

A l i n a G ę b s k a

**UZYSKIWANIE WCZESNYCH POSTACI PRÓCHNICY
SZKLIWA ZĘBÓW LUDZKICH METODAMI *IN VITRO***

Rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych

Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej

Katedry Mikrobiologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: Dr hab.n.med. Anna Kędzia prof.ndzw.

Gdańsk 2009

Pani Profesor Annie Kędzi

za przekazaną wiedzę, pomoc i opiekę naukową

w przygotowaniu niniejszej rozprawy

oraz cierpliwość, wyrozumiałość

i okazane mi serce

składam gorące podziękowanie

Pani Profesor Barbarze Kochańskiej

za pomoc merytoryczną i życzliwość

Panu Adamowi Wąskowi

Pani Ewie Kwapisz

Pani Aleksandrze Lamentowicz

za współpracę i pomoc w trakcie realizacji tej pracy

*również **serdecznie dziękuję***

S P I S T R E Ś C I

1. WSTĘP.....	5
1.1. Mikroflora jamy ustnej.....	7
1.2. Ślina – rola w procesie próchnicowym.....	12
1.3. Węglowodany – rola w procesie próchnicowym.....	17
1.4. Podatność tkanki zęba na rozwój próchnicy zęba.....	19
1.5. Etiologia próchnicy zębów.....	23
1.6. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego modeli doświadczalnych opracowanych w celu indukowania próchnicy zębów.....	36
2. CEL PRACY.....	45
3. MATERIAŁY i METODY.....	46
4. WYNIKI BADAŃ.....	57
5. DYSKUSJA.....	68
6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ.....	78
7. WNIOSKI.....	80
8. PIŚMIENNICTWO.....	82
9. DOKUMENTACJA BADAŃ.....	98
10. STRESZCZENIE.....	113

1. W S T Ę P

Próchnica – w języku łacińskim *caries* oznacza „rozkład, gnicie”. Już w XVI wieku Fauchard rozpoznawał próchnicę zębów na podstawie stwierdzenia jej makroskopowych objawów, które określano jako „zepsute zęby”. Współczesna definicja określa ją, jako miejscowe zniszczenie tkanki zęba przez kwasy organiczne produkowane przez bakterie. Obecnie diagnostyka procesu próchnicowego opiera się na kilku połączonych wynikach badań, do których należą: obecność aktywnej bakteryjnej płytki nazębnej na powierzchni zęba, zmiana w przezierności szkliwa i jego struktury na powierzchni oraz ubytek (8).

Próchnica zębów rozwija się w miejscu, gdzie możliwe jest gromadzenie się bakterii i tworzenie biofilmu, który nie jest często i w odpowiedni sposób tzn. profesjonalnie usuwany lub naruszany mechanicznie np. żucie, abrazja, atrycja (50).

Do próchnicy zębów dochodzi, gdy procesy demineralizacyjne przeważają nad remineralizacyjnymi. Proces rozwija się wieloetapowo. Zachodząca coraz większa utrata związków mineralnych szkliwa, powoduje początkowo zmiany na poziomie ultrastrukturalnym, które z czasem mogą przejść w otwarte ubytki szkliwa i przez zębinę dojść do miazgi. Utworzenie ubytku jest końcowym stadium próchnicy zęba (114).

Według czołowego badacza Silverstone (167) ognisko próchnicowe rozpoczyna się w warstwach podpowierzchniowych szkliwa zęba i może się w nich rozwijać nawet przez około 3 lata. Klinicznie, taką zmianę obserwuje się jako, białą, opalizującą plamę (*white opaque spot, white spot lesions*) (180).

Na wczesne zmiany próchnicowe (*caries incipiens*) w szkliwie mają wpływ zachodzące w jamie ustnej procesy demineralizacyjne i remineralizacyjne. Spostrzeżenia te potwierdziło wielu badaczy, m.in.: Fejerskov (49), Kidd (94), Marsh (114), ten Cate i wsp. (25), Silverstone (166, 167).

Jako pierwsi zjawisko podpowierzchniowych zmian w szkliwie zębów zaobserwowali Hollander i Saper (1935), ale uznali to za fotograficzny artefakt (3). Parę lat później autorzy Applebaum (1940), Thewlis (1940), Besic (1953), Coolidge i wsp. (1955), Gray i Francis (1963) zbadali i zweryfikowali zjawisko podpowierzchniowej demineralizacji szkliwa (3, 166).

Darling (1942) produkował sztuczną próchnicę szkliwa *in vitro* prowadząc inkubację zębów w bulionie z laktozą zaszczerpionym mikroorganizmami kwasotwórczymi i w roztworze z kwasem mlekowym. Powstałe uszkodzenia w każdym z tych systemów, w badaniu mikroradiograficznym, wykazały nietkniętą warstwę powierzchniową nad zdemineralizowanym obszarem. Badacz sugerował, że zachowanie tej powierzchni może być spowodowane obecnością posiadanej „błonki” szkliwa (166).

W kolejnych doświadczeniach Darling (1958) zademonstrował miejsca „przejścia” czynników próchnicotwórczych przez powierzchnię szkliwa. W mikroskopie polaryzacyjnym i metodą mikroradiografii wykazał, że są one związane z przebiegiem linii Retziusa w zmienionym obszarze (166).

Hals i wsp. (1955) przedstawili związek między procesem demineralizacji a dyfuzją kwasów do szkliwa. Wykazali, że jest tylko jedna możliwość wytworzenia podpowierzchniowych zmian, przez pozostawienie odpowiednio dobrze zmineralizowanej warstwy powierzchniowej szkliwa, której pH wynosi 4,12 – 5,25. Ponadto zademonstrowali, że usunięcie tej pierwotnej warstwy i wyeksponowanie jej na warunki sprzyjające podpowierzchniowej demineralizacji, powoduje powstanie ubytków powierzchniowych – na zewnętrznej powierzchni szkliwa (166).

Z kolei Sperber i Buonocore (1963a) uzyskiwali *in vitro* zmiany w postaci „white spots”, wykorzystując do tego bufor kwasowy i wykazali, że atak kwasów na powierzchnię jest redukowany, gdy do tego buforu zostaną dodane pewne aniony kwasowe (166).

Gray i Francis (1963) wytwarzali także próchnicę zębów w warunkach *in vitro*, przez zastosowanie buforu kwasowego z dodatkiem organicznego polimeru, hydroksyetylocelulozy oraz jonów wapnia w postaci CaCl_2 . Z przeprowadzonych badań mikroradiograficznych wynikało, że jony te redukowały stopień demineralizacji i powodowały wzrost grubości nietkniętej zewnętrznej warstwy powierzchniowej szkliwa (3, 166).

Jak zauważyli Brudevold i wsp. (1965) większa odporność warstwy powierzchniowej szkliwa na rozpuszczanie jest przypisana charakterystycznemu składowi tej warstwy, wysokiemu stopniowi mineralizacji oraz małej zawartości wody i węglanów a także kumulowaniu jonów fluoru (166).

Jeśli ząb nie ma zmian makroskopowych, staje się możliwe samoistne cofnięcie wczesnych zmian próchnicowych, przy zachowaniu odpowiedniej dawki fluoru i ślinie bogatej w mikroelementy (167, 175, 180).

1.1 Mikroflora jamy ustnej

Jak oszacowano, ciało człowieka liczy w przybliżeniu 10^{14} komórek, z czego tylko 10% z nich jest charakterystycznych dla organizmu ludzkiego, bowiem reszta (90%) to komórki drobnoustrojów. Te mikroorganizmy stanowią stałą, rezydentną mikroflorę. Zasiedlanie organizmu człowieka przez mikroorganizmy rozpoczyna się w momencie jego narodzin lub tuż po narodzinach, a mikroflora zróżnicowana i w miarę stabilna wtedy pozostaje w równowadze z makroorganizmem (homeostaza) (114).

Zdrowa jama ustna jest środowiskiem-ekosystemem, w którym występuje kilka siedlisk określonych gatunków mikroorganizmów. W tych siedliskach, uznanych za nisze, poszczególne gatunki drobnoustrojów pełnią te same funkcje i uniemożliwiają innym mikroorganizmom zasiedlenie danej niszy. W jamie ustnej wyodrębnia się kilka charakterystycznych nisz. Są to: usta, błona śluzowa policzków i podniebienia, język, dziąsła i powierzchnie twarde czyli zęby. Każde z tych środowisk podlega zmianom w ciągu całego życia człowieka. Obecnie można zidentyfikować co najmniej 300 gatunków drobnoustrojów występujących w jamie ustnej (114).

Błony śluzowe jamy ustnej noworodka, w ciągu kilku godzin po jego urodzeniu, zostają skolonizowane przez pierwsze drobnoustroje. Są to ziarenkowce Gram-dodatnie z gatunku *Streptococcus salivarius*. Te pierwsze bakterie noworodki nabywają od matek. W późniejszym czasie pojawiają się kolejne streptokoki należące do gatunków: *S.mitis*, *S.oralis*, *S.anginosus* i *S.gordonii*. Z upływem lat mikroflora organizmu ludzkiego staje się coraz bardziej urozmaicona. Pojawiają się bakterie Gram-ujemne beztlenowe z rodzaju *Fusobacterium*, *Prevotella* i *Veillonella* (116). Mogą także być obecne drobnoustroje mikroaerofilne, tj. *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia* czy *Eikenella*. Wyrzynanie się pierwszych zębów mlecznych powoduje powstawanie kolejnych nisz jamy ustnej. Do powierzchni

zębów przylegają drobnoustroje, które mają cechę adhezji. Wśród nich są paciorkowce z gatunków: *Streptococcus mutans* oraz *S.sanguinis* (poprzednio *S.sanguis*). Z czasem do mikroflory jamy ustnej dołączają ziarniaki Gram-ujemne *Neisseria*, bakterie nitkowate Gram-dodatnie *Actinomyces*, pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, *Rothia*, *Porhyromonas* a także *Aggregatibacter* (poprzednio *Actinobacillus*). Pojawieniu się zębów towarzyszy szczelina dziąsłowa z jej własnym, odrębnym źródłem składników odżywczych – płynem dziąsłowym. Szczeliny kolonizowane są głównie przez drobnoustroje beztlenowe, tj. krętki z rodzaju *Treponema* oraz wrzecionowce z rodzaju *Fusobacterium*.

Przy wymianie uzębienia z mlecznego na stałe mikroflora podlega pewnym zmianom (18). Na zmianę mikroflory dodatkowo wpływają zakładane do ubytków wypełnienia, ekstrakcje zębów, użytkowanie protez zębowych oraz wszystkie zabiegi stomatologiczne (np. założenie implantu czy wykonanie scalingu).

Na mikroflorę jamy ustnej wpływa obecna tu ślina, która umożliwia utrzymywanie neutralnego pH, temperatura w zakresie 35- 36°C oraz swoiste i wrodzone odpornościowe czynniki obronne gospodarza (114). Są to tzw. czynniki endogenne. Do czynników egzogennych oddziałujących na florę jamy ustnej zalicza się: higienę jamy ustnej, pokarm, choroby, zażywane leki, palenie tytoniu, radio- i chemioterapię. Wiek i płeć także wpływają na rodzaje bakterii obecnych w jamie ustnej. U osób starszych często pojawiają grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*, a nawet patogeny oportunistyczne, normalnie nie występujące w jamie ustnej takie jak pałeczki jelitowe, np. (*Klebsiella spp.*, *Escherichia spp.*, *Pseudomonas spp.*)

Flora jamy ustnej podlega pewnym zmianom przez całe życie osobnicze: tzn. od narodzin, po pojawieniu się zębów mlecznych, następnie stałych, po utracie uzębienia i w okresie użytkowania protez zębowych (114).

Płytką nazębna jest to nalot utworzony na powierzchniach twardych jamy ustnej, który składa się z żywych i martwych bakterii, ich produktów metabolizmu wraz z produktami gospodarza, pochodzącymi ze śliny (157).

Płytką nazębna, zwana też bakteryjną, tworzy się już w kilka minut po oczyszczeniu zębów. Na czystych powierzchniach zębów odkłada się najpierw bezbakteryjna błonka nabyta (pellicle), w której składzie są obecne glikoproteiny

(fosfolipidy, lipidy), pochodzące ze śliny (104, 154, 171). Pellicle pojawiająca się w ciągu 4 godzin, jest formą bezkomórkową o grubości około 0,01-1µm, do której przylaczają się drobnoustroje. Adhezja-przyleganie bakterii do powierzchni zębów jest możliwe dzięki obecności, na powierzchni komórek bakterii, struktur zwanych adhezynami, które rozpoznają odpowiednie receptory glikoproteinowe zlokalizowane w błonie nabytej. U bakterii rolę adhezyn pełnią najczęściej fimbrie. Czynniki pochodzące od gospodarza, np. człowieka, zwane są ligandami. Ligandy i adhezyny łączą się ze sobą za pomocą sił Van-der-Waalsa lub elektrostatycznych (19).

Błonka nabyta pełni ważną, modyfikującą rolę w rozwoju procesu próchnicowego. Jej selektywna przepuszczalność ogranicza transport jonów, zarówno do wewnątrz, jak i na zewnątrz tkanki zęba. Dzięki niej następuje zahamowanie odwapniania podpowierzchniowych warstw szkliwa zęba w warunkach *in vitro* (193).

W początkowym etapie tworzenia się płytki bakteryjnej w warunkach tlenowych, jako pierwsze przylegają ziarenkowce Gram(+). Należą do nich paciorkowce z rodzaju *Streptococcus* z gatunków: *S.oralis*, *S.mitis*, *S.sanguinis*, *S.gordonii* czy *S.mutans*. (ok.2%). W ciągu doby szybko wzrasta ich liczba w płytce nazębnej. W zależności od miejsca powierzchni zęba bakterie tworzą pojedynczą warstwę lub wiele warstw. W ciągu 48 godzin formowania się płytki nazębnej paciorkowce są grupą dominującą, zarówno na szkliwie, jak i na powierzchni korzenia zęba. Dowodzą tego badania przeprowadzone w warunkach *in vivo* i *in vitro* (139).

We wczesnym etapie, w wytworzonej kilkugodzinnej płytce nazębnej stwierdza się mniej żywych bakterii w porównaniu z fazami późniejszymi, np. po 24 godzinach. Badania wykazują, że we wczesnej fazie działają antybakteryjne czynniki śliny, które hamują przyleganie bakterii (187). *Streptococcus mutans* i *S.sobrinus* nie odgrywają znacznej roli w początkowym okresie tworzenia się płytki i słabo przylegają do niej. Dotyczy to zwłaszcza *S.mutans*, mimo iż produkuje lepkie zewnątrzkomórkowe polisacharydy (140).

Dzięki wytwarzanym odpowiednim receptorom, paciorkowce jamy ustnej mogą selektywnie przylaczają do siebie kolejne drobnoustroje, np.: Gram-dodatnie

bakterie z rodzaju *Actinomyces*, pałeczki z gatunku *Corynebacterium matruchotii* czy *Propionibacterium acnes*. Gatunki *Streptococcus gordonii*, *S.sanguinis* czy *S.oralis*, przyłączają pałeczki *Actinomyces naeslundii*, do których z kolei mogą dołączyć pałeczki *Eikenella corrodens* lub ziarniaki *Veillonella atypica* (101).

Niektóre bakterie wytwarzają wielocukier tzw. glikokaliks na powierzchni ściany komórkowej, który ułatwia ich kolonizację i przyleganie do różnych powierzchni twardych i miękkich. Ponadto umożliwia on zlepianie się bakterii, które nie mają zdolności adhezyjnych (157).

W miarę pogrubiania się płytki nazębnej można zauważyć przesuwanie się dominacji z jednej grupy bakterii na drugą. Paciorkowce ustępują miejsca promieniowcom, które coraz bardziej przeważają w płytce. W dojrzałej płytce na ogół już nie występuje np. pionierski paciorkowiec *S.oralis* (96).

W kilkudniowej płytce nazębnej bakterie z rodzaju *Actinomyces* umiejscawiają się prostopadle do powierzchni zęba, a do nich przylegają kolejne bakterie sferyczne, tworząc struktury zwane „kolbami kukurydzy”. Struktury te składają się z włókna centralnego (pałeczka) pokrytego kulistymi drobnoustrojami (117). Agregacja bakterii jest ważną cechą wspomagającą tworzenie warstw i zwiększającą różnorodność gatunków w płytce nazębnej. W miarę upływu czasu w płytce nazębnej obniża się potencjał oksydo-redukcyjny, doprowadzając do wytworzenia warunków beztlenowych i zaczynają przeważać w niej beztlenowce i bakterie mikroaerofilne z gatunku *Veillonella atypica*, *Rothia dentocariosa*, *Fusobacterium nucleatum*, *Corynebacterium matruchotii*, *Propionibacterium acnes* i z rodzajów *Peptostreptococcus*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema* czy też *Aggregatibacter* (156). Po 9 dniach w płytce dominują drobnoustroje beztlenowe. Kilkutygodniowa płytka nazębna jest już strukturą dojrzałą, dobrze zorganizowaną, w której bakterie stanowią 50-70% a nawet 80% całej jej masy, są zbite i ściśle przylegają do bezpostaciowej formy płytki – tzw. matrycy (matrix). Liczba bakterii w płytce wynosi 10^{11} /g masy (12, 114).

Badania laboratoryjne wykazują, że składniki śliny wpływają na adhezję drobnoustrojów do powierzchni zębów. Białka bogate w prolinę powodują lepsze przyleganie do hydroksypapatytu szkliwa bakterii *S.mutas*, *Porphyromonas*

gingivalis, *Prevotella loescheii* czy *P.melaninogenica*, a stateryna umożliwia adhezję *Actinomyces viscosus* (134).

Bakterie wytwarzają różne enzymy, które także ułatwiają im przeżycie w płytce nazębnej. Paciorkowce *S.oralis* produkują proteazy trawiące immunoglobuliny IgA. Promieniowce i niektóre szczepy *S.mitis* wytwarzają neuraminidazy, które odcinają grupę kwasu sialowego z łańcucha oligocukrowego, obecnego w mucynie ślinowej (114).

Źródłem pożywienia dla bakterii, zarówno tych w jamie ustnej, jak i w bakteryjnej płytce nazębnej, są tzw. czynniki endogenne i egzogenne. Ślina, czynnik endogeny, dostarcza im organicznych składników, takich jak peptydy, glikoproteiny, glukoza oraz składniki mineralne. Węglowodany, czynnik egzogeny, są metabolizowane przez bakterie płytki na kwaśne produkty, które następnie biorą udział w procesie demineralizacji szkliwa, prowadzącym do próchnicy zębów (114).

Płytką nazębną zostaje utworzona na większości powierzchni zębów. W zależności od miejsca pochodzenia, wyróżnia dwa rodzaje płytek nazębnych – naddziąsłową i poddziąsłową. Płytką naddziąsłową tworzy się na bruzdach (głównie trzonowców), na powierzchniach styknych zębów i na powierzchniach gładkich zębów (policzkowych i podniebiennych). Płytką poddziąsłową powstaje poniżej linii dziąseł i w szczelinie dziąsłowej.

Bakteryjna płytka nazębna może ulec mineralizacji (zwapnieniu). Jeśli ślina jest bardzo przesycona jonami wapniowymi i fosforanowymi, to jony te mogą zostać odłożone w warstwy płytki nazębnej. Gdy nie ma przeszkód, płytka rozrasta się, a drobnoustroje, za pomocą proteaz i fosfataz, mogą degradować niektóre czynniki śliny (np. staterynę) i sprzyjać procesowi mineralizacji. Tworzą się nierozpuszczalne, zlewające się kryształki fosforanu wapnia i bakteryjna płytka nazębna zmienia się w kamień nazębny. W skład dojrzałego kamienia nazębnego wchodzi 80% zmineralizowanego materiału (sucha masa), a 20% to składniki organiczne (157).

Kamień nazębny ma porowatą, szorstką powierzchnię i dlatego jest idealnym miejscem kumulowania się szkodliwych toksyn bakteryjnych, sprzyjających chorobom przyzębia.

1.2 Ślina – rola w procesie próchnicowym

Ślina to stały i bardzo ważny element jamy ustnej. Jej główną rolą jest ciągle zwilżanie błon śluzowych policzków, dziąseł i języka oraz powierzchni zębów.

Ślina jest wydzieliną kilku gruczołów ślinowych dużych i małych. Duże gruczoły stanowią parzyste ślinianki przyuszne, podjęzykowe i podżuchwowe. To one w 90% wytwarzają ślinę. Reszta śliny jest wydzieliną małych gruczołów ślinowych, umiejscowionych w błonie śluzowej jamy ustnej, z wyjątkiem dziąseł i części przedniej podniebienia twardego. W ślinie mieszanej występuje niewielka ilość płynu dziąsłowego, pochodzącego ze szczeliny dziąsłowej, resztki pokarmowe, złuszczone komórki nabłonka oraz bakterie wraz z ich produktami metabolizmu. Głównym składnikiem śliny jest woda, która stanowi 99%. Pozostałość (1%) to białka, elektrolity, czynniki organiczne jak i nieorganiczne. Zdrowy człowiek wydziela od 0,5 do 1 litra śliny dziennie (39).

Wyróżniamy dwa rodzaje śliny, tzw. niestymulowaną i stymulowaną. Podstawowa ślina zostaje wydzielana do jamy ustnej bez stymulacji i nazywana jest śliną niestymulowaną, spoczynkową. Ślina spoczynkowa, wydzielana w 65% przez ślinianki przyuszne i podjęzykowe, jest płynna, wodnista, przejrzysta i lekka, gdyż produkują ją komórki surowicze tych gruczołów. Gęsta, lepka i śluzowa ślina pochodzi ze ślinianek podniebiennych i nasady języka. Mieszanie śliny, pochodzącej z różnych gruczołów, następuje podczas żucia, poruszania językiem czy ustami. Ślina spoczynkowa ma wartość pH w zakresie od 6,5 do 6,9, a ślina mieszana stymulowana ma pH 7,0-7,5. Jest ona bardziej płynna w przeciwieństwie do śliny spoczynkowej. Ilość wydzielania jej zależy od częstości stymulacji (96).

Wydzielanie śliny mieszanej spoczynkowej (np. między posiłkami – gdy brak działania bodźca) wynosi 0,3-0,5 ml/min. Spożywanie pokarmów pobudza do aktywności 3 duże gruczoły ślinowe, a prędkość wydzielania śliny zwiększa się od 1,5 do 2,3ml/min. Podczas snu natomiast wydzielanie jej ulega zdecydowanemu obniżeniu i może wynosić do około 0,05ml./min.

Zależnie od miejsca w jamie ustnej, ślina ma inny skład, objętość i szybkość przepływu. Po powierzchniach gładkich lepiej spływa i usuwa zanieczyszczenia niż w bruzdach i rowkach na powierzchni zębów. Nierównomierny jej przepływ

powoduje, że niektóre powierzchnie są bardziej narażone na powstawanie bakteryjnej płytki nazębnej (134).

Ślina zawiera wiele składników organicznych. Wśród nich są białka, lipidy, węglowodany, czy też azotowe substancje niebiałkowe (mocznik, kwas moczowy). Ważną rolę przypisuje się białkom należącym do immunoglobulin klasy A, M i G. Największe stężenie w ślinie uzyskują przeciwciała IgA, zwane wydzielniczymi (sekrecyjnymi), które wspomagają fagocytozę paciorkowców przez leukocyty. Razem z immunoglobuliną G te przeciwciała są zdolne do aglutynacji niektórych bakterii, np. *Streptococcus mutans*, ułatwiając usuwanie ich z jamy ustnej wraz ze śliną. Hamują także przyleganie bakterii do nabłonków policzków i do szkliwa (106). Natomiast immunoglobulina M wywiera silne działania lityczne na drobnoustroje.

Mucyna (glikoproteina) jest bardzo ważnym białkiem ślinowym, które połączone z węglowodanami przyczynia się do opłaszczania i usuwania niektórych drobnoustrojów z jamy ustnej (151). Oprócz tego białka obecne są także histatyny, syntetyzowane przez komórki przewodów wyprowadzających ślinianek - podżuchwowej i przyusznej. Histatyny to niskocząsteczkowe peptydy, które wykazują zdolności bakteriostatyczne jak i bakteriobójcze wobec paciorkowców z gatunku *Streptococcus mutans* oraz wobec grzybów, np. z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* (88). Obniżony poziom tych peptydów zauważa się u pacjentów zakażonych wirusem HIV, u których często dochodzi do oportunistycznych infekcji grzybiczych w jamie ustnej (112).

Ślina zawiera także cystatyny, które pełnią funkcję ochronną i hamują działanie niektórych proteaz bakteryjnych (89). Obecne są również peptydy o wysokim powinowactwie do hydroksyapatytu tworzącego szkliwo. Są to tzw. stateryny, białka bogate w prolinę (PRPs), wytwarzane przez ślinianki przyusne i podżuchwowe. Z nimi wiążą się, jako jedne z pierwszych, bakterie *Streptococcus gordonii*, gdy zaczyna formować się bakteryjna płytka nazębna (101). Rolą ich jest spontaniczne hamowanie precypitacji wapnia i tworzenie środowiska ochronno-naprawczego, potrzebnego do zachowania integralności zębów. Kochańska w badaniach wykazała, że mała ilość stateryn w ślinie nasila rozwój próchnicy (99).

Z wymienionych powyżej peptydów tylko histatyny i PRPs są składnikami charakterystycznymi wyłącznie dla śliny (158).

Lipidy, obecne w małym stężeniu w ślinie, to głównie wolne kwasy tłuszczowe, cholesterol i fosfolipidy. Przypuszcza się, że razem z mucynami mogą hamować przyleganie bakterii do powierzchni zębów oraz zapobiegać dyfuzji kwasów bakteryjnych przez błonkę nabytą, pokrywającą zęby.

Lizozym to białko enzymatyczne, które uczestniczy w lizie komórek bakterii Gram(+) i grzybów z rodzaju *Candida*, występujących w jamie ustnej. Powoduje ono hydrolizę wiązania $\beta(1-4)$ pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozoaminą warstwy peptydoglikanowej ściany komórki bakteryjnej (134).

Laktoferryne, to kolejna glikoproteina ślinowa, zdolna do wiązania i blokowania dostępu do żelaza patogenom jamy ustnej. Ma działanie bakteriostatyczne (10,11,141). Laktoferryne wolna od żelaza to tzw. apolaktoferryne, która wykazuje bójcze działanie wobec paciorkowców z gatunku *S.mutans*. Oho i wsp.(142) wykazali w badaniach *in vitro*, że laktoferryne hamuje adhezję *S.mutans* do hydroksyapatytów zębów pokrytych śliną.

Sialoperoksydaza (peroksydaza ślinowa), jak i mieloperoksydaza stanowią tzw. system peroksydazy w ślinie (41). System ten uaktywnia się w środowisku tlenowym i wykazuje wysoką aktywność przy niskim pH. Działa także przeciwbakteryjnie. Chroni białka i komórki gospodarza przed toksycznym działaniem nadtlenu wodoru (H_2O_2), wytwarzanym przez niektóre gatunki stałej flory jamy ustnej, np. *Streptococcus mitis*. W zależności od pH i stężenia toksycznego podcyjanitu (pH obojętne) lub kwasu podcyjanowego (pH niskie) system peroksydazy blokuje metabolizm bakterii *S.mutans*, *L.acidophilus*, grzybów drożdżopodobnych i wielu bakterii beztlenowych. Wykazuje ponadto działanie przeciwwirusowe.

Amylaza jest enzymem obecnym w ślinie w największej ilości, stanowi około 50% całkowitego białka śliny. Bierze udział w procesie trawiennym w jamie ustnej, rozkłada skrobię na cukry – maltozę i glukozę. Maltoza może być fermentowana przez bakterie jamy ustnej. Rolą amylazy jest oczyszczanie jamy ustnej z pozostałości pokarmowych i powstających tu kwasów (134).

Ważnym składnikiem śliny, który podnosi pH w jamie ustnej, jest peptyd ślinianki przyusznej, zwany sialiną (134). Podobną rolę pełni produkt metabolizmu

gruczołów ślinowych mocznik, degradowany do amoniaku i dwutlenku węgla przez ureazę, którą wytwarzają bakterie obecne w płytce nazębnej. Amoniak uczestniczy w zobojętnianiu kwasów. Podwyższone pH chroni szkliwo zębów przed szkodliwym działaniem kwasów produkowanych przez bakterie jamy ustnej (114).

Oprócz organicznych, ślina posiada także nieorganiczne składniki. Są to kationy i aniony w postaci jonowej, których ilość w ślinie nie jest stała i podlega wahaniom dobowym, na skutek reakcji zachodzących w jamie ustnej. Większość z tych czynników pochodzi z krwioobiegu (147).

Jedne z ważniejszych jonów, to aniony wodorowęglanowe (HCO_3^-), które tworzą system buforowy śliny - wodorowęglan/kwas węglowy. Ilość anionów HCO_3^- znacznie wzrasta w ślinie stymulowanej.

Fosforany, w postaci PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$, stanowią ważne składowe mineralne śliny. Wpływają na strukturę szkliwa w czasie dojrzewania i w procesie remineralizacji. Tworzą ponadto układ buforowy – fosforan/kwas fosforowy. Na stężenie jonów fosforanowych wpływa pH śliny. Ze wzrostem podatności na próchnicę obniża się stężenie fosforanów w spoczynkowej ślinie mieszanej i znacznie spada poziom pH (98).

Obecne w ślinie jony chlorkowe (Cl^-) aktywują amylazę, a jony fluorkowe (F) wpływają, podobnie jak fosforany, na strukturę szkliwa i proces jego demineralizacji. Fluorkom przypisuje się działanie bakteriostatyczne. Ilość jonów fluorkowych w ślinie zależy od ich stężenia w środowisku, np. w wodzie pitnej. Jony jodowe (J^-) występują w systemie peroksydazy, tym samym biorą udział w mechanizmach obronnych jamy ustnej.

Do kationów należą jony sodowe (Na^+), potasowe (K^+), wapniowe (Ca^{+2}) i magnezowe (Mg^{+2}). Jony sodowe i potasowe biorą udział w transporcie aktywnych związków przez błony komórkowe. Jony K^+ i Ca^{+2} występują w ślinie stymulowanej na stałym poziomie, podczas gdy stężenie jonów Na^+ wzrasta. Ślina spoczynkowa ma niski poziom jonów sodowych. Jony sodowe, obecne w hydroksyapatytach, sprzyjają ich rozpuszczaniu w kwasach produkowanych przez drobnoustroje jamy ustnej. Wapń w ślinie może występować postaci wolnej – zjonizowanej lub związanej, w zależności od pH śliny. Wiadomo, że apatyty szkliwa także są zbudowane z tych jonów. Jony wapniowe biorą udział w remineralizacji

początkowych, drobnych uszkodzeń szkliwa. Magnez, podobnie do wapnia, uczestniczy w budowie szkliwa zębów i aktywacji wybranych enzymów śliny. Jednakże zbyt duża jego ilość w hydroksyapatycie zwiększa rozpuszczalność szkliwa w kwasach (147).

W jamie ustnej ślina spełnia rolę: ochronną, buforową, obronną, odżywczą, trawienną i wydalniczą (147).

Funkcję ochronną zawdzięcza swojej płynnej konsystencji i obecności glikoprotein. Tworzy warstwę pokrywającą wszystkie struktury miękkie i twarde jamy ustnej. Chroni przed zranieniem i wysuszeniem, ułatwia żucie i połykanie pokarmów. Mechanicznie oczyszcza jamę ustną z resztek pokarmowych, złuszczonego nabłonka, jak i obecnych tu licznych drobnoustrojów.

Buforowa funkcja śliny związana jest z obecnością dwóch układów: węglanowego i fosforanowego. Póki jony wodorowęglanowe są w ślinie i jej pH nie ulega zmianie, to zachowana jest równowaga kwasowo-zasadowa i dochodzi do neutralizacji kwasów organicznych, pochodzących z pokarmu i produkowanych przez bakterie jamy ustnej. Jeśli pH jest kwaśne, to obecne tu jony HCO_3^- lub amoniak wiążą jony wodorowe. Pojemność buforową warunkuje tempo metabolizmu, gospodarka hormonalna oraz stan zdrowia. Uważa się, że jest ona wyższa u mężczyzn niż u kobiet (103).

W sprawowaniu funkcji odżywczej śliny pomagają jej składowe mineralne czyli: jony wapnia, fosforanowe, magnezowe i fluorkowe, ponieważ biorą udział w dojrzwaniu oraz remineralizacji szkliwa zębów. Przy pH wynoszącym 5,5, ślina stanowi roztwór nasycony jonami wapniowymi i fosforanowymi w stosunku do hydroksyapatytów szkliwa. Jeśli pH obniża się, ślina staje się roztworem nienasyconym tych jonów, co prowadzi do ich dyfuzji z hydroksyapatytów do śliny. Ponowny wzrost pH, nasycenie roztworu śliny jonami wapnia i fosforanów, powoduje odwrotny przepływ jonów, tzn. ze śliny do hydroksyapatytów. Ważne jest, aby pH nie spadało poniżej wartości 5,5, gdyż wtedy dochodzi do znacznej utraty związków mineralnych, a to prowadzi do wypadania z pryzmatów szkliwa hydroksyapatytów i powstania ubytku.

W funkcji trawiennej śliny pomagają jej enzymy ślinowe, tj. amylaza (ptialina) czy lipaza. Amylaza rozkłada nierozpuszczalne wielocukry – skrobię do maltozy, a lipaza podjęzykowa metabolizuje część tłuszczów (83).

Wydalnicza rola śliny polega na usuwaniu z jamy ustnej różnych substancji. Są to odpowiednio np. jony metali ciężkich (ołów), mocznik i niektóre leki.

Rola obronna śliny sprowadza się do ograniczenia adhezji bakterii do powierzchni błon śluzowych i zębów. Uczestniczą też w tym procesie sialoperoksydaza, lizozym, laktoferryna, aglutyniny i przeciwciała.

1.3 Węglowodany – rola w procesie próchnicowym

Liczne badania prowadzone do tej pory udowodniły, że węglowodany są tą grupą składników dostarczanych z dietą, która ma największy wpływ na zapoczątkowanie przez bakterie demineralizacji tkanek zęba (78). Różne pokarmy oraz napoje, zawierające duże ilości cukru, przyczyniają się do obniżenia pH w bakteryjnej płytce nazębnej. Bakterie metabolizują węglowodany do kwasów, które powodują obniżenie pH do wartości krytycznej, wynoszącej 5,0. O ile nie zadziała system buforowy śliny, przywracający pH do poziomu neutralnego 6,5 – 7,0 i nie nastąpi usunięcie kwasów, może dojść do zainicjowania podpowierzchniowej demineralizacji szkliwa.

Za węglowodany związane z rozwojem próchnicy uważa się niektóre monosacharydy, disacharydy i polisacharydy. Do monosacharydów zaliczamy: glukozę i fruktozę; do disacharydów sacharozę, maltozę i laktozę; a do polisacharydów skrobię. Spośród wymienionych węglowodanów największy udział w próchnicy ma sacharoza.

Sacharoza to węglowodan oddziałujący najbardziej niekorzystnie na zęby, ponieważ jest najlepszym substratem dla bakterii próchnicotwórczych. Jest rozkładana do glukozy i fruktozy. W obecności tego węglowodanu bakterie najszybciej syntetyzują zewnątrzkomórkowe polisacharydy, wchodzące w skład bakteryjnej płytki nazębnej.

Hardwick (70) uważał, że w starożytności próchnica występowała rzadko. W diecie ludności żyjącej w tej cywilizacji nie było cukrów, gdyż ich dietę stanowiły najczęściej zioła, surowe ziarna i korzenie roślin. U ludzi współcześnie egzystujących w prymitywnych warunkach jest podobnie. Spożywają niewielkie ilości węglowodanów i próchnica występuje u nich na niskim poziomie. Wraz z narastającym dobrobytem, gdy zmieniają się nawyki żywieniowe, dochodzi do wzrostu zachorowań na próchnicę (96).

Stephan już w 1944r. wykazał doświadczalnie bezpośrednią zależność między niskim pH płytki nazębnej i skoncentrowanymi w niej kwasami a zmianami, jakim podlega w tych warunkach twarda tkanka zębów (150). Płukanie 10% roztworem sacharozy „aktywnych ubytków próchnicowych” doprowadzało do uzyskania w płytce nazębnej najniższego pH. Natomiast najwyższe wartości pH stwierdzano na powierzchni szkliwa zdrowego. Udowodnił tym samym, że osoby z intensywną próchnicą narażają się na nią jeszcze bardziej stosując niewłaściwą dietę, spożywając często duże ilości węglowodanów (150).

Bakterie płytki nazębnej mogą produkować bardzo duże ilości kwasów przy dostarczaniu nawet niewielkiej ilości cukrów. Michalek i wsp. (126), w badaniu przeprowadzonym na gnotobiotycznych szczurach wykazali, że dieta zawierająca niewielką ilość sacharozy np. 0,1% może być wystarczająca do zapoczątkowania próchnicy powodowanej przez paciorkowce z gatunku *S.mutans*.. Trudno zatem ustalić taką ilość sacharozy, aby można byłoby uznać ją za graniczną, która jest bezpieczna dla zębów. Takie same trudności dotyczą ustalenia bezpiecznego poziomu dla glukozy i fruktozy, które są spożywane w codziennej diecie. Inaczej jest z laktozą obecną w krowim mleku, którą uważa się za umiarkowanie kariogenną. Cykliczne spożywanie laktozy i jej wydłużony kontakt z zębami, na skutek zalegania, doprowadza do spadku pH płytki (58, 152). Badania mleka ludzkiego wykazały, że ma ono wyższą zawartość laktozy niż krowie. To samo dotyczy ilości wapnia i fosforanów, które blokują rozpuszczanie szkliwa przez kwasy.

Marthaler (118) oraz Newbrun i wsp. (135) zbadali zależność między spożywaniem cukru a próchnicą zębów u osób, które mają wrodzoną nietolerancję na fruktozę. Osoby te nie mogą spożywać fruktozy, jak i sacharozy, która składa się z glukozy i fruktozy. W badaniu osób z nietolerancją fruktozy okazało się,

iż pomimo podawania im sacharozy, próchnica kształtowała się na niskim poziomie (197).

Badania skrobi wykazały, że nie sprzyja ona rozwojowi próchnicy (135). Duża masa cząsteczkowa nie umożliwia dyfundowania w głąb płytki nazębnej i dlatego gromadzi się ona na jej powierzchni. Jednakże przedłużone zaleganie tego polisacharydu w jamie ustnej doprowadza do jego hydrolizy na cukry proste, dzięki amylazie ślinowej. Spożywanie skrobi surowej prowadzić może jedynie do niewielkiego obniżenia pH płytki nazębnej. Skrobia poddana obróbce np. poprzez gotowanie przyczynia się do takiego samego lub nieznacznego spadku pH, jaki powodują inne cukry (laktoza). Ma to związek z tym, że obróbka skrobi wpływa na skrócenie łańcuchów molekularnych, które z łatwością mogą wnikać do płytki nazębnej i dalej ulegać rozkładowi. Na potwierdzenie tego zjawiska Lingström i wsp. (107) przeprowadzili doświadczenie, w którym wykazali, że potrawy podawane między posiłkami sporządzone tylko ze skrobi spożywczej, przyczyniają się do nieznaczonej demineralizacji szkliwa oraz zębiny. Natomiast, gdy posiłki zawierały inne cukry, utrata składników mineralnych szkliwa była znacznie większa.

Streptococcus mutans posiada wiele enzymów zdolnych do cięcia różnych wiązań obecnych w cząsteczce skrobi. Jednakże nie ma to większego wpływu na tworzenie się ubytków w zębach, gdyż bakterie te nie wytwarzają kwasu ze skrobi (114).

Zatem z badań wynika, że decydujący wpływ na rozwój próchnicy ma częstość spożywanego cukru i czas jego przebywania w jamie ustnej, a nie jego ilość (68, 197).

Podsumowując, największe obniżenie wartości pH w bakteryjnej płytce nazębnej powoduje sacharoza, mniejsze fruktoza, maltoza i glukoza, a najmniejsze skrobia (nieprzetwarzana), która jest uznawana za niekariogenną.

1.4 Podatność tkanki zęba na rozwój próchnicy

Tkanka zęba składa się z materiału organicznego, jak i nieorganicznego. W zależności od stosunku ilościowego masy nieorganicznej do organicznej, wykazuje ona odpowiednią odporność na działanie środowiska. Zęby o prawidłowej

budowie i właściwym stopniu mineralizacji uważane są za odporne na działanie zewnętrznych czynników próchnicotwórczych (181). Struktura tkanki twardej zęba, kształtowana czasie odontogenezy, zależy od składników organicznych i nieorganicznych dostarczanych organizmowi w odpowiednich ilościach. Białka, witaminy (A,D,C), aminokwasy oraz sole mineralne (fosfor, wapń, fluor, żelazo, magnez) to niezbędne składniki do tworzenia organicznego podłoża tkanki zęba.

Szklivo zęba - najtwardsza tkanka organizmu ludzkiego jest bezkomórkową, wysoce zmineralizowaną warstwą zęba. Zbudowane jest w 96% ze związków nieorganicznych w postaci kryształów fosforanu wapnia, z 1% związków organicznych (glikoproteiny) oraz 3% wody. Kryształy wyglądem przypominają mineralny hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, a ułożenie zawartych w nim jonów wapniowych, fosforanowych i wodorotlenowych ma charakter krystalicznej siatki. W zależności od rodzaju zęba, grubość szkliva może wahać się od 2,6mm na powierzchni żującej do 2,4mm, odpowiednio w zębach trzonowych i przedtrzonowych. Najcieńsza warstwa występuje w okolicy szyjki korzenia zęba i wynosi 0,1mm. (25, 97).

Szklivo to struktura jednorodna. Powierzchniowa warstwa szkliva zawiera największe stężenia jonów fosforanowych, wapnia, fluoru, chloru i dlatego jest ona najtwardsza ze wszystkich warstw. Wydłużone, cylindryczne kryształy - element strukturalny szkliva o promienistym układzie, biegną przez całą jego szerokość tj. od wolnej powierzchni dośrodkowo w kierunku linii szklivno-zębinowej. Warstwa powierzchniowa zawiera gęsto ułożone, równoległe przylegające do siebie kryształy hydroksyapatytów (HA) w powtarzalnych układach, które tworzą pryzmaty szkliva. Przyrost pryzmatów powoduje, że szklivo wykazuje charakterystyczny układ warstwowy. Przestrzeń między nimi wypełnia substancja międzypryzmatyczna, która zawiera wodę i składniki organiczne. Substancja jest mniej zmineralizowana, a obecne w niej hydroksyapatyty są ułożone pod kątem 40-70 stopni w stosunku do długiej osi kryształów zawartych w pryzmatach. Warstwa międzypryzmatyczna ma zdolność do przyłączania różnych jonów anionowych, kationowych, wolnych jonów fosforanowych, cytrynianów oraz węglanów. W miarę wapnienia, utwardzania się szkliva i pogrubiania pryzmatów, ilość tej substancji maleje. W odróżnieniu od zasadochłonnych pryzmatów substancja jest kwasochłonna. W głębszych

warstwach, sąsiadujących z zębina, szkliwo jest bardziej miękkie w związku z większą zawartością jonów potasu, sodu i magnezu. Pryzmaty w tych warstwach są cieńsze, ponieważ maleje ilość kryształów HA, które są tutaj rzadziej upakowane. Pojawia się więcej substancji międzypryzmatycznej w przeciwieństwie do warstwy powierzchniowej, która posiada jej niewiele (97, 181).

Na powierzchni zewnętrznej kryształy szkliwa posiadają więcej fluorku a mniej węglanów niż głębiej położone warstwy. Taki układ powoduje, że warstwa zewnętrzna szkliwa jest bardziej odporna na rozpuszczanie. Skład warstwy otaczającej pryzmaty także wpływa na stopień rozpuszczalności kryształów. Obecność dużych ilości węglanów i cytrynianów przyczynia się do większej rozpuszczalności kryształów, co zwiększa podatność na próchnicę. Najbardziej zewnętrzna warstwa wokół kryształu jest warstwą uwodnioną, przez którą odbywa się adsorpcja i wymiana jonów między środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym zęba (25, 181).

Hydroksyapatyty są najbardziej stabilną formą fosforanu wapnia, gdy pH płynu tkankowego wynosi 7,4. Po wyrżnięciu zęba zewnętrzne warstwy szkliwa z apatytami są narażone na działanie pH w szerokim zakresie, na skutek stosowania różnej diety oraz obecności bakteryjnej płytki nazębnej.

Rozpuszczalność hydroksyapatytów jak i fosforanów wapnia jest uzależniona od wartości pH roztworu. Jeśli w roztworze znajdują się jony wapnia, fosforanowe PO_4^{3-} i wodorotlenowe OH^- to rozpuszczanie hydroksyapatytów jest wolniejsze i trwa do momentu nasycenia roztworu, w wyniku czego następuje zatrzymanie procesu rozpuszczania. Amfoteryczna powierzchnia hydroksyapatytów powoduje, że dobrze wiążą się zarówno białka kwasowe jak i zasadowe. Ich powierzchnia wykazuje ujemny ładunek, natomiast jony wapniowe mają ładunek dodatni. Gdy zostanie dodany kwas, jony fosforanowe i wodorotlenowe przyłączają jony wodorowe H^+ i tworzą odpowiednio jony wodorofosforanowe oraz wodę. Powoduje to usunięcie części jonów fosforanowych i wodorotlenowych z roztworu, który staje się nienasycony. Rozpuszczeniu ulega więcej hydroksyapatytów do czasu, gdy sytuacja odwróci się i roztwór ponownie będzie nasycony. W przypadku pH=5 aktywność jonowa w odniesieniu do hydroksyapatytu jest o wiele mniejsza od jego rozpuszczalności i roztwór staje się nienasycony. Przy

obojętnym pH=7 aktywność zwiększa się, a roztwór uważa się za przesycony. W sytuacji, gdy obniża się pH roztworu przesyconego, punkt przy którym roztwór ponownie jest nasycony, w odniesieniu do składników mineralnych kryształów, nazywany jest „pH krytycznym”. Krytycznym pH dla szkliwa jest wartość 5,5. W tym środowisku, w częściowo rozpuszczanych kryształach hydroksyapatytów, może dojść do powstania centralnego ubytku. Zmiany tego typu w szkliwie są widoczne w obrazie uzyskiwanym w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) (25). Dodanie jonów wapnia lub fosforanów do roztworu, w którym hydroksyapatyt jest rozpuszczany, zmniejsza ilość apatytów, które ulegną rozpuszczeniu. Dlatego, gdy w stanie równowagi wapń zostanie usunięty z roztworu przez czynnik wiążący go np. kwas, nastąpi rozpuszczenie większej ilości hydroksyapatytów.

Reasumując, kryształy HA ulegają rozpuszczeniu w kwasie, w nienasyconym roztworze tzn., gdy brakuje jednego lub wielu jonów. Proces rozpuszczania HA uzależniony jest od stopnia nasycenia roztworu.

W badaniach wykazano, że niektóre jony fosforanowe są wymieniane na jony węglanowe przy jednoczesnej zmianie wapnia na sód. Jak się jednak okazuje, jest to proces ograniczony, gdyż tylko pewna ilość węglanów zostaje umieszczona w sieci krystalicznej bez jej rozerwania. Powoduje to większą wrażliwość zęba na działanie kwasu.

Bardzo ważną cechą hydroksyapatytów jest zdolność wymiany jonu wodorotlenowego (OH^-) na jon fluorkowy (F^-). Włączony fluor utwardza apatyt, tworząc fluoroapatyt. Jest to forma zdecydowanie stabilniejsza od HA. Fluoroapatyt zawiera mniej węglanów i cytrynianów przez co nie ulega tak szybko rozpuszczeniu. Fluoroapatyty kumulują się w szkliwie, przede wszystkim w warstwie zewnętrznej, przez co nadają zębom większą odporność na działanie czynników zewnętrznych np. kwasy produkowane przez bakterie próchnicotwórcze. Obecność fluoru hamuje rozwój próchnicy zębów (25, 181).

Badania szkliwa świeżo wyrżniętego zęba wykazały, że jest ono niedojrzałe i zawiera dużo wody (powyżej 10%) w przestrzeniach niezmineralizowanych. Obecność kwasu w otoczeniu zęba powoduje powiększanie się przestrzeni między kryształami hydroksyapatytów. W takich warunkach łatwiej zachodzi dyfuzja

i wymiana jonów, co sprzyja szybszemu odwapnieniu i remineralizacji zęba. Z tego powodu „młode” zęby uznawane są za bardziej podatne na odwapnienia (102). Badania tkanki zębów mlecznych wykazały, że dojrzałe zęby mleczne charakteryzują się większą twardością niż młode zęby. W przypadku zębów stałych jest na odwrót, starsze stają się bardziej miękkie i kruche. Dzieje się tak, gdyż w starzejących się zębach następuje zmiana składu mineralnego tkanki twardej. Z wiekiem w zębach następuje wzrost poziomu wapnia (173), siarki, potasu i cynku (174, 176), co pozwala stwierdzić, że skłonność do próchnicy zależy od wieku zęba. Jednakże do tego stwierdzenia niektórzy autorzy mają nadal wątpliwości (176).

Pojęcie „podatność zębów na próchnicę” powoduje wiele sprzecznych opinii wśród fachowców. Twierdzą oni, że nawet wrodzonej skłonności do rozwoju próchnicy można skutecznie zapobiegać, dzięki np.: odpowiedniej higienie jamy ustnej, a zęby słabiej zmineralizowane (z hipoplazją) wcale nie są bardziej podatne na próchnicę. Pod wpływem działania bakteryjnych kwasów próchnicotwórczych każdy ząb staje się podatny na próchnicę, tak samo jak i na erozję (trawienie wolnymi kwasami z pożywienia) (82).

1.5 Etiologia próchnicy zębów

Próchnica zębów to ograniczony proces patologiczny, spowodowany działaniem bakterii próchnicotwórczych, którego następstwem jest demineralizacja i rozpad tkanki zęba. Jest chorobą wieloczynnikową. Aby do niej doszło muszą razem, jednocześnie, zaistnieć określone czynniki etiologiczne. Są to:

1. obecność bakterii próchnicotwórczych w płytce nazębnej;
2. podatne szkliwo – niedostateczna mineralizacja tkanki zęba;
3. obecność węglowodanów w jamie ustnej – dostarczane z dietą.

Współzależność tych czynników została przedstawiona w 1962r. przez Keyes’a i Jordana (92), jako zachodzące na siebie koła. (Ryc.1)

Ryc.1 Schemat przedstawiający czynniki, sprzyjające powstawaniu próchnicy zębów (92)



W 1987r. König (181) zmodyfikował ten schemat, uwzględnił czas jako kolejny ważny czynnik w rozwoju próchnicy i dodał czwarte koło (Ryc.2). Proces próchnicowy, jak wiadomo, wymaga odpowiednio długiego czasu i zazwyczaj rozwija się bardzo wolno.

Ryc.2 Zmodyfikowany schemat Königa, przedstawiający czynniki sprzyjające powstawaniu próchnicy zębów.



Rola bakterii w próchnicy zębów

Udział drobnoustrojów w powstawaniu wczesnej fazy próchnicy zębów brany był pod uwagę, już ponad sto lat temu, na przełomie XIX i XX wieku. Przełomem w badaniach stała się hipoteza dwustopniowego przebiegu próchnicy, którą wysunął amerykański stomatolog Willoughby Dayton Miller. Zakładał on, że pierwszym etapem próchnicy jest „bakteryjny atak kwasowy na powierzchnię szkliwa”, który prowadzi do jego demineralizacji, a drugim „rozpuszczenie odwapnionej zębiny”. Opierając się na tej teorii bakteryjno-chemicznej, próbował doświadczalnie wywołać próchnicę w warunkach *in vitro* (95, 181). Miller po raz pierwszy w 1890r. określił próchnicę jako chorobę wywoływaną przez bakterie (111) i dlatego jego odkrycie można uznać za epokowe w dziedzinie kariologii.

Jednak Miller nie rozważał wówczas znaczenia bakteryjnej płytki nazębnej w procesie powstawania próchnicy, na którą później w 1897r.zwrócił uwagę

Williams (122). Miller uważał, że za rozwój próchnicy są odpowiedzialne bakterie obecne w ślinie (122, 181).

Dopiero w 1924r. dr Clarke po raz pierwszy wyizolował drobnoustroj z ubytku próchnicowego, opisał go i nazwał *Streptococcus mutans*. Nazwę drobnoustroju, jako „*mutans*” uzasadnił tym, że paciorkowiec ten wykazuje tendencje do zmiany kształtu (forma kulista i lekko wydłużona przypominająca krótką pałeczkę) (36, 110, 122). Niestety nie udało się mu udowodnić roli tej bakterii w powstawaniu próchnicy. Odkrycia Clarke zostały potwierdzone 3 lata później przez Macleana (31).

Przełomowe okazały się lata 50 XX wieku, kiedy kolejne badania przeprowadzone przez Orlanda i wsp. wykazały, że próchnicę wywołują bakterie o ściśle określonych właściwościach (181). Do swoich doświadczeń wykorzystali szczury gnotobiotyczne – wyjęte w jałowych warunkach z macicy po cesarskim cięciu. Szczury te hodowano w jałowych boksach i karmiono jałową dietą przez 150 dni. Wykazali też, że karmienie gnotobiotycznych zwierząt taką dietą, która w 2/3 składa się z sacharozy, nie wywołuje u nich próchnicy zębów. Natomiast w grupie zwierząt kontrolnych, karmionych tą samą dietą w zwykłych warunkach (niejałowych) w zębach powstawały ubytki próchnicowe. Ponadto udowodniono, że wprowadzenie do jamy ustnej gnotobiotycznych zwierząt bakterii pochodzących z ubytków próchnicowych, powoduje u nich rozwój próchnicy zębów (68, 181). Oznacza to, że dopóki w środowisku jamy ustnej nie pojawią się bakterie próchnicotwórcze, to nawet w obecności pozostałych czynników, sprzyjających próchnicy wymienionych wcześniej, nie dochodzi do zmian próchnicowych w szkliwie zębów (16, 49, 122).

W latach 60 ubiegłego wieku szczegółowe badania drobnoustrojów typowo próchnicowych przeprowadzili jako pierwsi Fitzgerald i Keyes (91). Wykazali oni, że paciorkowce próchnicotwórcze to takie ziarniaki, które wytwarzają zewnątrzkomórkowy glukan, dzięki któremu mogą przylegać do powierzchni zębów. Te cechy zadecydowały o wyodrębnieniu bakterii próchnicotwórczych spośród licznej mikroflory jamy ustnej. Destrukcyjne działanie tych bakterii na szkliwo zębów także wykazano w doświadczeniach na zwierzętach gnotobiotycznych –

szczurach i chomikach. Autorzy ci ponadto udowodnili, że próchnica zębów jest chorobą zakaźną i może być przenoszona od matki na potomstwo (53, 54, 91, 93).

W 70 latach minionego wieku, dzięki rozwojowi technologii, Loesche wykrył drobnoustroje próchnicotwórcze w płytce nazębnej i zaznaczył, że tylko niektóre z nich pełnią ważną rolę w rozwoju choroby. Uznał, że paciorkowce należące do grupy *Streptococcus mutans* oraz pałeczki kwasu mlekowego odgrywają znaczną rolę w chorobie próchnicowej (110). Później ustalono, że bakterie te stanowią składnik naturalnej stałej bakteryjnej flory jamy ustnej i w związku z tym próchnica należy do chorób pochodzenia endogennego (38).

W wyniku dalszych badań ustalono, że próchnicę powoduje wiele mikroorganizmów, które charakteryzują się następującymi cechami:

- produkują kwasy organiczne;
- preferują środowisko kwaśne (o niskim pH);
- syntetyzują zewnątrzkomórkowe wielocukry tj. glukany (mutany);
- produkują zewnątrzkomórkowe, nierozpuszczalne dwucukry o dużej lepkości;
- magazynują wewnątrzkomórkowe cukry w postaci rezerwy metabolicznej np. glikogen.

Właśnie tymi cechami charakteryzuje się większość kwasotwórczych paciorkowców jamy ustnej (122).

Jak wynika z danych z piśmiennictwa (14, 79, 160, 165) do drobnoustrojów próchnicotwórczych występujących w jamie ustnej człowieka zaliczane są:

1. Gram-dodatnie ziarenkowce – *Streptococcus mutans*
Streptococcus sobrinus
2. Gram-dodatnie pałeczki – *Lactobacillus acidophilus*,
Lactobacillus rhamnosus
Actinomyces spp.

Z tych drobnoustrojów, za inicjowanie próchnicy zębów, odpowiedzialny jest gatunek *Streptococcus mutans*, natomiast pozostałe drobnoustroje biorą udział w pogłębianiu się ubytku.

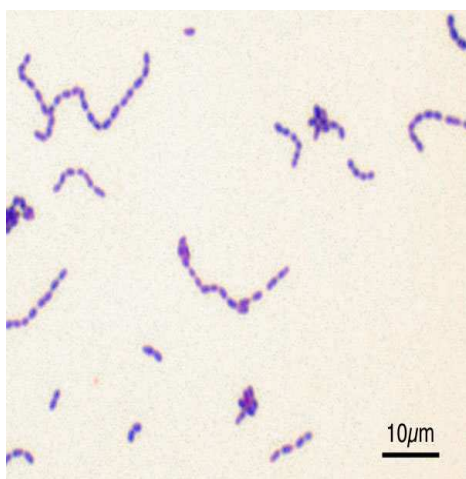
Paciorkowiec *S.mutans* pojawia się w jamie ustnej dziecka tuż po wyrżnięciu się pierwszych zębów mlecznych. Jest to związane z silnym powinowactwem do

twardych powierzchni czyli do szkliwa zębów. Obecnie teoria powinowactwa do tkanek twardych jest podważana, ponieważ udało się wyizolować *S.mutans* z brodawek języka w bezzębnej jamie ustnej (184).

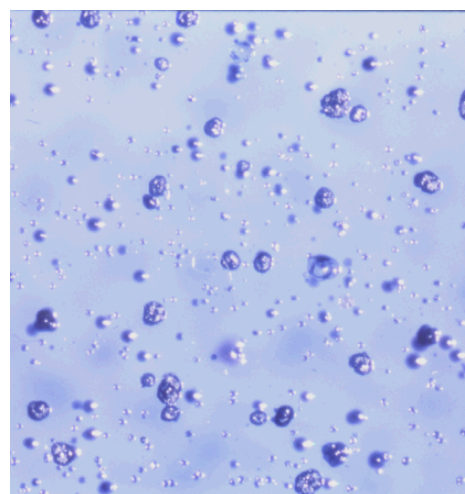
Charakterystyka paciorkowców grupy *Streptococcus mutans*

S.mutans należy do jednej z czterech grup paciorkowców jamy ustnej - do tzw. grupy *S.mutans* (grupa MS). W skład tej grupy wchodzi 8 gatunków. Gatunki *Streptococcus downei*, *S.ferrus*, *S.macaccae* i *S.hyovaginalis* występują wyłącznie u zwierząt. *S.ratti*, *S.cricetus*, *S.sobrinus* i *S.mutans*, izoluje się z organizmów zwierzęcych, jak i ludzkich (30, 31, 34, 62,). Nazwa gatunku *S.mutans* została zarezerwowana dla paciorkowców izolowanych z jamy ustnej od człowieka (114).

S.mutans jest ziarniakiem Gram-dodatnim (Ryc.3), który rośnie w warunkach względnie beztlenowych w temperaturze 37°C. Na podłożu agarowym z dodatkiem krwi baraniej wywołuje najczęściej niepełną hemolizę typu α , która charakteryzuje się zazielenieniem pola wokół kolonii. Są też szczepy, które nie powodują hemolizy (68, 110). Paciorkowiec ten dobrze rośnie na podłożu wybiórczym MSB (mitis-salivarius bacitracin agar) (65, 74, 75, 186). Kolonie *S.mutans* są małe (ok.1mm), twarde, nieregularne, galaretowate i otoczone substancją, zawierającą zewnątrzkomórkowe polisacharydy (Ryc. 3).



Ryc.3 *S.mutans* –preparat barwiony metodą Grama



Ryc. 4 *S mutans* – kolonie na podłożu Mitis-Salivarius

S.mutans wytwarza wiele różnych czynników, także wirulentnych, do których zaliczane są:

- transferaza glikozylowa - odpowiedzialna za przyleganie do powierzchni szkliva;
- powierzchniowe antygeny proteinowe, dzięki którym *S.mutans* może tworzyć wraz z molekułami śliny i innymi bakteriami biofilm;
- dekstran – cukier powierzchniowy, który tworzy zewnątrzkomórkowy glukan;
- antygeny białkowe powierzchniowe obecne w ścianie komórek bakterii, które są związane z opornością na antybiotyki oraz umożliwiają przyleganie;
- różne rodzaje polisacharydów ściany komórkowej (glukoza, galaktoza, ramnoza, glicerol), dzięki którym można zaszeregować te paciorkowce do różnych grup serologicznych, np. c, e, f, k (31, 36 68, 128).

Paciorkowce *S.mutans* nie wytwarzają katalazy, oksydazy ani alkalicznej fosfatazy i nie hydrolizują argininy do amoniaku. Nie produkują także toksycznego nadtlenu wodoru. Hydrolizują eskulinę i fermentują niektóre węglowodany z wytworzeniem kwasów. Większość szczepów metabolizuje węglowodany tj. sacharoza, mannitol, trehaloza, sorbitol, inulina, rafinoza i melibioza (31, 68, 110). Zdarzają się również szczepy zmutowane, które są np. melibiozo-ujemne (144).

Spośród wyżej wymienionych węglowodanów najważniejsza jest sacharoza, która jest rozkładana na dwa cukry glukozę i fruktozę. Cechą charakterystyczną bakterii z grupy MS jest to, że z tych wymienionych cukrów przy udziale odpowiednich enzymów glikozylotransferaz (GTFs - sacharazy dekstranowej i lewanowej) tworzą one zewnątrzkomórkowe polisacharydy glukany i fruktany oraz wewnątrzkomórkowy polisacharyd glikogen (68, 131). Glukany i fruktany stanowią podstawę do produkcji kwasów organicznych, szczególnie kwasu mlekowego, na drodze fermentacji beztlenowej.

Z przemian glukozy z udziałem GTF *S.mutans* wytwarza glukany nierozpuszczalne i rozpuszczalne w wodzie, zwane odpowiednio mutanami i dekstranami (84). Mutany posiadają dużą lepkość, która powoduje łatwiejsze przyleganie bakterii do różnych powierzchni, np. drutów stalowych (87), ścianek szkła (60) i do szkliva zębów (61). Dekstrany umożliwiają także agregację czyli zlepianie się, co sprzyja zwiększaniu masy płytki bakteryjnej (59, 84, 85, 182)

i stanowią rezerwę do dalszych metabolicznych przemian przy niedoborze cukru w pożywieniu (181). Jak wynika z badań paciorkowce te produkują znacznie więcej dekstranu niż mutanu (110).

Z fruktozy, przy udziale fruktozylotransferazy, *S.mutans* produkuje fruktany zwane też lewanami. Fruktan jest nietrwały, pełni funkcję podobną do dekstranu, stanowiąc rezerwę metaboliczną. Przy braku egzogenego źródła cukru paciorkowiec może metabolizować go do kwasu mlekowego.

Egzopolisacharydy pełnią różne funkcje w komórce bakteryjnej. Chronią ją przed niekorzystnym działaniem środowiska (wysokim i niskim pH, wysoką i niską temperaturą), immunologiczną odpowiedzią organizmu gospodarza i bakteriofagami oraz ułatwiają kolonizację środowiska (66).

Paciorkowce grupy MS wykazują oporność na bacytracynę, co odróżnia je od innych szczepów paciorkowców jamy ustnej (110).

W badaniach *in vitro* wykazano, że *S.mutans* produkuje zdecydowanie więcej kwasu mlekowego, jeśli rośnie w obecności dużej ilości glukanów. Dowiedziono także, że glukany umożliwiają przenikanie kwasów z zewnętrznej powierzchni płytki do jej głębszych warstw, przez co wzrasta ryzyko odwapnienia tkanki zęba. Ponadto doświadczalnie udowodniono, że *S.mutans* wykazuje 4-krotny wzrost aktywności glikolitycznej oraz 5-krotnie większą zdolność do demineralizacji szkliwa w pH 4,8 niż w pH 6,6 (181). Bakterie tego gatunku znacznie szybciej tworzą kwasy i to w większych ilościach niż inne drobnoustroje (114). Niektóre szczepy, oprócz kwasu mlekowego, produkują w warunkach tlenowych kwas octowy i etanol (96).

Wśród bakterii *S.mutans* serotypu c znaleziono mutanty (172), które nie syntetyzowały glukanów w podłożu z 5% sacharozą. Brak tej cechy wiąże się ze znaczną redukcją zdolności do wywoływania próchnicy (np. u zwierząt), jak i spadkiem produkcji kwasów z sacharozy i glukozy (35). Mutanty te charakteryzują się także słabą adherencją do powierzchni (56, 100).

Obecność bakteryjnej błonki nazębnej i kumulowanie w niej kwasów przyczynia się do obniżenia pH w środowisku jamy ustnej, a to ułatwia osiedlanie się innych drobnoustrojów np. ziarenkowców Gram-ujemnych z rodzaju *Veillonella*. Brak u tych bakterii enzymów glukokinazy i fruktokinazy powoduje, że nie są one zdolne do metabolizowania cukrów. Między paciorkowcami *S.mutans* a rodzajem

Veillonella występuje korzystne oddziaływanie (114). Ziarniaki *Veillonella* zużywają wyprodukowany przez *S.mutans* kwas mlekowy, traktując go jako źródła węgla, ponieważ same nie są w stanie wytworzyć tego kwasu bezpośrednio z glukozy. Podobne korzyści czerpią inne bakterie obecne w jamie ustnej np. beztlenowe pałeczki z rodzaju *Propionibacterium* czy *Eggerthella* (poprzednio *Eubacterium*). Kwas mlekowy może następnie zostać przetworzony do słabszych kwasów: propionowego, pirogronowego, octowego czy masłowego. Kwas mlekowy i pirogronowy mogą stanowić nawet 50% wszystkich wyprodukowanych kwasów kumulowanych w płytce nazębnej (181).

Kwasy, wytwarzane przez bakterie obecne w płytce, demineralizują szkliwo i atakują okoliczną tkankę, powodując choroby dziąseł. Okazuje się, że wzrost paciorkowców *S.mutans* na kryształach hydroksyapatytów stymuluje je do jeszcze większej produkcji kwasów. Zjawiska tego nie stwierdzono u innych paciorkowców jamy ustnej (114). W badaniach wykazano, że wśród bakterii obecnych w płytce nazębnej, grupa *Streptococcus mutans* stanowi zaledwie 2% początkowej mikroflory paciorkowcowej. Ziarniaki *S.mutans* nie są przecież pierwszymi drobnoustrojami, które kolonizują powierzchnię zęba (49, 138).

Te bakterie próchnicotwórcze są także zdolne do magazynowania cukru wewnątrzkomórkowego w postaci glikogenu. Pozwala to im na przetrwanie, w tzw. "poście cukrowym", czyli przy braku węglowodanów w otoczeniu, które są potrzebne do wytwarzania energii.

Paciorkowce *S.mutans* produkują enzymy proteazy, których celem jest niszczenie przeciwciał IgA występujących w jamie ustnej gospodarza. Dzięki temu łatwiej kolonizują jamę ustną i w niej przeżywają. Bakterie te produkują też mucynazę, która hamuje rozwój innych bakterii Gram-dodatnich w obrębie jamy ustnej.

Streptococcus mutans jest uznawany za główny czynnik etiologiczny wywołujący próchnicę szkliwa zębów. Poza błonką bakteryjną i ubytkami próchnicowymi można go także wyizolować z zapaleń jamy ustnej, związanych z użytkowaniem protez (stomatopatie protetyczne). Może być również przyczyną bakteriemii, powolnego zapalenia wsierdza, szczególnie po ekstrakcji zęba lub po usunięciu kamienia nazębnego albo bakteryjnej płytki nazębnej (114).

Spośród paciorkowców grupy MS na uwagę zasługuje *Streptococcus sobrinus* (27). Gatunek ten reprezentowany jest przez serotypy d i g (68, 129, 132 155). Potrafi metabolizować węglowodany i wytwarzać z nich kwasy oraz produkować zewnątrzkomórkowe polisacharydy (47). Posiada także zdolności do rozmnażania się i przeżywania w niskim pH środowiska.

W przeciwieństwie do paciorkowca *S.mutans*, *S.sobrinus* posiada tylko jeden enzym - glukozylotransferazę (GTF-I), który aktywuje proces syntezy nierozpuszczalnego glukanu oraz 3 enzymy GTF-S katalizujące reakcję wytwarzania rozpuszczalnego w wodzie dekstranu (142). *S.sobrinus* produkuje znacznie więcej mutanów niż dekstranów (110) i wytwarza H_2O_2 przeciwnie do *S.mutans*. Jednak jest tak samo jak on oporny na bacytracynę (31). W odróżnieniu od paciorkowca *S.mutans* nie hydrolizuje argininy, nie fermentuje rafinozy, melibiozy i inuliny.

Niektórzy badacze dowodzą, że obecność w jamie ustnej *S.sobrinus* obok *S.mutans* może zwiększać rozwój próchnicy zębów. Są też tacy, którzy uważają, że tylko w obecności diety wysokocukrowej oba gatunki występują razem (76, 185). Badania przeprowadzone na grupie dzieci wykazały, że gdy w płytkach nazębnych występowały obie bakterie, częściej rejestrowano intensywniejszą próchnicę ($p < 0,01$) niż w przypadku, gdy występował tylko jeden z tych gatunków (7, 36, 133, 143).

W badaniach porównujących częstość występowania obu gatunków w płytkach nazębnych, pochodzących z różnych miejsc w jamie ustnej wykazano, że znacznie częściej jest izolowany *S.mutans* (31, 110).

Charakterytyka pałeczek *Lactobacillus acidophilus*

Poza paciorkowcami z grupy MS, w rozwoju próchnicy ważną rolę odgrywają bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zwane pałeczkami kwasu mlekowego (21). Pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* są Gram-dodatnie (Ryc.5), nieprzetrwalnikują i nie wytwarzają katalazy. Zdarzają się i takie szczepy, które rozkładają H_2O_2 przez pseudokatalazę. Do wzrostu preferują warunki względnie beztlenowe, ale niektóre mogą wzrastać w środowisku ściśle beztlenowym w obecności 5% CO_2 (124).

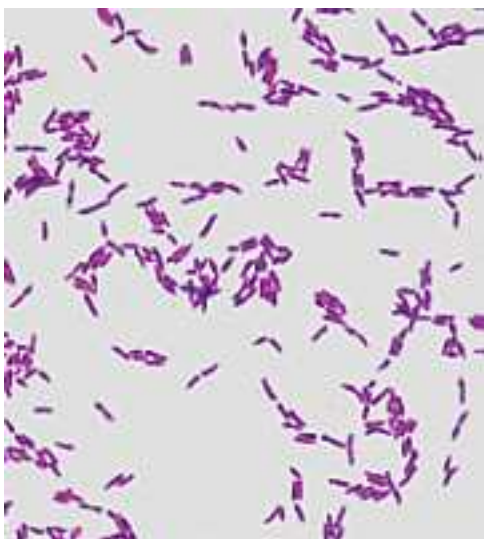
Niektóre drobnoustroje z tego rodzaju są obecne w mikroflorze jamy ustnej, przewodu pokarmowego i w drogach rodnych. Mogą być przyczyną zakażeń

oportunistycznych powodując np. bakteriemie, zapalenie wsierdza, ropnie narządów wewnętrznych.

Podobnie do paciorkowców *S.mutans* pałeczki *Lactobacillus* posiadają właściwości kwasotwórcze i kwasoodporne. Optymalne pH do ich wzrostu mieści się w zakresie 5,5-5,8. Pałeczki hoduje się na podłożu wybiórczym Rogosy (Ryc. 6), na którym rosną w postaci kremowych wypukłych kolonii.

Do gatunków uczestniczących w procesach próchnicowych zębów należą np. *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.fermentum*, *L.plantarum* i *L.rhamnosus*. Z grupy tej dominującym drobnoustrojem w rozwoju próchnicy jest *L.acidophilus* (20).

W jamie ustnej w warunkach homeostazy pałeczki kwasu mlekowego występują w ślinie w niewielkiej liczbie i stanowią od 0,1 do 1% ogólnej liczby obecnych tu drobnoustrojów.



Ryc. 5 *Lactobacillus acidophilus*- preparat barwiony metodą Grama



Ryc. 6 *L.acidophilus* – kolonie na agarzeMRS

Pałeczki te nie wykazują adhezji, słabo kolonizują powierzchnie i dlatego też nielicznie występują w bakteryjnej płytce nazębnej (80). Do osiedlania się w jamie ustnej preferują bardziej zagłębienia anatomiczne zębów, np. bruzdy powierzchni zgryzowych niż powierzchnie gładkie. Do większego wzrostu stymuluje je obecność innych bakterii np. *S.mutans* lub pałeczek z rodzaju *Actinomyces* (51).

Pałeczki kwasu mlekowego fermentują większość węglowodanów np. sacharozę, glukozę, fruktozę czy trehalozę (64).

W rodzaju *Lactobacillus* zostały wyróżnione dwie grupy bakterii tzw. homo- i heterofermentatywne. Homofermentatywne drobnoustroje fermentując glukozę, wytwarzają kwas mlekowy (65%) (np. *L.acidophilus*, *L.casei*, *L.salivarius*), podczas gdy bakterie z drugiej grupy, poza kwasem mlekowym, wytwarzają dodatkowo kwas octowy, alkohol etylowy i CO₂ (np. *L.fermentum*, *L.brevis*) (157).

Pałeczki kwasu mlekowego same nie są w stanie inicjować procesu próchnicowego (49, 122). Często natomiast są izolowane z głębokich ubytków próchnicowych (124) i w związku z tym uważa się je za czynniki etiologiczne postępującej próchnicy zębów (43, 124, 168). Ich liczba w jamie ustnej wzrasta wraz z rozwojem próchnicy, ponieważ właśnie takie warunki sprzyjają pałeczkom do intensywniejszego rozmnażania się.

Wykrywanie ich w wysokiej liczbie w testach ślinowych uważa się za wskaźnik wysokiego spożycia węglowodanów oraz wskaźnik podwyższonego ryzyka rozwoju próchnicy (73). Okazuje się, że pałeczki *Lactobacillus* są jeszcze bardziej kwasolubnymi drobnoustrojami niż *S.mutans* i bardziej obniżają pH płytki bakteryjnej przez produkcję kwasów (13, 114). Hodowla tych pałeczek w środowisku o pH=5,0 czy pH=5,5 jest tak samo intensywna jak w pH=7 (71).

Obniżone wartości (pH=5,0) w płytce nazębnej, spowodowane obecnością w niej kwasów, sprzyjają rozmnażaniu bakterii, takich jak *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* i *Actinomyces viscosus*. Badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że karmienie ich dietą bogatą w sacharozę powoduje wzrost liczby *S.mutans* kosztem *S.sanguinis* i *A.viscosus*. Dieta wysokowęglowodanowa (3-5%) i związana z nią intensywna produkcja kwasów, przyczynia się do znacznego obniżenia pH(<5), co sprzyja szybkiemu namnażaniu się bakterii próchnicotwórczych tj. *Lactobacillus*, *S.mutans* i rozwojowi próchnicy (77). Jak zaobserwowano, przekroczenie progowej wartości cukru wynoszącej 20%, sprzyja zapadalności na próchnicę (81). Jednak, gdy stężenie cukrów w środowisku przewyższa 30%, komórka bakteryjna ma trudności z osmozą. Dochodzi do odciągania wody z komórki, co powoduje zaburzenie jej metabolizmu. Wykazano, że wytworzenie kwasów wymaga znacznie dłuższego czasu, jeśli w otoczeniu bakterii stężenie sacharozy wynosi >20-50% (181).

Eliminacja cukrów z diety wpływa na ogólną liczbę drobnoustrojów w płytce nazębnej oraz powoduje obniżenie liczby streptokoków z grupy MS. Taka sytuacja sprzyja wzrostowi liczby bakterii np. *S.sanguinis* i zmniejsza ryzyko próchnicy (68, 108). Badania epidemiologiczne wykazały, że wczesna kolonizacja jamy ustnej przez ten gatunek bakterii znacząco opóźnia osiedlanie przez *S.mutans* (26).

W próchnicy udział swój mają także pleomorficzne, Gram-dodatnie pałeczki z rodzaju *Actinomyces* (9, 192). Bakterie te fermentują glukozę, tworząc krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe. Z badań wynika, że proporcje liczb *S.mutans* i *A.viscosus* są wyższe statystycznie, w przypadku potwierdzonej demineralizacji szkliwa. Wiadomo, że wyizolowanie *A.viscosus* z wczesnych zmian próchnicowych szkliwa oznacza wysokie ryzyko wystąpienia ubytku. To samo dotyczy rodzaju *Lactobacillus*. Pałeczki *Actinomyces odontolyticus* wykrywa się zarówno we wczesnych stadiach próchnicy, jak i w progresji niewielkich zmian próchnicowych. Z kolei gatunek *A.naeslundii* związany jest z rozwojem próchnicy korzeni zębowych.

Jednakże nie ulega wątpliwości, że paciorkowce z gatunku *Streptococcus mutans* odgrywają kluczową rolę przy inicjowaniu próchnicy zębów, a pałeczki kwasu mlekowego czy *Actinomyces* biorą udział przy pogłębianiu ubytków i w dalszym rozwoju tej choroby. Rodzaj *Actinomyces* ze względu na preferowanie warunków beztlenowych częściej powoduje destrukcję cementu korzeniowego niż korony zębów (43, 111). Należy dodać, że podczas rozwijania się ubytku próchnicowego, mikroflora w nim występująca podlega zmianie (114, 122).

Aby nie dopuścić do rozwoju próchnicy, ważne jest ograniczanie spożycia węglowodanów, które są wykorzystywane przez bakterie do produkcji kwasów oraz utrzymanie liczby bakterii próchnicotwórczych w ślinie na niskim poziomie tzn. *S.mutans* $<10^5$ CFU/ml a *Lactobacillus* $<10^4$ CFU/ml (157). Ponadto należy dostarczać do jamy ustnej odpowiednie czynniki prowadzące do wzmacniania tkanki zęba. Są to wapń, fosfor oraz fluor, które kumulują się w bakteryjnej płytce nazębnej i utwardzają tkanki, a także remineralizują szkliwo zębów (fluor).

1.6. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego modeli doświadczalnych opracowanych w celu indukowania próchnicy zębów

Dysponując wiedzą na temat etiologii procesu próchnicowego zębów oraz środowiska, jakim jest jama ustna człowieka, próbowano i nadal próbuje się stworzyć laboratoryjny model wytwarzania próchnicy *in vitro*, zbliżony jak najbardziej do naturalnego, powstającego w warunkach *in vivo*.

Do tej pory powstały różne modele doświadczalne, zarówno do badań w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* tj.:

1. *in vivo, in situ*- wewnątrzustne modele u ludzi;
2. *in vivo* – u zwierząt;
3. *in vitro* –model chemiczny;
4. *in vitro* – model mikrobiologiczny;
5. *in vitro* – sztuczna jama ustna.

Przegląd piśmiennictwa, dotyczący wad i zalet oraz zastosowania powyższych modeli dokonany został przez autorów zamieszczonych w tabeli 1.

Tabela 1. Przegląd piśmiennictwa modeli doświadczalnych dotyczących próchnicy zębów

White (190)	modele <i>in vitro</i>
Bowden (15)	<i>in vivo</i> i <i>in situ</i> , mikrobiologiczny model, <i>in vivo</i> (zwierzęta)
Marsh (115)	<i>in situ</i> , <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> (zwierzęta)
ten Cate i wsp. (24)	<i>in vitro</i> chemiczny i mikrobiologiczny model
Arends (4)	model mikrobiologiczny <i>in vitro</i> i <i>in situ</i>
Surdacka (2003)	modele wewnątrzustne
Sissons (169) Tang i wsp. (183)	„sztuczne jamy ustne”

Model *in vivo* utworzyli i po raz pierwszy użyli do swoich doświadczeń Ogaard i wsp.(1957) (48) a *in situ* opisali Koulourides i Volker (1964) (177, 196). Ogaard i wsp.(1957) umieścili cienką złotą płytkę na policzkowej powierzchni zębów przedtrzonowych przygotowanych do usunięcia, uzyskując w ten sposób

próchnicę naturalną (48). Z czasem na miejsce złotej płytki wprowadzili pierścienie ortodontyczne (113). Jednakże model *in vivo* można zbadać tylko raz w odróżnieniu do modelu *in situ*, który pozwala na powtórki danych badań u tego samego pacjenta (177).

Modele wewnątrzustne wydają się najodpowiedniejsze do uzyskania i badania próchnicy. Na procesy próchnicowe zachodzące w jamie ustnej wpływa wiele czynników. Dlatego modele takie wymagają obecności twardej tkanki zęba, bakteryjnej płytki nazębnej, śliny, dostarczania w codziennej diecie węglowodanów, określonej liczby osobników oraz odpowiednio długiego czasu doświadczenia. Do badań w warunkach *in situ* wykorzystywane są fragmenty szkliwa, które wbudowuje się w ruchome protezy dolne (40, 121, 125) lub w podniebienne płyty (32), które umieszcza się w jamie ustnej. Szkliwo najczęściej pochodzi z usuniętych zębów ludzkich. Niewątpliwą zaletą tego typu modelu jest fakt, że proces próchnicowy zachodzi w naturalnych warunkach. Jak okazuje się, modele wewnątrzustne mają także wady. Należą do nich np. ograniczenia co do doboru i liczby uczestniczących w nich pacjentów (stan zdrowia, wiek, płeć i dieta) oraz długości trwania doświadczenia i utrzymanie stałych warunków eksperymentu. Wiadomo, że utrzymanie tych samych warunków *in vivo* przez dłuższy czas jest niemożliwe, przeciwnie do warunków *in vitro*. W warunkach *in vivo* trudno ustalić w jakim czasie zachodzą naprzemiennie cykle de- i remineralizacji zębów (4). Poza tym występują trudności z prawidłową oceną uzyskanych wyników. Przepływ śliny w jamie ustnej nie jest jednakowo szybki. W związku z tym uzyskane wyniki mogą wykazywać duże różnice (125). Wielu autorów zwraca uwagę na trudności z ujednoliceniem warunków badań oraz pokreśla kosztowność modeli wewnątrzustnych (23, 46, 115, 196). Dzięki badaniom *in situ*, Koulourides i wsp. (1964) przedstawili np. sposób działania fluoru (177). Modele *in situ* często wykorzystywane są do badania procesu remineralizacji zębów, działania różnych substancji np. żeli remineralizujących (119, 178, 179), past czy też roztworów zawierających fluor (188), na twardą tkankę zęba.

Model zwierzęcy odegrał kluczową rolę w zrozumieniu etiologii próchnicy zębów (15,115). Dzięki temu było możliwe wyjaśnienie udziału bakterii w tworzeniu ubytków próchnicowych, jak i porównanie zdolności różnych gatunków

drobnoustrojów do indukowania próchnicy. Do badań tych wykorzystano zwierzęta gnotobiotyczne (jałowe - pozbawione drobnoustrojów) oraz pochodzące z hodowli tradycyjnych. Na modelu zwierzęcym prześladowano proces formowania bakteryjnej płytki nazębnej, rozwój próchnicy, a także oceniono działanie przeciwbakteryjnych i fluorkowych składników różnych substancji wpływających na bakteryjną płytkę (67). Zaletą modelu zwierzęcego jest stała obecność śliny, która odgrywa ważną rolę w przebiegu próchnicy. Do doświadczenia można wykorzystać więcej osobników w określonym wieku, zachowując jednakowe warunki hodowli dla wszystkich zwierząt np. stosując taką samą dietę. W doświadczeniach na ludziach jest to bardzo trudne do przeprowadzenia. Jednakże ze względu na różnice w mikrobiologicznej florze i w porowatości szkliwa zwierzęcego, otrzymane wyniki trudno porównać z uzyskanymi w badaniach na szkliwie ludzkim.

Mając na uwadze zalety i wady modeli *in vivo*, wydaje się uzasadnione, prowadzenie doświadczeń w celu uzyskania próchnicy w warunkach *in vitro*.

Modele *in vitro* zasługują na uwagę ze względu na możliwości utrzymania stabilności, kontrolowania warunków środowiska doświadczenia oraz powtarzalność i prostotę. Dzięki temu łatwiejsza jest ocena i porównanie uzyskanych wyników.

W warunkach *in vitro* do wytwarzania próchnicy wykorzystuje się dwa laboratoryjne modele-systemy – chemiczny z udziałem kwasów, systemów buforowych kwasowych lub żeli kwasowych (6, 42, 94, 120, 162, 166, 189, 191, 193, 194) i mikrobiologiczny z udziałem bakterii (5, 26, 28, 29, 37, 42, 55, 57, 63, 72, 90, 105, 194, 195). O trudnościach, związanych z uzyskaniem zmian w szkliwie o charakterze podpowierzchniowym, świadczą liczne i wieloletnie doświadczenia prowadzone przez wyżej wymienionych autorów.

Ze względu na problemy w dostępie do szkliwa ludzkiego, do badań nad próchnicą w warunkach *in vitro* wykorzystywano także zęby pochodzące od zwierząt (bydło, owce, konie). Powstawanie wczesnych zmian próchnicowych na szkliwie zwierzęcym prowadził Pearse (148), progresje sztucznych zmian próchnicowych badali Featherstone i Mellberg (45) a mikrotwardość i głębokość ubytków Arends i wsp.(2). Boyde (1965) zwrócił uwagę na istniejące różnice w budowie szkliwa ludzkiego i zwierzęcego (42). Spośród wymienionych rodzajów szkliwa, najbardziej zbliżone do ludzkiego jest szkliwo bydlęce, lecz ma inną

porowatość. Potwierdzili to w doświadczeniu Edmunds i wsp. (42), w którym wykorzystali szkliwo bydlęce, owcze, końskie oraz ludzkie. Produkując sztuczną próchnicę przy zastosowaniu dwóch modeli, w tym chemicznego (15% żel krzemionkowy z kwasem mlekowym o pH 4,5 zawierającym 1,9 ppm fluoru) i mikrobiologicznego ze szczepem *Streptococcus mutans* NCTC 10832, autorzy wykazali podobieństwa w wyglądzie zmian próchnicowych, ale także zróżnicowanie w głębokościach zmian uzyskanych w szklwie zwierzęcej i ludzkiej. Badanie mikroradiograficzne ujawniło, że w obu modelach tzn. mikrobiologicznym i chemicznym, doszło do podpowierzchniowej demineralizacji we wszystkich użytych rodzajach szkliwa. Zmiany typu *caries incipiens* powstałe w modelu mikrobiologicznym, obserwowane w mikroskopie polaryzacyjnym, wykazały podobieństwo we wszystkich czterech próbkach szkliwa. Po zanurzeniu w wodzie widoczne były strefy powierzchniowe pozytywnie załamujące się. Głębokość penetracji w zmianach mierzona w wodzie, była podobna do obecnych w próbkach szkliwa zwierzęcego, ale około dwukrotnie większa w porównaniu ze szkliwem ludzkim. Statystyczna analiza wykazała, że nie było różnic między samymi próbami ze szkliwem zwierzęcym, jednak znaczące różnice były obserwowane między nimi a szkliwem ludzkim. Podobne wyniki uzyskano w modelu chemicznym.

Mając na uwadze różnice w strukturze i porowatości szkliwa zwierzęcego oraz ludzkiego, do doświadczeń w kierunku uzyskiwania próchnicy a także do procesów naprawczych szkliwa, powinny być stosowane zęby pochodzące od ludzi (23, 42, 177).

Wybierając laboratoryjny model do indukowania procesu próchnicowego *in vitro*, należy zwrócić uwagę na to, aby warunki do jego przeprowadzenia były jak najbardziej zbliżone do naturalnych, zachodzących *in vivo*. Z wyżej wymienionych dwóch modeli *in vitro* najodpowiedniejszym jest mikrobiologiczny z udziałem bakterii próchnicotwórczych. Modele chemiczne z zastosowaniem buforowych systemów demineralizujących, kwasów i żeli kwasowych dotyczą jedynie aspektów fizyko-chemicznych związanych z rozpuszczaniem szkliwa zębów (5, 149).

Model mikrobiologiczny *in vitro* wg Bowdena wydaje się najbardziej wiarygodny, gdyż najlepiej odtwarza warunki jakie panują w jamie ustnej, w porównaniu z eksperymentami opartymi na modelu chemicznym, który wykorzystuje kwasy do wywoływania podpowierzchniowej demineralizacji (5, 15).

Dzięki systemom *in vitro* można zbadać i zmierzyć parametry takie jak: rozwój próchnicy – od wczesnych faz aż po głębokie ubytki, głębokość ubytku w szkliwie, straty składników mineralnych, twardość, wykorzystywanie fluoru i jego ubytki oraz rozkład szkliwa. Łatwiej też jest zbadać pH środowiska, w którym jest prowadzone doświadczenie i utrzymać stałe warunki. Ponadto można oceniać działanie czynników przeciwdrobnoustrojowych na sztucznie wywołaną próchnicę czy też skuteczność przylegania różnych materiałów stosowanych do wypełnienia ubytków (24, 55).

W badaniach indukujących próchnicę *in vitro* ważny jest dobór odpowiedniej tkanki twardej. Jeśli chce się uzyskać sztuczną próchnicę, najlepiej naśladującą naturalną, występującą u ludzi, należałoby wybrać zęby ludzkie.

Doświadczenia na zębach ludzkich w celu uzyskania demineralizacji szkliwa przeprowadzili Jordan i Keyes (86), Zahradnik i wsp. (194, 195), Dummer i wsp. (37), Kauffman i wsp. (90), Edmunds i wsp. (42), Arnold i wsp. (5), Hashizume i wsp. (72). Edmunds i wsp. (42) i Gallagher i wsp. (57) wykorzystali szkliwo bydlęce, a Lima (105) bloczki z zębiny bydlęcej. Shu (164), Shen i wsp. (163), Yip i wsp. (192) indukowali próchnicę korzenia, a Deng i ten Cate (33) próchnicę zębiny zębów ludzkich.

Bardzo ważny jest także wybór bakterii próchnicotwórczych. Jak wynika z etiologii próchnicy, są dwa gatunki bakterii, które odgrywają najważniejszą rolę w początkowej fazie rozwoju próchnicy. Są to *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus acidophilus*.

Drobnoustrojem najczęściej stosowanym w doświadczeniach *in vitro* w modelu mikrobiologicznym był paciorkowiec próchnicotwórczy *S.mutans*. Do badań wykorzystywano szczepy izolowane od ludzi *S.mutans* IB1600 (194), także od zwierząt np. chomików (*S.mutans* E49) (194) oraz wzorcowe szczepy np. *S.mutans* NCTC 10449 (72). Oprócz tych paciorkowców używano także szczepy *Streptococcus sanguis* G9B (90) i *Streptococcus sobrinus* 6715 (5). Poza

paciorkowcami stosowano też ziarniaki Gram-ujemne z rodzaju *Veillonella* (137), Gram-dodatnie pałeczki kwasu mlekowego np. *Lactobacillus acidophilus* (105) i z rodzaju *Actinomyces* (163, 192).

Spośród wyżej wymienionych bakterii jedynym uznanym drobnoustrojem odpowiedzialnym za inicjowanie procesu próchnicowego powierzchni gładkich szkliwa jest *S.mutans* (109, 110). Natomiast *Lactobacillus* bierze udział w progresji choroby. Pałeczka kwasu mlekowego sama nie jest zdolna do inicjowania tego procesu (49, 114). Dopiero obecność paciorkowców tj. *S.mutans* i produkowanie przez nie kwasu mlekowego w bakteryjnej płytce nazębnej promuje wzrost *Lactobacillus*. Natomiast bakterie z rodzaju *Actinomyces* są związane z próchnicą cementu korzeniowego zęba (52, 69, 164, 192).

Jak wynika z piśmiennictwa, wielu badaczy do doświadczeń *in vitro* używało najczęściej tylko jednego drobnoustroju (28, 29, 37, 42, 55, 90, 105, 161, 194). Był nim paciorkowiec z gatunku *S.mutans*. Lima i wsp. (105), jako jedyni spośród wcześniej wymienionych autorów, zastosowali dwie bakterie próchnicotwórcze, w tym paciorkowca (*S.mutans*) i pałeczkę z rodzaju *Lactobacillus* (*L.acidophilus* lub *L.casei* Shirota).

Wiadomo, że bakterie wykazują bardzo słabą adhezję do czystych powierzchni np. do niepokrytego szkliwa zęba. W badaniu *in vitro*, które dotyczyło tworzenia w podłożu z 5% sacharozą *dental plaque* przez różne szczepy paciorkowców jamy ustnej, takie jak *Streptococcus salivarius*, *S.sanguis* (obecnie *S.sanguinis*), *S.mutans*, Kałowski (87) wykazał, że *S.mutans* ma umiarkowaną zdolność do adhezji do czystej powierzchni (druć ze stali chromowo-niklowej). Paciorkowiec ten wytwarzał maksimum *dental plaque* po 3 - 6 dniach. Ocena wg skali od 0 do 6 wskazała na zakres 1-3.

W jamie ustnej jest obecna ślina - stały i bardzo ważny element, który pokrywa wszystkie znajdujące się tu powierzchnie twarde i miękkie. Pełni ona swoistą rolę zarówno w procesie demineralizacyjnym, jak i remineralizacyjnym zębów. W jamie ustnej na oczyszczonej powierzchni zęba, w ciągu kilku minut odkłada się bezkomórkowa błonka nabyta, która zawiera właśnie składowe śliny - glikoproteiny. Dopiero do pokrytego błonką zęba przylegają bakterie i rozpoczyna się formowanie bakteryjnej płytki nazębnej. W związku z tym należy założyć, że

użycie śliny jest koniecznym czynnikiem w procesie wytwarzania sztucznej próchnicy. Uwagę na to zwrócili już autorzy Ørstavik i wsp. (145), Zahradnik, Moreno, Burke (193) oraz Zahradnik, Propas i Moreno (194).

Jednak nie wszyscy twórcy modeli mikrobiologicznych uznali ślinę za ważny element i nie zastosowali jej w swoich doświadczeniach. Byli to między innymi: Gallagher i wsp. (57), Kaufman i wsp. (90), Clarkson i wsp. (29), Edmunds i wsp. (42). Należy to uznać za duży błąd. Natomiast niektórzy badacze jak np. Jordan i Keyes (86) w swoich pionierskich badaniach zastosowali sztuczną ślinę, według własnego składu.

Obecnie wiemy, że ślina do takiego badania powinna pochodzić od człowieka, ponieważ jest najodpowiedniejsza, ze względu na zawartość wielu różnych czynników np. białek. W swoich doświadczeniach do indukowania próchnicy w warunkach *in vitro* ludzką ślinę zastosowali Zahradnik i wsp. (194, 195) oraz Arnold i wsp. (5).

Do hodowli drobnoustrojów *in vitro* potrzebne są też odpowiednie podłoża. Konieczne jest uzupełnianie ich składu przez dodanie węglowodanów, niezbędnych do wzrostu bakterii. Bakterie próchnicotwórcze *S.mutans* najlepiej rosną w obecności sacharozy. W wyniku fermentacji sacharozy zostają wytworzone rozpuszczalne i nierozpuszczalne wielocukry (dekstrany i mutany), ułatwiające bakteriom przyleganie do powierzchni zęba, a także różne organiczne kwasy, w tym najważniejszy w rozwoju próchnicy - kwas mlekowy.

Jak wynika z piśmiennictwa, hodowlę bakterii prowadzono w wielu różnych gotowych podłożach mikrobiologicznych, które wzbogacano sacharozą. Były to np.: bulion tryptykazowo-sojowy (TSB) z 2% sacharozą i dodatkiem 200µg/ml streptomycyny (194, 195), bulion mózgowo-sercowy (BHI) z 2% sacharozą (90), TSB (bez glukozy) z 5% sacharozą (55), BHI z 5% sacharozą (72), BHI wzbogacony ekstraktem drożdżowym, 0,5% glukozą i 1% sacharozą (105). Niektórzy badacze hodowle drobnoustrojów prowadzili na wieloskładnikowych podłożach, których skład chemiczny sami ustalali, jak np. Jordan i Keyes (86), Dummer i wsp.(37) Clarkson i wsp. (29), Edmunds i wsp. (42) oraz Arnold i wsp. (5). W niektórych doświadczeniach dodawano do podłoża inne węglowodany tj. glukozę, mannitol, xylitol (57). Jednakże wielu naukowców podkreśla, że nie powinno się zastępować

sacharozy innymi cukrami, gdyż nie są uznawane za kariogenne i nie odgrywają ważnej roli w procesie próchnicotwórczym (86). W tak przygotowanych podłożach zaszczipionych bakteriami, umieszczano zęby, w celu indukowania sztucznej próchnicy.

Zależnie od eksperymentu dokonywano wymiany podłoż na świeże najczęściej co 24 bądź 48 godzin. Wtedy też zaszczipiano podłoża świeżą hodowlą bakterii. Jednakże były też i takie badania, w których nie rekultywowano podłoż i tylko raz dodawano drobnoustroje np. na początku doświadczenia (194).

W niektórych eksperymentach użyte zęby dodatkowo w ciągu doby poddawano działaniu różnych roztworów. Jordan i Keyes (86) na początku badań zęby umieszczali na 3h w podłożu z hodowlą *S.mutans* a następnie przenosili na 1h do roztworu z 5% sacharozą i 0,1% K_2HPO_4 o pH 7,0, po czym umieszczali je w syntetycznej ślinie (pozbawionej węglanu wapnia) na 3 godziny. Całą inkubację prowadzili w temp. 37°C. Na noc zęby przenosili do sztucznej śliny i przechowywali w temp. 5°C. Taki skomplikowany cykl był stosowany codziennie, przez cały okres trwania doświadczenia. Podobnie Fontana i wsp. (55) w ciągu 12h stosowali 3x naprzemiennie mineralny roztwór myjący (3x3,5h) i świeże podłoża zawierające bakterie (3x0,5h).

Na potrzeby każdego eksperymentu w celu uzyskaniu sztucznej próchnicy zębów ustalano różne czasy jej indukowania. Doświadczenia te trwały od kilku do kilkudziesięciu dni. Jordan i Keyes (86) prowadzili badania przez 14 dni, Edmunds i wsp. (42) 5 dni, Fontana i wsp. (55) 7 i 12 dni, Arnold i wsp. (5) przez 1, 7, 14 i 28 dni, a Hashizume i wsp. (72) od 1 do 7 dni. Prowadzenie doświadczeń przez kilka dni wydaje się zbyt krótkie, aby wywołać typową, wczesną zmianę próchnicową zębów.

Proces indukowania próchnicy przez bakterie prowadzono w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych (63, 72), w warunkach mikroaerofilnych bądź beztlenowych używając w tym celu odpowiedniego typu systemu GasPack (29, 105, 194, 195).

Przedstawione w piśmiennictwie różne mikrobiologiczne modele demineralizacyjne mają jedną wspólną cechę: są ukierunkowane na jeden określony cel np.: do uzyskiwania próchnicy pierwotnej czy wtórnej w warunkach *in vitro*,

badania fizjologii mikroorganizmów lub też tworzenia płytki nazębnej. Pomimo, że badania mikroradiograficzne czy obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym potwierdzają naśladowanie w dużym stopniu uzyskanych zmian do naturalnej próchnicy, to jednak modele te nie są doskonałe.

Pozaustrojowy model mikrobiologiczny do indukowania wczesnych zmian próchnicowych szkliwa zębów powinien być prowadzony wyłącznie na zębach ludzkich, z udziałem ludzkiej śliny, w obecności sacharozy (cukru preferowanego przez drobnoustroje próchnicotwórcze) i dwóch gatunków bakterii próchnicotwórczych, w tym *S.mutans* inicjującego proces próchnicowy i pałeczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, które pogłębiają zmianę próchnicową. Ponadto powinien umożliwiać łatwą sterylizację użytych składników, możliwość manipulowania składowymi modelu w jałowych warunkach, być prosty w obsłudze, zapewniać powtarzalność badań i być tani. Najlepiej jak będzie prowadzony i monitorowany przez jedną osobę (55). Żaden z opisanych w piśmiennictwie modeli mikrobiologicznych prowadzonych w warunkach *in vitro*, nie spełniał dotychczas takich warunków.

Dlatego też nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań z wykorzystaniem modelu mikrobiologicznego, w celu uzyskania próchnicy zębów *in vitro*, który będzie efektywny i najbardziej zbliżony do warunków naturalnych.

2. C E L P R A C Y

Celem pracy było:

1. Opracowanie prostego, powtarzalnego i niekosztownego modelu mikrobiologicznego do indukowania wczesnych zmian próchnicowych zębów ludzkich w warunkach *in vitro* jak najbardziej zbliżonego do warunków naturalnych zachodzących *in vivo*.
2. Ocena efektywności uzyskania wczesnych postaci próchnicy szkliwa ludzkiego w warunkach *in vitro* w modelu mikrobiologicznym przy użyciu dwóch różnych metod.

3. MATERIAŁY i METODY

MATERIAŁY

1. Szczepy wzorcowe bakterii użytych do badań

Streptococcus mutans LMG 14558

Lactobacillus acidophilus (rhamnosus) LMG 6400

2. 50 zębów ludzkich trzonowych i przedtrzonowych

3. Podłoża:

a) podłoże użyte w Metodzie I

Brain-Heart Infusion (BHI) z 5% sacharozą - (BHI-S)

3.1.1. BHI (bioMerieux, Francja) - 37g/ 1000ml wody destylowanej

Skład : Calf brain, infusion from 200,0

Beef heart, infusion from 250,0

bio-Gelatynie 10,0

Sodium chloride 5,0

Disodium phosphate 2,5

Dextrose 2,0

po wyjałowieniu pH podłoża = 7,4

Sacharoza (POCh, Polska) - 50g/1000ml podłoża

- sterylizowana przez filtrowanie (sączek membranowy)

b) podłoże użyte w Metodzie II

Podłoże podstawowe z 5% sacharozą wg Jordana i Keyesa (86) -(PP-S)

zmodyfikowane przez M.Kałowskiego (87) i A.Kędzię (2003)

Skład:

- Bacto Casitone (Difco USA) - 10,0

- Yeast Extract (Difco USA) - 10,0

- K₂HPO₄ (Fluka Niemcy) - 10,0

- Mieszanina mineralna - 1 ml

- woda destylowana - 1000 ml

po wyjałowieniu pH podłoża = 7,1

Sacharoza 50g/1000ml podłoża

- sterylizowana przez filtrowanie (sączek membranowy)

Skład Mieszanki mineralnej dodanej do podłoża PP-S:

Skład na 100 ml:

- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (POCh Polska) - 0,8g
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (POCh Polska) - 0,04g
- MnCl_2 (POCh Polska) - 0,012g (uwodnionego 0,018g)
- woda destylowana - 100 ml

Podłoża użyte w obu metodach

c) Agar odżywczy z krwią baranią - (AK)

Agar odżywczy (Disco, USA)

Odwłókniona krew barania 5% (Graso, Polska)

d) Mitis-Salivarius Agar (MS Agar) (Becton Dickinson, USA)-

do hodowli bakterii *Streptococcus mutans*,

e) Lactobacilli MRS Agar (Difco, USA) -do hodowli bakterii *Lactobacillus*

f) Lactobacilli MRS Broth (Difco, USA) -do hodowli bakterii *Lactobacillus*

4. Supernatant świeżej śliny mieszanej stymulowanej parafiną zebranej rano (9⁰⁰) od zdrowych ochotników (2 godz. po jedzeniu) - 150 ml

- ślina była zbierana do probówek Corninga umieszczonych w lodzie
- supernatant uzyskano po odwirowaniu całej zebranej śliny w warunkach 5000xg przez 30 minut (w celu usunięcia resztek pokarmowych i bakterii)

5. Jałowy roztwór 135mM KCl - do opłukiwania zębów - 1000 ml

6. Aparatura:

- anaerostat (BBL, USA)
- mikroskop świetlny Carl Zeiss Jena
- elektronowy mikroskop skaningowy SEM (Philips, Belgia)
- mikrotomograf komputerowy typ 1076 (Skyscan, Belgia)
- chromatograf gazowy UNICAM ProGC+ (Wielka Brytania)
- pH-Metr (Elwiro, Polska)

METODY

1. Przygotowanie zębów użytych do doświadczeń w modelu mikrobiologicznym do indukowanie próchnicy w Metodzie I i II

Badaniem objęto 50 zębów trzonowych i przedtrzonowych, pochodzących od młodzieży i osób dorosłych, usuniętych z powodów ortodontycznych lub periodontologicznych. Wybrane zęby nie wykazywały uszkodzeń szkliwa. Zęby przechowywano w 0,9% roztworze NaCl z dodatkiem 0,1% tymolu. Każdy ząb pozbawiano zanieczyszczeń, myto, suszono, umieszczano na stalowych drutach, lakierowano z wyjątkiem okienka 3x3mm na koronie zęba, pakowano w rękaw typu folia-papier i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut pod ciśnieniem 1 atm. Wysterylizowane zęby podzielono na 2 grupy (po 25 sztuk), w celu przeprowadzenia badań dwiema różnymi Metodami.

2. Szczepy bakterii użyte do badań w Metodzie I i II

Do doświadczeń wykorzystano szczepy wzorcowe bakterii z gatunków: *Streptococcus mutans* LMG 14558 i *Lactobacillus acidophilus* LMG 6400.

Szczepy posiewano na odpowiednio podłoża, w tym Mitis-Salivarius Agar (MS Agar), Lactobacilli MRS Agar oraz Lactobacilli MRS Broth. Czystość szczepów sprawdzano na podstawie wzrostu na agarze z dodatkiem 5% krwi baraniej (AK) i ocenie mikroskopowej preparatów barwionych metodą Grama. Następnie szczepy przesiewano do bulionu Brain-Heart Infusion z 5% sacharozą (BHI-S), (Metoda I) lub Podłoża Podstawowego z dodatkiem 5% sacharozy (PP-S) (Metoda II). Inoculum zawierało 10^6 drobnoustrojów (CFU) w 1ml. Żywotność szczepu *S.mutans* sprawdzano na podłożu MS Agar a *L.acidophilus* na Lactobacilli MRS Agar.

3. Opis użytego modelu mikrobiologicznego dla Metody I i Metody II

METODA I

Założenia Metody I zostały oparte na opisie doświadczenia Arnolda i wsp. (5), zmodyfikowane przez Kędziałę A., z modyfikacją własną na potrzeby doświadczenia.

Modyfikacja własna polegała na wydłużeniu czasu doświadczenia z 2 do 4 miesięcy, badaniu pH hodowli i oznaczeniu wytworzonych przez bakterie lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego.

Badania Metodą I przeprowadzono z użyciem 25 zębów (Tabela 2). Schemat przebiegu doświadczenia z wykorzystaniem Metody I przedstawiono na Ryc.7.

Na początku doświadczenia każdy ząb został aseptycznie przeniesiony do jałowej próbówki, zawierającej 3ml supernatantu śliny. Probówki umieszczono na godzinę w cieplarni w 37°C w warunkach tlenowych. Następnie każdy ząb został 3-krotnie opłukany jałowym roztworem KCl i przeniesiony aseptycznie jałową pęsetą do probówek, zawierających po 10 ml podłoża BHI-S. Do każdej próbówki z podłożem dodano po 0,1ml zawiesiny bakterii o gęstości 10^6 CFU/ml (colony forming unit) z 24-godzinnej hodowli szczepu *Streptococcus mutans* w bulionie BHI-S

Zęby inkubowano przez 4h w 37°C w warunkach tlenowych. Następnie zęby aseptycznie wyjmowano z próbek, opłukiwano roztworem KCl i umieszczano w świeżym bulionie BHI-S, który zaszczipiano 0,1ml 24-godzinnej hodowli szczepu *S.mutans* (w podłożu BHI-S). Inkubację zębów prowadzono w 37°C przez 48 godzin w warunkach tlenowych.

W tej Metodzie co 48 godzin zęby umieszczano w świeżym podłożu, które następnie zaszczipiano 0,1ml zawiesiny danego szczepu (Ryc.7). Po każdej zmianie podłoża mierzono pH hodowli za pomocą pH-metru oraz pasków wskaźnikowych pH.

Kontrolę stanowiły zęby umieszczone w hodowli BHI-S bez dodatku zawiesiny bakterii. Taką kontrolę prowadzono przez cały czas trwania eksperymentu.

Pierwsze 4 tygodnie zęby inkubowano w warunkach tlenowych z użyciem szczepu *S.mutans*. Po 14 dniach wyłączono z badań 3 zęby (Tabela 2). Po kolejnych 14 dniach (28 dni od rozpoczęcia doświadczenia) z dalszych badań wyłączono następne zęby i wymieniono zawiesinę bakteryjną na *Lactobacillus acidophilus*. Inoculum stanowiła 24-godzinna zawiesina wymienionych wyżej bakterii w podłożu BHI-S. Co 48 godzin wymieniano podłoża na świeże i zaszczipiano 0,1ml

zawiesiny hodowli szczepu *L.acidophilus*. Inkubację zębów prowadzono w 37°C w warunkach tlenowych.

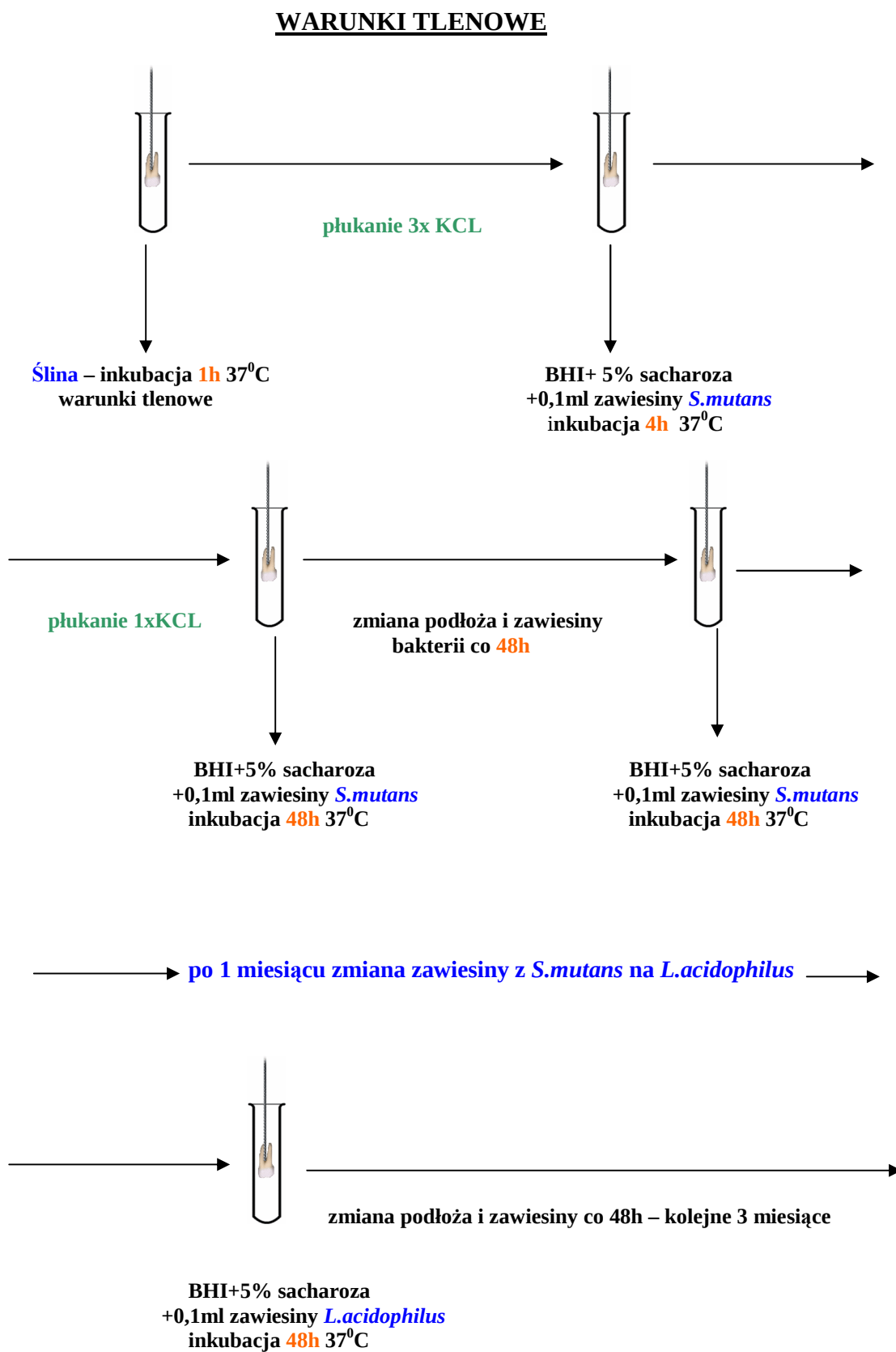
Podsumowując, całe doświadczenie trwało 16 tygodni i było prowadzone w warunkach tlenowych. Co 14 dni wyłączano z dalszych badań kolejne zęby (Tabela 2). Badania z użyciem szczepu *S.mutans* trwały przez 1 miesiąc a ze szczepem *L.acidophilus* 3 miesiące. Żywotność oraz czystość szczepów była monitorowana przez cały czas doświadczenia.

Odlączone z doświadczenia zęby opłukano roztworem KCl i przenoszono do jałowych probówek. Wylot probówek zabezpieczano sterylną gazą zwilżoną jałową wodą destylowaną, na której umieszczono kryształki tymolu. Probówki zamykano korkiem, który owijano parafilmem w celu dodatkowego zabezpieczenia przed kontaminacją z otoczenia. Zęby te były następnie wykorzystane do oceny uzyskanej próchnicy metodami: wizualną, z wykorzystaniem zgłębnika, w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM) i metodą mikrotomografii komputerowej (MC-T).

Tabela 2. Dane dotyczące czasu badań i liczby zębów użytych w Metodzie I

Rodzaj bakterii	Liczba zębów inkubowanych w BHI-S	Numery zębów odlączanych z hodowli co 2 tygodnie	Czas inkubacji zębów w hodowli - tygodnie
WARUNKI TLENOWE			
<i>S.mutans</i>	25	0	0 – czas rozpoczęcia badań
<i>S.mutans</i>	25	Ia/1, Ib/1, Ib/2	2 tygodnie
<i>S.mutans</i>	22	Ia/2, Ib/3, Ib/4	4
<i>L.acidophilus</i>	19	Ia/3, Ib/5, Ib/6,	6
<i>L.acidophilus</i>	16	Ia/4, Ib/7, Ib/8	8
<i>L.acidophilus</i>	13	Ia/5, Ib/9, Ib/10	10
<i>L.acidophilus</i>	10	Ia/6, Ib/11, Ib/12	12
<i>L.acidophilus</i>	7	Ia/7, Ib/13, Ib/14	14
<i>L.acidophilus</i>	4	Ia/8, Ib/15, Ib/16, Ib/17	16

Ryc. 7. Schemat postępowania w Metodzie I



METODA II

Założenia tej Metody zostały oparte na doświadczeniu opisanym przez Jordana i Keyesa (86), zmodyfikowane przez Kałowskiego (87), a następnie zmodyfikowane przez A.Kędzię, z kolejną modyfikacją własną na potrzeby doświadczenia.

Modyfikacja własna polegała na wydłużeniu czasu doświadczenia z 2 do 4 miesięcy, badaniu pH hodowli i kontroli wytwarzania lotnych kwasów tłuszczowych oraz kwasu mlekowego przez bakterie użyte do doświadczenia.

Badania Metodą II objęły 25 zębów (Tabela 3). Schemat przebiegu doświadczenia z wykorzystaniem Metody II przedstawiono na Ryc. 8.

Doświadczenie rozpoczęto od aseptycznego przeniesienia zębów za pomocą jałowej pęsety do jałowych probówek, zawierających po 3ml supernatantu śliny. Probówki umieszczono na 1h w cieplarni w 37°C w warunkach tlenowych. Następnie zęby opłukiwano 3-krotnie roztworem KCl i przenoszono aseptycznie do probówek zawierających po 10ml podłoża PP-S, które zaszczipiano 0,1ml zawiesiny paciorkowców z gatunku *S.mutans*. Były to 24-godzinne hodowle wymienionego szczepu o gęstości 10^6 CFU/ml w podłożu PP-S. Podłoże zawierające zęby inkubowano przez 4 godziny w 37°C w anaerostacie, w którym umieszczano GasPak CampyPak EZ (BD) w celu uzyskania warunków mikroaerofilnych. Po 4h inkubacji zęby płukano 1x roztworem KCl i przenoszono aseptycznie do probówek ze świeżym podłożem PP-S, które zaszczipiano 0,1ml zawiesiny szczepu *S.mutans*. Hodowlę prowadzono w 37°C przez 24 godziny w anaerostacie w warunkach mikroaerofilnych (Ryc.8). Co 24h zęby umieszczano w świeżym podłożu, które zaszczipiano 0,1ml 24h hodowlą zawiesiny *S.mutans* w PP-S. Inkubacje trwające 24h były prowadzone przez pierwsze 10 dni doświadczenia. Następnie okres ten został przedłużony do 48h z zachowaniem warunków mikroaerofilnych. Po każdej zmianie podłoża mierzono jego pH za pomocą pH-metru oraz pasków wskaźnikowych pH.

Kontrolę w badaniu stanowiły zęby umieszczone w czystej hodowli PP-S bez dodatku zawiesiny bakteryjnej. Taką kontrolę prowadzono przez cały czas trwania doświadczenia.

Pierwsze 4 tygodnie hodowla zębów była prowadzona w warunkach mikroaerofilnych z użyciem szczepu *S.mutans*. Po 14 dniach od rozpoczęcia eksperymentu z dalszych badań zostały wyłączone pierwsze 3 zęby (Tabela 3).

Po 28 dniach, licząc od początku badań, zostały wyłączone kolejne zęby (Tabela 3). Zamiast stosowanej dotychczas zawiesiny szczepu z gatunku *S.mutans*, użyto hodowli pałeczek *L.acidophilus* (gęstość 10^6 CFU/ml). Inkubację zębów w podłożu PP-S zaszczepionym nowym szczepem prowadzono już w warunkach tlenowych w 37°C. Co 48h zęby przenoszono do świeżego podłoża PP-S, które zaszczepiano 0,1ml zawiesiny *L.acidophilus* pochodzącej z 24h hodowli w bulionie PP-S. Przez cały czas badań wykonywano pomiary pH. Czystość i żywotność obu użytych szczepu monitorowano przez cały czas trwania eksperymentu.

Podsumowując, badania z użyciem *S.mutans* trwały 1 miesiąc w warunkach mikroaerofilnych), a ze szczepem *L.acidophilus* 3 miesiące (w warunkach tlenowych). Co 14 dni wyłączano z dalszych badań kolejne zęby (Tabela 3). Łącznie doświadczenie prowadzono przez 4 miesiące tj. 16 tygodni.

Odlączone z badań zęby były opłukiwane roztworem KCl i umieszczane w jałowych probówkach oraz zabezpieczane w taki sam sposób jak w Metodzie I. Zęby te były następnie wykorzystane do oceny uzyskanej próchnicy metodami: wizualną, z wykorzystaniem zgłębnika, w elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM) i metodą mikrotomografii komputerowej (MC-T).

Oceny zębów użytych w obu metodach badawczych zostały przeprowadzone w różnych jednostkach badawczych, w ramach współpracy naukowo-badawczej. Były to: Zakłady GUMed, Politechniki Gdańskiej oraz dwóch Uniwersytetów w Belgii. Ocenę wizualną i z wykorzystaniem zgłębnika wykonał lek.stom. Adam Wąsek z Katedry i Zakładu Stomatologii Zachowawczej GUMed. Badania mikrotomograficzne zostały wykonane w Belgii – Department of Microtomography, RUCA University of Antwerp, Belgium. Natomiast badania profilometryczne z użyciem elektronowego mikroskopu skaningowego zostały przeprowadzone w Belgii – Department of Histology, Vrije Universiteit on Brussels, Belgium.

Ryc. 8. Schemat postępowania w Metodzie II

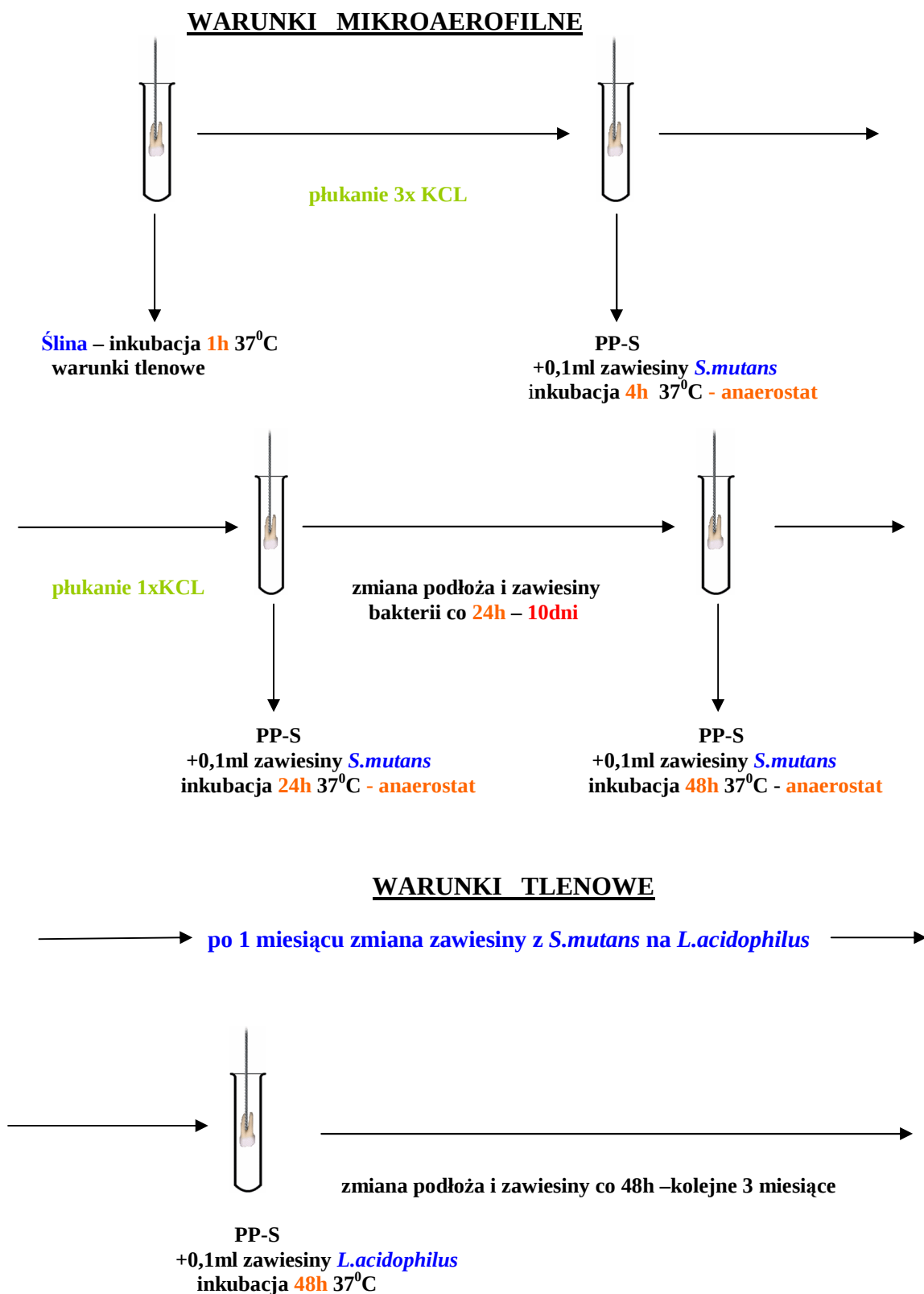


Tabela 3. Dane dotyczące czasu badań i liczby zębów użytych w Metodzie II.

Rodzaj bakterii	Liczba zębów inkubowanych w PP-S	Numery zębów odłączanych z hodowli co 2 tygodnie	Czas inkubacji zębów w hodowli - tygodnie
WARUNKI MIKROAEROFILNE			
<i>S.mutans</i>	25	0	0 – czas rozpoczęcia badań
<i>S.mutans</i>	25	IIa/1, IIb/1, IIb/2	2 tygodnie
<i>S.mutans</i>	22	IIa/2, IIb/3, IIb/4	4
WARUNKI TLENOWE			
<i>L.acidophilus</i>	19	IIa/3, IIb/5, IIb/6,	6
<i>L.acidophilus</i>	16	IIa/4, IIb/7, IIb/8	8
<i>L.acidophilus</i>	13	IIa/5, IIb/9, IIb/10	10
<i>L.acidophilus</i>	10	IIa/6, IIb/11, IIb/12	12
<i>L.acidophilus</i>	7	IIa/7, IIb/13, IIb/14	14
<i>L.acidophilus</i>	4	IIa/8, IIb/15, IIb/16, IIb/17	16

Oznaczanie wytwarzanych lotnych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej

W celu stwierdzenia wytwarzania lotnych kwasów tłuszczowych przez bakterie *S.mutans* i *L.acidophilus* w podłożu zawierającym zęby, pobierano po 1ml 24 lub 48 godzinnej hodowli i przenoszono do probówki wirówkowej do której dodawano 0,2ml 50% kwasu siarkowego, 0,4g NaCl i 1 ml eteru etylowego. Zawartość probówki mieszano i wirowano. Następnie pobierano warstwę eterową, dodawano bezwodnego CaCl_2 i pozostawiano na około 5 minut. Próbkę pobierano strzykawką 7 μl i wstrzykiwano do kolumny chromatografu gazowego po osiągnięciu przez urządzenie temperatury 160°C (przyrost temp.wynosił 50°C/min). Badanie przeprowadzono w celu wykrycia obecności kwasów od C_1 do C_6 tzn. mrówkowego, octowego, propionowego, masłowego, walerianowego, kapronowego. Takimi samymi badaniami objęto też podłoża, które zostały zaszczerpięone *S.mutans* lub *L.acidophilus*, ale nie zawierały zębów.

Hodowle szczepów były 24 i 48 godzinne i były inkubowane w takich samych warunkach, jakie były stosowane w Metodzie I i Metodzie II

Badanie wytwarzania kwasu mlekowego przez drobnoustroje metodą chromatografii gazowej

Metoda analizy pochodnych metylowych

W celu wykrycia obecności kwasu mlekowego wytworzonego przez bakterie *S.mutans* lub *L.acidophilus* w podłożu zawierającym zęby, pobierano po 1 ml 24- lub 48-godzinnej hodowli i przenoszono do probówki wirówkowej, do której dodawano 2ml alkoholu metylowego i 0,4ml 50% H_2SO_4 . Zamkniętą probówkę ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 60°C przez 30 minut. Następnie dodawano 1ml wody i 0,5ml chloroformu i silnie mieszano. Próbkę poddawano odwirowaniu i pobierano strzykawką warstwę chloroformową. Próbkę w objętości 7 μ l wstrzykiwano do kolumny chromatografu gazowego po osiągnięciu przez injektor 160°C. Temperatura w czasie 20 minut badania próbki była w zakresie od 50°C do 150°C (przyrost temperatury wynosił 40°C/min). Jako gaz nośny zastosowano hel przy szybkości przepływu 30ml/min. Dodatkowo zostało wykonane badanie kwasu mlekowego w bulionach zaszczipionych szczepem *S.mutans* lub *L.acidophilus*, w których nie były umieszczone zęby. Hodowle szczepów były inkubowane przez 24 lub 48 godzin w takich samych warunkach jakie były stosowane w Metodzie I i II.

Wyniki zapisywano w postaci wykresów (chromatogramy). Otrzymane piki były porównywane do wysokości pików uzyskanych dla mieszanin standardowych odpowiednich kwasów (wzorzec) (Ryc. 33, 34, 35, 36).

4. WYNIKI BADAŃ

Analiza przebiegu doświadczeń w Metodzie I i Metodzie II pod kątem użytych podłoży, bakterii i warunków prowadzenia hodowli

Wzrost drobnoustrojów w podłożach bulionowych w Metodzie I i II

Zaobserwowano, że w każdym użytym podłożu, drobnoustroje wyrastały inaczej.

Metoda I

Szczep *S.mutans* rósł, w postaci gęstej, puszystej hodowli w podłożu BHI-S, już po 24 godzinach w warunkach tlenowych (Ryc. 10). Wzrost tego drobnoustroju w kolejnych hodowlach, od początku do końca prowadzonych doświadczeń, był taki sam. Szczep *S.mutans* wykazywał adhezję do powierzchni szkła (próbówka), do drutu stalowego na którym zamocowany był ząb i do powierzchni badanego zęba. (Ryc.9). Na wygląd hodowli szczepu *S.mutans* miała wpływ jego wyjątkowo wysoka zdolność adhezji do różnych powierzchni. Natomiast po wymianie szczepu na *L.acidophilus* wygląd hodowli nie uległ dużej zmianie. Charakter hodowli zachował swój puszysty wygląd (Ryc.11). W tym przypadku pałeczki *L.acidophilus*, które charakteryzują się słabą adhezją do powierzchni, przylegały do komórek paciorkowców (do biofilmu). Ich zadanie polegało na wytworzeniu kwasu mlekowego, który jest czynnikiem próchnicotwórczym i wspomaganie działania szczepu *S.mutans*. Narastanie na powierzchni zębów bakteryjnej płytki w czasie trwania doświadczenia zostało przedstawione na rycinach 18 i 20.

Metoda II

W Metodzie II, w której zostało użyte podłoże PP-S i warunki zmieniono na mikroaerofilne, wzrost szczepu *S.mutans* już po 24 godzinach i w ciągu dalszych inkubacji, dotyczył słabej adhezji do powierzchni szkła, drutu a znacznej adhezji do powierzchni szkliva zębów. Jednak wzrost drobnoustrojów był bardziej gęsty i skupiony w okolicy umieszczonego zęba (Ryc.12). Po wymianie bakterii na *L.acidophilus* i zmianie warunków na tlenowe, hodowla wyglądała inaczej. Największe skupienia drobnoustrojów były obserwowane tylko w okolicy zęba umieszczonego w bulionie. Jest to spowodowane tym, że pałeczki *Lactobacillus*

wykazują bardzo słabe cechy adhezji do innych powierzchni. Wzrost tego typu był obserwowany przez cały czas trwania doświadczenia (Ryc.13).

Wzrost szczepów *S.mutans* i *L.acidophilus* po 48h inkubacji w podłożach użytych w Metodzie I i II, które nie zawierały zębów, przedstawiają ryciny 14, 15, 16, 17.

Narastanie na powierzchni zębów bakteryjnej płytki w czasie trwania doświadczenia zostało przedstawione na rycinach 19 i 21.

Podsumowując, uzyskane przez mnie wyniki badań, zarówno w Metodzie I jak i Metodzie II potwierdzają, że szczepy zostały użyte w właściwej kolejności, na co wskazuje później przeprowadzona analiza danych.

Ocena wartości pH podłoży kontrolnych i hodowli zawierających *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus acidophilus* w Metodzie I i II

Metoda I

W Metodzie I do inkubacji zębów użyto odpowiednich drobnoustrojów i bulionu BHI z dodatkiem 5% sacharozy. To samo podłoże niezawierające bakterii stosowano jako kontrolę doświadczeń.

W przypadku podłoży kontrolnych wartości pH wynosiły 7,4. Natomiast w podłożach użytych do badań, w których umieszczono zęby i zaszczipiono zawiesiną hodowli szczepu *S.mutans*, po 48 godzinnej inkubacji w 37°C w warunkach tlenowych, wartości pH wynosiły od 4,2 do 4,5 (średnie pH $4,35 \pm 0,05$) (Tabela 4). Podobnie w podłożach, w których umieszczono zęby i dodano zawiesinę hodowli szczepu *L.acidophilus*, po 48 godzinnej inkubacji w 37°C w warunkach tlenowych, wartości pH wynosiły od 4,2 do 4,5 (średnie pH $4,41 \pm 0,04$) (Tabela 5).

Tabela 4. Przykłady wartości pH hodowli BHI-S z *S.mutans* w kolejnych dniach doświadczenia (Metoda I, warunki tlenowe)

Nr hodowli	Wartości pH hodowli po 48h inkubacji <i>S.mutans</i> w BHI-S w dniach:				Średnia wartość pH
	22 dzień	24 dzień	26 dzień	28 dzień	
Hodowla nr 6	4,5	4,4	4,3	4,5	4,43
Hodowla nr 13	4,5	4,4	4,3	4,3	4,38
Hodowla nr 16	4,4	4,5	4,3	4,3	4,38
Hodowla nr 24	4,4	4,3	4,3	4,4	4,35
Hodowla nr 26	4,5	4,2	4,2	4,2	4,28
Hodowla nr 42	4,5	4,3	4,2	4,5	4,38
Średnia wartość pH	4,46 ± 0,05	4,35 ± 0,1	4,28 ± 0,05	4,4 ± 0,12	4,35 ± 0,05

Tabela 5. Przykłady wartości pH hodowli BHI-S z *L.acidophilus* w kolejnych dniach doświadczenia (Metoda I, warunki tlenowe)

Nr hodowli	Wartości pH hodowli po 48h inkubacji <i>L.acidophilus</i> w BHI-S w dniach:				Średnia wartość pH
	30 dzień	32 dzień	34 dzień	36 dzień	
Hodowla nr 6	4,5	4,4	4,4	4,5	4,45
Hodowla nr 13	4,5	4,4	4,5	4,3	4,43
Hodowla nr 16	4,4	4,5	4,3	4,3	4,38
Hodowla nr 24	4,4	4,3	4,3	4,4	4,35
Hodowla nr 26	4,5	4,6	4,3	4,4	4,45
Hodowla nr 42	4,5	4,3	4,2	4,5	4,38
Średnia wartość pH	4,46 ± 0,05	4,45 ± 0,1	4,33 ± 0,1	4,4 ± 0,09	4,41 ± 0,04

Metoda II

W Metodzie II do hodowli drobnoustrojów użyto podłoża PP z dodatkiem 5% sacharozy. Takie samo podłoże nie zawierające drobnoustrojów służyło jako kontrola badań. Wartości pH w podłożach kontrolnych były jednakowe i wynosiły 7,1. Natomiast w podłożach bulionowych, w których znajdowały się zęby i zostały zaszczipione hodowlą *S.mutans*, po 24 godzinnej inkubacji w 37°C w warunkach mikroaerofilnych, wartości pH wynosiły od 4,3 do 4,6 (średnie pH 4,45±0,05). Takie same wartości pH stwierdzono w podłożach zawierających zęby oraz *S.mutans*, po przedłużeniu inkubacji do 48 godzin w 37°C w warunkach mikroaerofilnych (Tabela 6). W przypadku podłoży bulionowych, w których umieszczono zęby i zaszczipiano hodowlą szczepu *L.acidophilus* po 48 godzinnej inkubacji w 37°C w warunkach tlenowych, wartości pH także wynosiły od 4,3 do 4,6 (średnie pH 4,42 ± 0,05) (Tabela 7).

Tabela 6. Przykłady wartości pH hodowli PP-S z *S.mutans* w kolejnych dniach doświadczenia (Metoda II, warunki mikroaerofilne)

Nr hodowli	Wartość pH hodowli po 48h inkubacji <i>S.mutans</i> w PP-S w dniach:				Średnia wartość pH
	22 dzień	24 dzień	26 dzień	28 dzień	
Hodowla nr 4	4,4	4,5	4,6	4,4	4,48
Hodowla nr 14	4,3	4,4	4,4	4,5	4,48
Hodowla nr 19	4,4	4,5	4,3	4,3	4,38
Hodowla nr 23	4,4	4,6	4,5	4,3	4,45
Hodowla nr 43	4,5	4,6	4,3	4,4	4,5
Hodowla nr 44	4,5	4,3	4,2	4,5	4,38
Średnia wartość pH	4,42 ± 0,08	4,48 ± 0,1	4,38 ± 0,15	4,4 ± 0,09	4,45 ± 0,05

Tabela 7. Przykłady wartości pH hodowli PP-S z *L.acidophilus* w kolejnych dniach doświadczenia (Metoda II, warunki tlenowe)

Nr hodowli	Wartości pH hodowli po 48h inkubacji <i>L.acidophilus</i> w PP-S w dniach:				Średnia wartość pH
	30 dzień	32 dzień	34 dzień	36 dzień	
Hodowla nr 4	4,4	4,5	4,6	4,4	4,48
Hodowla nr 14	4,6	4,4	4,4	4,5	4,48
Hodowla nr 19	4,4	4,5	4,3	4,3	4,38
Hodowla nr 23	4,3	4,3	4,5	4,3	4,35
Hodowla nr 43	4,5	4,6	4,3	4,4	4,45
Hodowla nr 44	4,5	4,3	4,3	4,5	4,40
Średnia wartość pH	4,45 ± 0,1	4,43 ± 0,12	4,40 ± 0,15	4,40 ± 0,1	4,42 ± 0,05

Ocena zdolności wytwarzania przez drobnoustroje lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego w podłożach kontrolnych i w hodowlach zębów w Metodzie I i II

Metoda I

Do podłoży bulionowych, w których umieszczono zęby, dodano zawiesinę hodowli szczepu *S.mutans* i poddano 24 godzinnej inkubacji w 37°C w warunkach tlenowych, stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 107,0 µM/ml do 122,7 µM/ml (średnie stężenie wynosiło 114,85 µM/ml), a po 48h inkubacji wynosiło od 113,6 µM/ml do 154,5 µM/ml (średnie stężenie 134,05 µM/ml) (Tabela 8). W bulionie, który nie zawierał zębów i został zaszczipiony hodowlą *S.mutans*, po 24 i 48 godzinach inkubacji, w warunkach jak wyżej, stężenie kwasu mlekowego wynosiło 42,02 µM/ml i 100,12 µM/ml odpowiednio (średnie stężenie 71,07 µM/ml ± 41,08) (Tabela 9). W tych hodowlach nie stwierdzono lotnych kwasów tłuszczowych.

W podłożach bulionowych, w których umieszczono zęby i zostały zaszczerpione zawieszoną hodowlą szczepu *L.acidophilus* oraz poddane 24 godzinnej inkubacji w 37°C w warunkach tlenowych, stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 115,0 do 181,3 μM/ml (średnie stężenie wynosiło 148,15 μM/ml), a po 48godzinnej inkubacji wynosiło od 134,7 do 215,5 μM/ml (średnie stężenie 175,1 μM/ml) (Tabela 10). Natomiast w bulionie zaszczerpionym *L.acidophilus*, który nie zawierał zębów, po 24h i 48h inkubacji w warunkach tlenowych, stężenie kwasu mlekowego wynosiło 2,27 μM/ml i 33,38 μM/ml odpowiednio (średnie stężenie 17,83 μM/ml ± 22) (Tabela 9). Analiza chromatograficzna hodowli zębów, zarówno ze szczepami *S.mutans* jak i *L.acidophilus*, nie wykazała obecności lotnych kwasów tłuszczowych od C₁ do C₆. W podłożach kontrolnych, w których umieszczono zęby, lecz nie zawierały drobnoustrojów i były inkubowane w tych samych warunkach doświadczenia, także nie stwierdzono obecności kwasu mlekowego, ani lotnych kwasów tłuszczowych.

Tabela 8. Wyniki badań stężenia kwasu mlekowego w hodowlach BHI-S z *S.mutans* (Metoda I, warunki tlenowe)

Dzień badania	Stężenie kwasu mlekowego	Metoda I BHI-S z <i>S.mutans</i>		
		Warunki tlenowe		
		Hodowla nr 16	Hodowla nr 24	Średnie stężenie kwasu mlekowego
23	po 24h inkubacji	107,0 μM/ml	122,7 μM/ml	114,85 μM/ml
24	po 48h inkubacji	113,6 μM/ml	154,5 μM/ml	134,05 μM/ml
	Średnie stężenie kw. mlekowego	110,3 μM/ml ±4,67	138,6 μM/ml ±22,42	124,45 μM/ml ±13,58

Tabela 9. Wyniki badań stężenia kwasu mlekowego w podłożach BHI-S i PP-S zaszczerpionych *S.mutans* lub *L.acidophilus*, niezawierających zębów (Metoda I i Metoda II)

Stężenie kwasu mlekowego po czasie	Metoda I BHI-S		Metoda II PP-S	
	<i>S.mutans</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>L.acidophilus</i>
	Warunki tlenowe		Warunki mikroaerofilne	Warunki tlenowe
24h	42,02 $\mu\text{M/ml}$	2,27 $\mu\text{M/ml}$	50,83 $\mu\text{M/ml}$	6,85 $\mu\text{M/ml}$
48h	100,12 $\mu\text{M/ml}$	33,38 $\mu\text{M/ml}$	203,13 $\mu\text{M/ml}$	52,86 $\mu\text{M/ml}$
Średnie stężenie kwasu mlekowego	71,07 $\mu\text{M/ml} \pm 41,08$	17,83 $\mu\text{M/ml} \pm 22$	126,98 $\mu\text{M/ml} \pm 107,69$	29,85 $\mu\text{M/ml} \pm 32,53$

Tabela 10. Wyniki badań stężenia kwasu mlekowego w hodowlach BHI-S z *L.acidophilus* (Metoda I, warunki tlenowe)

Dzień badania	Stężenie kwasu mlekowego	Metoda I BHI-S z <i>L.acidophilus</i>		
		Warunki tlenowe		
		Hodowla nr 16	Hodowla nr 24	Średnie stężenie kwasu mlekowego
31	po 24h inkubacji	115,0 $\mu\text{M/ml}$	181,3 $\mu\text{M/ml}$	148,15 $\mu\text{M/ml}$
32	po 48h inkubacji	134,7 $\mu\text{M/ml}$	215,5 $\mu\text{M/ml}$	175,1 $\mu\text{M/ml}$
	Średnie stężenie	124,85 $\mu\text{M/ml} \pm 13,93$	198,4 $\mu\text{M/ml} \pm 24,96$	161,63 $\mu\text{M/ml} \pm 19,06$

Metoda II

W podłożach bulionowych, w których zostały umieszczone zęby i dodano zawiesinę hodowli szczepu *S.mutans* oraz poddano 48 godzinnej inkubacji w 37⁰C w warunkach mikroaerofilnych, stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 180,2 do 338,7 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 261,8 $\mu\text{M/ml}$) (Tabela 11). Natomiast w hodowlach niezawierających zębów, które były zaszczerpione *S.mutans* i inkubowane w warunkach, jak wyżej przez 24h lub 48h, stężenie kwasu mlekowego wynosiło 50,83 $\mu\text{M/ml}$ i 203,13 $\mu\text{M/ml}$ odpowiednio (średnie stężenie 126,98 $\mu\text{M/ml} \pm 107,69$) (Tabela 9). W podłożach bulionowych, w których umieszczono zęby

i zaszczipiono hodowlą szczepu *L.acidophilus*, które zostały poddane 24 godzinnej inkubacji w 37⁰C w warunkach tlenowych, stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 250,6 do 273,5 μM/ml (średnie stężenie 262,05 μM/ml), a po 48 godzinnej wynosiło od 252,1 do 285,3 μM/ml (średnie stężenie 268,7 μM/ml) (Tabela 12). W hodowlach zaszczipionych pałeczką *L.acidophilus*, niezawierających zębów, po 24h lub 48h inkubacji stężenia kwasu mlekowego wynosiły 6,85 μM/ml i 52,86 μM/ml odpowiednio (średnie stężenie 29,85μl/ml± 32,53) (Tabela 9). Natomiast w ocenianych próbkach nie stwierdzono lotnych kwasów tłuszczowych. W podłożach kontrolnych, w których były umieszczone zęby, które nie zawierały drobnoustrojów i były inkubowane w tych samych warunkach doświadczenia, nie stwierdzono obecności kwasu mlekowego, ani lotnych kwasów tłuszczowych.

Tabela 11. Wyniki badań stężenia kwasu mlekowego w hodowlach z *S.mutans* w PP-S (Metoda II, warunki mikroaerofilne)

Dzień badania	Stężenie kwasu mlekowego	Metoda II PP-S z <i>S.mutans</i>			
		Warunki mikroaerofilne			Średnie stężenie kwasu mlekowego
		Hodowla nr 14	Hodowla nr 15	Hodowlanr23	
28	po 48h inkubacji	266,45μM/ml	338,7μM/ml	180,2μM/ml	261,8 μM/ml ± 79,35

Tabela 12. Wyniki badań stężenia kwasu mlekowego w hodowlach z *L.acidophilus* w PP-S (Metoda II, warunki tlenowe)

Dzień badania	Stężenie kwasu mlekowego	Metoda II PP-S z <i>Lacidophilus</i>		
		Warunki tlenowe		
		Hodowla nr 14	Hodowla nr 23	Średnie stężenie kwasu mlekowego
31	po 24h inkubacji	250,6 $\mu\text{M/ml}$	273,5 $\mu\text{M/ml}$	262,05 $\mu\text{M/ml}$
32	po 48h inkubacji	252,1 $\mu\text{M/ml}$	285,3 $\mu\text{M/ml}$	268,7 $\mu\text{M/ml}$
	Średnie stężenie	251,35 $\mu\text{M/ml} \pm 1,06$	279,4 $\mu\text{M/ml} \pm 8,35$	265,38 $\mu\text{M/ml} \pm 3,64$

Ocena wizualna zębów poddanych doświadczeniu w modelu mikrobiologicznym i zębów kontrolnych (Metoda I i Metoda II)

Przeprowadzono ocenę wizualną i z wykorzystaniem zgłębnika zmian powstałych na powierzchni szkliwa zębów, uzyskanych w obu Metodach doświadczalnych. Po 2 tygodniach nie zaobserwowano żadnych zmian na powierzchni szkliwa zębów badanych tymi Metodami. Po 4 tygodniach od rozpoczęcia doświadczenia analiza wzrokowa ujawniła matowe, kredowo-białe zmiany szkliwa, co wskazuje na wczesne uszkodzenie próchnicowe powierzchni szkliwa zębów (próchnica początkowa szkliwa). Intensywność zmian nasilała się w czasie trwania doświadczenia. Plamy kredowo-białe były bardziej zaznaczone na powierzchniach zlokalizowanych w pobliżu linii między kostniwem i szkliwem na szyjce zęba. Uzyskane efekty były bardziej wyraźne na powierzchni zębów, które zostały poddane doświadczeniu w Metodzie II niż uzyskane w Metodzie I w tym samym czasie. Przejaśnienia szkliwa w Metodzie I w porównaniu do Metody II, zaobserwowano dopiero po 14 tygodniach trwania doświadczenia, w przypadku gdy w Metodzie II taki efekt uzyskano już po 4 tygodniach. Na powierzchni zębów kontrolnych nie występowały żadne uszkodzenia (Ryc. 22, 23, 24, 25, 26, 27).

Ocena zębów poddanych doświadczeniu w Metodzie I i Metodzie II i zębów kontrolnych metodą profilometryczną, przy użyciu elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM)

Badania profilometryczne zostały przeprowadzone przez lek.stomat. Adama Wąska z Katedry i Zakładu Stomatologii Zachowawczej GUM. Oceniono powierzchnię szkliwa zębów w powiększeniu rzędu 150 i 1200 x. Z dokonanej oceny obrazów profilometrycznych zębów poddanych doświadczeniom w obu Metodach można wywnioskować, że zmiany próchnicowe szkliwa pod postacią mikroziarnistości (o średnicy od 1 do 4 μm) pojawiają się po 4 tygodniach trwania doświadczeń w obu Metodach, lecz w Metodzie II są one zdecydowanie wyraźniejsze. Ponadto obrazy obserwowane w 8 tygodniu doświadczenia w Metodzie I przypominają obraz uzyskany w 4 tygodniu w Metodzie II. Może to sugerować, że tempo niszczenia szkliwa w warunkach *in vitro* jest w Metodzie I opóźnione o około 4 tygodnie w porównaniu z Metodą II. Po 10 tygodniach prowadzenia doświadczeń wczesne zmiany próchnicowe są łatwiej dostrzegalne w Metodzie II (Ryc. 29). Zauważone zmiany próchnicowe na powierzchni szkliwa były podobne do zmian obserwowanych w przypadku badanych białych plam, jakie występują we wczesnej próchnicy szkliwa zębów w warunkach naturalnych, co potwierdziła także ocena profilometryczna. Na powierzchni zębów kontrolnych nie zaobserwowano żadnych uszkodzeń szkliwa. Różnice występujące między powierzchniami szkliwa zębów po 10 i 16 tygodniu badań pokazują ryciny 28, 29 i 30.

Ocena zębów poddanych doświadczeniu w Metodzie I i Metodzie II i zębów kontrolnych metodą mikrotomografii komputerowej (MC-T)

Ocena ta została dokonana w Belgii. Przeprowadzone badania metodą mikrotomografii dotyczyły 6 zębów z Metody I, które zostały wyjęte z hodowli bulionowej po 10 tygodniach oraz 2 zębów z Metody II, które wyłączono z badań po 16 tygodniach trwania doświadczenia (Ryc. 31, 32).

Wykonano też badanie 2 zębów, które po tym samym czasie zostały wyjęte z podłoża niezaszczepionych drobnoustrojami (kontrola).

Analiza mikrotomograficzna zębów z badań przeprowadzonych Metodą I i II wykazała, że we wszystkich zębach poddanych doświadczeniu była obecna podpowierzchniowa demineralizacja, co świadczy o próchnicy początkowej szkliwa. Stwierdzono, że po 10 tygodniach hodowli zębów demineralizacja penetrowała poprzez całą warstwę szkliwa i sięgała połączeń szkliwno-zębinowych. Po 16 tygodniach hodowli na powierzchni szkliwa były obecne zmiany w postaci białych i brązowych plam – co potwierdziło badanie z użyciem mikrotomografii komputerowej. Ujawniono, że w białych plamach występująca podpowierzchniowa demineralizacja sięgała do około połowy warstwy szkliwa. Natomiast w brązowych plamach demineralizacja była bardziej nasilona i penetrowała do zębiny. Te wyniki potwierdzają prawidłową kolejność użytych do badań szczepów tzn., że *S.mutans* rozpoczyna demineralizację szkliwa a *L.acidophilus* te zmiany jeszcze pogłębia. Żadnych zmian nie zaobserwowano na powierzchni zębów, które zostały użyte jako kontrole. Metoda mikrotomografii komputerowej potwierdziła wyniki uzyskane w ocenie wizualnej, z wykorzystaniem zgłębnika i w badaniu profilometrycznym.

5. DYSKUSJA

Pierwsze próby uzyskania próchnicy zębów w warunkach *in vitro* rozpoczęły się pod koniec XIX wieku. Zapoczątkował je amerykański dentysta D.W.Miller w 1890 roku. Później został on uznany za „ojca mikrobiologii jamy ustnej”. Od wielu lat prowadzi się doświadczenia w warunkach *in vitro*, w których uzyskuje się próchnicopodobne uszkodzenia szkliwa zębów ludzkich i zwierzęcych. W tym celu wykorzystywane są modele chemiczne (1, 17, 44, 94, 123, 127, 146, 159, 162, 166, 170) i mikrobiologiczne (28, 29, 37, 42, 55, 57, 90, 105, 161, 194, 195). W doświadczalnym modelu chemicznym ubytki próchnicopodobne uzyskuje się za pomocą różnych kwasów, buforowych systemów kwasowych o pH 4,5 lub żeli z dodatkiem kwasów o pH w zakresie 4,5 – 5,0. W niektórych metodach chemicznych zmiany próchnicopodobne szkliwa następowały już po 3 dniach, co wydawało się korzystne (1, 123). Jednak większość badaczy prowadziła doświadczenia w dłuższym czasie np. 7 – 105 dni (17, 44, 94, 123, 146, 153, 159, 162). Model chemiczny, pomimo pewnych zalet, nie jest doskonały, gdyż nie uwzględnia wielu ważnych czynników, które mają istotne znaczenie w powstawaniu ubytków próchnicowych w warunkach *in vitro* i *in vivo*. W etiopatogenezie próchnicy zębów ważną rolę odgrywają drobnoustroje obecne w bakteryjnej płycie nazębnej, czas, dieta i szereg innych czynników. W związku z tym badania *in vitro*, w celu uzyskania próchnicy szkliwa zębów, powinny być prowadzone w warunkach jak najbardziej zbliżonych do naturalnych, czyli panujących w jamie ustnej. Na te zagadnienia zwróciło uwagę w swoich publikacjach wielu autorów (5, 15, 28, 29, 42, 86, 90, 105, 145, 161, 193, 194, 195).

Model mikrobiologiczny użyty do przeprowadzenia badań zapewniał warunki jak najbardziej zbliżone do obecnych w jamie ustnej. Model mikrobiologiczny, jako korzystniejszy niż model chemiczny do wytworzenia próchnicopodobnych ubytków zębów, wybrali też inni autorzy (29, 37, 42, 55, 90, 161, 194). W modelach tych były wykorzystywane różnorodne systemy doświadczalne. Niektórzy badacze prowadzili eksperymenty w mniej lub więcej skomplikowanych urządzeniach zwanych „sztuczną jamą ustną”. W takich urządzeniach, zwykle poza bakteriami w sposób ciągły dostarcza się sztuczną ślinę

o odpowiednim składzie chemicznym, co ma zbliżać warunki do naturalnych. Jednak urządzenia takie są skomplikowane, kosztowne, kłopotliwe w użyciu, trudne do utrzymania jałowości i sterylizowania ich przed ponownym użyciem. Minusem jest też fakt, że w tych warunkach nie można wykorzystać do doświadczeń ludzkiej śliny.

Wśród modeli laboratoryjnych znane są i używane tzw. chemostaty. System „sztucznej jamy ustnej” i chemostat różnią się możliwościami użycia. W obu tych systemach można wykorzystywać mieszane hodowle, jednak w chemostacie nie udaje się wytworzyć biofilmu, a w „sztucznej jamie ustnej” trudno uzyskać stabilność hodowli bakteryjnej, co może uniemożliwić powtórzenie badań i prowadzenie badań kontrolnych.

Różne modele mikrobiologiczne jako „sztuczna jama ustna” były wykorzystane do badań przez uczonych tj. Marsh (115), Noorda i wsp. (137), Fontana i wsp. (55), a chemostat przez Seemana i wsp. (161).

Moje badania w modelu mikrobiologicznym zostały przeprowadzone metodą próbowkową. Model ten stosowali do doświadczeń także inni autorzy, w tym Edmunds i wsp. (42), Zahradnik i wsp. (194, 195) Kaufman i wsp. (90) i Dummer i wsp. (37). Wszyscy wymienieni badacze, bez względu na użytą metodę, uzyskali ubytki próchnicopodobne zębów. Jednak zastosowana metoda próbowkowa jest tańsza, łatwiejsza do przeprowadzenia i utrzymania jałowości, niekłopotliwa w manipulacji (odłączanie kolejnych zębów z doświadczeń), daje możliwość prowadzenia stałej obserwacji próbek (hodowli), stwarza warunki do wytworzenia bakteryjnego biofilmu na powierzchni zębów, stałej oceny wartości pH podłoża, oznaczania wytworzonych przez bakterie lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego oraz zapewnia powtarzalność badań w tych samych warunkach. Metoda ta ma wiele zalet, a uzyskane wyniki są zbliżone do tych, jakie otrzymali inni autorzy, przeprowadzając podobne doświadczenia, często z użyciem skomplikowanych urządzeń. Spośród dwóch, wykorzystanych przeze mnie Metod badawczych, pierwsza była nieco łatwiejsza do wykonania, ponieważ w drugiej, trzeba było prowadzić badania w warunkach mikroaerofilnych, z wykorzystaniem anaerostatu. Była też kosztowniejsza, ze względu na użycie zestawu CampyPak EZ (firma BD), który zapewniał odpowiednie warunki środowiska, ponieważ w czasie od 2 do 24 godzin wytwarzał odpowiednio 6 -16% O₂ i 2 – 10% CO₂. Pomimo

otrzymanych podobnych wyników badań w obu Metodach, Metoda II okazała się w efekcie korzystniejsza, ponieważ uzyskane podpowierzchniowe zmiany w szkliwie zębów były bardziej wyraźne, co potwierdziła metoda wizualna, z wykorzystaniem zgłębnika, profilometryczna i mikrotomografii komputerowej.

W doświadczeniach wykorzystywałam zęby ludzkie. Za wyborem takich zębów opowiadają się też inni autorzy. Przeprowadzone przez nich badania potwierdzają, że w celu uzyskania ubytków próchnicopodobnych zębów w warunkach *in vitro*, które są najbardziej zbliżone do próchnicy naturalnej, występującej u ludzi, powinno się użyć zębów ludzkich (5, 37, 42, 55, 72, 90, 194, 195).

W moich doświadczeniach, w celu uzyskania próchnicy szkliwa zębów w warunkach *in vitro*, wykorzystałam 2 szczepy, w tym *Streptococcus mutans* LMG 14558 i *Lactobacillus acidophilus* LMG 6400. Do swoich badań szczep paciorkowca próchnicotwórczego z gatunku *Streptococcus mutans* użyli także inni autorzy (28, 29, 37, 42, 55, 90, 105, 161, 194). Loesche i wsp. (109) oraz Loesche (110) udowodnili doświadczalnie, że szczep *S.mutans* spełnia bardzo ważną rolę w inicjowaniu procesu próchnicotwórczego na gładkich powierzchniach szkliwa. Z kolei pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* uczestniczą w progresji zmian próchnicowych szkliwa zębów (49, 114). Dlatego w moich doświadczeniach pałeczki te zostały wprowadzone w dalszych etapach badań (od 5 tygodnia do końca doświadczeń). Użycie w modelu doświadczalnym najpierw jednego szczepu (*S.mutans*), a potem drugiego (*L.acidophilus*) w celu pogłębienia ubytków próchnicopodobnych szkliwa zębów ludzkich było korzystne. Tylko Lima i wsp. (105) wykorzystali te dwa szczepy, w tej samej kolejności w swoich badaniach. Jednak nie miały one na celu uzyskania zmian próchnicowych szkliwa, a ocenę adhezji szczepów probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus* do wytworzonych ubytków próchnicowych w szkliwie zębów bydlęcych. Doświadczenie w tym przypadku trwało 16 dni, a w moich badaniach łącznie 4 miesiące. Jednak niektórzy autorzy uważają, że do wytworzenia próchnicopodobnych ubytków szkliwa w modelach mikrobiologicznych należy użyć nie jednej, ale kilku różnych bakterii (mieszanej hodowli drobnoustrojów) (5, 63, 72, 90, 105, 109, 110, 192, 194). Przeprowadzono też badania w których, do wytworzenia zmian próchnicowych zębów, wykorzystywano inne bakterie niż *S.mutans*. Kaufman i wsp. (90) użyli

szczepu z gatunku *Streptococcus sanguis*, Arnold i wsp. (5) paciorkowce z gatunku *Streptococcus sobrinus*, Lima i wsp. (105) pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* a Yip i wsp. (192) pałeczki Gram-dodatnie z rodzaju *Actinomyces*.

Wiadomo, że drobnoustroje jamy ustnej charakteryzują się słabą zdolnością do adhezji do powierzchni „czystego” niczym niepokrytego szkliwa. Biorąc to pod uwagę w moich doświadczeniach, w celu umożliwienia adhezji paciorkowców do powierzchni zębów, użyłam śliny ludzkiej. Dzięki glikoproteinom zawartym w ślinie, na powierzchni szkliwa wytworzyła się tzw. „osłonka nabyta”, do której łatwo przylegają drobnoustroje próchnicotwórcze. W swoich badaniach ślinę stosowali tacy badacze jak: Østravik i wsp. (145), Zahradnik i wsp. (193), Zahradnik i wsp. (195). Jednak niektórzy autorzy są odmiennego zdania i nie uznają śliny za niezbędny czynnik w procesie wytwarzania zmian próchnicowych szkliwa w warunkach *in vitro*. Wśród nich są m.in. Gallagher i wsp. (57), Kaufman i wsp. (90), Clarkson i wsp. (29), Edmunds i wsp. (42). Zakłada się też, że do badań powinna być użyta ślina pochodząca od człowieka a nie sztuczna, ponieważ zapewnia warunki zbliżone do występujących w jamie ustnej. Dlatego w moich doświadczeniach wykorzystałam do wytworzenia „osłonki nabytej” na powierzchni szkliwa zębów stymulowaną, mieszaną ślinę, odwirowaną, pochodzącą od zdrowych osób. Korzyści wynikające z zastosowania śliny ludzkiej w modelu mikrobiologicznym potwierdziły doświadczenia Arnolda i wsp. (5). Natomiast doświadczenia przeprowadzone przez Zahradnika i wsp. (194, 195) wykazały zdolność do tworzenia na powierzchni szkliwa zęba „osłonki nabytej”, do której następnie przylegały paciorkowce z gatunku *S.mutans*. Wytworzona na powierzchni szkliwa „osłonka nabyta” umożliwia z kolei powstanie biofilmu i rozwój bakteryjnej płytki nazębnej. Model mikrobiologiczny, w którym używa się śliny i drobnoustrojów wytwarzających biofilm, przyczynia się do lepszego poznania procesów związanych z wytwarzaniem ubytków próchnicowych szkliwa zębów (15, 55, 115). Biofilm i bakteryjna płytka nazębna zawierają drobnoustroje przyczyniające się do rozwoju próchnicy zębów. Jako pierwsze do „osłonki nabytej” przylegają różne gatunki paciorkowców. Potem do tych drobnoustrojów dołączają inne bakterie, które powodują rozwój płytki nazębnej i jej pogrubienie z upływem czasu. Bakteryjna płytka w warunkach *in vitro* może być wytwarzana przy użyciu

jednego lub kilku różnych drobnoustrojów (mieszaniny bakterii). W moim modelu mikrobiologicznym została wykorzystana płytka bakteryjna wytworzona najpierw przez jeden drobnoustrój (*S.mutans*), a potem przez drugi (*L.acidophilus*). Inni autorzy również w tym celu używali tylko jednego szczepu. Tak było w przypadku badań prowadzonych przez Clarksona i wsp. (28), Edmundsa i wsp. (42), Jordana i wsp. (86), Zahradnika i wsp. (195) i Noorda i wsp.(136). Natomiast Shu i wsp. (165) użyli jeden szczep oraz mieszaninę kilku drobnoustrojów, aby ocenić zdolność do tworzenia płytki bakteryjnej przez różne szczepy, użyte pojedynczo lub w mieszaninie. Autorzy wykazali, że gatunki *S.mutans* i *Actinomyces naeslundii* były w stanie wytworzyć samodzielnie płytkę nazębną, a takiej cechy nie posiadały testowane przez nich pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*. Ponadto autorzy stwierdzili, że wielodrobnoustrojowa płytka bakteryjna wykazuje silniejsze działanie próchnicotwórcze niż utworzona przez pojedynczy drobnoustrój. Natomiast Noorda i wsp.(136) wykazali, że tworzenie bakteryjnej płytki nazębnej przez jeden lub dwa drobnoustroje zachodzi podobnie.

Kolejnym ważnym czynnikiem w badaniach *in vitro*, który w znacznym stopniu oddziałuje na wzrost bakterii, jest odpowiednie podłoże. W moich doświadczeniach zostały wykorzystane dwa różne podłoża, które zapewniały wzrost bakterii próchnicotwórczych. Chodziło o porównanie, które z nich będzie bardziej przydatne do badań. W Metodzie I zostało użyte podłoże BHI (bulion mózgowo-sercowy) z dodatkiem 5% sacharozy. Takie samo podłoże wykorzystali w badaniach Hashizume i wsp. (72). Natomiast bulion BHI wzbogacony dodatkiem wyciągu drożdżowego, glukozą (0,5%) i sacharozą (1%) użyli do swoich doświadczeń wytwarzania próchnicy zębów *in vitro* Lima i wsp. (105). W innym badaniu Kaufman i wsp. (90) prowadzili hodowlę szczepów *S.mutans* i *S.sanguinis* (poprzednio *S.sanguis*) w podłożu BHI z dodatkiem 2% sacharozy oraz w podłożu syntetycznym, zawierającym określone składniki chemiczne. Autorzy ci stwierdzili, że w podłożu BHI wszystkie badane szczepy wytwarzały podpowierzchniowe ubytki szkliwa zębów. Jednak pomimo uzyskania, w obu zastosowanych przez nich metodach, zbliżonych efektów i podobnej podpowierzchniowej demineralizacji szkliwa zębów, autorzy uważają, że korzystniejsze warunki doświadczalne stwarza stosowane przez nich podłoże syntetyczne, w porównaniu z bulionem BHI.

W mojej Metodzie II do badań zostało użyte podłoże PP z dodatkiem 5% sacharozy, które do doświadczeń wprowadzili w roku 1966 Jordan i Keyes (86). Okazało się ono bardziej przydatne do hodowli zarówno paciorkowców próchnicotwórczych, jak i pałeczek *Lactobacillus*. Podłoże to wydaje się być korzystniejsze niż BHI do wytwarzania zmian próchnicopodobnych szkliwa, szczególnie w konieczności prowadzenia badań przez dłuższy czas (3 – 4 miesiące). Do hodowli drobnoustrojów były też stosowane inne podłoża. Bulion tryptikazowo-sojowy z dodatkiem sacharozy był wykorzystany przez Zahradnika i wsp. (194, 195) i Fontanę i wsp. (55); bulion tryptikazowy z dodatkiem sacharozy użyli Dummer i wsp. (37) a bulion tioglikolanowy Clarkson i wsp. (28).

W przypadku mojej Metody I doświadczenie przeprowadzono w warunkach tlenowych. Natomiast w Metodzie II środowisko hodowli szczepów było najpierw mikroaerofilne (4 tygodnie), a potem tlenowe (do końca badań). Inni autorzy doświadczenia *in vitro*, w celu uzyskania ubytków próchnicowych zębów, prowadzili częściej w warunkach tlenowych (28, 37, 42, 55, 90, 161, 194). Środowisko beztlenowe było wybierane do prowadzenia badań tylko w tych przypadkach, gdy chodziło o wytworzenie zmian próchnicowych w szkliwie z użyciem mieszaniny drobnoustrojów, wśród których były też bakterie rosnące tylko beztlenowo (29, 137). Jednak znany jest fakt, że bakterie *S.mutans* i inne paciorkowce a także niektóre pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* lepiej rosną w warunkach mikroaerofilnych. Dlatego w moich badaniach (zależnie od metody) bakterie były hodowane w warunkach tlenowych i mikroaerofilnych, żeby można było ocenić, które środowisko jest dla tych drobnoustrojów bardziej odpowiednie. Otrzymane wyniki wskazują, że korzystniejsze jest prowadzenie hodowli szczepu *S.mutans* w warunkach mikroaerofilnych.

Zaletą w badaniach prowadzonych *in vitro* jest możliwość monitorowania pH podłoży użytych do hodowli drobnoustrojów. Ocena ta jest bardzo ważna, ponieważ obniżenie się pH poniżej wartości krytycznej, za którą uznano pH=5,0, prowadzi do demineralizacji tkanek zęba i do rozwoju próchnicy. Badania wykazały, że drobnoustroje próchnicotwórcze tj. *S.mutans* i *L.acidophilus* są zdolne do rozkładania niektórych węglowodanów i wytwarzania z nich kwasów, przyczyniających się do szybkiego obniżenia pH środowiska do wartości poniżej 5,0.

Stwierdzono też, że w przypadku szczepów *S.mutans*, przy pH=4,8 wzrasta 4-krotnie aktywność glikolityczna i 5-krotnie zdolność do powodowania demineralizacji szkliwa zębów (181). W moich badaniach, w obu Metodach postanowiłam przeprowadzić kontrole pH hodowli co 48 godzin, przez cały czas trwania doświadczeń. W mojej Metodzie I wartości pH podłoży niezawierających drobnoustrojów (kontrola) wynosiły 7,4. Po zaszczepieniu podłoży zawiesiną szczepu *S.mutans* lub *L.acidophilus* po 48 godzinnej inkubacji, pH podłoży obniżały się do wartości od 4,2 do 4,5. Wartości pH nie zmieniały się znacznie w czasie kontynuacji badań aż do ich zakończenia. Przykłady uzyskanych wartości pH hodowli zawierających *S.mutans* lub *L.acidophilus* zostały zamieszczone w tabelach 4 i 5. Kaufman i wsp. (90) oceniali przez 8 dni zmiany pH podłoża BHI z dodatkiem 2% sacharozy, do których dodawali zawiesiny różnych szczepów z gatunku *S.mutans* i także zaobserwowali znaczne obniżenie się wartości pH. Zależnie od użytego szczepu wartości te po 24 godzinnej inkubacji wynosiły: dla *S.mutans* BHT $4,83 \pm 0,03$ a dla *S.mutans* GS5 $4,53 \pm 0,02$. W innym doświadczeniu Hashizume i wsp. (72) prowadzili codzienną kontrolę pH biofilmu wytworzonego na powierzchni skrawków histologicznych szkliwa zębów. Do wytworzenia biofilmu użyli szczepu *S.mutans* NCTC 10449 w bulionie BHI zawierającym 5% sacharozy. Początkowe pH podłoża miało wartość 7,0. Szczegółowa ocena wykazała, że po jednodniowej inkubacji pH biofilmu obniżyło się odpowiednio do $4,18 \pm 0,04$, w kolejnych dniach (od 2 do 6) inkubacji wartości wynosiły $4,30 \pm 0,02$, $4,48 \pm 0,02$, $4,35 \pm 0,04$, $4,57 \pm 0,13$ i $4,41 \pm 0,01$. Po 7 dniach inkubacji podłoży pH osiągnęło wartość $4,60 \pm 0,12$. Warunki, podłoże i gatunek szczepu użytego w powyższych badaniach są takie same jak w mojej Metodzie I, ale wartości pH zostały ocenione po 48 godzinnej inkubacji. Otrzymane przeze mnie wartości pH 4,2 - 4,5; średnia wartość $4,35 \pm 0,05$, są zbliżone do tych, jakie uzyskali Hashizume i wsp. (72). W innych badaniach, Clarkson i wsp. (28) hodowali szczep *S.mutans* FA1 w podłożu tioglikolanowym zawierającym 3,5% glukozy w 37°C. Po 48 godzinnej inkubacji pH obniżało się do wartości wynoszących od 4,3 do 4,6. Otrzymane przez tych autorów wyniki są zbliżone do uzyskanych przeze mnie (pH 4,2- 4,5). Fontana i wsp. (55) w badaniach trwających 7 – 12 dni używali podłoża tryptykazowo-sojowego z dodatkiem 5% sacharozy, które zaszczepiali mieszaniną

drobnoustrojów, zawierającą szczepy *S.mutans* i *L.casei*. Po 7 – 12 dniach doświadczenia wartości pH w grupie badanej (hodowla) wynosiły 4,1 - 4,5, a w podłożu niezaszczepionym (kontrola) 6,8 – 7,0. Wartości pH uzyskane przez Kaufmana i wsp. (90) i Clarksona wsp. (28) w powyższych doświadczeniach były zbliżone do tych, jakie uzyskałam w moich badaniach. Również Fontana i wsp. (55) w doświadczeniach z wykorzystaniem do badań mieszaniny drobnoustrojów (*S.mutans* i *L.casei*) otrzymali wyniki zbliżone do uzyskanych przeze mnie, ponieważ w podłożu zaszczepionym zarówno *S.mutans* jak i *L.acidophilus*, końcowe pH podłoży było w granicach 4,2 - 4,5. W Metodzie II, w której zostało użyte podłoże PP z dodatkiem 5% sacharozy (wartość pH =7,1) po dodaniu do niego hodowli *S.mutans* i po 24 lub 48 godzinnej inkubacji w warunkach mikroaerofilnych wartości pH wynosiły 4,3 – 4,6 (średnia $4,45 \pm 0,05$). Podobnie po zaszczepieniu podłoża PP-S szczepem *L.acidophilus* po 48 godzinnej inkubacji w warunkach tlenowych pH, które na początku wynosiło 7,0, obniżyło się do wartości 4,3 – 4,6 (średnia $4,42 \pm 0,05$). Natomiast pH podłoży kontrolnych, które nie zawierały drobnoustrojów, miały wartość 7,1. Zatem w tych dwóch Metodach uzyskano zbliżone wartości końcowego pH hodowli bez względu na gatunek użytego szczepu. Wynika z tego, że pH podłoży po zakończeniu badań w obu Metodach i uzyskane w doświadczeniach przez innych autorów, którzy stosowali różne podłoża, były zbliżone.

Drobnoustroje próchnicotwórcze, gdy rosną w podłożach zawierających glukozę, sacharozę lub inne cukry, powodują ich rozkład z wytworzeniem różnych lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego. Takie kwasy są też produkowane przez drobnoustroje bytujące w bakteryjnej płytce nazębnej. Z przeprowadzonych badań wynika, że głównym metabolitem płytki nazębnej jest kwas mlekowy (44, 57, 137). Są też pojedyncze doniesienia na temat innych kwasów produkowanych przez drobnoustroje wytwarzające zmiany próchnicopodobne szkliwa zębów w warunkach *in vitro*. W moich doświadczeniach zostało zbadane wytwarzanie przez użyte drobnoustroje lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego metodą chromatografii gazowej. W Metodzie I, gdy był użyty szczep *S.mutans* hodowany przez 24 godziny w bulionie BHI-S w warunkach tlenowych, stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 107,0 do 122,7 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie kwasu wynosiło

114,85 $\mu\text{M/ml}$) a po 48h inkubacji wynosiło od 113,6 do 154,5 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 134,05 $\mu\text{M/ml}$). Natomiast w przypadku szczepu *L.acidophilus* po 24h inkubacji stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 115,0 do 181,3 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 148,15 $\mu\text{M/ml}$), a po 48h od 134,7 do 215,5 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 175,1 $\mu\text{M/ml}$). W podłożach kontrolnych, nie zawierających bakterii, nie stwierdzono obecności kwasu mlekowego.

W Metodzie II, po użyciu szczepu *S.mutans* w bulionie PP-S, końcowe stężenia kwasu mlekowego po 48 godzinnej inkubacji w warunkach mikroaerofilnych wynosiły od 180,2 do 338,7 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 261,8 $\mu\text{M/ml}$), a w przypadku szczepu *L.acidophilus* hodowanego na tym samym podłożu przez 24 godziny w warunkach tlenowych, stężenia kwasu mlekowego osiągały wartości od 250,6 do 273,5 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 262,05 $\mu\text{M/ml}$), a po 48h inkubacji od 252,1 do 285,3 $\mu\text{M/ml}$ (średnie stężenie 268,7 $\mu\text{M/ml}$). W podłożach kontrolnych, które nie zawierały drobnoustrojów, nie stwierdzono obecności kwasu mlekowego. Otrzymane wyniki badań wskazują, że korzystniejsze warunki do rozwoju bakterii próchnicotwórczych stwarzała Metoda II, w której stężenia kwasu mlekowego wytwarzanego przez użyte drobnoustroje były wyższe od obserwowanych w Metodzie I.

Noorda i wsp. (137) badali metabolizm bakteryjnej płytki wytwarzanej przez szczep *S.mutans* C67-1 i przez mieszaninę bakterii zawierającą *S.mutans* C67-1 oraz *Veillonella alcalescens* V-1. Szczepy były hodowane w bulionie Todd-Hewitta z dodatkiem 1,2% sacharozy. W warunkach tlenowych szczep *S.mutans* C67-1 po 1 tygodniu inkubacji wytwarzał ponad 100 nM kwasu/ μg DNA. Natomiast w mieszanej hodowli (*S.mutans* + *V.alcalescens*), w warunkach tlenowych po tygodniu inkubacji stężenie kwasu mlekowego wzrastało do 190 nM / μg DNA, a w warunkach beztlenowej hodowli do wartości ponad 350 nM/ μg DNA. W przypadku hodowli szczepu *S.mutans* poza kwasem mlekowym próbki zawierały też kwas octowy i mrówkowy. Jednak autorzy podkreślają, że we wszystkich badaniach bez względu na warunki hodowli i czas, dominującym był kwas mlekowy (137). W innym doświadczeniu Gallagher i wsp. (57) oznaczali wytwarzanie lotnych kwasów tłuszczowych (metodą chromatografii gazowej) przez szereg różnych drobnoustrojów, w tym także przez 2 szczepy *S.mutans* (D11 i D16), w podłożu

zawierającym dodatkowo jeden z cukrów tj. glukozę, mannitol lub ksylitol. Wyniki wskazują, że hodowany w bulionie z glukozą szczep *S.mutans* D11 wytwarzał $8,1 \times 10^{-3}$ M/L kwasu mlekowego, $0,8 \times 10^{-3}$ M/L kwasu bursztynowego, $4,2 \times 10^{-3}$ M/L kwasu mrówkowego i $2,3 \times 10^{-3}$ M/L kwasu octowego. Natomiast szczep *S.mutans* D16 wytwarzał $23,7 \times 10^{-3}$ M/L kwasu mlekowego, $1,0 \times 10^{-3}$ M/L kwasu bursztynowego i $1,4 \times 10^{-3}$ M/L kwasu octowego. W moich badaniach prowadzonych ze szczepem *S.mutans*, niezależnie od użytej Metody badań, stwierdziłam tylko obecność kwasu mlekowego.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ

Wyniki wskazują, że obie użyte Metody doświadczalne, różniące się podłożami i warunkami hodowli, doprowadziły do wytworzenia próchnicopodobnych zmian szkliwa zębów ludzkich. Potwierdziła to ocena dokonana metodą wizualną, w mikroskopie elektronowym skaningowym i metoda mikrotomografii komputerowej. Ocena wizualna zmian ujawniła, że plamy kredowo-białe na szkliwie zębów były obserwowane po 4 tygodniach trwania doświadczeń, prowadzonych obiema Metodami. Jednak analiza profilometryczna wykazała, że w Metodzie II zmiany próchnicopodobne o charakterze *caries incipiens* były znacznie bardziej wyraźne. Jeśli zakłada się prowadzenie badań przez dłuższy czas (3 – 4 miesiące) to w takim przypadku korzystniejsza będzie Metoda II. Wykazano, że przygotowanie skrawków szkliwa do badań było znacznie łatwiejsze w przypadku zębów z doświadczenia prowadzonego tą Metodą ze względu na to, że posiadały one bardziej zwartą strukturę.

Wybór 2 szczepów działających próchnicotwórczo i użycie najpierw szczepu *S.mutans*, a potem *L.acidophilus* było korzystne. Doprowadziło to do uzyskania wyraźnych zmian szkliwa w postaci biało-kredowych plam już po 1 miesiącu badań.

Zmiana warunków hodowli z tlenowych (Metoda I) na mikroaerofilne (1 miesiąc badań), a potem tlenowe (3 miesiące badań) w Metodzie II była dobrym wyborem, ponieważ obserwowane zmiany szkliwa zębów były wyraźniejsze niż w Metodzie I, co może wskazywać, że proces próchnicowy był bardziej nasilony (zachodził szybciej).

Doświadczenia, związane z indukowaniem próchnicy zębów w warunkach *in vitro*, są bardzo potrzebne do wyjaśniania różnych zagadnień związanych z jej powstawaniem i wieloma szczegółami dotyczącymi pogłębiania się tego procesu. Model mikrobiologiczny poza uzyskiwaniem zmian próchnicopodobnych szkliwa może być także wykorzystany praktycznie, np. w różnych celach doświadczalnych do:

- oceny skuteczności działania preparatów powodujących remineralizację szkliwa zębów;
- oceny skuteczności stosowanej fluoryzacji zębów;

- oceny skuteczności działania środków przeciwdrobnoustrojowych (antyseptyków, środków roślinnych);
- oceny działania preparatów przeciwpróchnicowych;
- badania etiologii bakteryjnej wtórnej próchnicy zębów;
- badania wpływu poszczególnych drobnoustrojów lub ich mieszanin na rozwój próchnicy zębów;
- badań nad rozwojem bakteryjnej płytki nazębnej;
- oceny właściwości różnych środków (związków, preparatów) do hamowania adhezji drobnoustrojów do powierzchni szkliwa;
- oceny zdolności hamowania powstawania bakteryjnej płytki nazębnej (np. wielodrobnoustrojowej);
- oceny oddziaływania probiotyków na powierzchnię szkliwa zębów.

Należy podkreślić, że model mikrobiologiczny jest korzystniejszy od chemicznego, ponieważ umożliwia stworzenie warunków doświadczalnych zbliżonych do naturalnych. Parametry badań są stabilne i dają możliwości powtarzania eksperymentów oraz ich kontroli. W czasie doświadczeń można oceniać niektóre zachodzące procesy, w tym np. pH, wytwarzanie metabolitów, powstające zmiany środowiska. Badania mogą być kontynuowane przez tygodnie lub miesiące (3-4 miesiące) i zostać przerwane w każdym czasie. Zaletą jest to, że zmiany próchnicopodobne szkliwa zębów, uzyskane w tych warunkach doświadczalnych, mają podobny charakter do naturalnych ubytków próchnicowych szkliwa zębów. Modele mikrobiologiczne nie są też doskonałe i nie można całkowicie w nich odtworzyć wszystkich czynników, panujących w jamie ustnej, które oddziałują w warunkach *in vivo* na powierzchnię zębów i nie zastąpią w pełni badań klinicznych. Pomimo tych niedoskonałości, model mikrobiologiczny jest lepszy od modelu chemicznego. Doświadczenia są proste w wykonaniu, powtarzalne, niekosztowne i mogą być wykorzystywane w badaniach przesiewowych np. do oceny działania na powierzchnię szkliwa zębów różnych środków przeciwpróchnicowych lub antyseptyków.

7. WNIOSKI

1. W obu Metodach po 2 tygodniach inkubacji zębów z drobnoustrojami nie uzyskano zmian w szkliwie zębów poddanych doświadczeniom. Zostało to potwierdzone w badaniu wizualnym i z wykorzystaniem zgłębnika.
2. Zmiany próchnicopodobne szkliwa zębów typu *caries incipiens* pojawiły się po 4 tygodniach badań w obu użytych Metodach, jednak w Metodzie II (warunki mikroaerofilne) były one bardziej wyraźne co wskazuje, że zmiany nasilały się w czasie trwania doświadczeń. Potwierdzono to metodą wizualną, badaniem z wykorzystaniem zgłębnika i metodą profilometryczną.
3. Zmiany o charakterze podpowierzchniowym szkliwa zębów (*caries incipiens*) występują w obu Metodach i są zmianami spowodowanymi tylko przez szczep *S.mutans*. Wskazuje to, że doświadczenia w razie potrzeby mogą być zakończone już na tym etapie a zęby mogą być wykorzystane do prowadzenia innych badań nad próchnicą.
4. Po 10 tygodniach trwania doświadczeń wczesne zmiany próchnicowe zębów były łatwiej dostrzegalne w Metodzie II, co wynika z oceny obrazów profilometrycznych.
5. Wyniki wskazują, że kolejność użytych szczepów była prawidłowa. Szczep *S.mutans* rozpoczynał proces próchnicowy, a szczep *L.acidophilus* pogłębiał te zmiany. Potwierdzają to wyniki badań mikrotomograficznych.
6. Zmiany wykryte w szkliwie zębów mają charakter podpowierzchniowy, potwierdzony przez nieinwazyjną analizę mikrotomograficzną. Podpowierzchniowa strefa o podobnym charakterze może być odnaleziona w białych plamach szkliwa powstających w naturalnych warunkach w początkowej próchnicy zębów.
7. Analiza profilometryczna wykazała, że charakter zmian próchnicopodobnych uzyskanych w Metodzie II jest bardziej zbliżony do charakteru naturalnych zmian próchnicowych zębów niż w Metodzie I.

8. W obu Metodach po zaszczepieniu podłoży drobnoustrojami po 24h jak i 48h następowało szybkie obniżenie wartości pH, co wspomagało rozwój zmian próchnicowych zębów.
9. W Metodzie I i II oba drobnoustroje w hodowlach zawierających zęby wytwarzały kwas mlekowy. Jednak szczep *S.mutans* w warunkach mikroaerofilnych (Metoda II) produkował go znacznie więcej. W hodowlach obu szczepów (w Metodzie I i II) nie wykryto obecności lotnych kwasów tłuszczowych.
10. Opracowana mikrobiologiczna Metoda II okazała się skuteczniejsza niż Metoda I. Może ona być wykorzystana do uzyskiwania zmian próchnicopodobnych szkliwa zębów, a także w innych celach np. do oceny działania na szkliwo zębów środków przeciwpróchnicowych i przeciwdrobnoustrojowych.

8. PIŚMIENNICTWO

1. **About I**, Mitsiadis T. Molecular aspects of tooth pathogenesis and repair *in vivo* and *in vitro* models. *Adv Dent Res.* 2001; 15:59-62.
2. **Arends J**, Schuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res.* 1980; 14:190-195.
3. **Arends J**, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res.* 1986; 65(1):2-11.
4. **Arends J**. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth: reaction paper. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 194-197.
5. **Arnold WH**, Gaengler P, Sabov K, Schmitz I, Gedalia I. Induction and 3D reconstruction of caries-like lesions in an experimental dental plaque biofilm model. *J Oral Rehabilitation* 2001; 28: 748-754.
6. **Arnold WH**, Sonkol T, Zoellner A, Gaengler P. Comparative study of *in vitro* caries-like lesions and natural caries lesions at crown margins. *J Prosthodontics* 2007; 16(6): 445-451.
7. **Babaahmady KG**, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus spp.* at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries Res.* 1998; 32: 511-58.
8. **Baelum V**, Fejerskov O.: Rozpoznanie próchnicy: "moment zastanowienia się przed podjęciem interwencji"? W: Fejerskov O. i Kidd E.(red.), Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Urban&Partner, Wrocław 2006; 103-113.
9. **Beighton D**, Lynch E, Heath MR. A microbiological study of primary root-caries lesions with different treatment needs. *J Dent Res.* 1993; 72(3): 623-629.
10. **Bellamy W**, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol.* 1992; 73: 472-479.
11. **Bellamy W**, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Kipling of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immun.* 1993; 182: 97-105.
12. **Bowden GH**, Hardie JM, Slade GL. Microbial variations in approximal dental plaque. *Caries Res.* 1978; 253-277.

13. **Bowden GHW**, Hamilton IR. Competition between *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* in mixed continuous culture. Oral Microbiol Immun. 1989; 4: 57-64.
14. **Bowden GHW**. Microbiology of root surface caries in humans. J Dent Res. 1990; 69: 1205-1210.
15. **Bowden G.H.** The role of microbiology in models of dental caries: reaction paper. Adv Dent Res. 1995; 9(3): 255-269.
16. **Bowden GH**. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? International Workshop: Community Dentistry and Oral Epidemiology "Understanding dental caries" Aarhus, 6-8 July, 1996.
17. **Boyle E.L**, Higham S.M, Edgar W.M. The production of subsurface artificial caries lesions on third molar teeth. Caries Res. 1998; 32(2):154-158.
18. **Brailsford SR**, Sheeby EC, Gilbert S.C., Clark DT, Kidd EAM, Zoiopoulos L, Adams SE, Visser JM, Beighton D. The microflora of the erupting first permanent molar. Caries Res. 2005; 39:78-84.
19. **Busscher HJ**, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv Dent Res. 1997; 11: 24.
20. **Byun R**, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol. 2004; 42(7):3128-3136
21. **Carlsson J**, Grahen H, Jonsson G. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. Caries Res. 1975; 9: 333-9.
22. **Carlsson P**, Gandour IA, Olsson B, Rickardsson B, Abbas K. High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. Oral Microbiol Immunol. 1987; 2: 121-124.
23. **ten Cate JM**, van de Plassche-Simon YM, van Strijp AJP. Importance of model parameters in the assessment of intra-oral remineralization. J Dent Res. 1992; 71: 879-883.
24. **ten Cate JM**, Mundorff-Shrestha SA. Working group report 1: laboratory models for caries (*in vitro* and animal models) Adv Dent Res. 1995; 9(3): 332-334.

25. **ten Cate JM**, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Oddziaływanie chemiczne między zębem płynami jamy ustnej. W: Fejerskov O, Kidd E. (red.) Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Urban&Partner, Wrocław; 2006; 51-72.
26. **Caufield PW**, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. Infect Immun. 2000; 68: 4018-4023.
27. **Chestnutt IG**, MacFarlane TW, Stephen K. An in vitro investigation of the cariogenic potential of oral streptococci. Arch Oral Biol. 1994; 39(7): 589-593.
28. **Clarkson BH**, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria *in vitro*. J Dent Res. 1984; 63(10): 1186-1189.
29. **Clarkson BH**, Krell D, Wefel S, Crall J, Feagin FF. In vitro caries-like lesion production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. J Dent Res. 1987; 66(3):795-798.
30. **Coykendall AL**. Genetic heterogeneity in *Streptococcus mutans*. J of Bacter. 1971; 106(1): 192-196.
31. **Coykendall AL**. Classification and identification of the viridans Streptococci. Clin Microb Rev. 1989; 2(3): 315-328.
32. **Cury JA**, Hashizume LN, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: An in situ study. Caries Res. 2001; 35(2): 106-110.
33. **Deng DM**, ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. Caries Res. 2004; 38(1): 54-61.
34. **Devriese LA**, Pot B, Vandamme P, Kersters K, Collins MD, Alvarez N, F. Haesebrouck, F, Hommez J. *Streptococcus hyovaginalis* sp. nov. and *Streptococcus thoralensis* sp. nov., from the Genital Tract of Sows. Int J Syst Bacteriol. 1997; 47: 1073-1077.
35. **Dongue HD**, Newman HN. Effect of glucose and sucrose on survival in bath culture of *Streptococcus mutans* C67-1 and a noncariogenic mutant, C67-25. Infect Immun. 1976; 13:16-21.
36. **Dubielecka M**, Słotwińska SM. Próchnica zębów-choroba zakaźna. Mikrobiologia próchnicy zębów. Mag Stomat. 2009; 2: 28-31.

37. **Dummer PMH**, Edmunds DH, Green RM. Demineralisation of human enamel by *Streptococcus mutans* NCTC 10832 using a sequential batch culture technique. Caries Res. 1982; 16: 193-196.
38. **Dybizbańska E**. Wgląd do jamy ustnej. Nowa Stomat. 1999; 11(4): 1-10.
39. **Edgar WM**. Saliva its secretion, composition and functions. Br. Dent. J. 1992; 172: 305-312.
40. **Edgar WM**, Higham SM. Role of saliva in caries models. Adv Dent Res. 1995; 9(3): 235-238.
41. **Edgerton M**, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. Adv Dent Res. 2000; 14: 16-21.
42. **Edmunds DH**, Whittaker DK, Green RM. Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. Caries Res. 1988; 22: 327-336.
43. **Edwardsson S**. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. Odontol Revy 1974; 25(Suppl.32).
44. **Featherstone JDB**, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. Caries Res. 1981; 15:377-385.
45. **Featherstone JDB**, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. Caries Res. 1981; 15: 109-114.
46. **Featherstone JDB**, Zero DT. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. J Dent Res. 1992; 71: 804-810.
47. **Featherstone JDB**. The science and practice of caries prevention. JADA 2000; 131:887-899.
48. **Fejerskov O**, Nyvad B, Joost Larsen M. Human experimental caries models: intra-oral environmental variability. Adv Dent Res. 1994; 8(2): 134-143.
49. **Fejerskov O**. Concepts on dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol. 1997; 25: 5-12.
50. **Fejerskov O**, Nyvad B, Kidd EAM. Kliniczne i histologiczne manifestacje próchnicy zębów. W: Fejerskov O, Kidd E. (red.), Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Urban&Partner, Wrocław 2006; 73-100.

51. **Filоче SK**, Anderson S.A., Sissons CH. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans* Oral Microb Immun. 2004; 19: 322-326.
52. **Firestone AR**, Feagin FF, Heaven TJ, Sheetz J, Denys F. In vitro demineralization by strains of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus sobrinus* of sound and demineralized root surface. J Dent Res. 1993; 72(8): 1180-1183.
53. **Fitzgerald RJ**. Gnobiotic contribution to oral microbiology. J Dent Res. 1963; 42(1): 549-552.
54. **Fitzgerald RJ**. Demonstration of the etiologic role os streptococci in experimental caries in the hamster. J Am. Dent. Assoc. 1963b; 66: 597-599.
55. **Fontana M**, Dunipace AJ, Gregory RL, Noblitt TW, Li Y, Park KK, Stookey GK. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. Caries Res. 1996; 30:112-118.
56. **Freedman ML**, Tanzer JM. Dissociation of plaque formation from glucan induced agglutination in mutants of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1974; 10: 189-196.
57. **Gallagher IHC**, Pearce EIF, Cutress TW. Artificial caries produced by different oral bacterial cultures incubated with bovine dental enamel. Arch Oral Biol. 1983; 28(4): 317-325.
58. **Gardner DE**, Norwood JR, Eisensohn JE. At-will breast feeding and dental caries: four case reports. ASDC J Dent Child. 1977; 44(3):186–191.
59. **Gibbons RJ**, Fitzgerald RJ. Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. J Bacteriol. 1969; 98(2): 341-346.
60. **Gibbons RJ**. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J Dent Res. 1984; 63: 378-385.
61. **Gibbons RJ**. Bacterial adhesion to oral tissue: a model for infections diseases. J Dent Res. 1989; 68: 750-760.
62. **Gilmour MN**, Whittam TS, Killian M, Selander RK. Genetic relationships among the oral *Streptococci*. J Bacteriol. 1987; 169(11): 5247-5257.
63. **Gilmour ASM**, Edmunds DH. The polarized light microscopic appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth. J Oral Reh. 1998; 25: 929-939.

64. **Goderska K**, Czarnecki Z. Characterization of selected strains *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. Afr.J Microbiol.Res. 2007; 1(6): 65-78.
65. **Gold OG**, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Archs Oral Biol. 1973; 18:1357-1364.
66. **Górska S**, Grycko P, Rybka J, Gamian A. Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego-biosynteza i struktura. Postępy Hig Med.Dośw. 2007; 61: 805-818.
67. **Guggenheim B**, Schmid R. Chemical plaque control: what *in vitro* and animal tests are appropriate. J Dent Res. 1989; 68: 1645-1654.
68. **Hamada S**, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus*. Microb Rev. 1980; 44(2): 331-384.
69. **Hara AT**, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. Caries Res. 2003; 37:339-344.
70. **Hardwick JL**. The incidence and distribution of caries throughout the ages in relation to the Englishman's diet. Br Dent J. 1960; 108: 9-17.
71. **Harper DS**, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. Arch Oral Biol. 1984; 29:843.
72. **Hashizume LN**, Shinada K, Kawaguchi Y, Yamashita Y. Sequence of ultrastructural changes of enamel crystals and *Streptococcus mutans* biofilm in early enamel caries in vitro. J Med Dent Scien. 2002; 49:67-75.
73. **Hausen H**. Prognozowanie próchnicy. W: Fejerskov O, Kidd E. (red.), Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Urban&Partner, Wrocław 2006; 351-364.
74. **Hirasawa M**, Takada K. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to cell wall inhibitors and development of a novel selective medium for *S.sobrinus*. Caries Res. 2002; 36(3): 155-160.
75. **Hirasawa M**, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S.mutans* and *S.sobrinus* and their serotypes in dental plaque. Caries Res. 2003; 37(3): 212-217.
76. **Hirose H**, Hirose K, Isogai E, Mima H, Ueda I. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. Caries Res. 1993; 27: 292-297.
77. **Hoeven JS**, Franken HCM. Production of acid in rat dental plaque with or without *Streptococcus mutans*. Caries Res. 1982; 16: 389.

78. **van Houte J.** Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J.* 1980; 30: 305-326.
79. **van Houte J.** Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res.* 1994; 73: 672-681.
80. **Ikeda T, Sandham HJ, Bradley Jr EL.** Changes in *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. *Arch Oral Biol.* 1973; 18: 555-566.
81. **Imfeld TN.** Identification of low caries risk dietary components. Karger, Basel 1983.
82. **Imfeld T.** Dental erosion. Definition., classification and links. *J Oral. Sci.* 1996; 104: 151-155.
83. **Jankowska AK, Waszkiel D, Kowalczyk A.** Ślina jako główny składnik ekosystemu jamy ustnej. Część I. Mechanizm wydzielania i funkcje. *Wiadomości Lekarskie* 2007; LX: 3-4.
84. **Johnson MC, Bozzola JJ, Shechmeister IL.** Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharide mutants. *J Bacteriol.* 1974; 118(1): 304-311.
85. **Johnson MC, Bozzola JJ, Shechmeister IL, Shklair IL.** Biochemical study of the relationship of extracellular glucan to adherence and cariogenicity in *Streptococcus mutans* and an extracellular polysaccharide mutant. *J Bacteriol.* 1977; 29(1): 351-357
86. **Jordan HV, Keyes PH.** *In vitro* methods for the study of plaque formation and carious lesions. *Arch Oral Microb.* 1966; 11(8):793-802.
87. **Kałowski M.** Wytwarzanie *dental plaque in vitro* przez niektóre paciorkowce jamy ustnej. *Czas. Stomat.* 1974; XXVII (8): 835-840.
88. **Kamysz W, Okrój M, Łukasiak J, Kędzia A.** Histatyny – białka ślinowe bogate w histydyne. *Nowa Stomat.* 2004; 1: 1-5.
89. **Kasiak M.** Aktywność antypapainowa cystatyn w ślinie mieszanej a próchnica zębów. *Dent Med Probl.* 2006; 43(1): 27-31.
90. **Kaufman HW, Pollock JJ, Murphy J, Lunardi S, Vlack J.** Factors involved in artificial caries induction by oral *Streptococci* in extracted human teeth. *J Den Res* 1984; 63(5): 653-657.
91. **Keyes PH.** The infections and transmissible nature of experimental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960; 1: 304-320.

92. **Keyes PH**, Jordan HV. Factors influencing initiation, transmission and inhibition of dental caries. W: Harris RJ, (red.) Mechanisms of hard tissue destruction. New York: Academic Press, 1963: 261-283.
93. **Keyes PH**, Fitzgerald RJ. Dental caries in the Syria hamster. X The natural history of the disease in the single family. Int Dent. J. 1963: 13, 86-109.
94. **Kidd EAM**, Joyston-Bechal S. Susceptibility of natural carious lesions in enamel to an artificial caries-like attack *in vitro*. Br Dent J. 1986; 160: 345-348.
95. **Kleinberg I**, A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(2): 108-125.
96. **Klimek J**, Hellwig E. Etiologia i diagnostyka próchnicy. W: Heidemann D. (red.), Kariologia. Próchnica zębów. Leczenia, wypełnienia. Urban&Partner, Wrocław 2001; 3-42.
97. **Kmieć Z**. Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej. Urban&Partner, Wrocław 2007.
98. **KochańskaB**, Borowska-Afeltowicz E. Stężenie fosforanów nieorganicznych w ślinie spoczynkowej mieszej a podatność na próchnicę zębów. Czas Stomat. 1996; 49: 665-671.
99. **Kochańska B**. Stężenie stateryny w ślinie a występowanie próchnicy zębów i ubytków niepróchnicowego pochodzenia. Rozprawa habilitacyjna. Gdańsk 2000.
100. **Koga T**, Inoue M. Cellular adherence, glukosyltransferase adsorption, and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants. Infect Immun. 1978; 19: 402-410.
101. **Kolenbrander PE**, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2002; 66(3): 486-505.
102. **Koning KG**. Przyczyny próchnicy. W: Ketterl W.(red.), Stomatologia zachowawcza I, Urban&Partner, Wrocław 1994; 1-24.
103. **Lenander-Lumikari M**, Loimaranta V. Saliva and dental caries. Adv Dent Res. 2000; 14: 40-47.
104. **Lendenmann U**, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle-a review. Adv Dent Res. 2000; 14: 22-28.

105. **Lima LM**, Motisuki C, Palomari Spolodorio DM, Santos-Pinto L. *In vitro* evaluation of probiotics microorganisms adhesion to an artificial caries model. Eur J Clin Nutr. 2005; 59:884-886.
106. **Lindquist B**, Emilson CG, Wennerholm K. Relationship between mutans streptococci in saliva and their colonization of the tooth surfaces. Oral Microbiol Immunol 1989; 4: 71-76.
107. **Lingström P**, Birkhed D, Ruben J, Arends J. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH in situ. J Dent Res. 1994; 73: 652-660.
108. **Loesche WJ**, Rowan L, Straffon H, Loos PJ. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect Immun. 1975; 11:1252-1260.
109. **Loesche WJ**, Straffon LH. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. Infect Immun 1979; 26(2):498-507.
110. **Loesche WJ**. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microb Rev. 1986; 50(4); 353-380.
111. **Love RM**, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(2): 171-183.
112. **Mandel ID**. Barr CE, Turgeon L. Longitudinal study of parotid saliva in HIV-1 infection. J Oral Pathol Med. 1992; 21(5): 209-213.
113. **Manning RH**, Edgar UM, Agalamanyi EA. Effects of chewing gums sweetened with sorbitol or a sorbitol/xylitol mixture on the remineralisation of human enamel lesions in situ. Caries Res. 1992; 26(2): 104-109
114. **Marsh PD**, Martin M. Mikrobiologia jamy ustnej, PWN, Warszawa 1994.
115. **Marsh PD**. The role of microbiology in models of dental caries. Adv Dent Res. 1995; 9(3): 244-254.
116. **Marsh PD**, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. J Industrial. Microbiol Biotech. 1995; 15: 169-175.
117. **Marsh PD**, Nyvad B. Mikroflora jamy ustnej i błony biologiczne na zębach. W: Fejerskov O, Kidd E. (red.), Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Urban&Partner 2006; 29-50.
118. **Marthaler TM**. Epidemiological and clinical dental findings in relation to intake of carbohydrates. Caries Res. 1967; 1: 222-238.

119. **Matthews-Brzozowska T**, Surdacka A, Kobylańska M, Józwiak K, Stachecki B. Remineralizacja sztucznie wywołanych uszkodzeń szkliwa w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Czas Stomat. 1991; XLIV(4): 251-258.
120. **Matthews-Brzozowska T**. Czas oddziaływania środka odwapniającego czynnikiem wpływającym na postęp demineralizacji szkliwa. Czas. Stomat. 1992; XLV(4): 196-205.
121. **Matthews-Brzozowska T**, Surdacka A. Remineralizacja sztucznych uszkodzeń szkliwa po aplikacji pasty z zawartością hydroksyapatytu z wykorzystaniem modelu wewnątrzustnego. Czas Stomat. 1992; XLV(5): 254-263.
122. **Matthews-Brzozowska T**. Rola bakterii w zapoczątkowaniu próchnicy zębów. Poznańska Stomatologia 1998; 89-94.
123. **McIntyre JM**, Featherstone JDB, Fu J. Studies of dental root surface caries. 1: Comparison of natural and artificial root caries lesions. Australian Dent J. 2000; 45(1):24-30.
124. **McKay GS**. The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth. Arch Oral Biol. 1976; 21:51-58.
125. **Mellberg JR**, Petrou ID, Grote NE. A study of the ability of an situ remineralization model to differentiate between the effects of two fluoride dentifrices that produced significantly different clinical caries results. J Dent Res. 1992; 71(5): 1169-1172.
126. **Michalek SM**, McGhee JR, Shiota T, Devenyns D. Low sucrose levels promote extensive *Streptococcus mutans* - induced dental caries. Infect Immun. 1977; 16(2): 712-714.
127. **Moreno EC**, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. J Dent Res. Suppl. 2, 1974; 53: 226-234.
128. **Nakano K**, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. J Clin Microbiol. 2004; 42: 198-202.
129. **Nakano K**, Nomura R, Shimizu N, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Development of PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. J Clin Microbiol. 2004; 42(11): 4925-4930.
130. **Nakano K**, Fujita K, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of biofilm regulatory protein A of *Streptococcus mutans*, to systemic virulence. Microb Infect. 2005; 7: 1246-1255.

131. **Nakano K**, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Caries Res. 2005; 39:262-268.
132. **Nakano K**, Lapirottanakul J, Nomura R, Nemoto H, Alaluusua S, Gronroos L, Vaara M, Hamada S, Ooshima T, Nakagawa I. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2007; 45 (8): 2616-2625.
133. **Nascimento MM**, Hofling JF, Goncalves RB. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res. 2004; 38(5): 454-463.
134. **Nauntofte B**, Tenovou JO, Lagerlöf F. Wydzielanie i skład śliny. W: Fejerskov O, Kidd E. (red.), Próchnica zębów. Choroba próchnicowa i postępowanie kliniczne, Urban&Partner, Wrocław 2006; 7-28.
135. **Newbrun E**, Hoover C, Mettraux G, Graf H. Comparison of dietary habits and dental health of subjects with hereditary fructose intolerance and control subjects. JADA 1980; 101: 619-626.
136. **Noorda WD**, van Montfort AMAP, Purdell-Lewis DJ, Weerkamp AH. Developmental and metabolic aspects of a monobacterial plaque of *Streptococcus mutans* C67-1 grown on human enamel slabs in an artificial mouth model. I. Plaque data. Caries Res. 1986; 20: 300-307.
137. **Noorda WD**, Purdell-Lewis DJ, van Montfort AMAP, Weerkamp AH. Monobacterial and mixed bacterial plaques of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in an artificial mouth: development, metabolism and effect on human dental enamel. Caries Res. 1988; 22:342-347.
138. **Nyvad B**, Kilian M. Microbiology of the early microbial colonization of human enamel and root surface *in vivo*. Scand J Dent Res. 1987; 95: 369-380.
139. **Nyvad B**, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. Caries Res. 1990; 24: 267-272.
140. **Nyvad B**, Fejerskov O. Development, structure and pH of dental plaque. W: Thylstrup&Fejerskov (red.), Textbook of clinical cariology, Munksgaard, Copenhagen 1994.
141. **Odell EW**, Sarra R, Foxworthy M, Chapple DS, Evans RW. Bactericidal activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. FEBS Lett. 1996; 382: 175-178.

142. **Oho T**, Mitoma M, Koga T. Functional domain of bovine milk lactoferrin which inhibits the adherence of *Streptococcus mutans* cells to a salivary film. Infect Immun. 2002; 70 (9): 5279-5282.
143. **Okada M**, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S.sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbiol. 2002; 51: 443-447.
144. **Ota F**, Yamato M, Hayashi M, Ota M, Koga T, Sherin A, Mukai Ch, Sakai K, Yamamoto S. Genetic studies on reference strains of *mutans* streptococci. Microbiol. Res. 2002; 157: 305-310.
145. **Ørstavik D**, Kraus FW, Henshaw LC. *In vitro* attachment of Streptococci to the tooth surface. Infect Immun. 1974; 9(5): 794-800.
146. **Paris S**, Meyer-Lueckel H, Mueller J, Hummel M, Kielbassa AM. Progression of sealed initial bovine enamel lesions under demineralizing conditions in vitro. Caries Res. 2006; 40:124-129.
147. **Paul-Stalmaszczyk M**. Rola śliny w procesie próchnicowym. W: Piątkowska D. (red.), Zarys kariologii, Wyd. Medyczne, Warszawa 2002; 83-92.
148. **Pearse EI**. A microradiographic and chemical comparison of in vitro systems for the simulation of incipient caries in abraded bovine enamel. J Dent Res. 1983; 62: 969-974.
149. **Phankosol P**, Ettinger RL, Hicks MJ, Wefel JS. Histopathology of the initial lesion of the root surface: an in vitro study. J Dent Res. 1985; 54(5): 804-809.
150. **Piåtkowska D**. (red) Etiologia próchnicy zębów. W: Zarys kariologii, Wyd. Medyczne, Warszawa 2002; 11-17.
151. **Pol J**, Buczkowska-Radlińska J, Bińczyk-Kuleta A, Trusewicz M. Mucyny śliny ludzkiej – ich rola i znaczenie. Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie 2007; 53(2): 87-91.
152. **Ripa LW**. Nursing caries: a comprehensive review. Pediatr Dent. 1988; 10: 427-435.
153. **Robinson C**, Brookes SJ, Kirkham J, Wood SR, Shore RC. In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. Caries Res. 2001; 35:136-141.
154. **Russell MW**, Mansson-Rahemtulla B. Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components. Oral Microb Immun. 1989; 4: 106-111.

155. **Saarela M**, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S. Genetic diversity within isolates of mutant streptococci recognized by an rRNA gene probe. *J Clin Microbiol.* 1993; 31 (3): 584-587.
156. **Sadlak-Nowicka J**, Kędzia A. Drobnoustroje *plaque* i kieszonek dziąsłowych, a zapalenie przyzębia: dane z piśmiennictwa i badania własne. *Gd. Stomatol.* 1992: 29-36.
157. **Samaranayake L.P.** Fizjologiczna flora jamy ustnej, ekosystem jamy ustnej oraz płytka nazębna. *Mikrobiologia próchnicy*, (w:) Samaranayake LP (red.), *Podstawy mikrobiologii dla stomatologów*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2004; 237-266.
158. **Schenkels LC**, Veerman E, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6: 161-175.
159. **Schmidlin PR**, Tepper S.A., Scriba H, Lutz F. *In vitro* assessment of incipient approximal carious lesions using computer-assisted densitometric image analysis. *J Dentistry* 2002; 30:305-311.
160. **Schüpbach P**, Osterwalder V, Guggenheim B. Human root caries: microbiota in plaque covering sound, carious and arrested carious root surfaces. *Caries Research.* 1995; 29, 382-395.
161. **Seemann R**, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet J.-F. A novel *in vitro* microbial-based model for studying caries formation development and initial testing. *Caries Res.* 2005; 39: 185-190.
162. **Shellis RP**. Relationship between human enamel structure and the formation of caries-like lesions *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 1984; 29(12):9975-981.
163. **Shen S**, Samaranayake LP, Yip H-K. *In vitro* growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dentistry* 2004; 32: 667-678.
164. **Shu M**. Study of root caries in an artificial mouth. *New Zealand Dent J.* 1998; 94:62-64.
165. **Shu M**, Wong L, Miller JH, Sissons CH. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol.* 2000; 45:27-40.
166. **Silverstone LM**. The surface zone in caries and in caries-like lesions produced *in vitro*. *British Dent J.* 1968; Aug:145-157.
167. **Silverstone LM**. Caries and remineralization. *Dental Hygiene* 1983; May, 30-37.

168. **Simark-Mattsson C**, Jonsson R, Emilson CG, Roos K. Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral *Lactobacillus* strains mutants streptococci. Arch Oral Biol. 2009; 54:602-607.
169. **Sissons CH**. Artificial dental plaque biofilm model systems. Adv Dent Res. 1997; 11(1): 110-126.
170. **Smith PW**, Preston KP, Higham SM. Development of an in situ root caries model. A. In vitro investigations. J Dentistry 2005; 33:253-267.
171. **Staat RH**, Peyton JC. Adherence of oral streptococci: evidence for nonspecific adsorption to saliva-coated hydroxylapatite surfaces. Infect Immun. 1984; 44: 653-659.
172. **De Stoppelaar JD**, König KG, Plasschaert AJM, van der Hoeven JS. Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1971; 16: 971-975.
173. **Strużak-Wysokińska M**, Kot I. Analiza zawartości wapnia w zdrowych zębach u ludzi w różnym wieku. Czas Stomat. 1987; XL: 399.
174. **Strużak-Wysokińska M**, Kot I. Wiek a zawartość niektórych składników mineralnych w zębach stałych. Czas Stomat. 1989; XLII: 95.
175. **Surdacka A**, Matthews-Brzozowska T. Problem demineralizacji i remineralizacji szkliwa w świetle najnowszego piśmiennictwa i badań własnych. Poznańska Stomatologia 1991; 37-43.
176. **Surdacka A**, Matthews-Brzozowska T, Stopa J. Obraz powierzchni szkliwa z naturalnym i sztucznym uszkodzeniem w zależności od wieku – badania laboratoryjne. Stomat. Współczesna 2001; 8(3): 8-13.
177. **Surdacka A**. Wykorzystanie doświadczalnego modelu zewnątrzustnego w badaniach procesów demineralizacyjnych i demineralizacyjnych – przegląd piśmiennictwa. Czas Stomat. 2003; LVI, 4:235-240.
178. **Surdacka A**, Matthews-Brzozowska T, Stopa J. Wpływ żelu z dodatkiem syntetycznego hydroksyapatytu na mineralizację sztucznych uszkodzeń szkliwa w warunkach *in situ*. Czas Stomat. 2003; LVI, 6: 373-378.
179. **Surdacka A**, Matthews-Brzozowska T, Stopa J. Wpływ żelu mineralizującego z dodatkiem strontu na sztucznie uszkodzone szkliwo – badania w warunkach *in situ*. Czas Stomat. 2004; LVII, 1: 32-36.
180. **Surdacka A**. Wpływ past do zębów z dodatkiem jonów fluorkowych oraz jonów strontu na powierzchnię szkliwa i wybrane parametry środowiska jamy ustnej. Dental Forum 2005; 1: 49-56.

181. **Szymaniak E.** Etiologia próchnicy. (w:) Jańczak (red.), Stomatologia Zachowawcza. Zarys Kliniczny. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1995, 157-177.
182. **Tamesada M,** Kawabata S, Fujiwara T, Hamada S. Synergistic effects of Streptococcal glucosyltransferases on adhesive biofilm formation. J Dent Res. 2004; 83(11):874-879.
183. **Tang G,** Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model system and their contribution to caries research: a review. J Dentistry 2003; 31:161-171.
184. **Tanner AC,** Milgron PM, Kent R. Jr, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA.: The microbiota of young children from tooth and tongue samples. J Dent Res. 2002; 81: 53-57.
185. **Thomson LA,** Little WA, Bowen WH, Sierra LI, Aguirrer M, Gillespie G.: Prevalence of *Streptococcus mutans* serotypes, *Actinomyces*, and other bacteria in plaque of children. J Dent Res. 1980; 59: 1581-1589.
186. **Wan AKL,** Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. Australian Dent J. 2002; 47(1): 21-26.
187. **Weiger R,** Netuschil L, van Ohle G, Brex M. Vital microorganisms in early supra-gingival dental plaque and in stimulated human saliva. J Periodontal. Res. 1997; 32; 233-240.
188. **Wefel JS,** Maharry GJ, Jensen ME, Harles JD. Development of an intra-oral single-section remineralization model. J Dent Res. 1987; 66,9: 1485-1489.
189. **Wefel JS,** Harless JD. Comparison of artificial white spots by microradiography and polarized light microscopy. J Dent Res. 1984; 63(11):1271-1275.
190. **White DJ.** The application of *in vitro* models to research on deminaralization and remineralization on the teeth. Adv Dent Res. 1995; 9(3): 175-193.
191. **Yassin OM.** *In vitro* studies of the effect of a dental explorer on the formation of an artificial carious lesion. J Dent for Children 1995; 111:11-117.
192. **Yip HK,** Guo JH, Wong WHS. Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. J Dentist. 2007; 35: 377-382.
193. **Zahradnik RT,** Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization *in vitro*. J Dent Res. 1976; 55(4):664-670.

- 194. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC.** *In vitro* enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the presence of salivary pellicles. J Dent Res. 1977; 56(9):1107-1110.
- 195. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ.** Effect of salivary pellicle formation time on *in vitro* attachment and demineralization by *Streptococcus mutans*. J Dent Res. 1978; 57(11-12): 1036-1042.
- 196. Zero DT.** In situ caries models. Adv Dent Res. 1995; 9 (3): 214-230.
- 197. Zero DT.** Sugars-the arch criminal? Caries Res. 2004; 38 (3): 277-285.

9. DOKUMENTACJA BADAŃ

1. Wygląd hodowli *S.mutans* i *L.acidophilus* zawierających zęby oraz podłoży kontrolnych (Metoda I i Metoda II)

Metoda I



Ryc. 9 Wygląd hodowli *S.mutans* na powierzchni stalowego drutu w podłożu BHI-S, po 48h inkubacji (podłoże użyte w Metodzie I, warunki tlenowe)



Ryc. 10 Wygląd hodowli *S.mutans* zawierającej ząb nr 16 w podłożu BHI-S, po 3 tygodniach inkubacji (Metoda I, warunki tlenowe)



Ryc.11 od lewej- Kontrola (K) zawierająca ząb umieszczony w podłożu BHI-S (Metoda I) od prawej- Ząb(I/42) umieszczony w hodowli BHI-S z *L.acidophilus*, po 16 tygodniach inkubacji (Metoda I, warunki tlenowe)

Metoda II



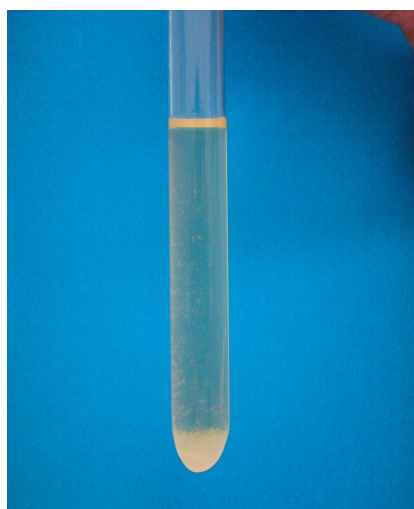
Ryc. 12 Wygląd hodowli *S.mutans* zawierającej ząb nr 14 w podłożu PP-S, po 3 tygodniach inkubacji (Metoda II, warunki mikroaerofilne)



Ryc. 13 od lewej - Kontrola (K) zawierająca zęb umieszczony w podłożu PP-S.
od prawej - Zęb(II/43) umieszczony w hodowli PP-S z *L.acidophilus*,
po 16 tygodniach inkubacji (Metoda II, warunki tlenowe)

2. Wzrost szczepu *S.mutans* i *L.acidophilus* w bulionach BHI-S i PP-S

Metoda I



Ryc.14 Wzrost *S.mutans*
w bulionie BHI-S po 48h
(warunki tlenowe)

Metoda II



Ryc.15 Wzrost *S.mutans*
w bulionie PP-S po 48h
(warunki mikroaerofilne)

Metoda I



Ryc. 16 Wzrost *L.acidophilus*
w bulionie BHI-S po 48h
(warunki tlenowe)

Metoda II



Ryc. 17 Wzrost *L.acidophilus*
w bulionie PP-S po 48h
(warunki tlenowe)

3. Zdjęcia zębów z nagromadzoną bakteryjną płytką nazębną

Metoda I



Ryc. 18 Zęby po różnym okresie
inkubacji w hodowli zawierającej
drobnoustroje – *dental plaque*
(warunki tlenowe)

Metoda II



Ryc.19 Zęby po różnym okresie
inkubacji w hodowli zawierającej
drobnoustroje - *dental plaque*
(warunki mikroaerofilne/ tlenowe)



Ryc.20 Ząb po 16-tygodniowej inkubacji w hodowli *L.acidophilus* w BHI- S, na powierzchni szkliwa widać nagromadzoną bakteryjną płytkę nazębną (Metoda I, warunki tlenowe)



Ryc. 21 Ząb po 12-tygodniowej inkubacji w hodowli ze szczepem *L.acidophilus* w PP-S, na powierzchni szkliwa widać nagromadzoną bakteryjną płytkę nazębną (Metoda II, warunki tlenowe)

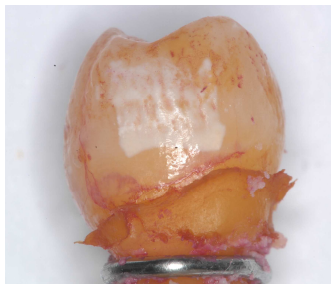
4. Ocena wizualna zębów poddanych doświadczeniu

Metoda I

Podłoże BHI-S (warunki tlenowe)



Ryc.22 Ząb po hodowli w BHI-S z *S.mutans* 4 tydzień



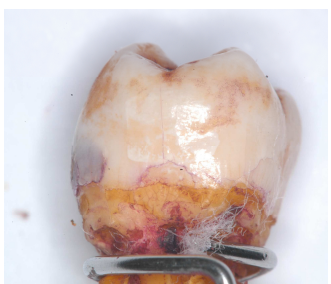
Ryc.23 Ząb po hodowli w BHI-S z *L.acidophilus* 6 tydzień



Ryc. 24 Ząb po hodowli w BHI-S z *L.acidophilus* 8 tydzień

Metoda II

Podłoże PP-S (warunki mikroaerofilne/ tlenowe)



Ryc.25 Ząb po hodowli w PP-S z *S.mutans* 4 tydzień warunki mikroaerofilne

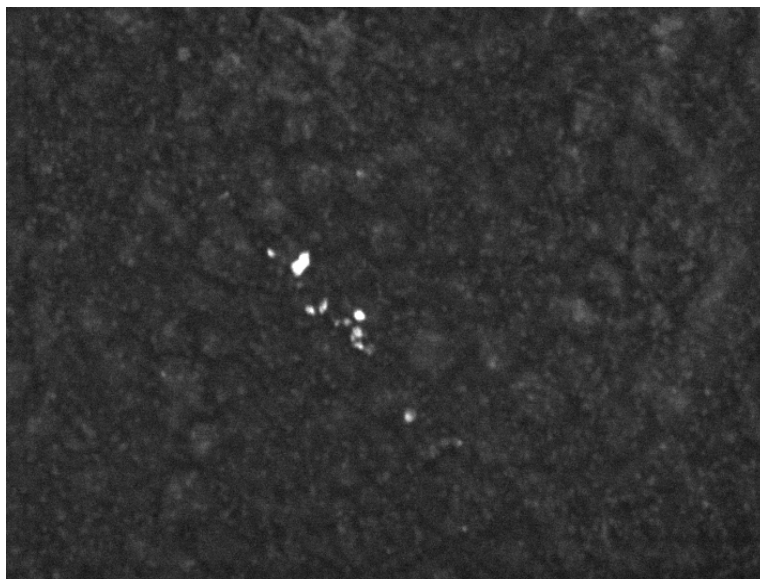


Ryc.26 Ząb po hodowli w PP-S z *L.acidophilus* 6 tydzień warunki tlenowe

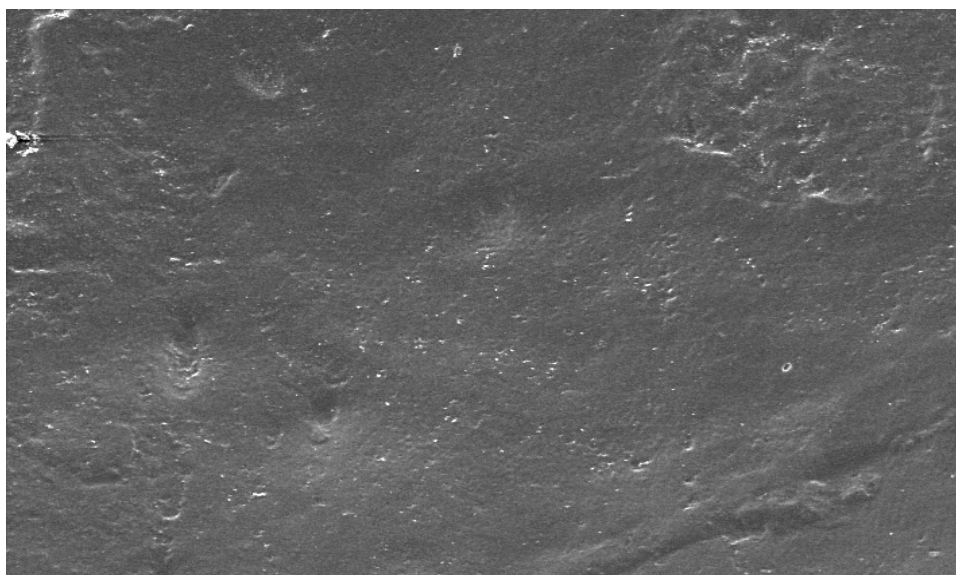


Ryc. 27 Ząb po hodowli w PP-S z *L.acidophilus* 8 tydzień warunki tlenowe

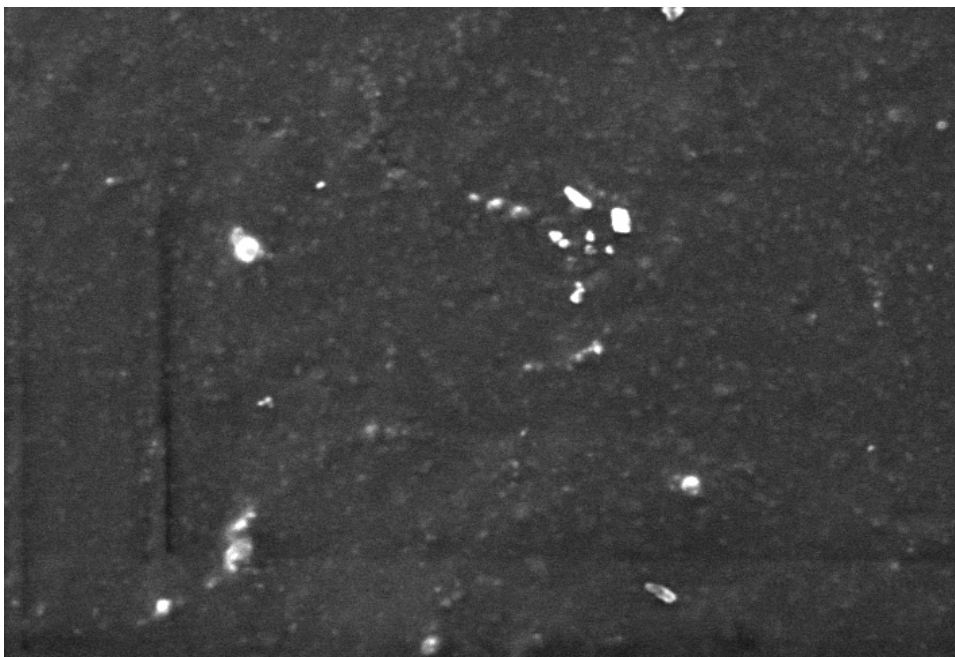
5. Zdjęcia powierzchni zębów poddanych doświadczeniu - badanie profilometryczne z użyciem elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM)



Ryc. 28 Metoda I -16 tydzień – dostrzegalne mikroziarnistości na powierzchni szkliwa zęba (pow.1200x)

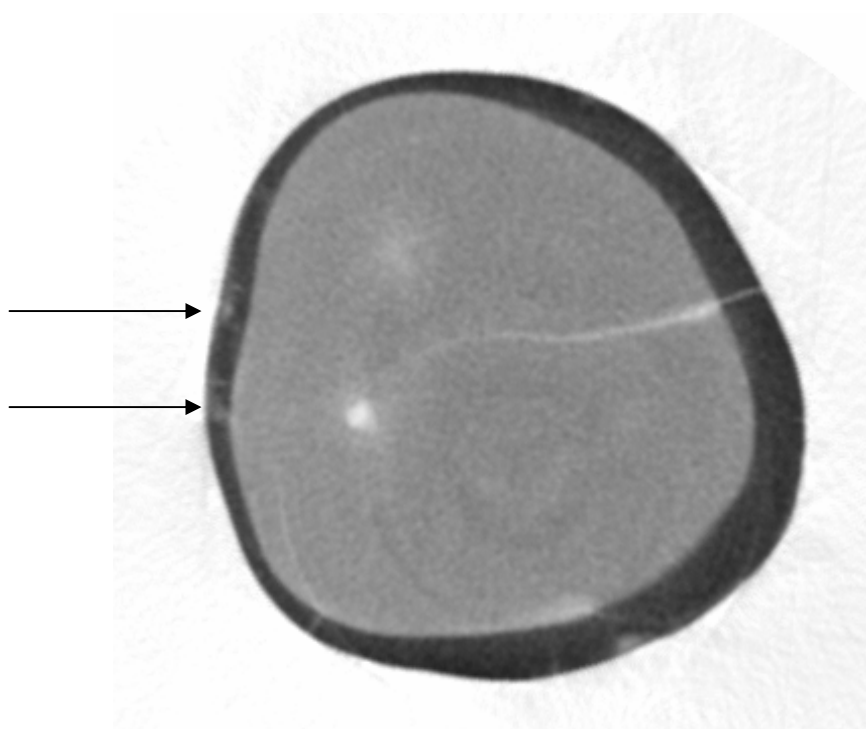


Ryc. 29 Metoda II – 10 tydzień – mikroziarnistości dostrzegalne na całej powierzchni szkliwa zęba (pow.150x)

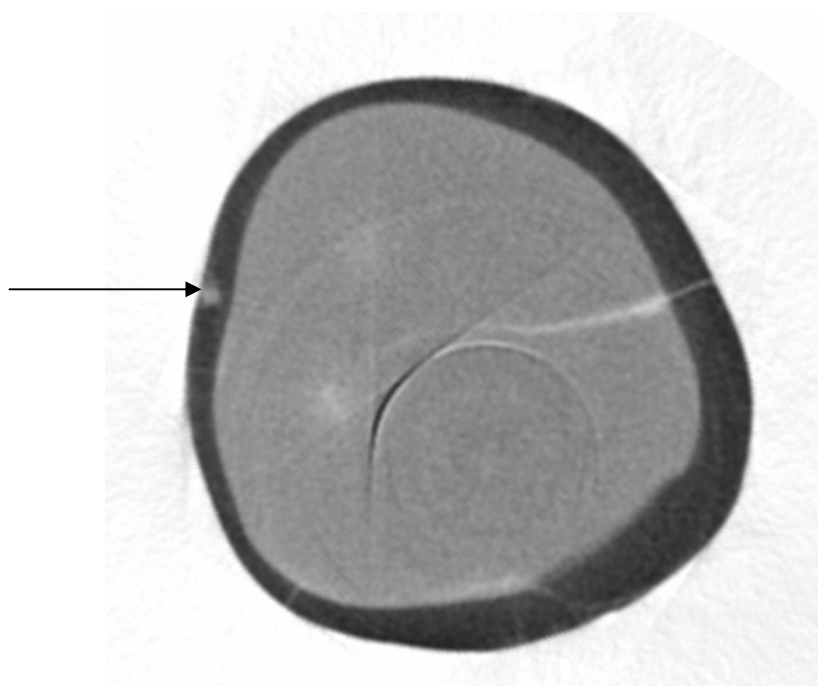


Ryc. 30 Metoda II – 16 tydzień – ziarnistości o średnicy 1-4 μm widoczne na powierzchni szkliwa zęba (pow. 1200x)

6. Zdjęcie zęba poddanego doświadczeniu – metoda mikrotomografii komputerowej



Ryc.31 Metoda II – z lewej strony strzałką zaznaczono miejsca obecnej podpowierzchniowej demineralizacji szkliwa zęba po 16 tygodniach badań



Ryc.32 Metoda II – z lewej strony widoczne podpowierzchniowe zmiany próchnicopodobne w szkliwie zęba po 16 tygodniach badań

7. Chromatogramy - wykresy pików kwasu mlekowego wytworzonego po 48 godzinnej inkubacji w odpowiednich warunkach

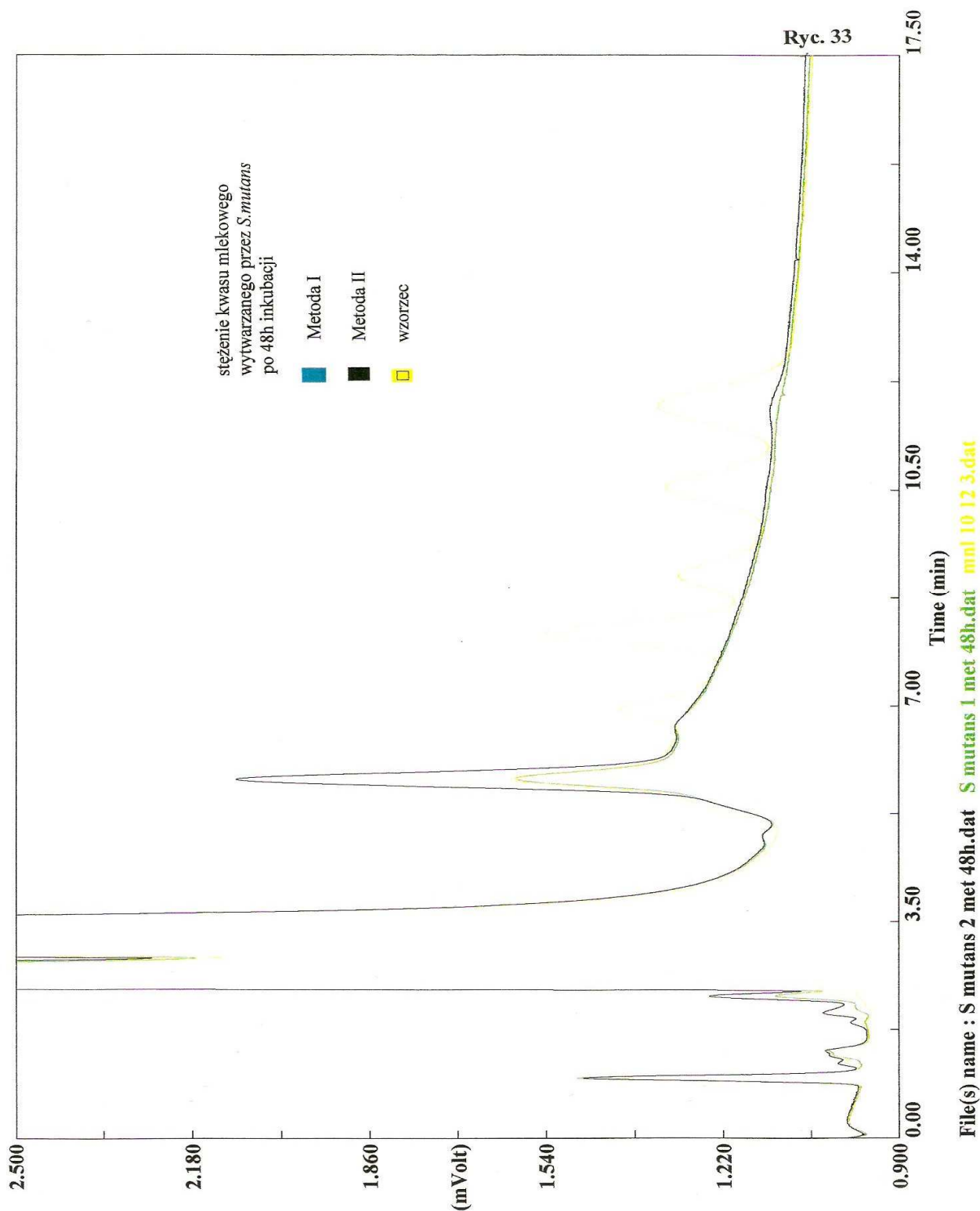
Ryc. 33 Porównanie ze wzorcem wykresów pików kwasu mlekowego wytwarzanego przez szczep *S.mutans* w podłożu BHI-S (Metoda I, warunki tlenowe) i PP-S (Metoda II, warunki mikroaerofilne)

Ryc. 34 Porównanie ze wzorcem wykresów pików kwasu mlekowego wytwarzanego w warunkach tlenowych przez szczep *L.acidophilus* w podłożu BHI-S (Metoda I) i PP-S (Metoda II)

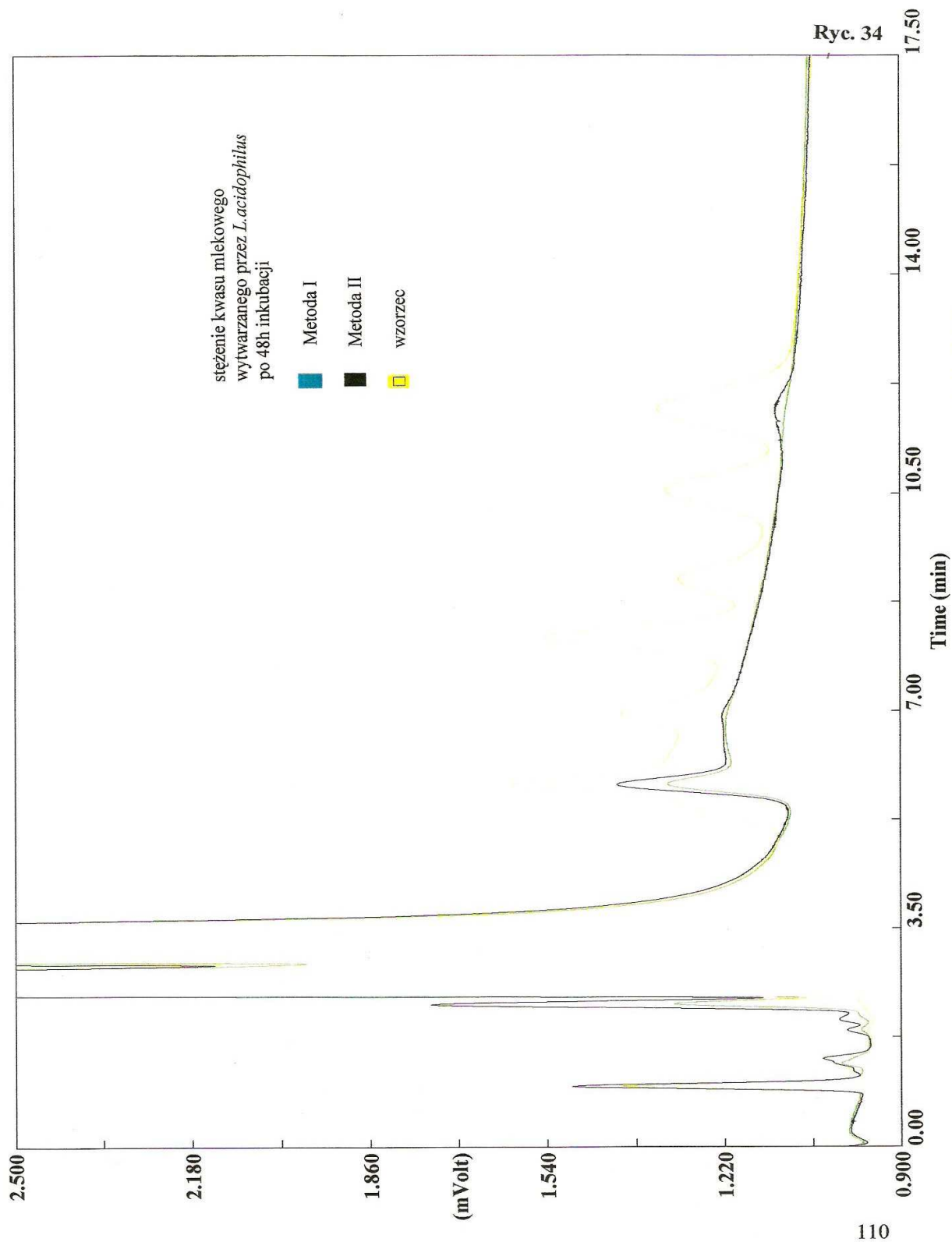
Ryc. 35 Porównanie ze wzorcem wykresów pików kwasu mlekowego wytwarzanego przez szczep *S.mutans* w podłożach w których były umieszczone zęby (BHI-S, Metoda I, warunki tlenowe) i (PP-S, Metoda II, warunki mikroaerofilne)

Ryc. 36 Porównanie ze wzorcem wykresów pików kwasu mlekowego wytwarzanego w warunkach tlenowych przez szczep *L.acidophilus* w podłożach BHI-S (Metoda I) i PP-S (Metoda II) w których były umieszczone zęby

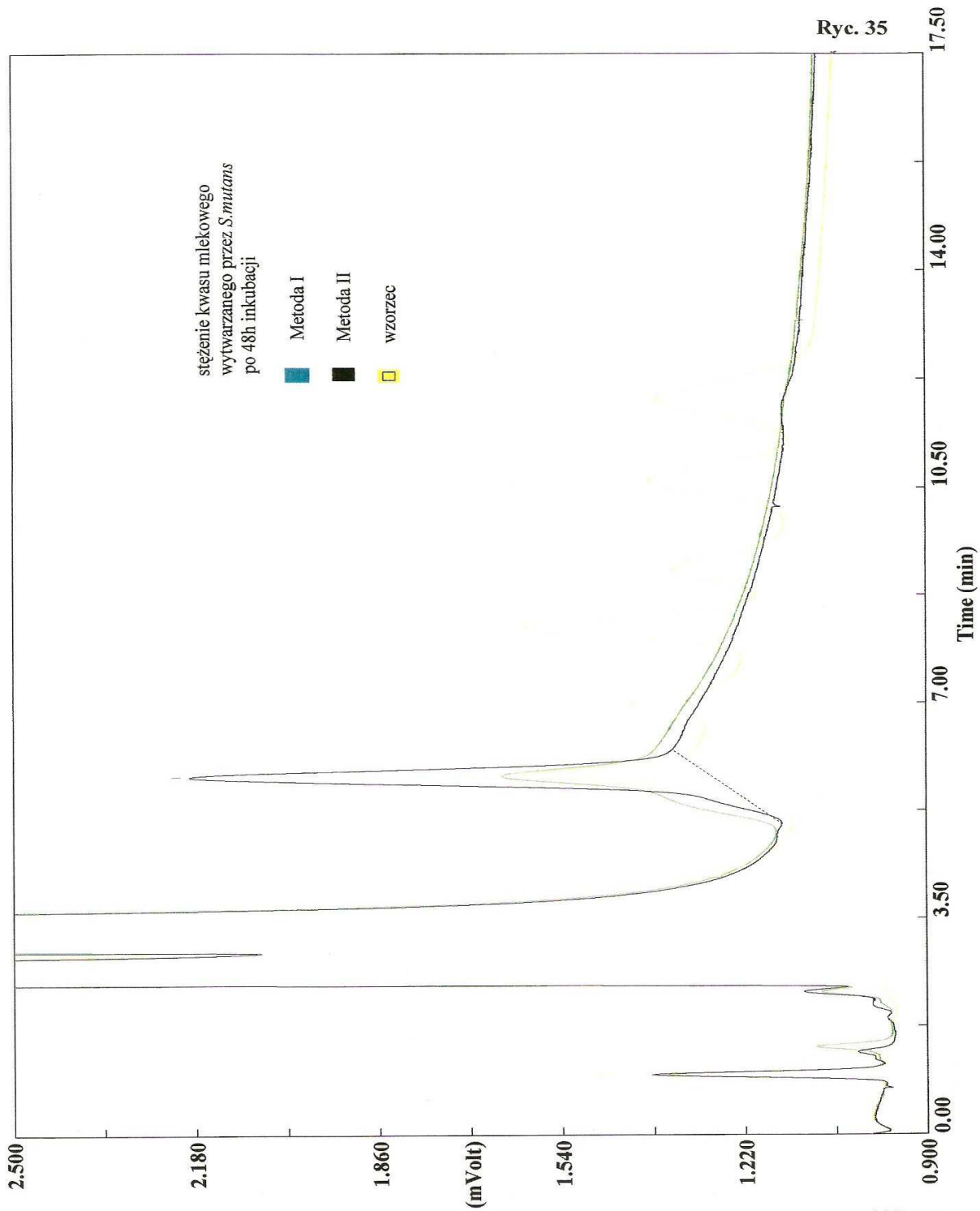
Chrom-Card Strip-Chart



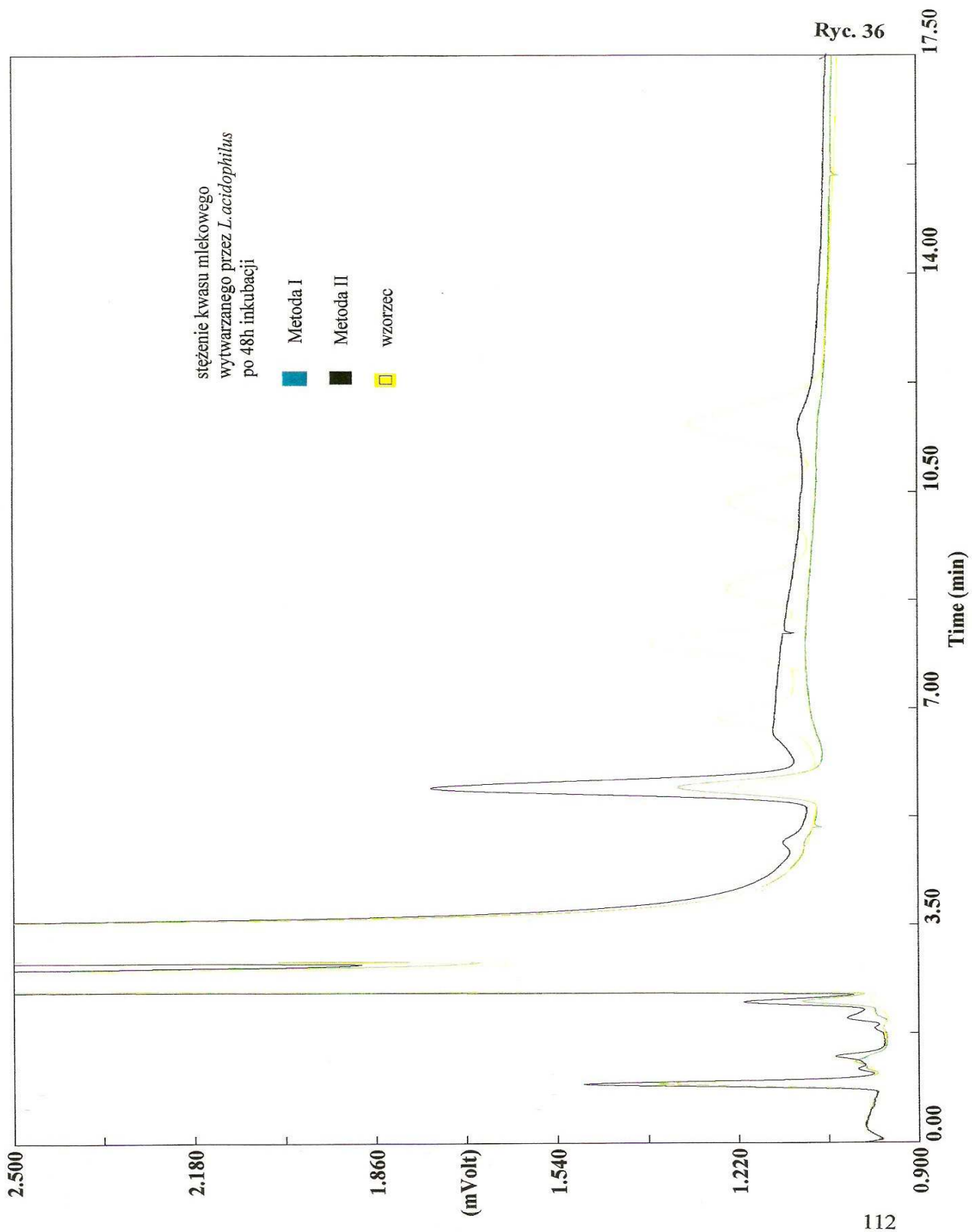
Chrom-Card Strip-Chart



Chrom-Card Strip-Chart



Chrom-Card Strip-Chart



Ryc. 36

File(s) name : al23L2m1.dat al24L1m1.dat mnl 09.dat

10. STRESZCZENIE

Próchnica zębów jest chorobą rozpoczynającą się od zmian w szkliwie. Czynniki warunkujące zapoczątkowanie procesu próchnicowego są: bakterie próchnicotwórcze, węglowodany stanowiące substrat dla enzymatycznych przemian bakteryjnych, podatne szkliwo zębów oraz odpowiednio długi czas ich oddziaływania.

W piśmiennictwie opisano różne metody indukowania zmian szkliwa o charakterze próchnicowym w warunkach *in vitro*. Badania nad ich uzyskaniem prowadzono na zębach ludzkich lub zwierzęcych. Najczęściej wczesne postaci próchnicy szkliwa zębów próbowano uzyskać stosując różne substancje demineralizujące, w tym kwasy organiczne i nieorganiczne. Jednak w ten sposób otrzymywano najczęściej jedynie powierzchniową demineralizację. Demineralizacja szkliwa, która występuje w początkowej fazie próchnicy w warunkach *in vivo* ma charakter podpowierzchniowy. Dlatego też, aby uzyskać demineralizację podpowierzchniową szkliwa zębów, charakterystyczną dla procesu próchnicowego, próbowano wykorzystać różne metody mikrobiologiczne w których najczęściej używano bakterie z gatunku *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* oraz *Lactobacillus acidophilus*.

Dotychczasowe wyniki badań prowadzone na modelach mikrobiologicznych są niezadawalające. Dlatego też nadal istnieje potrzeba prowadzenia badań nad modelem mikrobiologicznym w celu uzyskania próchnicy *in vitro*, który będzie jak najbardziej efektywny i zbliżony do warunków naturalnych.

Celem niniejszej pracy było opracowanie prostego, powtarzalnego i niekosztownego modelu mikrobiologicznego do indukowania wczesnych zmian próchnicowych zębów ludzkich w warunkach *in vitro*, jak najbardziej zbliżonego do warunków naturalnych zachodzących *in vivo* oraz ocena efektywności uzyskania wczesnych postaci próchnicy szkliwa ludzkiego w warunkach *in vitro* za pomocą dwóch różnych metod mikrobiologicznych.

Badaniem objęto 50 zębów ludzkich przedtrzonowych i trzonowych usuniętych z powodów ortodontycznych lub periodontologicznych. Wybrane zęby miały nieuszkodzone szkliwo. Zęby przechowywano w 0,9% roztworze NaCl z dodatkiem 0,1% tymolu. Każdy ząb pozbawiono zanieczyszczeń, myto, suszono,

instalowano na stalowych drutach, lakierowano z wyjątkiem okienka 3x3mm na koronie zęba, pakowano w rękaw typu folia-papier i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 minut.

Na potrzeby eksperymentu opracowano 2 różne metody mikrobiologiczne. W każdej metodzie zbadano po 25 zębów. Wykorzystane metody różniły się podłożami, długością trwania doświadczenia i warunkami hodowli. W Metodzie I użytym podłożem był bulion mózgowo-sercowy (BHI), w Metodzie II podłoże podstawowe (PP). Do obu podłoży dodano 5% sacharozy. Doświadczenie rozpoczęto od aseptycznego umieszczenia zębów w probówkach zawierających po 3ml śliny ludzkiej (świeżo pobrana, stymulowana i odwirowana) a następnie inkubowano w 37°C przez 1h w warunkach tlenowych. Po inkubacji zęby opłukiwano 3x jałowym roztworem KCl i przenoszono do probówek z odpowiednimi podłożami (zależnie od metody), do których dodawano po 0,1ml zawiesiny bakterii (10^6 CFU/ml) *Streptococcus mutans* LMG 14558 i inkubowano w 37°C w warunkach tlenowych (Metoda I) i w anaerostacie z GasPak w celu uzyskania warunków mikroaerofilnych (Metoda II). Po 4h zęby opłukano 1x jałowym roztworem KCl i przeniesiono do świeżego podłoża, które zaszczerpiono bakteriami *S.mutans* i inkubowano w 37°C. Zęby przenoszono do świeżych podłoży co 24 lub 48h (zależnie od metody) i zaszczerpiano zawiesiną bakterii *S.mutans*.

Inkubację zębów w Metodzie II prowadzono 24h w anaerostatach w warunkach mikroaerofilnych. Po 10 dniach czas inkubacji wydłużono do 48h zachowując warunki mikroaerofilne. Po miesiącu badań zawiesinę bakterii *S.mutans* zmieniono na gatunek *Lactobacillus acidophilus* LMG 6400. Badania trwały łącznie 16 tygodni. Po każdych 2 tygodniach z badań wyłączano po 3 zęby z każdej metody. Po 16 tygodniach wyłączono po ostatnie 4 zęby. Kontrolę stanowiły zęby, które hodowano w samym podłożu bez drobnoustrojów.

W celu stwierdzenia obecności zmian próchnicowych powstałych na powierzchni szkliwa, zęby użyte w obu Metodach zostały poddane ocenie wizualnej i elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) oraz mikrotomografii komputerowej. Oceny wizualnej dokonał lek.stom. Adam Wąsek. W obu Metodach ocena wizualna ujawniła obecność kredowo-białych zmian szkliwa wskazując na wczesne uszkodzenia szkliwa zębów (*caries incipiens*).

Przebarwienia zaobserwowano po 4 tygodniach trwania badania i były one wyraźniejsze na zębach użytych w Metodzie II. Na zębach kontrolnych nie było żadnych zmian.

Badania profilometryczne (SEM) wykazały zmiany próchnicowe typu *caries incipiens* już w 4 tygodniu trwania doświadczenia w obu metodach. Jednakże były one łatwiej dostrzegalne na zębach po 10 tygodniach inkubacji (Metoda II). Na zębach kontrolnych nie zaobserwowano żadnych uszkodzeń szkliwa.

Analiza mikrotomograficzna wykazała, że we wszystkich zębach poddanych doświadczeniu była obecna podpowierzchniowa demineralizacja, co świadczy o próchnicy początkowej szkliwa (Metoda I i II). Po 10 tygodniach hodowli zębów demineralizacja penetrowała poprzez całą warstwę szkliwa i sięgała połączeń szkliwno-zębinowych. Po 16 tygodniach na powierzchni szkliwa były obecne zmiany w postaci białych i brązowych plam – co potwierdziło badanie z użyciem mikrotomografii komputerowej. Zęby użyte do kontroli nie miały takich zmian.

Analizie poddano pH podłoży użytych do hodowli drobnoustrojów. W Metodzie I był to bulion mózgowo-sercowy z dodatkiem 5% sacharozy (BHI-S), a w drugiej podłoże podstawowe z dodatkiem 5% sacharozy (PP-S). Kontrolę stanowiły same podłoża niezawierające bakterii. W podłożu BHI-S w którym prowadzono 48-godziną inkubację zębów w 37⁰C z bakteriami *S.mutans* wartości pH wynosiły 4,2-4,5. Podobne wartości uzyskano, gdy 48h inkubację zębów prowadzono z pałeczką kwasu mlekowego *L.acidophilus*. Kontrola miała wartość pH =7,4. W Metodzie II, gdy zęby inkubowano w 37⁰C w bulionie PP-S ze szczepem *S.mutans* przez 24h (warunki mikroaerofilne) lub 48h (warunki tlenowe) zakres pH wynosił 4,3-4,6. W przypadku 48h inkubacji zębów w PP-S z zawiesiną bakterii *L.acidophilus* w 37⁰C w warunkach tlenowych wartości pH wynosiły 4,3-4,6. Podłoże kontrolne miało wartość pH =7,1.

Przeprowadzono także badania w celu stwierdzenia czy użyte szczepy wytwarzały lotne kwasy tłuszczowe i kwas mlekowy. Stwierdzono, że oba drobnoustroje nie wytwarzały w warunkach doświadczenia lotnych kwasów tłuszczowych. Natomiast w obu podłożach BHI-S i PP-S obie bakterie *S.mutans* i *L.acidophilus* produkowały tylko kwas mlekowy. Jednakże w bulionie PP-S użyte bakterie wytwarzały go w wyższych stężeniach niż w bulionie BHI-S.

Z przeprowadzonych badań wynikają następujące wnioski:

1. W obu Metodach po 2 tygodniach inkubacji zębów z drobnoustrojami nie uzyskano zmian w szkliwie zębów poddanych doświadczeniom, co potwierdzono w badaniu wizualnym i z wykorzystaniem zgłębnika.
2. Zmiany próchnicopodobne szkliwa zębów typu *caries incipiens* pojawiły się po 4 tygodniach badań w obu Metodach, lecz w Metodzie II były bardziej wyraźne, co wskazuje na nasilenie się ich w czasie kontynuacji badań.
3. Zmiany o charakterze podpowierzchniowym szkliwa zębów (*caries incipiens*) uzyskano w obu Metodach pod wpływem działania tylko szczepu *S.mutans*.
4. Po 10 tygodniach trwania doświadczeń wczesne zmiany próchnicowe zębów były łatwiej dostrzegalne w Metodzie II, co wynika z oceny obrazów profilometrycznych.
5. Wyniki wskazują, że kolejność użytych szczepów była prawidłowa. Szczep *S.mutans* rozpoczynał proces próchnicowy, a szczep *L.acidophilus* pogłębiał te zmiany. Potwierdzają to wyniki badań mikrotomograficznych.
6. Zmiany wykryte w szkliwie zębów (metoda mikrotomograficzna) mają charakter podpowierzchniowy. Są one podobne do białych plam szkliwa powstających w naturalnych warunkach w początkowej próchnicy zębów.
7. Analiza profilometryczna wykazała, że charakter zmian próchnicopodobnych uzyskanych w Metodzie II jest bardziej zbliżony do charakteru naturalnych zmian próchnicowych zębów niż w Metodzie I.
8. W obu metodach po zaszczepieniu podłoży drobnoustrojami po 24h i 48h następowało szybkie obniżenie wartości pH.

9. W Metodzie I i II oba drobnoustroje w hodowlach zawierających zęby wytwarzały kwas mlekowy. Jednak szczep *S.mutans* produkował go więcej w warunkach mikroaerofilnych (Metoda II). W hodowlach obu szczepów (w Metodzie I i II) nie wykryto obecności lotnych kwasów tłuszczowych.
10. Opracowana mikrobiologiczna Metoda II okazała się skuteczniejsza niż Metoda I. Może ona być wykorzystana do uzyskiwania zmian próchnicopodobnych szkliwa zębów, a także w innych celach np. do oceny działania na szkliwo zębów środków przeciwpróchnicowych i przeciwdrobnoustrojowych.