

KORELACIJA IZOENZIMSKE AKTIVNOSTI LDH SADRŽAJA RADIKULARNIH CISTA S CITOLOŠKOM I MIKROBIOLOŠKOM ANALIZOM

Halid Sulejmanagić, Miroslav Galić i Stjepko Jadrić

Klinika za oralnu hirurgiju Stomatološkog fakulteta Sarajevo
Institut za fiziologiju i biohemiju »Dr Aleksandar Sabovljević« Sarajevo

Primljeno 20. 4. 1986.

Sažetak

Cilj ovoga rada bio je metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu izdiferencirati pojedine izoenzime laktatdehidrogenaze iz uzoraka sadržaja adikularnih cista te pri tome ispitati postojanje korelacije između izoenzimatskog spektra sadržaja sa citološkom i mikrobiološkom analizom istog. Cjelokupna istraživanja su urađena na 9 uzoraka. Biokemijski dio uređen je na Institutu za biohemiju po metodi Bloemendaala, citološki na Institutu za patologiju, a mikrobiološki u specijalističkom laboratoriju Instituta za mikrobiologiju »Dr Robert Fried« u Sarajevu. Preliminarni biokemijski rezultati ukazuju da je frakcija LDH₃ prosječno više zastupljena u odnosu na LDH₁, LDH₂ i LDH₄₊₅. Distribucija relativnih vrijednosti izoenzima LDH u sadržaju ispitivanih radikularnih cista najsličnija je onoj u skeletnim mišićima. Citološkom analizom materijala iz radikularnih cista nađene su deskvamirane epitelne ćelije nejasnih kontura, eritrociti, bez upalnih celularnih elemenata. Mikrobiološkom analizom od 9 uzoraka u 8 je nađena isključivo aerobna mikroflora s predominacijom streptococcus alfa haemoliticus, dok je jedan uzorak ostao sterilan. Anaerobne bakterije nisu izolirane ni u jednom uzorku.

Povećanjem udjela putridnih masa u sadržaju radikularne ciste te uz izolaciju fakultativnog anaeroba, pada aktivnost brzih frakcija LDH, a raste aktivnost sporih, osobito LDH₃. To ukazuje na to da su metabolički uvjeti u radikularnoj cisti pomaknuti k anaerobiji.

Ključne riječi: radikularna cista, laktatdehidrogenaza

UVOD

Sadržaj radikularne ciste, primarno neinficiran, može biti bistra tečnost, boje slame ili žućkast, gust, kazeozno-nekrotičan s kristalima holesterola. Cistični sadržaj u početku nastaje zbog sekretorne aktivnosti epitelnih ćelija, položenih periferno na vezivu ovojnice. Veličina radikularne ciste raste kontinuirano s povećanjem osmolarnosti njenog sadržaja. To povećanje uzrokuje razliku hidrostatskog pritiska između sadržaja i okolnog parodontnog tkiva. (1)

Pritisak, kojim cista raste djeluje na okolna tkiva, uzrokuje pojačanu osteoklastičnu aktivnost. Stepenn destrukcije spongioznog dijela dentoalveolnih struktura može se dijagnosticirati kvalitetnim rendgen snimkom. Vrijednost tog dijagnostičkog postupka je znatno manja u diferencijalnoj dijagnostici, budući da svi parodontni, kronično inflamatorni procesi ne moraju dati histopatološku sliku radikularne ciste. Wais je 1958 godine (2) histopatološkom analizom 50 parodontnih lezija praćenih resorptivnim promjenama uz ivičnu kondenzaciju spongioze, pozitivan rezultat našao samo u 13 slučajeva, što je svega 26%. Pridržavajući se strogo rendgenskog i kliničkog kriterija za dijagnostiku radikularne ciste. Sulejmanagić (3) je od 67 periapikalnih lezija, pozitivan histopatološki nalaz dobio u 27 slučajeva što je 35%. Zahvaljujući terapijskom značaju diferencijalne dijagnostike u ranoj detekciji vrste patološkog procesa, te njihovoj repkusiji na funkciju mastikatornog organa, primjenjuju se i metode kliničke biohemije.

Metodom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu izdiferencirali smo izoenzime laktat dehidrogenaze iz uzoraka sadržaja radikularnih cista, te pri tome ispitali da li postoji korelacija između izoenzimskog spektra sadržaja s citološkom i mikrobiološkom analizom istog.

MATERIJAL I METODE:

Preliminarna studija biohemijske, citološke i mikrobiološke analize sadrži 9 sadržaja većih radikularnih cista koje su operirane u periodu od jedne godine na Klinici za oralnu kirurgiju Stomatološkog fakulteta u Sarajevu.

Nakon enukleacije ciste sterilnom štrcaljkom punktiran je njen sadržaj. Elektroforetska separacija pojedinih izoenzima laktatdehidrogenaze (LDH) cističnog sadržaja vršena je na poliakrilamidnom gelu u aparatu firme »Pleuger« Vijenagem (Belgija) po metodi Bloemendaal-a (4) na Institutu za fiziologiju i biohemiju »Dr. Aleksandar Sabovljević« u Sarajevu. Za citološku analizu od svakog uzorka urađeno je po 5 razmaza ukupno 45 koji su obrađeni standardnom metodom u patohistološkom laboratoriju Stomatološkog fakulteta u Sarajevu a analiza je rađena na Institutu za patološku anatomiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo. Brisevi za mikrobiološku obradu uzimani su sterilnim transpocult sistemom, a izolacija aerobnih i anaerobnih mikroorganizama rađena je u specijalističkoj laboratoriji za anaerobne infekcije Instituta za mikrobiologiju »Dr. Robert Fried« u Sarajevu.

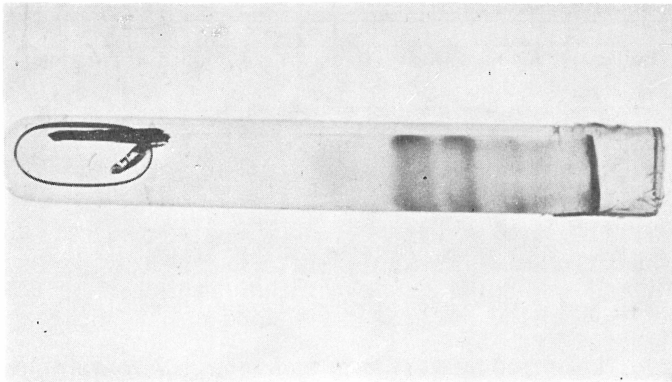
REZULTATI

Specifična distribucija relativnih vrijednosti pojedinih izoenzima LDH, manifestira se različitim stepenom njihove elektroforetske pokretljivosti.

Zahvaljujući tome što je LDH tetramerni enzim nastao slobodnom kombinacijom dva različita tipa polipeptidnih lanaca označenih kao H i M sub-jedinice na principu homo i hetero tetramera, to nastaje pet različitih tetramernih izoenzima aktatdehidrogenaze: LDH₁(H₄); LDH₂(H₃M); LDH₃(H₂M₂); LDH₄(HM₃); LDH₅(M₄). Zastupljenost pojedinih baznih amino kiselina (arginina, tirozina i dr.) raste od LDH₁(H₄) do LDH₅(M₄), pri čemu opada tovar negativnog naboja, a time i elektroforetska pokretljivost. LDH₁(H₄) i LDH₂(H₃M) se zovu brzim frakcijama zato što imaju najveći negativni naboj, te time najbrže putuju anodi, u procesu elektroforeze.

Kliničkom i rendgenskom pretragom ustanovljen je koštani defekt veličine jajeta koji je lokaliziran od medijalne linije do zuba 26. Sadržaj ciste je mutan, prljavo-sivo-žućkast i tečan. Mikrobiološkom analizom anaerobni mikroorganizmi nisu izolirani. Izolirane i identificirane aerobne bakterije staphylococcus epidermidis, streptococcus alfa haemoliticus.

Elfelogram uzorka cističnog sadržaja prikazuje dominaciju brzih frakcija izoenzima LDH-osobito LDH₁ što je uočljivije kvantitativnom dezino-metrijskom analizom prikazanoj na grafikonu broj 1. Mikroorganizmi kontaminati pripadaju aerobnim bakterijama (Slika br. 1 i grafikon br. 1)

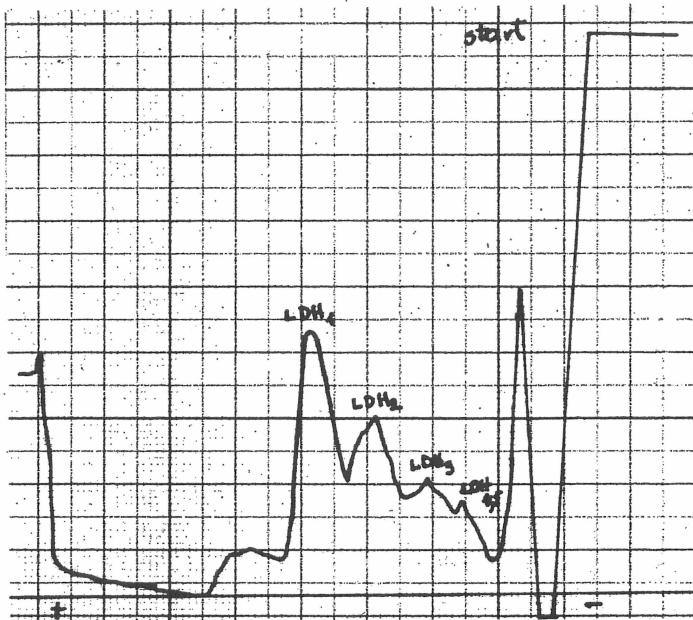


Slika 1. Elfelogram cističnog sadržaja uzorka br. 1

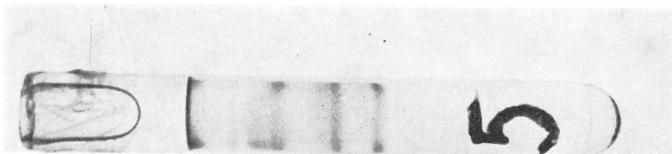
Patološke promjene u smislu destrukcije spongioze viličnih struktura u regiji 11 i 22. Lezija je veličine oraha, smještena ispod poda nosne šupljine. Sadržaj ciste je mutan, gust, kazeoznonekrotičan s hemoragičnom komponentom. Mikrobiološki izolirani i identificirani su aerobni kontaminati: streptococcus pneumoniae i streptococcus SBE.

Elfelogram uzorka ovog cističnog sadržaja ukazuje na predominaciju frakcije LDH₂ što je grafikonom broj 2 moguće kvantitativno odrediti. (Slika br. 2 i grafikon br. 2)

Kod drugog slučaja resorptivni proces bio je lokalizovan u mentalnoj regiji između zuba (32—42) u smislu radikularne ciste veličine oraha,



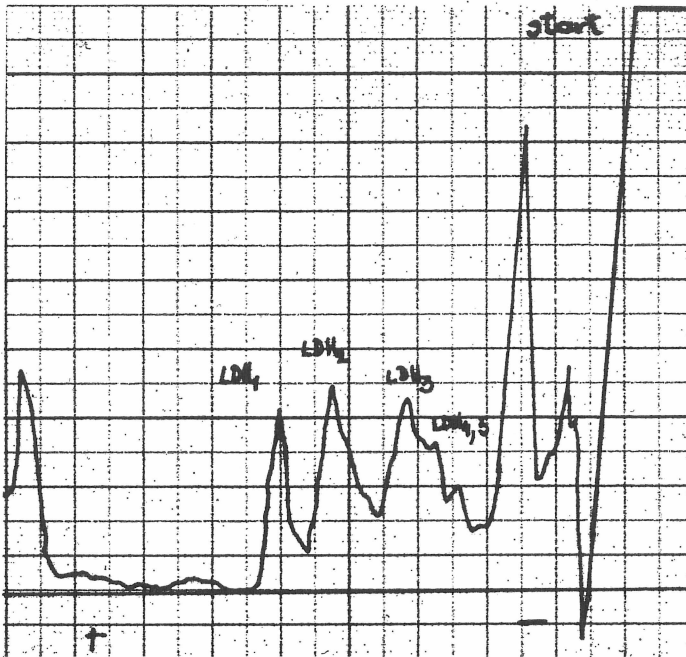
Grafikon 1. Kvantitativna denzitometrijska analiza elferograma



Slika 2. Elferogram cističnog sadržaja uzorka br. 5

izrazito gustog, kazeozno-nekrotičnog sadržaja. Elferogram cističnog sadržaja prikazuje predominaciju relativne zastupljenosti LDH_3 frakcije. Kvantitativna denzitometrijska analiza elferograma broj 3 prikazana je na grafikonu broj 3. Mikroorganizam-kontaminant je fakultativni anaerob-gram negativna koliformna bakterija-escherichia coli (Slika br. 3 i graf. br. 3) U svim citološkim analizama dominira identična slika-deskvamirane epitelne ćelije nejasnih kontura, proteinski agregati, celulirani detritus i eritrociti (Slika br. 4).

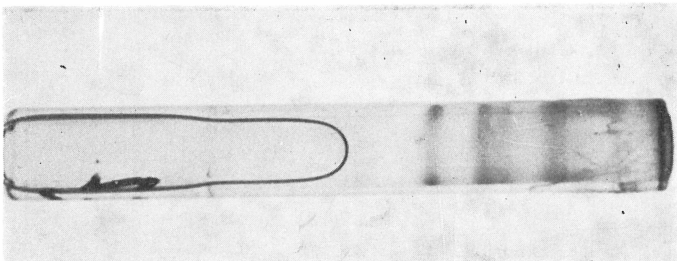
U sadržaju radikularnih cista dominiraju H subjedinice nad zastupljenošću M subjedinica izraženo u $\%$. Razlika konzistencija sadržaja cista, mikrobiološki kontaminanti te starost same ciste ne dozvoljavaju izvođenje statistički adekvatne srednje vrijednosti distribucije pojedinih izoenzima LDH. Radi opšteg pregleda specifične zastupljenosti u $\%$ frakcija LDH prikazane su minimalne i maksimalne vrijednosti izoenzima LDH sa



Grafikon 2. Kvantitativna denzinometrijska analiza elferograma

subjedinicama. Srednja vrijednost pojedinih izoenzima nema statističku značajnost (Tabela br. 1).

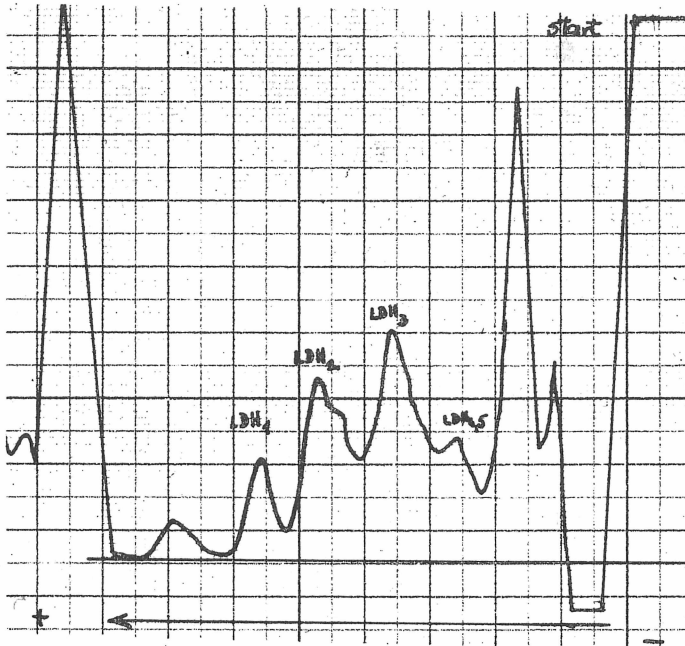
Relativna distribucija izoenzima LDH izražena je u % u korelaciji sa citološkim i mikrobiološkim nalazom. U tečnom cističnom sadržaju uz izolaciju aerobnih bakterija, dominira u ukupnoj aktivnosti frakcija LDH_1 . Porastom konzistencije sadržaja ciste povećanjem udjela putridnih masa uz



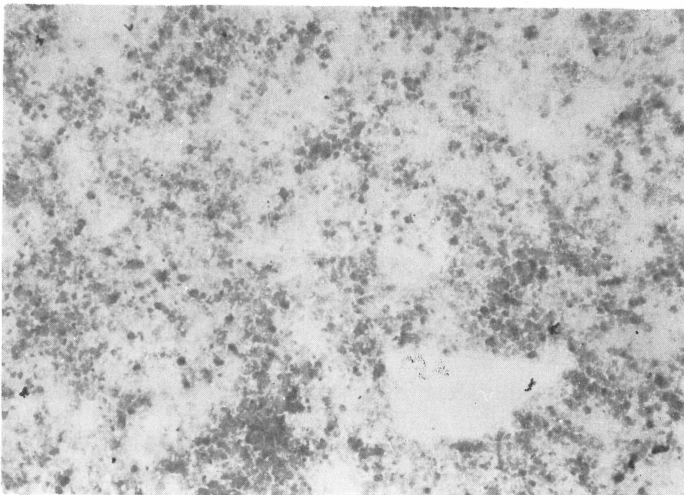
Slika 3. Elferogram cističnog sadržaja uzorka br. 7

izolaciju kontaminanta fakultativno-anaerobne mikroflora, opada aktivnost u % brzih (LDH_1) a raste sporih (LDH_3) frakcija. Uočljiv je obrnuto pro-

porcionalan odnos relativne zastupljenosti LDH₁ i LDH₃ frakcije te H i M subjedinice što prikazuje promjena vrijednosti indeksa H/M (Tabela br. 2).



Grafikon 3. Kvantitativna denzitometrijska analiza elferograma br. 7



Slika 4. Deskvamirane epitalne čelije proteinski agregati, celularni detritus, eritrociti

Tabela br. 1 Specifična distribucija relativnih vrijednosti izoenzima LDH i HIM subjedinicu u ‰

Min. i max. vrijednost	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH _{4,5}	H	M
	7,20—35,61	26,50—35,62	19,50—43,80	14,04—35,10	50,82—70,77	29,22—49,17
Srednja vrijednost	21,40	30,06	31,65	24,57	60,79	39,19

Vrijednost H/H indeksa zavisi od tipa bakterijske kontaminacije, pri čemu je najmanja, izoliranjem gram negativne koliformne bakterije-escherichiae coli. H-vrijednost H subjedinicu kontaminovanih uzoraka cističnog sadržaja.

H-vrijednost H subjedinicu sterilnog cističnog sadržaja. Kod cista koje su imale sterilan sadržaj najveću aktivnost ima LDH₃ što ukazuje na tendenciju ka anaerobnom tipu metabolizma, karakterističnu za hronično inflamatorni proces. (Tablica br. 3)

DISKUSIJA

Dentoalveolne strukture zahvaćene destruktivnim hroničnim inkapsuliranim procesima upalne prirode, karakteristične kliničke slike i rendgen-skog nalaza, po svom obliku mogu biti circumskriptni ili difuzni, a prema aktivnosti—aktivni ili pasivni. (5) Pojedine dentoalveolne ciste se mogu međusobno diferencirati metodom kvantitativnog određivanja proteina po Lowry-u uz separaciju pojedinih frakcija proteina diskelektroforezom na gelu poliakrilamida upoređujući rezultate s onim u plazmi bolesnika. Morse (6) je sa saradnicima 1973 godine poredio elektroforetsku pokretljivost proteinskih frakcija sadržaja pojedinih cista i granuloma s histopatološkim nalazom i uočio karakteristične rezultate. Histopatološki nalaz granuloma se manifestira elektroforetski karakterističnim padom veličine i gustine zona pojedinih proteinskih frakcija idući od albuminske prema globulinskoj.

Radikularne ciste karakteriše prisustvo zona globulinskih frakcija te veća i gušća zona albuminske od one u plazmi i granulomu. Budući da cistične i cistama slične parodontne rendgen svjetline teku gotovo asimptomski ili s oskudnom simptomatologijom to je određivanjem pojedinih frakcija izoenzima LDH iz uzoraka sadržaja radikularnih cista moguće približno ukazati na dužinu trajanja hroničnog patološkog procesa. Aktivnost pojedinih izoenzima sa specifičnom distribucijom H i M subjedinicu je jedan od indikatora tipa metaboličkih procesa.

Uloga LDH kao enzima iz klase oksidoreduktaza sastoji se u kataliziranju interkonverzije piruvata kao terminalnog produkta glikolize u laktat, putem oksidacije i redukcije NAD-a. Konverzija piruvata u laktat služi kao značajan izvor oksidirane forme NAD-a u anaerobnim uslovima.

Tabela br. 2 Relativna distribucija izoenzima LDH (u %) u korelaciji s mikrobiološkim i citološkim nalazom

Uzorak — broj —	Izjed čističnog sadržaja	LDH ¹	LDH ²	LDH ³	LDH ⁴	LDH ⁵	H	M	Index H/M	Izolirani aerobni mikroorganizmi — kontaminati —	Citološki nalaz
1	mutan, prijavo- sivo-žućkast tečan	35,61	28,60	19,50	14,04	70,77	29,22	2,42 : 1,0	—	staphylococcus epidermidis — streptococcus α haemolyticus	— deska- mirane epitelne celije, pro- teinski agre- gati, — eritrociti
8	mutan, gust	26,92	35,62	20,87	19,58	66,83	33,16	2,02 : 1,0	—	streptococcus pneumoniae — streptococcus α haemolyticus	"
5	mutan, gust kazeozno- nekrotičan	18,40	30,20	32,34	19,07	60,54	39,45	1,53 : 1,0	—	streptococcus pneumoniae — streptococcus sbe	"
4	izrazito gust, kazeozno- nekrotičan	9,80	32,00	34,00	27,80	58,07	41,93	1,38 : 1,0	—	sterilna kultura	"
7	izrazito gust, kazeozno nekrotičan (purulentan)	11,56	26,50	43,80	18,15	56,58	43,42	1,30 : 1,0	—	Rscherrichia coli	"

Tabela br. 3 Tabelarni prikaz odnosa kvantitativnih vrijednosti H subjedinica kontaminovanih uzoraka, sadržaja radikularnih cista, s kontrolnim, sterilnim uzorkom (u %).

Uzorak — broj —	H	Index H/H ¹	Izolirani mikroorganizmi — kontaminanti —
1	70,77	1,22	aerobno Gram pozitivne koke
8	66,83	1,15	"
5	60,54	1,04	"
7	50,58	0,97	fakultativno anaerobna Gram negativna kaliformna bakterija

H¹ — procentualna vrijednost H subjedinice kontrolnog uzorka.

Tkiva s aerobnim tipom metabolizma pod dejstvom LDH prevode piruvat u laktat koji se krvlju prenosi do jetre. Pad aktivnosti enzima mitohondrija uzrokuje porast aktivnosti LDH u cilju uklanjanja piruvata.

U ovom radu uočeno je da je aktivnost pojedinih izoenzima LDH iz sadržaja ispitivanih radikularnih cista zavisna od dužine trajanja procesa, stadija razvoja ciste, te od tipa mikrobioloških kontaminata. Citološki nalaz u ispitivanim uzorcima je identičan u svim slučajevima — deskvami-rane epitelne ćelije nejasnih kontura, detritus i eritrociti. Whitten (7) je 1968 u aspiriranom sadržaju radikularne ciste našao epitelne ćelije koje podsjećaju na akanaličke ćelije kod pemphigus vulgaris-a. U našem materijalu ta sličnost nije nađena. Mikrobiološki nalaz ukazuje na prisutnost gram pozitivnih koka-osebito predomina kontaminacija sa streptococcus alfa haemolyticus, streptococcus viridans a izolirane su i identificirane i druge aerobne bakterije: streptococcus pneumonia streptococcus SBE. Anaerobni kontaminati nisu izolirani niti u jednom uzorku, a od fakultativnih anaeroba izolirana i identificirana je samo escherichia coli kao gram negativna koliformna bakterija. Rezultati istraživanja mikroflora korijenskog kanala (8) ukazuju da su identificirani mikroorganizmi pripadali istim vrstama nađenim u usnoj šupljini.

Istraživanja izoenzima LDH u tkivu hronično inflamirane pulpe pokazuju da frakcija LDH₁ nedostaje uz veću relativnu aktivnost u zonama sporo pokretnih izoenzima. Također je primjećena signifikantna razlika u distribuciji relativnih aktivnosti izoenzima u pulpi zdravih i hronično inflamiranih zuba (9).

U odnosu na aktivnost izoenzima LDH u sadržaju ispitivanih radikularnih cista, postoji razlika u odnosu na kronično inflamiranu pulpu utoliko

što su u svakom uzorku cističnog sadržaja izolirane frakcije LDH₁. U nama dostupnoj literaturi nismo našli podatke o izoenzimskoj slici LDH radikularnih cista.

ZAKLJUČCI

1. Iz sadržaja ispitivanih uzoraka radikularnih cista izdiferencirane su četiri frakcije izoenzima LDH, od kojih najsporija predstavlja zapravo sumu izoenzima LDH₄ i LDH₅.

2. Određivanjem aktivnosti pojedinih frakcija izoenzima LDH ispitivanih uzoraka, moguće je približno ukazati na dužinu trajanja radikularne ciste.

3. Povećanjem udjela putridnih masa u sadržaju radikularne ciste te uz izolaciju fakultativnog anaeroba, pada aktivnost brzih frakcija LDH a raste onih sporih, osobito LDH₃. To ukazuje da su metabolički uvjeti u radikularnoj cisti pomjereni k anaerobiji.

4. Ovi rezultati se mogu smatrati preliminarnim i treba da budu provjereni dopunskim istraživanjima.

Literatura:

1. ARCHER H. Oral and maxillofacial surgery, Vol I, 5 th ed W. B. Saunders Company, 1975.
2. WAIS F T. Significance of findings following biopsy and histologic study of 100 periapical lesions. Oral Surg. 1958; 11: 650.
3. SULEJMANAGIĆ H, KRALJUŠIĆ M. Pctohistološke karakteristike granuloma i radikularnih cista. Stom Vj 1985; 3—4: 52.
4. BLOEMENDAL H. Zone electrophoresis in Blocks and Columns. Elsevier 1963.
5. ŠEREMET M, KAHVIC M. Periodontalna oboljenja-periodontitisi. Veselin Masleša, Sarajevo, 1983.
6. MORSE D R, PATNIK J. SCHACTERLE G R. Electrophoretic differentiation of radicular cysts and granulomas. Oral Surg, 1973; 35:249.
7. WHITTEN J B. Cytologic examination of aspirated material from cysts or cystlike lesions. Oral Surg 1968; 25:710.
8. ŠEREMET M. Uticaj biološkog i nebiološkog punjenja kanala zuba na mikrofloru i histopatološke promjene kod periapikalnih procesa. Doktorska disertacija. Sarajevo, 1978.
9. BAŠIĆ N, WINTERHALTER M, AVDIĆ Z. Analiza enzimograma laktat i malat dehidrogenaze u pulpi zuba. Stom Vj 1935; 1—2; 13.

A CORRELATION OF THE LDH ISOENZYMATIC ACTIVITY OF THE RADICULAR CYST CONTENT WITH CYTOLOGIC AND MICROBIOLOGIC ANALYSES

Summary

The aim of this study was to differentiate individual lactic dehydrogenase isoenzymes from the samples of the content of radicular cysts on a polyacrylamide gel using the method of electrophoresis, and to assess thereby the existence of correlation of the content isoenzymatic spectrum with its cytologic and

microbiologic analyses. The study was carried out in 9 samples. Biochemical analyses were done at the Institute of Biochemistry using the method of Bloemendaal, cytologic analyses were conducted at the Institute of Pathology, whereas microbiologic examinations were performed at the specialized laboratory Dr Robert Fried Institute of Microbiology in Sarajevo. The preliminary biochemical results have shown the LDH₃ fraction to prevail on an average in relation to LDH₁, LDH₂ and LDH₄ and ₅. The distribution of the relative LDH isoenzyme values in the content of radicular cysts is most alike that found in skeletal muscles. Desquamatory epithelial cells of blurred contours and erythrocytes but no inflammatory cellular elements were detected by the cytologic analysis of the radicular cyst material. In 8 out of 9 samples, exclusively aerobic microflora with the predominance of streptococcus alpha haemolyticus, was found by the microbiologic analysis, whereas one sample remained sterile. Anaerobic bacteria were not isolated in any of the samples studied. Along with an increase in the proportion of putrid masses in the content of radicular cysts and isolation of a facultative anaerobe, the activity of rapid LDH fractions decreases, whereas that of the slow ones, particularly of LDH₃, increases, pointing to the fact that metabolic conditions in the radicular cyst have shifted towards anaerobism.

Key words: radicular cyst, lactic dehydrogenase