

مقایسه غلظت اکسید نیتریک بزاق با مقدار پوسیدگی در کودکان ۱۲-۶ ساله

دکتر شهرزاد جوادی نژاد^{*}، دکتر مرتضی طالبی^۱، دکتر گل ناز اصلانی^۲

چکیده

مقدمه: به تازگی بر نقش نیترات‌ها و نیتريت‌های موجود در بزاق برای حفاظت در برابر بیماری‌های دهانی و گوارشی تأکید زیادی می‌شود. در انسان، نیترات توسط تنفس باکتریایی به نیتريت و نیتريت هم در محیط اسیدی به اکسید نیتریک (NO) تبدیل می‌شود. NO رادیکال بسیار فعالی است که در مکانیزم‌های دفاعی غیر اختصاصی حفره دهان از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. هدف از پژوهش حاضر، تعیین میزان NO و مقایسه آن در بزاق کودکان دوره دندانپزشکی مختلط با مقدار پوسیدگی متفاوت، می‌باشد.

* استادیار، گروه دندان پزشکی کودکان، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان
javadinjad@dental.khuisf.ac.ir

۱: استادیار، گروه آموزشی شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه اصفهان

۲: دندان پزشک

مواد و روش‌ها: ۳ گروه ۱۰ تا ۱۲ ساله با $dfs \leq 1$ ، $10 < dfs < 5$ و $dfs > 10$ انتخاب شدند. از هر بیمار حدود ۲ میلی لیتر نمونه بزاق گرفته، به آزمایشگاه فرستاده شد. در آزمایشگاه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی یونی، غلظت NO محاسبه گردید. آنالیز آماری به کمک آزمون‌های ANOVA و t- student صورت گرفت.

این مقاله در تاریخ ۸۶/۱/۲۰ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۸۶/۲/۹ اصلاح شده و در تاریخ ۸۶/۳/۸ تأیید گردیده است.

یافته‌ها: با توجه به بررسی غلظت انجام شده در ۳ گروه، میانگین غلظت NO در گروه $dfs \leq 1$ با دو گروه دیگر اختلاف آماری معنی‌دار داشت؛ ولی میانگین غلظت NO در دو گروه $dfs < 10$ و $dfs > 10$ اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. به طور کلی میانگین غلظت NO در سطوح مختلف پوسیدگی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشت.

مجله دانشکده دندان پزشکی اصفهان
۱۳۸۶؛ ۲(۳): ۷۱ تا ۷۵

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های پژوهش، با افزایش مقدار پوسیدگی غلظت NO نیز افزایش می‌یابد. تشکیل NO ممکن است از مکانیزم‌های دفاع میزبان محسوب شود.

کلید واژه‌ها: اکسید نیتریک، بزاق، پوسیدگی

مقدمه

پوسیدگی یک بیماری عفونی است که توسط باکتری‌های پلاک دندانی ایجاد می‌شود. کلیه روش‌های پیش‌گیری و متوقف کردن پوسیدگی و بیماری‌های پریدونتال یا بر کاهش بیماری‌زایی ارگانیزم‌ها، یا تلاش برای بهبود قدرت دفاعی دندان‌ها و نسوج پریدونتال و یا بالا بردن قابلیت ترمیم آنها تأکید می‌کنند [۱].

سیستم دفاعی بزاق شامل فاکتورهای مشخصی است. به تازگی، تأکید زیادی بر نقش ضد میکروبی نیترات‌ها برای حفاظت در برابر بیماری‌های گوارشی، پوستی و دهانی می‌شود [۲-۴] که امکان ارتباط این مواد با پوسیدگی دندانی را مطرح می‌کند.

اکسید نیتریک (NO) از دو راه ایجاد می‌شود. شیمیایی، از طریق متابولیسم نیترات خوراکی [۵] و آنزیمی، به واسطه تجزیه آل-آرژنین توسط آنزیم NO سنتتاز که از غدد بزاقی و سایر بافت‌ها ترشح می‌شود [۶]. در انسان، نیترات مواد غذایی از دئودنوم و روده وارد گردش خون شده، توسط سیستم انتقال فعال در غدد بزاقی تا ۱۰ برابر غلظت پلاسما تجمع می‌یابد [۷]. در انسان، نیترات ماده‌ای خنثی محسوب می‌شود و آنزیمی جهت تبدیل آن وجود ندارد. ولی در حفره دهان، نیترات بزاق در تماس با باکتری‌هایی قرار می‌گیرد که قادرند طی فرایند تنفس، نیترات را به نیتريت تبدیل کنند. در برخی نواحی حفره دهان، به خصوص کرپیت‌های زبان، باکتری‌ها در شرایط کم اکسیژن قرار می‌گیرند که تجزیه نیترات را تسهیل می‌کند. شرایط حفره دهان برای تجزیه نیترات در بین افراد مختلف تفاوت زیادی دارد [۸]. کاهش تولید نیتريت به هنگام مصرف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، تأییدی بر نقش باکتری‌ها در تجزیه نیترات است [۹]. در دهان آنزیم‌های نیترات ردوکتاز ترشح شده توسط میکروارگانیزم‌ها باعث تبدیل نیترات به نیتريت می‌شوند. فلور میکروبی پلاک دندانی شامل لاکتوباسیلوس، استرپتوکوک موتانس و اکتینومایسس، در محیط پوسیدگی اسید تولید می‌کنند که باعث اسیدی شدن نیتريت می‌شود [۱]. اسیدی شدن نیتريت تولید نیتروس اسید می‌کند. این اسید ناپایدار بوده، خود به خود تجزیه می‌شود و مخلوطی از اکسیدهای نیتروژن به ویژه NO را

تولید می‌کند [۱۰]. NO رادیکال بسیار فعالی است و در مکانیزم‌های دفاعی غیراختصاصی حفره دهان از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. NO در بخشی از مکانیزم نابودگری ماکروفاژها دخالت دارد [۱۱]. خاصیت ضد میکروبی NO از طریق تغییرات DNA کمپلکس‌های تنفسی و تقابل با سایر رادیکال‌ها نظیر سوپرکساید است [۱۲]. در مورد نقش NO در بیماری‌های مخاطی دهان، بیماری‌های پریدونتال و پوسیدگی، پژوهش‌های مختلفی به صورت آزمایشگاهی و بالینی انجام شده است.

Ohashi نمونه‌های مبتلا به لیکن پلان دهانی و زخم‌های آفتی راجعه را بررسی کرد. در این بیماران میزان NO بزاق نسبت به افراد سالم به طور معنی‌داری بیشتر بود [۱۳]. Allaker نقش NO را در بیماری‌های پریدونتال بررسی کرد. نتایج پژوهش وی نشان داد که در شرایط مناسب، NO بر رشد و بقای باکتری‌هایی نظیر *Fusobacterium nucleatum* و *Porphyromonas gingivalis* تأثیر می‌گذارد [۱۴]. Doel جهت بررسی تأثیر ضد پوسیدگی نیترات و نیتريت بزاق، شمارش لاکتوباسیل و استرپتوکوک موتانس و میزان پوسیدگی را بررسی کرد. افرادی که میزان نیترات و نیتريت زیادی داشتند، کاهش مشخصی در پوسیدگی نسبت به گروه شاهد نشان دادند [۱۵]. Carossa جهت بررسی خاصیت ضد باکتری NO، افزایش تولید NO در طی رسوب پلاک دندانی را بررسی کرد. مشخص شد که در طی رسوب پلاک، غلظت NO افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد که NO از اولین مکانیزم‌های دفاعی میزبان بر ضد پرولیفراسیون باکتریال پلاک است [۱۶]. Zetterquist ثابت کرد که چون ضخامت پلاک مانع نفوذ اکسیژن به لایه‌های عمقی‌تر می‌شود، میکروب‌های لایه‌های عمقی پلاک بی‌هوازی اجباری هستند. باکتری‌های بی‌هوازی اجباری وقتی در معرض مقادیر کم اکسیژن قرار می‌گیرند، آنزیم‌های نیتريت ردوکتاز را تولید می‌کنند. به همین دلیل در افرادی که پوسیدگی بیشتری دارند، میزان NO بیشتر است، چون در این گروه پلاک ضخیم‌تر است [۵]. Byinder غلظت NO بزاق و پلاک دندانی و ارتباط با پوسیدگی و رعایت

متوسط (dfs بین ۵ تا ۱۰)؛ و گروه سوم، گروه با پوسیدگی شدید (dfs بیشتر از ۱۰). قبل از نمونه‌گیری از بزاق، به کودکان آموزش داده شد که از خوردن و آشامیدن حداقل به مدت ۲ ساعت قبل از نمونه‌گیری خودداری کنند. جهت نمونه‌گیری از بزاق، کودکان به طور پیوسته و غیرتحریکی حدود ۲ میلی‌لیتر بزاق خود را در تیوب استریل می‌ریختند. تا زمان انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها در یخچال در دمای ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

در آزمایشگاه به هر نمونه بزاق، آب مقطر ۲ بار تقطیر عاری شده از یون اضافه شده، سپس روی کاغذ صافی واتمن ۵۴۱ صاف می‌شد و نیتریک اکساید (NO) استخراج می‌شد. سپس غلظت این یون به وسیله دستگاه کروماتوگرافی یونی مورد اندازه‌گیری قرار می‌گرفت. اندازه‌گیری با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی یونی (C 761 Metrohm Co, Swiss) صورت گرفت. سیستم به دکتور کداکتومتري مجهز است و تزریق نمونه به درون سیستم با استفاده از لوپ صورت می‌گیرد. ستون دستگاه عبارت است از یک ستون به ابعاد 3×150 میلی‌متر تحت عنوان Metrosep Anion Dual. غلظت یون NO بر حسب واحد μm از طریق ترسیم منحنی استاندارد مشخص می‌گردید. میانگین‌ها و انحراف معیارها محاسبه شدند. برای مقایسه میانگین غلظت، از آزمون ANOVA و t-student به کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

جدول شماره ۱، اطلاعات به دست آمده برای گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. میانگین غلظت NO در گروه اول ۳۸/۱، در گروه دوم ۵۱ و در گروه سوم ۵۳/۵ بود. در گروه با dfs بیشتر، میزان NO بیشتر بود. مقایسه میانگین غلظت بین گروه اول و دوم نشان داد که میانگین غلظت در گروه پوسیدگی متوسط بیشتر از گروه بدون پوسیدگی بود و با توجه به $p \text{ value} < 0/05$ ، اختلاف آماری میانگین غلظت معنی‌دار تلقی شد. مقایسه میانگین غلظت بین گروه اول و سوم نشان داد که میانگین غلظت در گروه پوسیدگی شدید بیشتر از گروه بدون پوسیدگی

بهداشت دهان را بررسی کرد. غلظت NO در پلاک بیشتر از بزاق بود. NO در گروه با OHI-S، DMFT بالاتر، بیشتر از گروه با مقادیر پایین این ایندکس‌ها بود [۱۷]. Tenuvoa میزان برخی مواد ضد میکروبی بزاق در کودکان بدون دندان و با دندان را با میزان این مواد در افراد بزرگسال جوان مقایسه کرد. میزان این مواد در کودکان به طور معنی‌داری کمتر بود [۱۸]. Radcliffe در پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان داد که نیتريت بزاق در شرایط اسیدی اثر بازدارنده‌ای بر رشد و بقای باکتری‌های پوسیدگی‌زا دارد [۱۹]. هدف پژوهش Silva Mendez، تأیید وجود یا عدم وجود اثر بازدارنده نیتريت در محیط اسیدی بر تعداد استرپتوکوک موتانس، لاکتوباسیلوس کازئو و اکتینومایسس بود. در pH کمتر از ۷، نیتريت باعث از بین رفتن کامل استرپتوکوک موتانس شد. این نتایج نشان دهنده امکان اثر نیتريت بزاق بر رشد و حیات باکتری‌های پوسیدگی‌زا می‌باشد [۲۰]. Xu نشان داد که انکوباسیون میکروب‌های بزاق در آزمایشگاه، باعث تولید نیتريت به میزان ۵۰ تا ۱۰۰ برابر کمتر از مقدار آن در بزاق می‌شود که دلیل آن وجود پلاک باکتریال در حفره دهان است [۸]. با توجه به تفاوت‌های موجود در مواد ضد میکروبی بزاق در کودکان [۱۸]، برای آزمون فرضیه ارتباط NO با مقدار پوسیدگی بر آن شدیم تا میزان NO بزاق را در کودکان در دوره دندان‌ی مختلط با مقدار پوسیدگی متفاوت، تعیین و مقایسه کنیم.

مواد و روش‌ها

کودکان مورد مطالعه شامل ۱۳ دختر و ۱۷ پسر مراجعه کننده به بخش کودکان دانشکده دندان‌پزشکی خوراسگان بودند. همه کودکان از سلامت کامل برخوردار بوده، هیچ یک داروی خاصی مصرف نمی‌کردند. متوسط سنی کودکان ۸ سال بود (محدوده سنی ۶-۱۲ سال).

میزان پوسیدگی بر اساس دستورالعمل WHO توسط محقق با استفاده از ایندکس dfs تعیین شد. بر اساس dfs ثبت شده، کودکان به ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه اول، گروه بدون پوسیدگی (dfs کمتر یا مساوی ۱)؛ گروه دوم، گروه با پوسیدگی

بود و چون $p \text{ value} < 0/05$ بود، اختلاف آماری میانگین غلظت معنی‌دار بود. مقایسه میانگین غلظت بین گروه دوم و سوم نشان داد که میانگین غلظت در گروه پوسیدگی شدید بیشتر از گروه پوسیدگی متوسط است و چون $p \text{ value} > 0/05$ بود، اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین غلظت‌ها وجود ندارد. میانگین غلظت NO در گروه‌های مختلف توسط آزمون ANOVA بررسی شد. با توجه به جدول شماره ۲ چون $0/05$

$p \text{ value} < 0/05$ بود، میانگین غلظت NO در سطوح مختلف پوسیدگی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت. چون در جدول آنالیز واریانس، اختلاف آماری معنی‌داری بین مقادیر مختلف NO داشتیم، از پس‌آزمون LSD استفاده کردیم تا معین گردد کدام دو گروه با هم اختلاف آماری معنی‌دار داشته، اختلاف کل را باعث شده‌اند که یافته‌های قبلی را تأیید کرد.

جدول ۱: میانگین غلظت NO در هر سطح پوسیدگی

آمار توصیفی	تعداد	میانگین NO بر حسب μm	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
غلظت NO در $dfs < 1$	۱۰	۳۸/۱	۷/۲۹	۳۱	۵۶
غلظت NO در $1 < dfs < 5$	۱۰	۵۱	۴/۴۲	۴۵	۵۸
غلظت NO در $dfs > 10$	۱۰	۵۳/۵	۶/۶۵	۴۶	۶۳

جدول ۲: آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (ANOVA) برای مقایسه میانگین غلظت NO در سطوح پوسیدگی مختلف

منبع تغییر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آمار f	value
بین گروهی	۱۳۶۶/۰۶۷	۲	۶۸۳/۰۳۳	۱۷/۵۰۷	۰/۰۰۱
درون گروهی	۱۰۵۳/۴	۲۷	۳۹/۰۱۵	-	-
کل	۲۴۱۹/۴۶۷	۲۹	-	-	-

بحث

بزاق و ترکیبات آن نقش مؤثری در مقابله با میکروب‌ها و روند پوسیدگی دارا هستند. در سالهای اخیر تأکید زیادی بر نقش نیترات‌ها و نیتريت‌ها و امکان ارتباط این مواد با پوسیدگی دندان، بیماری‌های پریودنتال و مخاط دهان مطرح شده است. چون امکان ارتباط نیترات‌ها و پوسیدگی به‌تازگی مطرح شده، پژوهش‌های محدودی در این زمینه وجود دارد.

در پژوهش حاضر، میزان NO حفره دهان در گروه‌های مختلف با میزان پوسیدگی متفاوت توسط آزمون t با یکدیگر مقایسه شدند و گروه بدون پوسیدگی به لحاظ میانگین غلظت NO با دو گروه دیگر اختلاف آماری معنی‌داری را نشان داد.

در پژوهش بالینی دیگری که میزان NO بزاق در دو گروه بیمار بزرگسال با پوسیدگی متفاوت توسط ایندکس DMFT مقایسه شده است، در گروه با DMFT برابر ۲/۷۲، میزان NO برابر با ۳۳/۲ و در گروه با DMFT برابر ۸/۷۲، میزان NO

مساوی ۷۱/۵ تعیین شد [۱۷] که با یافته‌های پژوهش ما مطابقت دارد؛ یعنی در گروه با پوسیدگی بیشتر، میزان NO بیشتر است. هر دو پژوهش نشان می‌دهد که پوسیدگی در حضور غلظت بالای NO کاهش نیافته است. یافته‌های Zetterquist در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر است. وی معتقد است که چون میکروب‌های لایه‌های عمقی پلاک بی‌هوازی اجباری هستند، وقتی در معرض مقادیر کم اکسیژن قرار می‌گیرند، آنزیم‌های نیتريت ردوکتاز را تولید می‌کنند. به همین دلیل در افراد با پوسیدگی بیشتر، میزان NO بیشتر است، چون در این گروه پلاک ضخیم‌تر وجود دارد [۵]. در مطالعه Doel، افرادی که میزان نیترات و نیتريت بیشتری داشتند، کاهش مشخصی در پوسیدگی نسبت به گروه کنترل نشان دادند [۱۵]. شاید بتوان این‌گونه تفسیر کرد که چون روند تبدیل نیتريت در محیط اسیدی پلاک انجام می‌شود [۱]، رسوب پلاک اجازه تبدیل نیتريت در سطوح اسیدی کمتر از ۷ و تولید NO سنتتاز را

می‌دهد که باعث تبدیل ال-آرژنین به NO می‌شود [۲۰]. در واقع بهداشت دهانی نامناسب، باعث تولید مقادیر زیاد NO می‌شود، ولی همراهی مقادیر زیاد NO با پوسیدگی بیشتر این نظریه را مطرح می‌کند که میزان بالای NO قادر نیست جلوی پوسیدگی‌زایی پلاک را بگیرد. شاید افزایش ضخامت پلاک و فعالیت پوسیدگی باعث این اختلاف باشد.

باید خاطر نشان کرد که ارزیابی هر نوع فاکتور ضد

پوسیدگی به تنهایی مشکل است، زیرا بزاق توانایی تغییر همه ترکیبات را به روش‌های مختلف داراست [۱۵] و هیچ ترکیب ضد باکتری بزاق به تنهایی در محیط دهان، در تعیین احتمال پوسیدگی تعیین‌کننده نیست [۲۱]. به علاوه پروتئین‌های ضد میکروبی با تضعیف یا تقویت اثر یکدیگر هم تقابل دارند، لذا با توجه به این یافته‌ها، نیاز به مطالعات بالینی بیشتری جهت تعیین ارتباط بین NO و پوسیدگی وجود دارد.

References

- De Soet JJ, de GJ. Microbiology of carious lesions. Dent Update 1998; 25(8):319-24.
- Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. Nat Med 1995; 1(6):546-51.
- Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M et al. Stomach NO synthesis. Nature 1994; 368(6471):502.
- Weller R, Price RJ, Ormerod AD, Benjamin N, Leifert C. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, Candida and bacterial skin pathogens. J Appl Microbiol 2001; 90(4):648-52.
- Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, Alving K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. Eur Respir J 1999; 13(2):327-33.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329(27):2002-12.
- Duncan C, Li H, Dykhuizen R, Frazer R, Johnston P, MacKnight G, et al. Protection against oral and gastrointestinal diseases: importance of dietary nitrate intake, oral nitrate reduction and enterosalivary nitrate circulation. Comp Biochem Physiol A Physiol 1997; 118(4):939-48.
- Xu J, Xu X, Verstraete W. Quantitative measurement of the nitrate reductase activity in the human oral cavity. Food Chem Toxicol 2001; 39(4):393-400.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. Gut 1994; 35(11):1543-6.
- Dougall HT, Smith L, Duncan C, Benjamin N. The effect of amoxycillin on salivary nitrite concentrations: an important mechanism of adverse reactions? Br J Clin Pharmacol 1995; 39(4):460-2.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997; 15:323-50.
- Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. J Clin Invest 1997; 99(12):2818-25.
- Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. J Oral Pathol Med 1999; 28(8):355-9.
- Allaker RP, Silva Mendez LS, Hardie JM, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. Oral Microbiol Immunol 2001; 16(4):253-6.
- Doel JJ, Hector MP, Amirtham CV, Al Anzan LA, Benjamin N, Allaker RP. Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries. Eur J Oral Sci 2004; 112(5):424-8.
- Carossa S, Pera P, Doglio P, Lombardo S, Colagrande P, Brussino L et al. Oral nitric oxide during plaque deposition. Eur J Clin Invest 2001; 31(10):876-9.
- Bayindir YZ, Polat MF, Seven N. Nitric oxide concentrations in saliva and dental plaque in relation to caries experience and oral hygiene. Caries Res 2005; 39(2):130-3.
- Tenovuo J. Antimicrobial agents in saliva--protection for the whole body. J Dent Res 2002; 81(12):807-9.
- Radcliffe CE, Akram NC, Hurrell F, Drucker DB. Effects of nitrite and nitrate on the growth and acidogenicity of Streptococcus mutans. J Dent 2002; 30(7-8):325-31.
- Silva Mendez LS, Allaker RP, Hardie JM, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on cariogenic bacteria. Oral Microbiol Immunol 1999; 14(6):391-2.
- Kirstila V, Hakkinen P, Jensch H, Vilija P, Tenovuo J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agent with caries increment and cariogenic micro-organisms. J Dent Res 1998; 77(1):73-80.