

Kaynak gösterilmeden kullanılamaz.

aydinmur@yahoo.com, m-aydin@doctor.com <http://www.aydinmur.com>

DİŞ ÇÜRÜĞÜ AŞILARI

Dr. Diş Hek. Murat AYDIN

Diş çürüğü sebebi olan (karyojenik) bakterilerin çoğunluğu mutans grubu streptokoklardır. Ağızın doğal savunmasının bir parçası olan salyadaki sekretuar doğal immünoglobulinlerin bir kısmı anti-mutans antikorlarıdır. Salyadaki bu doğal immünoglobulinler allel genlerden genetik olarak oryente edilir veya anne sütünden çocuğa geçer veya yaşamın erken çocukluk dönemlerinde kazanılır. Bu antikorlar aglütinasyon ve nötralizasyon yoluyla mutans streptokokları engelleyebilirler.

Her sağlıklı bireyde dişlerin yüzeyine bir yandan karyojenik bakteri kolonizasyonu olurken, diğer yandan salyadaki IgA antikorları ile bu bakterilerin diş sert dokularına adezyonu engellenir. Anti-mutans antikorlar her bireyin salyasında farklı konsantrasyonlarda bulunur. Yaşamın ilerleyen dönemlerinde salyadaki konsantrasyonu giderek artar. Bazı insanların salyasındaki anti-mutans IgA antikorları yüksek titrede bulunur ve diş çürüğüne dirençlidirler. Bu durum bazı bireylerin dişlerini yeterince fırçalamadıkları halde ağızlarında çürük bulunmayışını açıklar niteliktedir. Salyasındaki anti-mutans antikor titresi düşük olan bireyler diş çürüğüne istidatlıdır.

Son yıllardaki çalışmaların sonuçlarına göre, salyada bulunan ve diş çürüğünü engelleyen bu antikorları aşı ile bireye kazandırmak veya varsa konsantrasyonunu artırmak mümkün görünmektedir.

TARİHÇE:

Literatürde diş çürüğü aşısı üzerine başarısız çalışmalar vardır. Ölü mutans streptokoklardan hazırlanan bir aşı 1976 yılında injeksiyon yoluyla deney hayvanlarına uygulanmıştır. Streptokoklara karşı aşılanan deney hayvanlarının serumlarında gelişen özgül antikorlar kalp kası ile heterofil antikor reaksiyonu verip romatizal ateş sebebi olmuştur. Bu, ve benzer çalışmalar diş çürüğüne karşı aşı hazırlama çalışmalarının önünü tıkamıştır.

Daha sonraki yıllarda diş çürüğü aşısını kas içerisine değil ağıza damlatma şeklinde uygulanmış ve daha başarılı sonuçlar alınmıştır. Aşının ağıza damlatma

şeklinde uygulanması durumunda salyada özgül IgA artışı, serumdaki özgül IgG artışından fazla olmuştur. 1983, 1984 ve 1987 yıllarında 3 defa gönüllüler üzerinde buna benzer bir aşılama ağız yoluyla uygulanmış ve zararlı bir etki bildirilmemiştir. Fakat salyada oluşan anti-mutans antikorlarının titresi, çürükten koruyabilecek kadar yüksek olmamıştır.

Son yıllarda atenüe bakteri solüsyonunu tonsiller üzerine doğrudan damlatma şeklinde yapılan aşılamalarda salyadaki antikor titresi tatmin edici seviyede bulunmuş ve deney hayvanlarını çürükten korumak mümkün olmuştur. Ayrıca, zararlı bir etkiye rastlanmamıştır. Son on yıl içerisinde diş çürüğüne aşı hazırlanması çalışmaları artarak devam etmektedir.

AŞILAMA YOLU:

Atenüe edilmiş mutans grubu streptokok aşısını injeksiyon yolu ile kas içerisine, yutmak sureti ile sindirim kanalına, spreyci şeklinde nazal mukozaya veya damlatarak bademciklere uygulamak mümkündür. En fazla antikor indüksiyonu bademcikler üzerine damlatma şeklinde yapılan aşılama ile mümkün olmaktadır.

Nasal ve gastrik yoldan immünize edilen deney hayvanlarında zararlı bir etkiye rastlanmamıştır ama bu yoldan aşılama yapıldığında salyadaki karyojenik bakterileri nötralize edecek antikor titresi tatmin edici değildir. Tonsiller immünizasyon, hem nasal hem de gastrik immünizasyondan daha etkili bulunmuştur.

Yapılan deneyler göstermektedirki: *Streptococcus sobrinus* ve *S. mutans* formalin ile atenüe edilip deney hayvanlarına tonsiller yoldan uygulandığında salyada IgA seviyesi daha fazla olmakta, serumda özgül IgG antikor seviyesi pek az artmaktadır. Halbuki kas içerisine injeksiyon yolu ile aşılamada salyada pek az IgA antikoru oluşmakta, bu yol ile daha çok serumda IgG tipinde antikorlar oluşmaktadır.

Kuvvetli çürük yapan, *S. mutans* (Ingbritt suşu serotip c), ve *S. sobrinus* (AHT-k serotip g) saf kültürlerinden alınan 10^{10} hücre %10 luk formalinde bekletilerek atenüe edilmiş ve tavşanlara tonsiller ve intramüsküler yol ile 300 µl verilmiştir. 6 hafta boyunca, her 3 günde 1 defa olmak üzere bu işlem tekrarlanmıştır. Özgül antikorlar birinci haftanın sonunda görülmeye başlayıp, 5.inci haftada maksimuma ulaşmıştır. Tonsiller uygulamada salyada 1.6 µg/ml IgA, serumda 1.8 µg/ml IgG elde edilirken, intramüsküler uygulamada bu değerler sırasıyla 0.3 µg/ml IgA ve 2.0 µg/ml IgG olarak bulunmuştur.

Tonsil'ler, *Waldeyer's* lenf halkasının bir parçası olup, MALT tipinde dokulardır ve histolojik olarak barsaktaki *Peyer's* plaklarına benzerlik gösterir. Antijen, tonsillere temas eder etmez saatler ile ölçülebilen kısa bir sürede immün sisteme sunulur.

Tonsiller üzerine damlatma yolu ile yapılan aşılama, verilen atenue bakteri hücresi, konak tarafından nasıl muamele görmektedir? Bu soruya cevap aramak için yapılan bir çalışmada, floresan işaretli canlı *Candida albicans* hücre süspansiyonu (10^7 CFU) ve lipopolisakarit (LPS) çözeltisi (10 µg/ml) iki grup tavşanın tonsilleri üzerine 0.5 ml damlatılmış, daha sonra belirli zaman aralıklarında tonsil doku kesitleri incelenmiştir. *C. albicans*, 30 dakika içerisinde tonsillerinin kriptalarının kavimleri derinliklerinde epitel altına girmiştir (Halbuki aynı deneyde kandida yerine *S. pyogenes* kullanıldığında sadece kriptalara yapışmakta, tonsil epitelinin altına girmemektedir). Kandida hücreleri 60 dakika sonra tonsil foliküllerine; 180 dakika sonra tonsilin derin kortikal tabakalarına ve germinal merkeze girebilmiştir. Az sayıda kandida hücresi boyun derin lenf nodlarına ulaşmıştır. Bu sırada çok sayıda makrofaj ve T hücresi dokuya gelmiştir. Tonsiller üzerine damlatılan mikroorganizma değil antijen solüsyonu olduğunda penetrasyon daha derin olmuştur, LPS, 30 dakikada tonsil lenfoid foliküllerine, derin kortikal tabakalara girmiştir (Aynı deneyde LPS çözeltisi yerine çini mürekkebi kullanıldığında epitel altına penetre olması 1 gün sürer). LPS, 60 dakika sonra boyun derin lenf nodlarına ve aferent lenfatiklere penetre olmuş, bu sırada B hücreleri dokuya gelmiştir. LPS, 180 dakika sonra lenfoid folikülleri terkederek germinal merkezde toplanmış, bağ dokusuna sızmıştır.

Diş çürüğü aşısı için kullanılan tonsiller immünizasyon metodunda, hücre ve antijenin MALT dokudaki dağılımı muhtemelen buna benzer şekilde olmaktadır.

ADJUVAN KULLANIMI:

Eğer bu aşı kas içerisine yapıp serumda IgG cevabı arzu edilseydi tam veya tam olmayan *Freund's* adjuvanı ile kombine etmek iyi bir fikir olurdu. Halbuki hedeflenen ve artırılması arzu edilen bağışıklık mukozal bağışıklıktır.

Kolera vibriyosunun ürettiği toksinin B subünitinin mukozal immün cevabı artırdığı bilinir. Bu sebeple kombine edilmesi düşünülen adjuvan, kolera toksin B (KTB) olmuştur.

Kolera toksini, kolera vibriyosunun ısıya duyarlı enterotoksindir. Bu toksin A ve B olmak üzere iki subüniteden oluşur. A ve B parçaları tek başına toksik etkiye sahip değildir. B (binging) parçası taşıyıcıdır ve A parçasının konak hücresine adezyonu ve penetrasyonu sağlar. Dolayısıyla asıl toksik olan A parçasıdır. A ve B parçaları deney hayvanlarına ayrı-ayrı injekte edildiğinde toksik etki göstermez.

Konağa zarar verebilmesi için hem A hem B parçasının biraraya gelmesi gerekir. Bu sebeple B parçasının adjuvan olarak kullanılması konağa zarar vermez veya herhangi bir tehdit oluşturmaz.

KTB, 59 kDa ağırlığında bir polipeptittir. Her birisi 11.5 kDa olan peptit ünitelerinden meydana gelir. Kuvvetli immünojendir. Konağa temas ettiğinde kendisine karşı sekretuar antikor üretimini provoke eder.

KTB'nin bu özelliğinden faydalanılarak, atenüe streptokok aşısı ile kombine edilmesi düşünülmüştür. Tonsiller üzerine uygulandığında salyada antikor üretimini ne ölçüde artırdığını tespit edebilmek amacıyla yapılan bir çalışmada, tavşanlar, koyun eritrositleri(KE) ne karşı tonsiller yoldan immünize edilmiştir. Bir başka grup tavşan ise KE ve KTB karışımı ile immünize edilmiştir.

Tek başına KE kullanıldığında salyada IgA yapısındaki anti-KE antikorları 1.1 µg/ml ölçüldüğü halde, KE+KTB birlikte verildiğinde salyadaki antikor miktarı 1.38 µg/ml ölçülmüştür. Sadece KE ile immünize edilen tavşanların MALT ve RES dokularından 6 hafta sonra alınan örneklerde özgül IgA sentezi yapan hücre sayıları şöyle bulunmuştur: retrofaringeal lenfoid dokuda 500, nazal mukozada 1200, mezenterik lenfoid dokuda 1100, Peyer's plaklarında 800, parotis bezinde 4000, servikal lenf nodlarında 1500, palatin tonsilde 400, dalakta 8000 hücre/gr doku. Halbuki KE+KTB birlikte uygulandığında aynı değerler sırası ile 700, 1700, 2000, 1000, 5100, 2200, 600, 10000 hücre/gr doku şeklinde tespit edilmiştir.

Adjuvan olarak KTB kullanıldığında tonsiller immünizasyon ile yaklaşık %30 luk bir antikor artışı tespit edilmiştir. Herhangi bir olumsuz etki tespit edilmemiştir.

Mukozal immüniteyi artıran başka bir adjuvan IL-1'dir. Atenüe *S. sobrinus* solüsyonu yalnız başına ve IL-1 ile karıştırılarak tonsiller yoldan tavşanlara uygulandığında salyada oluşan antikorların streptokokları aglütine etme yeteneği %50 - %100 oranında artmıştır. Fakat bu adjuvan kullanıldığında *S. sobrinus*'un sadece hücre duvarındaki galaktoz'a karşı değil intraselüler proteinlerine karşı da antikorlar oluşmaktadır. Bu bir sakıncadır. IL-1 adjuvanı kullanılarak aşılanan tavşanlarda hücrel immünite artmış, serumlarında gamma Interferon seviyesi yükselmiş ve *S. sobrinus*'a karşı Tip-4 aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişmiştir. Bu adjuvan kullanılan deney hayvanlarının kulaklarında ödem gelişmiştir. Atenue streptokok aşılarında adjuvan olarak IL-1 kullanılması zararlı etkilere sebep olmuştur.

AŞININ ÖZGÜLLÜĞÜ ve KORUYUCULUĞU:

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda atenüe *S. sobrinus* g serotipinin tonsiller uygulaması ile oluşturulan antikorlar, diğer karyojenik bakteriler ile

çarpaz reaksiyon vermektedir. Örneğin *S. sobrinus* g serotipine karşı oluşan antikolar, *S. mutans* serotip a, serotip d ve serotip h ile reaksiyon vermektedir. Bu, önceden hedeflenmediği halde arzu edilen bir çarpaz reaksiyondur. Çünkü karyojenik bakterilerden bir tanesi için hazırlanan aşı, diğer karyojenik bakterilerin de mine yüzeyine adezyonuna engel olmaktadır. Salyada oluşan IgA tipindeki bu anti-streptokok antikoları şu bakterileri de aglütine edebilmektedir: *S. mutans* (B14 serotip e), *S. mutans* (OMZ 175 serotip f), *S. sobrinus* (OMZ176 serotip d), *S. criceteus* (HS-1 serotip a), *S. rattus* (BHT serotip b), *S. downei* (Mfe28 serotip h), *S. salivarius* (IFO 13956), *S. sanguis* (ATCC 10556), *Lactobacillus casei* (ATCC 393). Bunların hepsi çürük yapıcı bakterilerdir.

Salyadaki bu antikolar *Streptococcus pyogenes*'i de aglütine etmektedir. Bu klinik önemi olan bir bulgudur. Belkide gelecekte geliştirilmesi muhtemel bir çürük aşısı ile boğaz florasının en tedirgin edici patojeni olan *S. pyogenes* infeksiyonları da muhtemelen sınırlandırılabilir.

Bir çalışmada, karyojenik bir bakteri olan *S. sobrinus* saflaştırıldıktan sonra %10 formalin ile 24 saat bekletilmiş, bir grup (n=9) tavşanın bademcikleri üzerine 300 µl (10^{10} CFU) damlatılmıştır. Başka bir grup (n=3) tavşanın midesine aynı miktar bakteri solüsyonu instile edilmiştir. Bir başka grup (n=3) tavşana 6 hafta boyunca, haftada 1 kere 300 µl solüsyon kas içerisine injeksiyon ile verilmiştir. Bütün tavşanlar çürük yapıcı diyet ile beslenmiştir. 21 hafta sonra, tavşanların ağızlarında yeni oluşan çürüklerin yüzey alanı ölçülmüştür. Hiç aşılanmayan tavşanlarda, çürük yüzeyi 200 mm²; intramüsküler aşılananlarda, 190 mm²; intragastrik aşılananlarda, 148 mm²; tonsiller aşılananlarda 48 mm² olarak ölçülmüştür. Tonsiller aşılama dış çürük yüzeyi en azdır.

Bu deneyde, diğer tavşanlarda salyada *S. mutans*'a karşı oluşan IgA tipindeki özgül antikor seviyeleri 0.3 –0.7 µg/ml seviyesinde kalırken, tonsiller yoldan aşılanan tavşanların salyasında oluşan özgül antikorlar 2.2 µg/ml seviyesinde bulunmuştur. Kas içerisine injeksiyon ile aşılanan tavşanların serumundaki *S. sobrinus*'a özgül IgG antikor seviyesi 0.8-2.3 µg/ml iken bademciklerinden aşılanan grupta 2.6 µg/ml ölçülmüştür. Bu çalışma, bademcikler üzerine damlatılan atenüe bakteri solüsyonunun, salyada en yüksek özgül antikorlar oluşturduğunu ve diş çürüğünden koruyabildiğini göstermektedir. Bu aşılama metodunda oluşan antikolar sadece salyadaki serbest bakterileri nötralize etmekle kalmamakta, aynı zamanda diş sert dokularına adezyon ile kolonize olmuş bakterileri de elimine edebilmektedir.

Aynı çalışma bakteri süspansiyonu yerine, antijen kullanarak yapılmıştır. Tonsiller üzerine, buruna ve intragastrik instilasyon yolu ile aşılama yapılmış, en erken beliren özgül antikorların bademcikler yoluyla aşılana tavşanların salyasında olduğunu gösterilmiştir. Tonsiller aşılama ile salyadaki antikor titresini burun ve mide yoluyla aşılana tavşanların antikor titresinden 4-16 defa fazla bulunmuştur. Parotis bezinde, MALT dokuda, retrofaringeal lenf nodlarında, burun mukozasında, *Peyer's* plaklarında, servikal lenf nodlarında, tonsillerde ve dalakta özgül antikorlara rastlanmıştır.

AŞININ GÜVENİLİRLİĞİ:

Yukarıdaki çalışmalardan atenüe-tonsiller aşısı cesaretlendiren sonuçlar çıkar. Fakat serumda ortaya çıkan streptokoklara özgül IgG antikorlarının kalp kası ile çarpaz reaksiyona girmediğinin doğrulanması hayati önem taşır.

Bunu anlamak için, tonsiller ve intramüsküler uygulama ile elde edilen antikorlar, taze kadavradan alınan insan kalp kası ile muamele edilmiştir. Tonsiller uygulama ile hem salyada oluşan IgA, hem de serumda oluşan IgG antikorları insan kalp kası ile reaksiyona girmediği halde, intramüsküler uygulama ile serumda ortaya çıkan IgG antikorları insan kalp kasını lizis yapmıştır. İntramüsküler injeksiyon ile elde edilen IgG antikorlar 1/100 sulandırmada bile kalp kasına yapışabilmektedir. Çünkü oluşan antikorlar bakterinin 46, 52, 62 ve 85 kDa luk sitoplazmik membran proteinlerine karşıdır ve bu antikorlar kalp kasındaki myosin (*meromyosin*) proteinlerinin 18 ve 25 kDa luk L zincirlerine oturmaktadır.

Halbuki tonsiller uygulamada bakterinin protein değil, hücre duvarındaki galaktoz antijenlerine karşı antikor oluşmaktadır. Bu sebeple kalp kasına zarar vermemektedir. Kalp kasına zarar vermediği, immünfloresan, immündefüzyon ve Western blot teknikleriyle doğrulanmıştır.

Neden aynı bakteri farklı yollar ile verildiği için farklı antikorlar oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Belkide MALT hücreleri bakterinin (galaktoz gibi) sadece yüzey antijenik determinantlarını tanıyabilmekte ama RES hücreleri bakterinin hem yüzey hem intraselüler antijenik yapılarını tanıyıp kompetan hücrelere sunmaktadır. Belkide intramüsküler verilen atenüe bakteri ile ilk karşılaşan makrofajlar önce bakteriyi sindirip, ondan sonra antijeni kompetan hücrelere sunmaktadır, böylece sunulan antijen bakterinin intraselüler bir komponenti olmaktadır. Sonuçta oluşan antikorlar bakteri gövdesine veya membran proteinlerine karşı olmaktadır. Ama tonsiller uygulama ile tonsildeki dentritik hücrelerin bakteriyi sindirmeden önce sadece yüzey karbonhidrat antijenlerini kompetan hücrelere sunduğu

düşünülmektedir. Zaten tonsillere damlatılan canlı mikroorganizma deneyleri, bu dokuda fagositoz ağırlıklı bir savunma bulunmadığını göstermektedir. Böylece tonsiller immünizasyon ile oluşan antikorlar bakteriyel proteinlerine karşı olmadığı için kalp kası ile çarpaz reaksiyon vermemektedir.

Eldeki bilgiler bu immünizasyon yönteminin güvenilir olduğunu düşündürmektedir.

AŞININ GELECEĞİ:

Eser yayına hazırlandığı sırada, bütün bu çalışmalarını yapan Dr. Fukuizumi ile kişisel olarak haberleşildi ve çürük aşılarının bugünkü durumu soruldu. Erişkin gönüllüler üzerinde atenüe *S. sobrinus* aşısını denemekte olduğunu, erişkinlerin aşılanmadan önce salyalarındaki anti-mutans antikor konsantrasyonu 0.8 µg/ml den 2.5 µg/ml'ye çıktığını, salyadaki antikor titresinin aşılanmadan önce 1:8 iken, aşılandıktan sonra 1:256 'ya yükseldiğini, yeni oluşan antikorların önceden beklediği gibi diğer çürük yapıcı pek çok bakteri ile çarpaz reaksiyon verdiğini ifade etti.

Böyle bir aşı marketlenirse ve dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanırsa, dişhekimiğinde çürük ve çürüğe bağlı hastalıkların tedavisi önemli ölçüde azalabilecektir. Bu yol ile oral patojenleri hedef alan başka bazı aşıların hazırlanması için yeni bir fikir ve taslak bir metodoloji oluşturacaktır. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *Porphyromonas gingivalis* aşıları muhtemelen gelecekte üzerinde çalışılması gereken ilk aşılar olacaktır.

KAYNAKLAR:

1. Akan E. Tıbbi Mikrobiyoloji. Vibrio'lar s:121- 1993 Saray Tıp Kitapevleri
2. Childers NK, Tong G, Mitchell S, *et al.* A controlled clinical study of the effect of nasal immunization with Streptococcus mutans antigen alone or incorporated into liposomes on induction of immun responses. *Infection and Immunity*, 1999; 67(2):618-623.
3. Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, *et al.* Enhancement of antigen specific IgA induction in saliva using chlorea toxin B sununit by tonsillar application. *J Jap Oral Biol*,1995; 37(5):411-418.
4. Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, *et al.* IgA-Plasma cell induction in parotid gland after tonsillar instillation of antigen. *Dentistry in Japan*, 1995; 32:22-24.
5. Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, *et al.* Tonsillar application of formalin-killed cells of Streptococcus sobrinus reduces experimental dental caries in rabbits. *Infection and Immunity*, 1999; 67(1):426-428.
6. Fukuizumi T, Inoue H, Tsujisawa T, *et al.* Tonsillar application of killed Streptococcus mutans induces specific antibodies in rabbit saliva and blood plasma without inducing a cress-reacting antibody to human cardiac muscle. *Infection and Immunity*, 1997; 65:4558-4563.
7. Fukuizumi T, Inoue H, Anzai Y. Incorporation of instilled Candida albicans and lipopolysaccaride into the palatine tonsil of rabbit. *J Jap Oral Biol*, 1994; 36(3):222-229.
8. Kanda M, Inoue H, Fukuizumi T, *et al.* Detection and rapid increase of salivary antibodies to *Staphylococcus lentus*, an indigenous bacterium in rabbit saliva, through a single tonsillar application of bacterial cells. *Oral Microbiol Immunol*, 2001; 6(5):257-264.

9. Kokuryo S, Inoue H, Fukuizumi T, *et al.* Evaluation of interleukin 1 as a mucosal adjuvant in immunization with *Streptococcus sobrinus* cells by tonsillar application in rabbits. *Microbiol Immunol.*, 2002; 17(3):163-171.