

PERİODONTAL HASTALIĞIN TEŞHİSİNDE TÜKÜRÜK CYSTATİN C DÜZEYİNİN ROLÜ

Ahu URAZ¹, Serenay ELGÜN², Selda DEMİRTAŞ³, Nurdan ÖZMERİÇ¹

THE ROLE OF THE SALIVA CYSTATIN C LEVEL IN THE DIAGNOSIS OF PERIODONTAL DISEASE

Summary: Periodontitis results from the extension of inflammatory and destructive process initiated in the gingiva to the connective tissue and alveolar bone around teeth. Cystatins are physiological inhibitors of cysteine proteinases which are considered to contribute to periodontal breakdown. The purpose of this study was to examine the possible role of a cysteine proteinase inhibitor, cystatin C activity of saliva in the pathogenesis of periodontal disease. Mixed saliva samples were collected from 20 periodontitis patients and 15 systemically and periodontally healthy control subjects and assayed for cystatin C. Clinical status of patients was evaluated using the periodontal indices which measure the severity of disease on a graduated scale. Cystatin C levels were found to be significantly decreased in patients ($p < 0.05$). Although all periodontal indices were found to be significantly higher in the periodontitis group which demonstrated severe periodontal disease, no meaningful correlations were observed between cystatin C activity and periodontal variables ($p > 0.05$). Results suggest that, the decreased activity of cystatin C along with a possible increase in cysteine proteinases appears to contribute to the periodontal disease process, and this reduced activity might be the reflection of individual inclination to periodontitis.

Key Words: Periodontitis, Pathogenesis, Cystatin C, Saliva

Özet: Periodontitis, dişetinde başlayan inflamasyon ve yıkımın dişler etrafında, bağ doku ve alveoler kemiğe ilerlemesiyle oluşur. Cystatinler, periodontal yıkıma katkıda bulunduğu düşünülen cysteine proteinazların fizyolojik inhibitörleridir. Bu çalışmanın amacı, tükürükteki bir cysteine proteinaz inhibitörü olan cystatin C'nin aktivitesinin periodontal hastalığın patogeneğinde olası rolünü değerlendirmektir. Tükürük örnekleri, 20 periodontitis hastası ve 15 sistemik ve periodontal olarak sağlıklı kontrol bireyinden toplandı ve cystatin C için değerlendirildi. Hastaların klinik durumu, hastalığın düzeyini ölçen periodontal indeksler kullanılarak değerlendirildi. Cystatin C düzeyleri hastalarda önemli derecede azalmış olarak bulundu ($p < 0.05$). Bununla beraber bütün periodontal indeksler periodontitis grubunda, sağlıklı kontrollere oranla daha yüksek olarak bulundu. Cystatin C aktivitesi ve periodontal değişkenler arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmedi ($p > 0.05$). Sonuçta, cystatin C'nin azalan aktivitesi periodontal hastalık sürecine katkıda bulunduğu düşünülen cysteine proteinazlardaki olası artışla beraber seyretmekte ve bu azalmış aktivitenin periodontitise olan bireysel yatkınlığın sonucu olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Periodontitis, Patogenez, Cystatin C, Tükürük.

GİRİŞ

Periodontitis, ağız mikroflorası ve immün sistem arasındaki dengenin bozulmasından dolayı, dişler etrafında bağ doku ataşmanı ve kemik kaybının meydana

na geldiği inflamatuvar bir hastalıktır. Periodontal hastalığın gelişmesindeki en önemli etken gingival marjin ve sulkusla ilişkili olacak şekilde yerleşen bakteriyel plaktır (1,2,3). Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia yada Actinobacillus actinomycetem-

¹Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

²Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

³Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastahanesi Merkez Laboratuvarı



comitans gibi periodontopatojenik bakterilerin periodontal hastalık sürecinde rol oynadığına inanılmaktadır. Bu bakteriler tükürük proteinlerini, immünoglobulinleri ve kollagen tip I'ı yıkan proteolitik enzimleri salgılar (4,5). Bu patojenik bakteriler, polimorfonükleer lökositler (PMNL), makrofajlar, fibroblastlar, keratinositler ve osteoklastların tetiklediği sitokinlerin salınmasıyla sonuçlanan bir immün cevabın oluşmasını başlatır. Bu konak hücreleri proteinazları salgılar (6,5).

Cystatinler cysteine proteinazların peptit, protein, kollagen ve kemiği yıkma yeteneğine sahip olan ve fizyolojik inhibitörü olan enzimlerdir (4,7,8,9,10,11). Cystatinler, üç altgruba ayrılan bir aileye aittirler. En kompleks cystatin molekülleri, kininojen olarak da adlandırılan 3. aile cystatinleridir ve temel olarak intravasküler olarak bulunurlar. Aile 1 yaklaşık 100 amino asidin oluşturduğu cystatinleri kapsar, moleküller ağırlıkları 11kD dir ve intraselüler olarak bulunurlar. 115-120 amino asidin oluşturduğu aile 2 cystatinlerin moleküller ağırlığı 13 ila 14 kD'dir. Bu cystatinler S, SA, SN, C ve D ana olarak sekreteruar sıvılarda bulunurlar (4,10,12,13). Cystatin S, SA, SN ve D yalnızca tükürük ve gözyaşı sıvısında bulunurken cystatin C (CysC) bütün insan biyolojik sıvılarında tespit edilmiştir (4,10,14,15,16,17,18). Cystatin C'nin inflammatuar sürecin potent bir düzenleyicisi olduğu ve viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunmada rol oynayabileceği öne sürülmektedir (19,20).

Periodontal hastalıkların teşhisinde kullanılan klinik ölçümler mevcut hastalığın aktivitesinden çok daha önce geçirilmiş periodontal hastalığı gösterdiklerinden sınırlı yararlılıktadır.

Tükürüğün analizi özellikle mevcut periodontal durumu teşhiste ve gelecekte hastalığın ilerleyişini tahmin etmede yararlı olabilir. Konak ve mikrobiyal faktörlerin her ikisinde ihtiva eden tükürük birçok enzim ve enzim inhibitörleri içermektedir (21,22).

Bu çalışmanın amacı, kronik periodontitis hastalarında bağ dokusu ve kemikteki yıkıma katkıda bulunduğu düşünülen konak cevabının değerlendirilmesinde tükürükteki Cystatin C aktivitesinin yararlılığını araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta Seçimi

Kliniğimize müracaat eden 20 kronik periodontitisli hasta ile, periodontal açıdan sağlıklı birey 15 birey çalışmanın yöntemi ve amacının ayrıntılı olarak açıklanmasından sonra onayları alınarak çalışmaya dahil edildi. Materyalimizi oluşturan bireylerin hepsi sistemik yönden sağlıklıydı ve son 6 ay içinde anti-inflammatuar ajanlar, antibiyotik, immün sistemi baskılayıcı ilaç veya sistemik kontraseptif kullanmamışlardı. Deney grubunu oluşturan bireylerin yaş ortalaması 46.1 (31-65) olup 10'u bayan 10'u erkekti. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin yaş ortalaması ise 43.7 (29-67) olup, sekizi bayan yedisi erkekti. Hem deney hem de kontrol grubunu oluşturan bireylerin hepside sigara içmeyenlerden seçilmişti.

Bireylerin periodontal durumları, plak indeks (PI), gingival indeks (GI), sondlanabilen cep derinliği (SCD) ve klinik ataşman düzeyi (KAD) ölçümlerinin, ağızda mevcut olan tüm dişlerin dört yüzeyinde yapılmasıyla belirlendi.

Tükürük Örnekleri

Klinik veriler kaydedilmeden önce, bireylerin ağızları musluk suyuyla çalkalatıldı ve standart parafin mumu çiğnetilerek stimüle edilen tükürük 60 sn'de 1.5 ml toplandı. Örneklerin toplanma zamanı yaklaşık sabah 9 olarak tespit edildi. Örnekler içerdikleri partiküllerin uzaklaştırılması için +4 °C 'de 15000 'g'de 10 dakika santrifüj edildi ve analiz edilene kadar -20°C 'de saklandı.

Tükürükte Cystatin C Tayini

Cys C tayini, CX7 analizatörde (Beckman, Minnesota, USA) latex PET (particle enhanced turbidimetrik) immünoassay'le (DAKO, Glostrup, Denmark) çoğaltılması yoluyla yapıldı. DAKO Cystatin-C PET kiti, kimyasal olarak insan Cys C'sine karşı tavşan antikolarıyla bağlanmış homojen büyüklükte polystyrene partiküllerini içerir. Bu immuno partikül-

ler ve hasta örneklerindeki Cys C arasındaki reaksiyon, aglütinatların formasyonu ve beraberinde absorbance sinyalinde değişiklikliğin oluşmasıyla sonuçlandı. Hasta örneklerindeki Cys C konsantrasyonu kalibrasyon eğrisiyle belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Periodontitisli ve sağlıklı gruptaki her birey için klinik değişkenlerin (PI, GI, SCD,KAD) ve Cys C düzeyinin miktarı ortalama (\pm) standart sapma olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubu arasında klinik değişkenler ve Cys C düzeyleri arasındaki farklılık Student 's t testi ile değerlendirildi. Cys C düzeyleri ve klinik değişkenler arasındaki korelasyon ise Pearson korelasyon analizi kullanılarak incelendi.(SPSS, SPSS Inc., Chicago, USA)

BULGULAR

Deney ve kontrol grupları arasında PI, GI, SCD ve KAD ölçümlerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulundu (Tablo I). Periodontitis grubunda kontrol grubundan daha yüksek PI, GI, KAD ve daha derin SCD tespit edildi.

Tablo I. Periodontitis hastaları ve sağlıklı kontrollerin klinik ölçümleri (ortalama \pm standart sapma).

Değişkenler	Hastalar	Kontroller
Cep Derinliği (mm)	3.21 \pm 0.45*	1.79 \pm 0.36
Gingival İndeks	0.53 \pm 0.2**	0.24 \pm 0.23
Plak İndeks	0.93 \pm 0.34***	0.6 \pm 0.38
Ataşman Düzeyi (mm)	3.97 \pm 0.56*	1.87 \pm 0.39

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$

Deney ve kontrol gruplarındaki ortalama Cys C düzeyleri 1.13 \pm 0.42 mg/L ve 1.45 \pm 0.37 mg/L olarak bulundu (Tablo II). Cys C düzeyleri, her iki grup arasında önemli farklılık gösterdi.($p < 0.05$).

Table II. Periodontitis hastaları ve sağlıklı kontrollerin Cystatin C (ortalama \pm standart sapma) düzeyleri

Değişkenler	Hastalar (n)= 20	Kontroller (n)= 15	P değeri ^a
Cystatin C (mg / L)	1.13 \pm 0.42	1.45 \pm 0.37	P < 0.05*

^a * = İstatistiksel olarak anlamlı (Student 's t test)

Deney ve kontrol gruplarındaki Cys C düzeyleri ve klinik değişkenler arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde, her iki gruptaki klinik indekslerin ortalaması ve Cys C düzeyi arasında önemli bir korelasyon bulunamadı (P>0.05).

TARTIŞMA

Cystatinler putatif periodontopatojenlerce ortaya çıkarılan cysteine proteinazların proteolitik etkilerine karşı koruma sağlarlar. Bu bakteriyel cysteine proteinazlar ağız boşluğuna kolonize olmak ve yayılmak için mikroorganizmalarca kullanılırlar. Ayrıca, cysteine proteinazlar tükürüğün koruyucu proteinlerini ve immünoglobulinleri degrade ederler. Cystatinler, periodontal cebin içindeki katepsin B, H ve L tarafından oluşturulan kemik rezorpsiyonuna karşı korumada biyolojik role sahiptir (4). Tükürük cystatinleri periodontal hastalık sırasında periopatojenik bakterilerden yada inflamatuvar hücrelerden (katepsin B, H ve L) salınan cystein proteinazların proteolitik aktivitesine karşı ağız boşluğunun korunmasında önemli bir role sahiptir çünkü lizozomal cystein proteinazların aktivasyonu patolojik durumlar altında geri dönüşümsüz doku yıkımına yol açmaktadır (10).

İnflamatuvar hastalıkların gelişmesi sırasındaki hücrel ve moleküler olaylar, matriks proteinlerinin degradasyonunu, antijen sürecini ve nötrofil kemo-taksisini etkileyen konak lizozomal cystein proteinazların salınmasına eşlik eder. Bu çalışmada, cysteine proteinaz inhibitörü olan Cys C'nin aktivitesinin periodontitis grubunda kontrol grubuna oranla daha düşük bulunması, periodontitis hastalarında proteinazlar tarafından bu inhibitörün kullanımında artış olduğunu düşündürmektedir. Porphyromonas gingivalis ve Prevotella intermedia'nın Cys C tarafından modifiye olan proteinazların salınmasına neden oldukları gösterilmiştir (23). Bu bakteriler periodontitisdeki önemli periopatojenlerdir, Cys C'nin azalan aktivitesi bu bakteriyel proteinazların modifiye eden etkisiyle açıklanabilir. Ayrıca, proteinaz inhibitörlerinin, Porphyromonas gingivalis, Prevotella nigrescens ve Prevotella intermedia'nın çoğalmasını azalttıkları



gösterilmiştir, bu nedenle Cys C aktivitesinin azalması bu bakterilerin çoğalmasını artırarak periodontal hastalık sürecine katkıda bulunabilir (24). Diğer yandan, azalmış cys C aktivitesi granuler ve/veya lizozomal proteinazların fazla salınmasına yol açar ki, bu bireyleri periodontal hastalıklara karşı yatkın duruma getirir. Henskens ve arkadaşları periodontitis hastalarında tükürükte cystatin aktivitesindeki artışı göstermiştir (25). Onlar, bu artışın ağız boşluğundaki inflamatuvar duruma tükürük bezlerinin cevabından dolayı olduğunu öne sürmüşlerdir.

Diğer bir çalışmada periodontal olarak sağlıklı bireylerle hastalıklı kişiler arasında tükürük Cystatin aktivitesi arasında önemli bir fark bulunmamıştır (26). Bu çalışmanın sonuçlarındaki farklılık, benzer klinik belirtileri gösteren hastalarda bile kompleks hücresel olaylardaki değişikliklerin cystatin düzeylerindeki büyük değişikliklere yol açması yüzünden olabilir.

Diğer çalışmalar sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında periodontitisli hastaların tükürüğünde cystatin aktivitesi ve Cys C düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir (4,10,19,27).

Tükürük proteinlerinin sekresyonunda sigaranın etkileri tam olarak bilinmemekle beraber, sigara içen bireylerde lizozim ve lactoferrin gibi antimikrobial tükürük proteinlerinin önemli derecede düşük olduğunu gösteren çalışmalar vardır (13). Daha önce yapılan bir çalışmada sigaranın cystatinlerin tükürük sekresyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir (13). Bu çalışmanın sonuçları, sigara içen bireylerde dişeti iltihabı süresince cystatin aktivitesi ve Cys C üretiminde azalma olduğunu gösterdiğinden çalışmamızda hem hasta hem de kontrol grubumuzu sigara içmeyen bireylerden oluşturduk.

Sonuç olarak Cys C'nin periodontal hastalıkların patogenezinde rol oynadığı düşünülmekte ve tükürüğün cysteine proteinaz engelleme kapasitesindeki yetersizliğin periodontal hastalığa yatkınlık yarattığı izlenimini vermektedir. Bununla beraber tükürükteki Cys C nin düzeyinin ölçülmesinin yalnızca akut dö-

nemin ve hastalık sürecinin belirleyicisi olarak kullanılabileceği tartışmalı olup, bunu da klinik durumu tam olarak yansıtmayı yansıtmadığı ileri araştırma konularını oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Loe H, Theilade E, Jensen SB. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36, 177-187.
2. Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Good JJ, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. (1982) Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infection and Immunity* 38, 651-667.
3. Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Good JJ, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. (1984) Bacteriology of experimental gingivitis in children. *Infection and Immunity* 46, 1-6.
4. Henskens YMC, Van den Keijbus PAM, Veerman ECI, Van der Weijden GA, Timmerman MF, Snoek CM, Van der Velden U, Nieuw Amerongen AV. (1996) Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA. *J Periodont Res.* 31, 57-65.
5. Mayrand D, Holt SC. (1988) Biology of asaccharolytic black-pigmented bacteroides species. *Microbiol Rev.* 52, 134-152.
6. Birkedal-Hansen I. (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res.* 28, 500-510.
7. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. (1992) Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumor tissues. *Biochem.* 282, 273-278.
8. Delaisse JM, Eeckhout Y, Vaes G. (1980) Inhibition of bone resorption in culture by inhibitors of thiol proteinases. *Biochem J.* 192, 365-368.
9. Delaisse JM, Eeckhout Y, Vaes G. (1984) In vivo and in vitro evidence for the involvement of cysteine proteinases in bone resorption. *Biochem Biophys Res Com.* 125, 441-447.
10. Henskens YMC, Van der Weijden FA, Van den Keijbus PAM, Veerman ECI, Timmerman MF, Van der Velden U, Nieuw Amerongen AV. (1996) Effect of Periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. *J Periodontol* 67, 205-212.
11. Noorden van CJF, Everts V. (1991) Selective inhibition of cysteine proteinases by Z Phe-

- AlaCH2F suppresses digestion of collagen by fibroblasts and osteoclasts. *Biochem Biophys Res Com.* 178, 178-184.
12. Barret AJ, Fritz H, Grubb A. (1986a) Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J.* 236, 312.
13. Lie MA, Loos BG, Henskens YMC, Timmerman MF, Veerman ECI, Van der Velden U, Van der Weijden GA. (2001) Salivary cystatin activity and cystatin C in natural and experimental gingivitis in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 28, 979-984.
14. Abrahamson M, Salvesen G, Barret AJ, Grubb A. (1986) Isolation of six proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem.* 261, 11282-11289.
15. Abrahamson M. (1993) Cystatin-Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases. *J Braz assoc Adv Sci.* 45, 299-304.
16. Grubb A, Löfberg H. (1982) Human γ -trace, a basic microprotein : amino acid sequence and persence in the adenohipophysis. *Proc natl Acad Sci (USA)* 79, 3024-3027.
17. Isemura S, Saitoh E, Ito S, Isemura M, Sanada K. (1984) Cystatin S: a cysteine proteinase inhibitor of human whole saliva. *J Biochem.* 96, 1311-1314.

AÇIKLAMALAR

Bu makalenin yazılması sırasında değerli önerilerini le bize yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Kaya EREN'e teşekkür ederiz.