aktivitesini saptamak ve PCE ölçümleri ile hastalıklar arasındaki olası ilişkiyi araştırmaktır.

#### YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi polikliniklerine başvuran hastalardan alınan örneklerle yapıldı.

Hasta seçimi: Denekler, klinik ve radyolojik yönden AP veya gingivitis oldukları saptanmış ve en az bir yıldır hiçbir periodontal tedavi görmemiş veya antibiyotik kullanmamış ve tüm maksiller anterior dişleri tamam olan kişilerden oluşturuldu. Sistemik bir bozukluğu olanlar teste alınmadı. Her hasta grubu 10 hastadan oluşturuldu. Ortalama yaşlar; AP grubu için  $46.3 \pm 8.6$ , Gingivitis grubu için  $32.6 \pm 10.2$ , kontrol grubu için ise  $22.0 \pm 1.1$  idi. GCF ve tükürük örnekleri elde edilmeden önce, periodontal hastalığın önem derecesini saptamak amacıyla cep derinliği ölçüldü. Tüm denekler örnek toplama işlemi ve çalışmanın amacı hakkında bilgilendirildi. GCF ve tükürük örnekleri de periodontal tedavi öncesinde alındı.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma Chemical, Co. (ABD) fir-

masından sağlandı. Çalışmada; santrifugasyon için Eppendorf 5417R model soğutmalı mikrofuj, spektrofotometrik ölçümler için ise Milton-Roy Spectronic 3000 Diode Array Spectrophotometer kullanıldı.

GCF ve tükürük örneklerinin toplanması : GCF örneğinin alınmasında Rudin'in yöntemine göre, standardize (15 mm uzunluk x 2 mm genişlik) kağıt şeritler kullanıldı (10). Kağıt şeritlerin uçlarında standart bir işaret vardır. Kağıdın ucu cebe yerleştirilmiş ve işaret daha derine girmeyi engellemek amacı ile kullanılmıştır. GCF örnekleri tükürük ile kontaminasyon riskini önlemek amacıyla maksiller anterior dişlerin vestibuler yüzlerinden alındı. Örnek alanı pamuk tamponlarla izole edildi ve yavaşça havalandırıldı. GCF miktarları Valazza ve ark.nin (11) metodlarına göre saptandı. Belirli bir zaman aralığı içinde toplanan GCF miktarı tartım ile hesaplandı, sıvı emilen şerit alanını saptama yoluna gidilmedi. Kağıt şeritler plastik tüplerde kullanım öncesi tartıldı, örnek alımının hemen ardından tartım tekrarlandı. Örnek toplama süresi de ayrıca ölçüldü. Bu yolla da sıvı akışının mg/dakika cinsinden ölçümü sağlandı. Örnekler daha sonra alüminyum folyoya sarılarak analiz zamanına kadar  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Her kişiden 5 ml uyarılmış tükürük örneği toplandı. Tükürük örnekleri 15 dakika 3000 xg'de santrifüje edildi. Enzim aktivitesi ölçümü ve protein tayini tükürük süpernatantında gerçekleştirildi.

Depolama süresinin PCE aktivitesine olan etkisi, aynı deneklerden alınan örnekler kullanılarak denendi. Bu örneklerdeki PCE aktiviteleri farklı zamanlarda ölçülmüş ve depolama süresince bir aktivite kaybı olmadığı saptandı.

Kağıt şeritlerden GCF'nin ekstraksiyonu: GCF örnekleri emdirilmiş kağıt şeritlerin saklandıkları Eppendorf tüplere 400  $\mu\text{l}$  tampon ( 0.1 mol/L NaCl içeren 25 mM morpholinoethansülfonik asit / NaOH, pH=7.4) tamponu eklendi. Ekstraksiyon, tüplerin dakikada 120 devir yapan bir çalkalayıcıda gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi başlangıçta 10, 15, 30, 45 ve 60 dakika süreyle yapıldı. Onuncu ve 15. dakikalarda ekstrete edilen PCE enzim aktivitesi giderek artarken 30. dakikada en yüksek değere ula-

şıldı. Bu nedenle 30 dakikalık zaman rutin olarak kullanıldı. 30 dakika çalkalanarak şeritlerdeki enzimlerin ve proteinlerin tampona geçmesi sağlandı. Kağıt şerit çıkarıldıktan sonra ağızları kapatılan tüpler mikrofüjde 13500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alınarak PCE aktivitesi ve protein miktarı tayini için kullanıldı.

Hastalardan alınan tükürük örnekleri mikrofüjde 13500 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatantlar enzim aktivitesi ve protein miktarı ölçümlerinde kullanıldı.

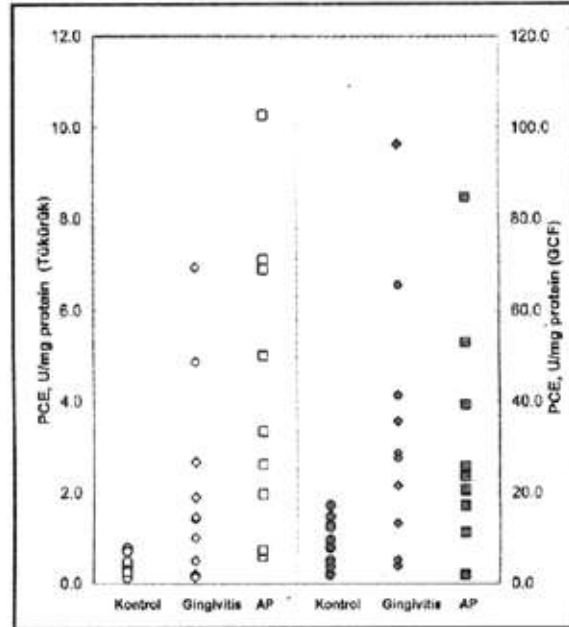
Örneklere PCE aktivitesinin saptanması : PCE aktivitesi Ellman'ın yöntemine (12) göre 500 µl ölçüm ortamı ile yapılmıştır. Ölçüm ortamı 250 µl 0.2 mol/L morpholinoetansülfonik asit /KOH tamponu (pH=7.2) ve 50 µl 1.25 mM 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asit içermektedir. Bu karışıma 100 µl GCF veya tükürük eklendi ve hacim distile su ile 450 µl'ye tamamlandı. Sıcaklığın dengelenmesi için örnekler 37°C'de 3 dakika öninkübasyon uygulandı. Enzim aktivitesi ölçümü 50 µl 5 mM butyrylthiocholine iodide (BTCI) ilavesi ile başlatıldı ve 412 nm'deki absorbanst artış izlendi. Bir enzim ünitesi, bir dakikada bir µmol BTCI'yi hidrolize eden enzim aktivite miktarı olarak kabul edildi. Hesaplamalar, seyreltme faktörü ve molar soğurganlık katsayısı ( $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}$ ) dikkate alınarak yapıldı.

**Protein miktarının tayini:** Örneklerdeki protein miktarları, Bradford yöntemine göre ölçüldü (13).

Gruplar arasındaki farklar varyans analizi ile değerlendirildi (14).

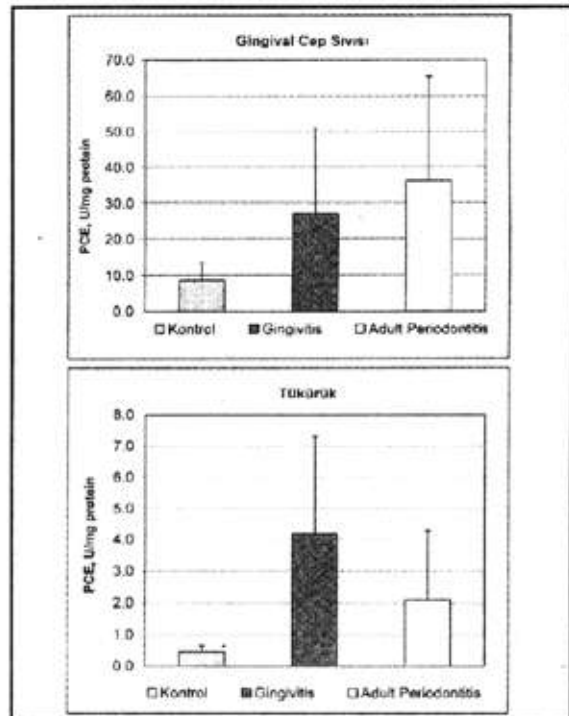
## BULGULAR

Tüm grupların gingival cep sıvıları (GCF) ve tükürük örneklerinde ölçülen PCE aktivitelerinin dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir. İlk dikkati çeken nokta, tükürük örneklerindeki aktivitelerin GCF örneklerinin yaklaşık 1/10'u kadar olmasıdır. Gingivitis, AP ve kontrol gruplarından alınan GCF örneklerinde ölçülen PCE aktiviteleri; sırasıyla  $27.28 \pm 23.87$ ,  $36.34 \pm 29.09$  ve  $8.78 \pm 4.84$  U/mg protein olarak saptandı. Aynı gruplardan alınan tükürük örneklerindeki PCE aktiviteleri ise sırasıyla;  $4.19 \pm 3.11$ ,  $2.11 \pm 2.20$  ve  $0.46 \pm 0.22$  U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 1. Gingivitis ve Adult Periodontitisli Hastaların Tükürük ve Gingival Cep Sıvılarında (GCF) Psö-dokolinesteraz Aktivitesi Dağılımı

Her iki gruptan alınan GCF örneklerindeki PCE aktiviteleri kontrol grubundakilerden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulundu (sırasıyla  $p < 0.05$  ve  $p < 0.05$ ). Her iki hastalık grubu arasında ise istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ) (Şekil 2).



Şekil 2. Gingivitis ve Adult Periodontitisli Hastaların Gingival Cep Sıvıları ve Tükürüklerinde Psö-dokolinesteraz Aktiviteleri

AP ve gingivitis gruplarından alınan tükürük örneklerinde de PCE aktivitelerinin kontrol grubundakilerden istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı olduğu saptandı (sırasıyla  $p < 0.05$  ve  $p < 0.05$ ). Her iki hastalık grubu arasında ise istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ )

### TARTIŞMA

Bu çalışmada her iki hasta grubunda da gingival cep sıvısı ve tükürük PCE aktiviteleri kontrollerden yüksektir. Ancak Adult Periodontitis ve gingivitis arasındaki farklar istatistiksel yönden önemsizdir. Bu durum örnekleme alanının sınırlı oluşunun sonucu olabilir. Zira tükürük oluşabilecek kontaminasyonu engellemek için, gingival cep sıvısı sadece maksiller anterior dişlerden toplanmıştır ki, bu dişler AP ve gingivitis hastalarında çok etkilenen dişler değildir.

GCF'deki PCE aktivitesi tükürükten yüksektir. Bu bulgu GCF'nin tükürükteki enzim konsantrasyonu üzerine etkili olabileceğine işaret etmektedir. Bu bulgularımız daha önceki ile uyumludur. Daha önce yapılan bir çalışma da tükürükteki PCE aktivitesinin plazmadan değil, fakat tükürük bezleri, mikroorganizmalar, lökositler ve GCF'den kaynaklandığını göstermiştir (6). PCE, bakteriler tarafından da oluşturulabildiğine göre tükürük ve GCF'deki PCE aktivite artışı periodontal hastalıklarda bol miktarda karşılaşılan bakterilere bağlı olabilir (1,6). Alternatif olarak bu artış ayrıca periodontal hastalık sırasında oluşan enflamasyon sonucu görülen esteraz sonucu da olabilir. PCE periodontal dokularda bilhassa kan damarları etrafında ve yangısal hücre yığınları ile ilişkili olarak saptanmıştır (15).

Daha önceki bir çalışmada klinik gingivitis hastalarında ortalama PCE değerleri sağlıklı kişilere kıyasla önemli bir yükseklik göstermemektedir (6). Ancak bizim çalışmamızda hem gingivitis grubunda, hem de AP grubunda GCF örneklerindeki PCE aktivitesi önemli olarak yüksektir. Bu iki çalışmanın sonuçlarına göre; başlangıç gingivitis fazında PCE aktivitesi önemli bir artış göstermeyebilir. Ancak bakteriyel flora kompleksleştikçe ve yangı alt dokulara yayıldıkça PCE aktivitesi daha yüksek değere ulaşabilir yorumu yapılabilir.

Periodontal hastalıklarda enzim aktivite artışı ayrıca Nakamura ve Slots (3), Zambon (16) ve Winer'in (7) çalışmaları ile de gösterilmiştir. Ancak

gerek daha önce yapılan çalışmaların sonuçları, gerekse bizim bulgularımızdan yola çıkarak, klinik muayene yapılarak tiplendirme ve evrelendirme yapılmaksızın, yalnızca enzim aktivitelerden ayrıntı bir tanı aracı olarak kullanmamız olanaksız görülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Chauncey, H.H. (1961) Salivary enzymes. J. Am. Dent. Assoc. 63: 361-368.
2. Cimasoni, G. (1974) The Crevicular Fluid. In: Monographs in Oral Science, Vol. 3, H.M. Meyer, Ed. pp. 21, 65, 92.
3. Nakamura, M., Slots, J. (1983) Salivary enzymes: Origin and Relationship to Periodontal Disease. J. Periodont Res. 18: 559-569.
4. Pigman, W., Reid, A.J. (1952) The Organic Compounds and Enzyme of Human Saliva. J. Am. Dent. Assoc., 45: 325-368.
5. Lamster, I.B., Hartley, L.J., Vogel, R.I. (1985) Development of A Biochemical Profile for Gingival Crevicular Fluid. Methodological Considerations and Evaluations of Collagen-depending and Ground Substance Degrading Enzyme Activity During Experimental Gingivitis. J. Periodontol. 56 ( Suppl. 11 ): 13-21.
6. Ryhancn, R.J. (1983) Pseudocholesterase Activity in Some Human Body Fluids. Gen. Pharmacol. 14: 459-460.
7. Winer, R.A. O'Donnel, L.J., Chauncey, H.H., McNamara, T.F. (1970) Enzyme Activity in Periodontal Disease. J. Periodontol., 41: 449-56.
8. Henry, J.B. (1991) Clinical Diagnosis & Management. W. B. Saunders, Co., 18. Ed., Philadelphia, s. 271.
9. Brown, S.S., Kalow, W., Pilz, W., Whittaker, M., Wornick, C.L. (1981) Plasma Cholinesterases. In: Advances In Clinical Chemistry, Vol. 22, New York Academic Press, s.1-123.
10. Rüdün, H.J., Overdiek, H.F., Rateitschak, K.H. (1970) Correlation Between Sulcus Fluid Rate and Clinical and Histological Inflammation of the Marginal Gingiva. Helv. Odont. Acta, 14: 21-26.
11. Valazza, A., Matter, J., Oglivie, A., Cimasoni, G. (1972) Fluide Gingivale. Profondeur des Poches et Perte Osseuse. Rev. Mens. Suisse Odontostomat., 82: 824-32.
12. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961) A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochem. Pharmacol., 7:88-95.
13. Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
14. Edwards, A.L. (1964) Statistical Analysis. Holt, Reinhardt and Winston. Co., New York, s.141-148.
15. Lisanti, V.F. (1960) Hydrolytic Enzymes in Periodontal Tissues. Ann. NY Acad. Sci. 85 : 461-66.
16. Zambon, J. J., Nakamura, M., Slots, J. (1985) Effects of Periodontal Therapy on Salivary Enzymatic Activity. J. Periodont. Res., 20: 652-59.