

Köpeklerde Dişeti Sağlığı Üzerine Asitli İçeceklerin Etkisini Gösteren Deneysel Bir Çalışma

Recep ORBAK

Atatürk Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE

Ertuğ DAYI

Atatürk Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE

Mustafa ATASEVER

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Gıda Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 02.07.2001

Özet: Bu çalışmada amacımız hayvanlarda dişeti sağlığı üzerine asitli bir içeceğin etkisini araştırmak ve insanlarda dişeti hasarlarında asitli içeceğin etkisini vurgulamak için bir ön çalışma yapmaktır. Çalışmamız, periodontal ve sistemik olarak sağlıklı 20 köpek üzerinde yürütüldü (ranji:2,3-12 yıl; ortalaması : 8,3 yıl). Köpekler tesadüfi olarak iki eşit gruba ayrıldı. Köpekler çalışma boyunca çok sayıda ticari gıdalarla beslendi. İlave olarak, kontrol gruba hiçbir asitli içecek verilmezken, deney grubuna belirli aralıklarla, günlük 500 ml kadar, güçlü asitli bir içecek olan klasik kola (pH: 2,4) verildi. Başlangıçta, köpeklerin periodontal durumları, plak indeksi ve gingival indeks ile belirlendi. On iki hafta sonra aynı indeksler tekrar alındı. Aynı zamanda tüm köpeklerin dişetinden bir biyopsi örneği alındı. Alınan biyopsilerde, flow-cytometrik olarak proliferatif indeks (PI) ölçüldü. Gruplar arasındaki farkların önemi eşleştirilmiş-t testi ile değerlendirildi. Elde edilen verilere göre; periodontal durum, kontrol grubunda deney grubundan daha iyi bulundu. Kontrol grubunun periodontal indekslerinin başlangıç ve 12 hafta sonraki değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($p>0,05$), deney grubunda bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Hücre siklusunda DNA dağılım bölümleri göz önüne alınarak hücre oranları tespit edildi. Deney grubunda sabit DNA içeriğine sahip olan ve bölünmeden dinlenme fazında bulunan hücrelerin (G0), mRNA sentezinin artmasıyla proliferasyon fazına geçen hücrelere (G1) oranı (G0/G1) düşük bulundu. Aynı şekilde sentez fazını takiben proliferasyona uğrayan hücrelerin (G2) Mitoza (M) oranı da (G2/M) düşük bulundu. Bu fazların aksine sentez fazı (S) ve PI fazı yüksek olarak bulundu. Deney köpek hücre popülasyonlarının, kontrol gruplarıyla karşılaştırılmasında aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sonuç olarak, yaygın olarak tüketilen ülkelerde, asitli içecekler bireylerin oral sağlıkları için potansiyel bir risk faktörüdür. Asitli içeceklerle gingivitis arasında sıkı bir ilişki vardır. Yüksek oranda asit içeren kola oral mukozada erosiv bir etki oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Köpekler, Dişeti sağlığı, Flow-cytometre, Kolalı içecekler

An Experimental Study on the Effect of Acidic Drinks on Gingival Health in Dogs

Abstract: The aim of this study was to conduct a preliminary investigation on the effects of cola drink consumption on gingival health in dogs and thereafter to come up with an opinion as to what extent cola consumption has an impact on gingival health in humans. The study was carried out on 20 healthy dogs (range 2.3-12 years; mean 8.3 years). The dogs were randomly divided into two equal groups. The control group was not given anything containing acid, while the experimental group was given classic Coca Cola® (pH: 2.4) (500 ml daily). All the dogs were fed a number of different commercial diets throughout the study. Gingival index (Löe-Silness) and plaque index (Silness-Löe) scores were utilized in order to assess the periodontal status of the dogs. These scores were re-evaluated after 12 weeks. At the same time, a biopsy was taken from the gingiva. The biopsy samples were examined by flow-cytometry, thus the proliferative index (PI) was determined. The significance of the differences was assessed using the paired t-test. The findings suggested that the periodontal condition the control group was better than the experimental group. While the difference between the evaluations at the beginning and after 12 weeks was not found to be statistically significant in the control group ($p>0.05$), this difference was found to be statistically significant in the experimental group ($p<0.001$). Considering the DNA distribution fraction of the cell cycle, the rates of cells were determined. In the experimental group, the ratio of cells having stable DNA content, and which were not in the mitotic phase (G0), to the cells which transform into the proliferation phase with the increase in mRNA synthesis (G1) (G0/G1) was found to be low. Similarly, the ratio of cells which proliferated following the synthesis phase (G2), to cells in the mitotic phase (M) (G2/M) was determined to be low. Contrary to this, both the synthesis phase (S) and the PI phase were seen to be high. The difference between the experimental group and the control group was statistically significant. In conclusion, acidic drinks are a potential risk factor for oral health. Cola that contained high acid resulted in erosive lesions in the oral mucosa.

Key Words: Dogs, Gingival health, Flow-cytometry, Cola drinks

Giriş

Asırlardır insanlar, toplumun yöresel ve kültürel özelliklerine göre hazırlanan doğal içecekleri içerlerdi. İnsanlığın ilerlemesi, sanayileşme ve gıda teknolojisinin gelişmesi ile alkollü içecekler ve doğal içecekler dışında bir çok yeni tatlar ve içecekler keşfedildi. Bu içecekler içime hazır şekilde insanların beğenisine sunuldu ya yemeklerle ya da yemek aralarında çok miktarda tüketilmeye başlandı (1). Tüm dünyada en popüler olan asitli içki koladır (2,3). Ülkemizde bu konuda yapılmış çalışmalar olmamasına karşın, gözlemler kolanın tüketiminin önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir. Ancak, tüketimin boyutlarının gösterilmesi için kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Son yıllarda, kola tüketiminin insan sağlığı üzerine olan etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır (4-10). Bu çalışmaların bir kısmında kolanın dişler için erosiv bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (11-15). Keza yapılan bir in vitro çalışmada 4 saat süreyle fosforik asit ihtiva eden bir içeceğin içine konulan sıgır diş minelerinde de derin eroziv lezyonlar gösterilmiştir (16). Başka bir deneysel çalışmada ise deneklerde, sitrik asit ihtiva eden meşrubatların, ağız pH'nı etkilediği bulunmuş olup, en düşük pH değerinin dilin dorsal yüzeyinde olduğu tesbit edilmiştir (17).

Bu çalışmada amacımız hayvanlarda dişeti sağlığı üzerine asitli bir içeceğin etkisini araştırmak ve insanlarda dişeti hasarlarında asitli içeceğin etkisini vurgulamak için bir ön çalışma yapmaktır.

Materyal ve Metot

Periodontal açıdan sağlıklı 20 köpek (ranjı: 2,3-12 yıl; ortalama: 8,3 yıl) araştırmada kullanıldı. Araştırma kapsamına alınan köpekler Erzurum ve çevresinde yaşayan Anadolu çoban köpeği ırkından olup 12'si erkek, 8'i dişi idi. Köpeklerin kilosu 47-56 kg arasında değişmekteydi. Köpekler araştırma protokolü gereği tesadüfi olarak 2 eşit gruba ayrıldı. Günlük beslenmeleri haricinde kontrol grubunu oluşturan köpeklere kola verilmezken, ikinci grubu oluşturan köpekler günlük 500 ml klasik kola ile muameleye tabi tutuldu. Uygulama 3 öğünde yapıldı. Aynı işleme 12 hafta devam edildi.

Köpeklerin başlangıç gingival indeks (Löe-Silness) (18) ve plak indeks (Silness-Löe) (19) değerleri kaydedildi ve 12 hafta sonra bu indeks skorlarına tekrar bakıldı. Ayrıca 12 hafta sonra gingivadan küçük bir biyopsi örneği alındı. Alınan biyopsi materyallerini süspansiyon haline getirmek için önce bistüri ile küçük parçalara ayrıldı ve daha sonra belirli büyüklükte filtrelerden geçirildi.

Hücrelerin izolasyonundan ve saf eldesinden sonra fluoresan bağlı monoklonal antikor[§] ile muameleye tabi tutuldu. İşaretsiz monoklonal antikorla birleşmiş hücrelerin flow-cytometri'de analizi için ikinci bir işaretli monoklonal antikor, hücrelere bağlı bulunan birinci antikora bağlandı (20). Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için üç kez phosphate buffer solution (PBS) ile yıkanan hücrelere formalin eklendi ve sonuçta hücreler flow cytometri'de analize hazır hale getirildi.

Süspansiyon halindeki hücreleri flow-cytometri cihazına vermeden önce, flow- cytometri cihazının ana parçaları olan; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistemi, cam veya quartzdan yapılmış ve büyük huniye benzer akış kabini, süspansiyonun huniye benzer yapının alt açıklığına doğru yönlendirmesini sağlayacak olan akış sistemi (Sheat Fluid), ışık kaynağı (lazer ışığı), çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, ayırma mekanizması (cell sorting) ve sinyal dedektörleri kontrol edildi. Verilerin toplanması, saklanması, sunumu ve analizini yapan bilgisayar ve elektronik sistemler devreye sokuldu.

Daha sonra süspansiyon halindeki işaretli partiküllerin hava basıncıyla Sheat Fluid içinden geçirilmesi sağlandı. Sheat Fluid içindeki sıvının akışının çok hızlı olması yüksek bir basınç oluşturdu ve bu basınç ile hücreler cam veya quartzdan yapılmış akış kabinine getirildi. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminer akışı hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağladı. Tek sıra halindeki hücreler lazer ışığının içinden geçerek görünür hale getirildi. Böylece pozitif hücrelerin sayısı ve yüzdesi ölçüldü (20).

Flow cytometrik analizi (FCA) bir Epics Elite EST flow cytometresi kullanılarak yapıldı.* GO/G1, S ve G2/M hücre siklüs fazlarındaki hücre fraksiyonları multicycle DNA bilgisayar programı[¶] tarafından hesaplanan DNA hücre siklusu dağıtım fraksiyonu ile belirlendi (21). Bu değerler proliferatif indeks (PI) ile daha ileri bir analize tabii tutuldu (22).

[§] Clone PC10, Dako, Glostrup, Denmark.

* FACS analyser/Becton & Dickinson, Mountain View, CA,USA.

[¶] Simultest Immune Monitoring Software/Becton & Dickinson, Mountain View, CA,USA.

Hücre siklusunda DNA dağılım bölümleri göz önüne alınarak hücre oranlarına bakıldı. Deney grubunda sabit DNA içeriğine sahip olan ve bölünmeden dinlenme fazında bulunan hücrelerin (G0), mRNA sentezinin artmasıyla proliferasyon fazına geçen hücrelere (G1) oranına (G0/G1), benzer şekilde sentez fazını takiben proliferasyona uğrayan hücrelerin (G2) Mitoza (M) oranı (G2/M) bakıldı. Ayrıca aksine sentez fazı (S) ve PI fazı değerlendirildi.

$$PI = \frac{S+G2/M}{G0/G1+S+G2/M} \times 100$$

Gruplardan elde edilen gingival indeks, plak indeks ve hücre siklus analiz değerleri eşleştirilmiş-t testi ile karşılaştırıldı.

Bulgular

Kolanın temel bileşenleri Tablo 1'de verildi. Klasik kola karbonhidrat yönünden oldukça zengin olup 110 gr/l karbonhidrat içermektedir. Oldukça asitli içeceklerdir (pH: 2,4) ve titre edilebilir asiditesi 10 ml NaOH N/1'dir.

Periodontal durum, kontrol grubunda deney grubundan daha iyi bulundu. Kontrol grubunun periodontal indekslerinin başlangıç ve 12 hafta sonraki değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmazken ($p>0,05$), deney grubunda bu fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0,001$), (Tablo 2).

Deney köpek hücre popülasyonlarının kontrol köpek hücre popülasyonlarıyla karşılaştırılmasında G0/G1 ve G2/M fazlarının düşük olduğu S ve proliferatif indeks (PI) fazlarının yüksek olduğu bulundu. Deney ve kontrol gruplarının 12 hafta sonraki G0/G1 ortalama değerleri farkı $P<0,01$ düzeyinde, G2/M ortalama değerleri farkı $p<0,05$ düzeyinde, S ortalama değerleri farkı $p<0,001$ düzeyinde anlamlı bulundu. Keza proliferatif indeks değerleri arasındaki fark da ileri düzeyde anlamlı bulundu ($p<0,001$), (Tablo 3).

Tartışma

Dişeti iltihabının ve diş çürüğünün asıl etkeni bakteri plağıdır. Bununla birlikte yaş, cinsiyet, oral hijyen alışkanlıkları, sosyo-ekonomik durum, sigara içme ve diyet gibi diğer faktörlerde risk faktörü olarak tanımlanmıştır (23-25).

Sunulan bu çalışmada da, köpeklerde asitli bir içeceğin, dişeti ve oral mukoza sağlığı üzerine olan kısa dönem etkileri hem klinik hem de flow-cytometrik analizlerle değerlendirildi.

Çalışmamızda, köpekler günde bir öğün (sabah) beslendi. Bu yöntem en çok tercih edilen ve önerilen bir yöntemdir (26,27). Daha sonra deney grubu köpeklere asitli içecek olarak hem yaygın tüketilmesi, hem de güçlü asidik özelliği olması nedeniyle klasik kola verildi (22). Tablo 1'den de görüleceği üzere light kolada karbonhidrat

Tablo 1. Klasik ve light kolaların içeriği.

	Sükroz (g/L)	Glükoz (g/L)	Fruktoz (g/L)	Sodyum (mg/L)	Fosfor (mg/L)	Potasyum (mg/L)	PH (mg/L)	Kafein (mg/L)
Kola klasik	40	35	35	15-50	300	10	2.4	125
Kola light	0	0	0	15-50	300	10	2.4	---

	Plak İndeks		Gingival İndeks	
	Ortalama±S.Sapma	P	Ortalama±S.Sapma	P
DENEY	Başlangıç	0,97±0,26	0,83±0,31	
	12 hafta sonra	1,91±0,53	2,00±0,22	<0,001
KONTROL	Başlangıç	0,93±0,25	1,12±0,45	
	12 hafta sonra	0,94±0,27	1,01±0,27	>0,05

Tablo 2. Kontrol ve deney grubunda başlangıç ve 12 hafta sonraki plak ve dişeti kanama indeks değerleri ve bunların istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Parametre	Kontrol Grubu		Deney Grubu		p
	n	Ortalama±S.Sap.	n	Ortalama±S.Sap.	
GO/G1 (%)	10	82,91 ± 9,12	10	73,70 ± 5,91	<0,01
G2/m (%)	10	4,16 ± 2,79	10	2,43 ± 2,10	<0,05
S (%)	10	9,79 ± 0,98	10	32,17 ± 9,89	<0,001
PI	10	15,52 ± 7,83	10	34,81 ± 6,98	<0,001

Tablo 3. Oral mukoza hasarı yapan kolanın flow-cytometrik analizi.

mevcut olmadığı için tercih edilmedi. Nitekim, *Streptococcus mutans*'in kolada bulunan sükröz, glüköz ve fruktozu hızla metaboliye ederek laktik asit oluşturduğu, sonuçta pH'ı hızla düşürdüğü ; çok kısa zaman içinde pH'ı 4'e kadar düşürdüğü bildirilmiştir. Nitekim pH'ın 5.5 altına düşmesi diş minesini için eroziv bir ortam oluşturacağı belirtilmiştir. Ayrıca *Streptococcus mutans*'in sukrozu kullanarak bakterilerin diş yüzeyine yapışmasını sağlayan dextranı sentezlediği gösterilmiştir (28). Diş çevresinde biriken bakteri plağı sadece gingivitise neden olabileceği gibi, ilerleyerek diş çevresindeki periodontal dokuları etkileyerek periodontitisi de oluşturabilir (28,29). Nitekim periodontitisin her zaman gingivitis olarak başladığı görüşü çoğu çalışmada desteklenmiştir (30,31).

Enfekte dokunun en önemli özelliği dişeti kanamasıdır (28,29). Bu durum plak ve diştaşı birikimiyle doğru orantılıdır (29). Dişeti dokusunda dişeti sağlığı en doğru ve en kolay şekilde Löe ve Silness'in (18) gingival indeksiyle belirlenirken yine mevcut plak durumu Silness ve Löe'nin (19) plak indeksiyle belirlenebilir. Çalışmamızda da bu indekslerden yararlanılarak dişeti iltihabı ve plak durumu tespit edildi. Elde edilen verilerden kolanın dişeti çevresinde plak birikimini artırdığı ve gingivitise neden olduğu belirlendi. Deney grubunda, gingival ve plak indekslerinin başlangıç ve 12 hafta sonraki değerleri karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu bulundu ($p<0,001$).

Kaynaklar

- Guesry, P.R.: The nutritional role of soft drinks during childhood and adolescence. Nestle Nutrition Workshop Series Volume 37. Feeding from toddlers to adolescence (eds. Ballabriga A) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996, p.169-185.
- Pepsi Cola company annual report 1993, Purchase, New York.
- Coca Cola company annual report 1993, Atlanta, Georgia.
- Kapıcıoğlu, S., Baki, A., Reis, A., Tekelioğlu, Y.: Cola drinks consumption and oesophagitis. Dis. Esophagus. 1999; 12, (4): 306-308.
- Wjin, J.F.: Obesity in children. III. Feeding pattern in relation to the possible development of obesity. Tijdschr-Kindergeneesk. 1981; 49, (6): 214-220.

6. Kneepkens, C.M., Hoekstra, J.H.: Chronic nonspecific diarrhea of childhood: pathophysiology and management. *Pediatr. Clin. North Am.* 1996; 43, (2): 375-390.
7. Gilbert, T.S.: Obesity among Navajo adolescents: relationship to dietary intake blood pressure. *Am. J. Dis. Child.* 1992; 146: 289-295.
8. Carson, C.A., Cauley, J.A., Caggiula, A.W.: Relation of caffeine intake to blood lipids in elderly women. *Am. J. Epidemiol.* 1993; 138, (2): 94-100.
9. Hintz, H.F.: Calcium, cola, calamity. *Cornell. Vet.* 1980; 70, (1): 3-9.
10. Mazariegos-Ramos, E., Guerro-Romeo, F., Rodriguez-Moran, M.: Consumption of soft drinks with phosphoric acid as a risk factor for the development of hypocalcemia in children. *Pediatrics.* 1995; 126, (6): 940-942.
11. Mistry, M., Greenby, T.H.: Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. *Caries. Res.* 1993; 27, (1): 21-25.
12. Greenby, T.H.: In vitro experiments on effect of soft drinks on dental enamel. *Oralprophylaxe.* 1990; 112, (3): 103-113.
13. Koufman, J.A.: The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GORD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24 hour pH monitoring and experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope.* 1991; 6: 895-900.
14. Holloway, P.J., Mellanby, M., Steward, R.J.C.: Fruit drinks and tooth erosion. *Br. Dent.* 1985; 104: 305-309.
15. Meurman, J.H., Frank, R.M.: Progression and surface ultra structure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res.* 1991; 25: 81-87.
16. Meurman, J.H., Rytömaa, I., Kari, K., Laakso, T., Murtomaa, H.: Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries. Res.* 1987; 21: 353-359.
17. Rytömaa, F., Meurman, J.H., Koskinen, J., Laakso, T., Gharazi, L., Tarunen, R.: In vitro erosion of bovine enamel caused by acidic drinks and other foodstuffs. *Scand. J. Dent. Res.* 1988; 96: 324-333.
18. Löe, H., Silness, J.: Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta. Odont. Scand.* 1963; 21: 533-551.
19. Silness, J., Löe, H.: Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta. Odont. Scand.* 1964; 22: 121-135.
20. Riley, R.S., Mahin, E.J.: Analysis of cell surface antigens. In clinical applications of flow cytometry. Washington: ASCP National Meeting, 1989, p. 22-62.
21. Janossy, G., Amlot, P.: Immunofluorescence and immunohistochemistry. In: Klaus GGB. Lymphocytes a practical approach. Oxford: IRL Press. Ltd. 1987, p. 67-108.
22. Kıpıcioğlu, S., Baki, A., Tekelioğlu, Y., Araz, K.: The effect of cola consumption on oral mucosa in rats. *Dis. Esophagus.* 2000; 13: 69-71.
23. Löe, H.A., Anerud, A., Boysen, H., Marrison, E.: Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan Laborers 14 to 16 years of age. *J. Clin. Periodontol.* 1986; 13: 431-440.
24. Honkala, E., Freeman, R.: Oral hygiene behaviour and periodontal status in European adolescents: an overview. *Comm. Dent. Oral. Epidemiol.* 1988; 16: 194-198.
25. Kornman, K.S., Löe, H.: The role of local factors in the etiology of periodontal diseases. *Periodontology 2000.* 1993; 2: 83-97.
26. Fraser, C.M., Bergeron, J.A., Mays, A., Aiello, S.E.: The Merck veterinary manual. A handbook of diagnosis, therapy, and disease prevention and control for the veterinarian. 7th ed, Merck and Co., Inc Rahway NJ USA. 1991.
27. Leitbetseder, J.: The nutrition of the dog. 2nd ed., Roche F. Hoffmann-La Roche and Co. Ltd., Basle, Switzerland, 1976.
28. Lindhe, J.: Textbook of clinical periodontology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1983. p.77-79.
29. Carranza, F.A.: Clickman's clinical periodontology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1996, p. 486-604.
30. Baelum, V., Fejerskov, O., Karring, T.: Oral hygiene, gingivitis and periodontal breakdown in adult Tanzanians. *J. Periodont. Res.* 1986; 21: 221-232.
31. Grier, R.E., Janes, D.R.: Dental management of the pregnant patient. *Dent. Clin. North. Am.* 1983; 27: 419-428.
32. Çelenigil-Nazlıel, H., Ayhan, A., Uzun, H., Ruacan, S.: The effect of age on proliferating cell nuclear antigen expression in oral gingival epithelium of healthy and inflamed human gingiva. *J. Periodontol.* 2000; 71, (10): 1567-1574.
33. Grassel-Pietrusky, R., Hornstein, O.P.: Flow cytometric measurement of ploidy and proliferative activity of carcinomas of the oropharyngeal mucosa. *Arch Dermatol. Res.* 1982; 273 (1-2): 121-128.