

KARIJES PROFILAKTIČKI EFEKAT UREE

Stevanka Đorđević, Smiljana Cicmil, Dragan Ivanović
Katedra za preventivnu i dečiju stomatologiju
Stomatološki fakultet Foča

CARIES PROPHYLACTIC EFFECT OF UREA

Stevanka Djordjevic, Smiljana Cicmil, Dragan Ivanovic
Department of Preventive and Children Stomatology
School of Dental Medicine, Foca

SAŽETAK

Urea prisutna u funkcionalno bliskim supstratima: salivi, plaku i tečnosti gingivalnog sulkusa dotiče salivarnim putem ekskrecije iz krvi ili nastaje procesima sinteze i degradacije koje obavljaju bakterije plaka u cilju održanja viših pH vrednosti plaka. Polazeći od premise da je pH vrednost egzistencijalni uslov bakterijskog preživljavanja, cilj rada je ispitati puferski kapacitet različitih koncentracija uree na čistim i mešovitim bakterijskim kulturama, zasadenim na agar ploče. Ispitivanja su vršena vodenim rastvorima uree kao testnim supstancama, u koncentracijama 20, 25, 30 i 35%. Rastvori su aplikovani sterilnim papirnim diskovima natopljenim u određenu koncentraciju rastvora, a ploče inkubirane u CO₂ atmosferi očitavane su nakon 24 sata. Rezultati su potvrdili očekivane inhibitorne efekte uree na bakterijski rast, čiji su rezultati jasne zone inhibicije oko papirnih diskova podudarne sa zonama alkalizacije. Osim osobine da degradacijom daje dva molekula amonijaka koji podiže pH vrednost, urea ima dokazane sposobnosti da blokira metaboličke aktivnosti plaka pri kojima se stvaraju razorne organske kiseline, intermedijari sa izraženom tendencijom koncentrovanja u plaku. Sposobnost da u većim koncentracijama inaktivira bakterijski rast denaturacijom proteinskog dela bakterija, opisana je kao treći inhibitorni efekat uree. Rezultati akcentiraju pufersku snagu prisutne uree, važnost alkalnih odgovora mikrobiološkog sastava plaka u očuvanju acidobazne ravnoteže u fiziološkim uslovima i otvara mogućnosti primene viših koncentracija uree u terapijske svrhe i hemijsku kontrolu plaka.

Cljučne reči: urea, pH vrednost, karijes.

UVOD

Istraživački interes za ureu pojavio se 100 godina posle njene identifikacije. Prvi izveštaji pripadaju radovima oca i sina Grove and Grove 1933 /35. godine koji su nagovestili da salivarna urea i amonijak mogu biti u direktnoj korelaciji sa pojavom karijesa. Hipoteza je utemeljena na pozitivnoj korelaciji, odnosno značajno višim vrednostima ovih spojeva u mešovitoj salivi karijes rezistentnih osoba. Objava rezultata Stephana i Millera (1944. godine) da su primenom 40% uree postigli redukciju karijes aktivnosti između 80-100% osnažila je pionirske

ABSTRACT

Urea present in functionally close oral substrates (saliva, plaque and fluid of gingival sulcus) flows in by salivary route of blood excretion or by metabolic activities of synthesis and degradation performed by plaque bacteria with a purpose to maintain the acid-base balance. Considering the fact that pH value is an existential condition for bacterial survival, the purpose of this paper is to examine a buffer capacity of different urea concentrations on pure and combined bacterial cultures and agar plates. Tests were performed *in-vitro* applying water solutions of urea in concentrations 20, 25,30 and 35% as test substances. Applications were done by sterile paper disks imbued with certain concentrations. The plates were incubated in CO₂ atmosphere and read after 24h. The results confirmed expected inhibitory effects of urea in all concentrations, which had stipulated creation of clear zones of inhibited bacterial growth that coincided with alkalization zones around the paper disks. Except for alkalization, urea realizes its bactericidal activity through its ability to block metabolic activity or denaturalize protein parts of bacteria themselves. The results emphasize the importance of base production in plaque in physiological conditions and direct to the possibility of application of increased concentrations for therapy purposes and chemical plaque control.

Key words: urea, pH value, caries

radove oca i sina. Kessel i saradnici su 1948. u salivi karijes imunih osoba identifikovali povišene vrednosti amonijaka, i označili ga inhibitornim faktorom rasta LB-sa i drugih acidoprodukujućih bakterijskih vrsta. Antikariogenu ulogu uree podržali su radovi Pearlmana i Hilla 1951. godine, čiji rezultati upućuju da je inhibicija rasta LB-sa bila značajna samo kada je PH bio veći od 7 PH jedinica, a koncentracija uree veća od 3%. Značajan doprinos dale su studije na animalnom modelu (Firestone, 1982), u kojima je topikalnom primenom 10% uree, tri puta dnevno na zube pacova starih 23 dana, na kariogenoj dijeti (56%-ni rastvor šećera i redukcija uzimanja vode), i

inficiranih SM-om i *Actinomyces viscosus* i postignuta visoka efektivnost na pojavu karijesa i akumulaciju plaka. Autentične rezultate puferske i antimikrobne uloge uree, potvrdile su studije velikog broja autora: Mandela 1986, Edgara 1986, Vratsansona 1982, Minaha 1989, Klainberga 1984, Singera 1983 i dr. Interes za salivarnu ureu posebno je intrigirao dve grupe, Klainbergovu u Kanadi i Frostellovu u Švedskoj, koje su uradile najveći broj istraživanja iz ove oblasti u novije vreme.

CILJ RADA

- Ispitati PH vrednost podloge na različite koncentracije uree, pre i posle zasejavanja bakterijskih kultura maturiranog supragingivalnog plaka.

- Testirati inhibitory snagu različitih koncentracija uree na mešovitim i čistim kulturama identifikovanih mikroorganizama.

MATERIJAL I METOD

Testiranja su radena na uzorcima maturiranog supragingivalnog plaka. Uzorkovanje je vršeno sterilnom špatulom sa vrata zuba i marginalne gingive, sedmi nakon spontanog formiranja.

Ispitanici su pacijenti maksilofacijalne hirurgije u stanju bimaksilarne fiksacije i odsustvom higijenskih mera u intervalu od 7 dana.

U ispitivanjima je korišten Mueller-Hintonov agar sa dodatkom hlór-timol plavog indikatora i pH vrednošću podešenoj na 6,9 pH jedinica.

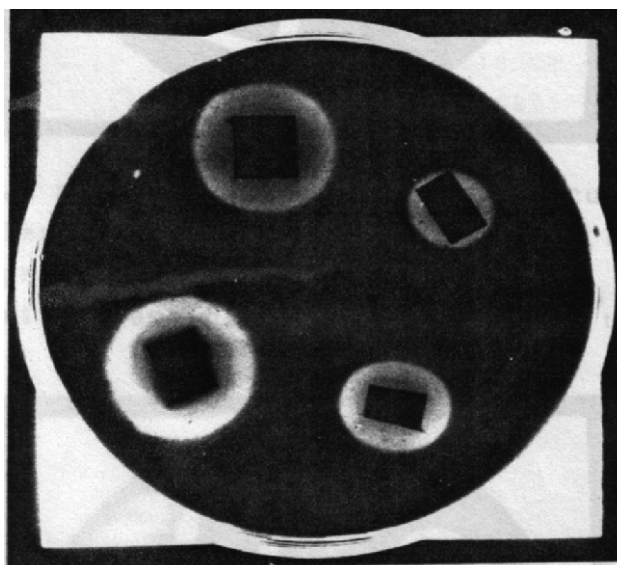
Na agar su zasejavani identifikovani mikroorganizami, mešovite kulture, gljivica (*Candida albicans*) i prazne ploče, na kojima se alkalizacija manifestovala promenom boje indikatora.

Testni rastvori (20, 25, 30 i 35% urea) aplikovani su nakon natapanja sterilnih diskova filter papira u različite koncentracije uree, i raspoređivane na Mueller-Hintonov agar.

Nakon zasejavanja podloge su inkubirane u CO₂ atmosferi 24 sata. Nakon isteka testnog vremena, očitavane su zone inhibicije i promena boje indikatora.

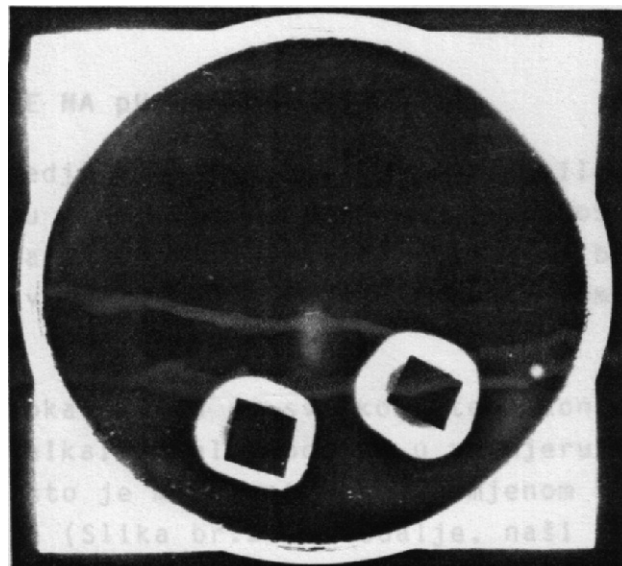
REZULTATI

Rezultati su posledica poznatih efekata uree i njene uključenosti u metaboličke aktivnosti na različite načine. Važnost pH vrednosti kao egzistencijalnog uslova za bakterijski opstanak, potvrđeni su i našim ispitivanjem i korespondiraju sa podacima iz dostupne literature.



Slika broj 1. Zone inhibicije na čistim kulturama *Streptococcus mutans* i *Streptococcus oralis*

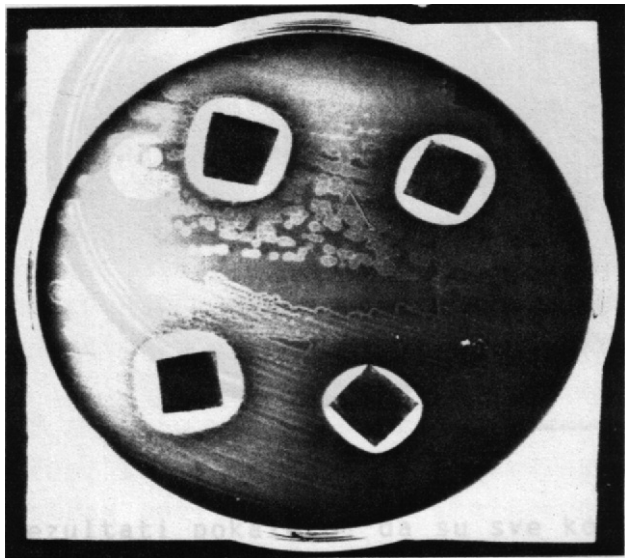
Na slici br 1. prikazani su rezultati difuzione metode in-vitro, na izolovanim bakterijskim vrstama SM-u i *Streptococcus oralis*. Aplikacija vodenog rastvora 25 i 30% uree kao testne supstance, rezultovali su pojavom širokih zona inhibicije bakterijskog rasta, koji potvrđuju visok stepen osetljivosti izolovanih sojeva na primenjene koncentracije uree.



Slika broj 2. Inhibicija bakterijskog rasta *Streptococcus haemolyticus*-a oko diskova sa ureom

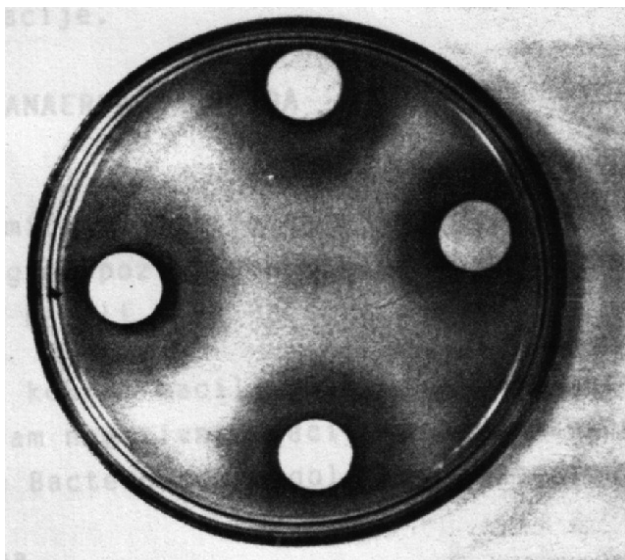
Difuziona metoda po sistemu antibiograma prikazana je na slici broj 2. Mešana kultura *Streptococcus haemolyticus* tretirana rastvorima uree, pencilinom, linkocinom, clindamicinom i ampicilinom po metodi antibiograma. U komparaciji sa

primenjenim testnim supstancama uočava se jak inhibitorski efekat uree u obe primenjene koncentracije, potvrđen širokim zonama inhibicije rasta podudarnim sa zonama alkalizacije.



Slika broj 3. Zone inhibicije rasta na zasejanoj kulturi *Candida albicans*

Na slici broj 3. prikazane su zone inhibicije rasta čiste kulture acidourične *Candida albicans*. Vidljive zone alkalizacije oko papirnih diskova primerene su primenjenim koncentracijama uree u različitim koncentracijama.



Slika broj 4. Zone alkalizacije podloge promera 20 mm oko diskova uronjenih u sve četiri koncentracije, uree manifestovano promenom boje indikatora.

Alkalizaciju agar podloge sa promenom boje delovanjem indikatora uslovile su 20, 25, 30 i 35%-ni

testni rastvori uree. Imajući u vidu činjenicu da se među izolatima nalazio i veliki broj otpornih sojeva koji su pokazali takode osetljivost na ureu, slobodni smo zaključiti da je baktericidno delovanje uree u in-vitro uslovima bilo zasnovano na promeni pH vrednosti.

DISKUSIJA

Osetljivost aerobnih mikroorganizama navodi na zaključak da je ureoliza neophodna u kontroli PH, i stvaranju amonijaka i ugljendioksida za bakterijski metabolizam. U farmakokinetičkim istraživanjima i terapeutskom praćenju lekova salivarnim protokom po Martinsovoj jednačini, koja se bazira na pH particionoj teoriji i počiva na vezivanju hemikalija i proteina dokazan je konstantan omer endogene i egzogene uree kod čoveka, psa i štakora. Pored uree isti omer utvrđen je samo za živu i kortizol. Zahvaljujući salivarnom putu ekskrecije iz krvi, urea je uvek prisutna u svim funkcionalno bliskim supstratima: salivi, plaku i gingivalnom fluidu. U svakom od njih, ima ulogu pufera s obzirom da kao molekula male molekularne težine slobodno difunduje kroz bakterijske zidove i sve prepreke plakovnog matriksa. Pod uticajem enzima ureze hiroličkom razgradnjom uree nastaju dva molekula amonijaka, koji sa vodom daju bazu amonijum hidroksid i jedan molekul ugljen dioksida koji sa vodom gradi molekul slabe ugljene kiseline. Zahvaljujući osnovnom procesu hidrolize i oslobađanju dva molekula amonijaka nastaje porast pH vrednosti i alkalizacija medija. Koncentracija amonijaka u plaku iznosi između 16-26% što je osam puta više nego u salivi. U koncentraciji od 50 mg na 100 ml salive on je snažan inhibitor za većinu mikroorganizama, ali je tu koncentraciju nemoguće održati iz tri razloga:

- Amonijak se troši na razlaganje mucina (13).
- Ima izrazitu tendenciju koncentrovanja u plaku.
- Ima varijabilne vrednosti u salivi (14).

Gingivalni fluid ima osobinu njenog koncentrovanja, a klinički značaj ima činjenica da su registrovane vrednosti uvek inverzne stepenu gingivalne inflamacije. Nivoi amonijaka su uslovljeni stalnim hidrolitičkim oslobađanjem iz uree i njenom stalnom sintezom, što objašnjava zašto pH plaka raste tako brzo nakon izlaganja urei (2, 7, 8). Mišljenja oko tačnog mehanizma baktericidnog delovanja uree, su još uvek podeljena. Baktericidnost uree i produkata njene degradacije je teško objasniti zbog vezanosti za metabolizam ugljenih hidrata i zamršenih interakcijskih odnosa sa drugim metaboličkim putevima. U prilog mišljenjima da je efekte uree

pogrešno razmatrati kao prosta rešenja kiselina i baza govore proverene činjenice:

- Bakterije teže očuvanju acido-bazne ravnoteže kao egzistencijalnog uslova i pokazuju naglašeniju ureolitičku nego glikolitičku aktivnost (5).

- Po svojoj prirodi alkalni odgovori su brži i jednostavniji, a pokreću se nakon formiranja nekoliko organskih kiselina u varijabilnim odnosima pri degradaciji ugljenih hidrata. Lokalni pad pH vrednosti ispod 5,5 pokreće suprotne enzimske reakcije u kojima se katabolišu nitrogene supstance: aminokiseline, aminošćeceri, urea, glutamin i dr.

- Amonijak i aminoformacije mogu ravnopravno suprotstaviti opadajućim efektima pH vrednosti koje indukuju kiseli metaboliti i mogu biti validni indikatori karijes aktivnosti (9).

- Autori koji istraživanja fokusiraju na alkalne produkcije zastupaju stav da se osim puferkog dejstva, baktericidnost uree temelji na njenim osobinama da vezivanjem za supstrat inaktivise enzimske reakcije i da u većoj koncentraciji denaturise proteine u samim bakterijama.

Bilo o kojem tipu inhibicije da je reč, rezultati naših testiranja korespondiraju sa sličnim istraživanjima, u kojima je potvrđena osobina uree da povećanjem pH vrednosti inaktivise rast aerobnih i anaerobnih bakterije. Efekat potvrđuju široke zone inhibicije bakterijskog rasta podudarne sa zonama alkalizacije oko 20 mm merene promenom boje indikatora.

ZAKLJUČCI

- Imajući u vidu da je među izolovanim bakterijama bilo i veoma otpornih sojeva, baktericidnost uree u in-vitro uslovima zasnovana je na promeni pH vrednosti pod uticajem različitih koncentracija uree.

- Sve korišćene koncentracije inhibirale su rast bakterija u promeru od 20mm.

- Na nezasejanoj podlozi alkalitet se manifestovao promenom boje indikatora

- Na zasejanim podlogama zone inhibicije su bile podudarne sa zonama alkalizacije.

LITERATURA

1. S Đorđević, B Kosorić. Antimikrobni efekti uree na čiste kulture SM-a izolovanog iz maturiranog supragingivalnog plaka. Jug. Kongres Ljubljana, 1988. Zbornik radova.
2. S Đorđević, G Stefanović, J Anđić. Uticaj uree na plakovni PH u in vivo uslovima. Jug. Kongres Pula, 1985. Zbornik radova.

3. Edgar WM, Geddes AM. Plaque acidogenecity models for cariogenecity testing-some theoretical and practical observations. J Dent Res 1986; 65: 98-102.
4. Firestone AR, Schmid R, Mihlemann HR. Effect of topical urea peroxide on rat caries and plaque. J Dent Res 1982; 61: 82-85.
5. Grove CJ, Grove CT. Chemical study of human saliva indicating that ammonia is an immunizing factor in dental caries. J Am Dent Assoc 1935; 22: 47-59.
6. Higham SM, Edgar WM. Acid production and nitrogen metabolism on plaque in-vivo. Effect of sucrose and salivary stimulation. J Dent Res 1986; 65: 11-15.
7. Kesel RG, Kirh ER, O, Donnell JF. Recent developmments in the biologic production of ammonia and carbamide in caries prevention. Oral Surg Med Path 1949; 2: 49-59.
8. Klainberg I, Kanapka JA, Craw D. Effect of saliva and salivary factors on the metabolism of the mixed oral flora. Spec Suppl Microbiology Abstracts 1984; 33-64.
9. Minah GE, McEney MC, Flores JA. Metabolic differences between saliva from caries-active and caries and restoration free children. Arch Oral Biol 1986; 31: 33-38.
10. Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM. Bacteriology of experimental gingivitis in children. Infect Immun 1984; 64: 1-6.
11. Paerlman S, Hill TJ. Influence of ammonia and of urea upon L. Acidophilus studies on aerobic glycolysis. J Dent Res 1951; 30: 42-49.
12. Singer DI, Kleinberg I. NH₃ formation in plaque in situ. 47 th general meeting. I.A.D.R. 1987: 63-66 Abstract.
13. Singer DI, Kleinberg I. The free amino acids in dental plaque. Arsh Oral Biol 1983; 28: 873-878.
14. Singer DI, Kleinberg I. NH₃ formation in plaque in situ. 47 th general meeting. I.A.D.R. 1987: 63 Abstract.
15. Vratsanos SM, Mandel ID. Comparative plaque acidogenesis of caries resistant and caries susceptible adults. J Dent Res 1982; 61: 65-68.