

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Anna K. Szkaradkiewicz-Karpińska

**Antagonistyczne oddziaływanie  
*Lactobacillus* mikroflory jamy ustnej  
wobec wybranych periopatogenów  
w badaniach *in vitro* i *in vivo***

ROZPRAWA HABILITACYJNA

Poznań 2013

Recenzent

*Prof. dr hab. n. med. Janina Stopa*

Skład i łamanie

*Mirosława Zajęzkowska*

Redakcja techniczna

*Grażyna Dromirecka*

Tytuł angielski

„Antagonistic effects of *Lactobacillus* in microflora of oral cavity toward selected periopathogens in *in vitro* and *in vivo* studies”

ISBN 978-83-7597-197-2

© Copyright by Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,  
Poznań 2013

© Copyright by Anna K. Szkaradkiewicz-Karpińska, Poznań 2013

Praca naukowa finansowana z projektu badawczego Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr projektu 502-14-02209324-08456).  
Kierownik projektu: dr n. med. Anna K. Szkaradkiewicz-Karpińska

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO  
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

60-812 Poznań, ul. Bukowska 70

[www.wydawnictwo.ump.edu.pl](http://www.wydawnictwo.ump.edu.pl)

Ark. wyd. 5,2 . Ark. druk. 7,5.

Format B5. Zam. nr 53/13.

Druk ukończono w kwietniu 2013 r.

*Nauczycielom moim dziękuję*



## Spis treści

1. WSTĘP . . . . .	7
2. CEL PRACY . . . . .	16
3. MATERIAŁ I METODY . . . . .	17
3.1. Pacjenci i badanie stomatologiczne . . . . .	17
3.2. Pobieranie próbek płynu dziąsłowego . . . . .	22
3.3. Hodowle bakterii . . . . .	22
3.4. Otrzymywanie supernatantów z hodowli bakterii . . . . .	24
3.5. Hodowle fibroblastów dziąsłowych . . . . .	24
3.6. Oznaczanie cytokin w płynie dziąsłowym . . . . .	25
Oznaczanie TNF- $\alpha$ . . . . .	25
Oznaczanie IL-1 $\beta$ . . . . .	25
Oznaczanie IL-17 . . . . .	26
3.7. Badania ekspresji genów w fibroblastach dziąsłowych . . . . .	26
3.8. Ocena obecności ATP . . . . .	30
3.9. Badanie żywotności fibroblastów dziąsłowych . . . . .	31
3.10. Metody statystyczne . . . . .	32
4. WYNIKI . . . . .	34
4.1. Wyniki badania stomatologicznego pacjentów grupy 1A i 1B . . . . .	34
4.2. Wyniki badania stomatologicznego pacjentów grupy 2A i 2B . . . . .	35
4.3. Wyniki badań mikrobiologicznych . . . . .	37
4.4. Wyniki badań poziomu cytokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ i IL-17 u chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia . . . . .	45
4.5. Wyniki badania wpływu supernatantów z hodowli wybranych szczepów perioapatogenów na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych . . . . .	49
4.6. Wyniki badania wpływu supernatantów z hodowli szczepów klinicznych <i>Lactobacillus acidophilus</i> na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych . . . . .	50
4.7. Wyniki analizy ekspresji wybranych genów . . . . .	52
5. DYSKUSJA . . . . .	54
6. WNIOSKI . . . . .	64
7. PIŚMIENNICTWO . . . . .	66
8. STRESZCZENIE . . . . .	83
9. SUMMARY . . . . .	87



# 1. WSTĘP

Przewlekłe zapalenie przyzębia (chronic periodontitis) jest prowadzącą do destrukcji chorobą zapalną, obejmującą dziąsła, cement korzeniowy, ozębną oraz wyrostek zębodołowy kości. Przewlekłe zapalenie przyzębia może występować w różnych grupach wiekowych, jednak najczęściej dotyczy osób dorosłych (powyżej 21. roku życia) i charakteryzuje się umiarkowanym lub ciężkim przebiegiem klinicznym. Częstość występowania i nasilenie choroby przyzębia wzrasta wraz z wiekiem [3]. Badania epidemiologiczne potwierdzają, że przewlekłe zapalenie przyzębia należy do najczęściej występujących chorób przewlekłych u ludzi. W Europie Zachodniej u około 36% osób w wieku 35–44 lat stwierdza się umiarkowaną, zaś u około 10% – ciężką postać tej choroby. Proporcje te są wyższe w krajach Europy Wschodniej i wynoszą odpowiednio 45% i 30–40%. W Polsce postać umiarkowaną przewlekłego zapalenia przyzębia rozpoznawano u około 32% osób, ciężką – u około 16% [166].

Do patologii związanych z przyzębiem, według klasyfikacji Amerykańskiej Akademii Periodontologicznej (AAP) z 2000 roku, zaliczamy choroby dziąseł i choroby przyzębia [9, 58]. Największą grupę stanowią zapalenia dziąseł i przyzębia, które powstają na skutek zaburzenia równowagi pomiędzy oddziałującymi na tkanki przyzębia bakteriami biofilmu, znajdującego się na powierzchni zębów i dziąseł, a mechanizmami obronnymi gospodarza, które z kolei modyfikowane są przez czynniki ryzyka (stres, palenie tytoniu, nieprawidłowa higiena jamy ustnej). Przewlekłe zapalenia przyzębia są najczęstszą postacią zapalenia przyzębia u dorosłych. Głównymi cechami klinicznymi tej choroby są: utrata przyczepu łącznotkankowego, utrata kości wyrostka zębodołowego, obecność kieszonek przyzębnych i stan zapalny dziąseł. Dodatkowe cechy tej jednostki chorobowej to także: występowanie złogów nazębnych nad- i poddziąsłowych, obrzęk lub recesja dziąseł, krwawienie podczas badania, obnażenie furkacji oraz ruchomość zębów. Choroba rozwija się wolno lub w umiarkowanie szybkim tempie, ale może mieć okresy szybkich postępów i gwałtownie się nasilać [8, 38, 45, 125, 139].

Zasadniczym czynnikiem etiologicznym przewlekłego zapalenia przyzębia jest płytka bakteryjna. Może ona uszkadzać tkanki gospodarza bezpośrednio lub za pośrednictwem mediatorów prozapalnych. Bakterie płytki wywierają szkodliwe działanie na fibroblasty, komórki nabłonka i śródbłonka oraz na składniki substancji pozakomórkowej. Mogą również oddziaływać na komórki układu immunologicznego, pobudzając je do wytworzenia mediatorów reakcji zapalnych [32, 102, 117, 135, 218].

Badania mikrobiologiczne i doświadczalne na modelu zwierzęcym wskazują, że w etiopatogenezie przewlekłego zapalenia przyzębia podstawową rolę odgrywają patogenne beztlenowe bakterie nieprzetrwalnikujące, określane jako periodontopatogeny lub periopatogeny [90]. Dominującym periopatogenem jest *Porphyromonas gingivalis* [30, 92, 173]. Ponadto, do istotnych czynników etiopatogenetycznych chorób przyzębia u dorosłych należą gatunki: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, a także względny beztlenowiec *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [26, 157, 172, 218].

*Porphyromonas gingivalis* jest ważnym klinicznie, stwierdzanym u ponad 40% chorych z chorobą przyzębia, gatunkiem bakterii z rodzaju *Porphyromonas*, sklasyfikowanym w obrębie rodziny *Porphyromonadaceae* [30]. Szczepy *P. gingivalis* posiadają fimbrie z licznymi adhezynami, które zapewniają adhezję bakterii do tkanek przyzębia oraz umożliwiają koagregację z innymi gatunkami, a ponadto indukują prozapalną odpowiedź cytokinową. Jednocześnie szczepy te wytwarzają egzoenzymy – proteazy cysteinowe (tzw. gingipainy) o właściwościach podobnych do trypsyny, powodujące destrukcję tkanki. Na podstawie specyficzności substratowej, gingipainy podzielono na arginino-specyficzne nazywane arg-gingipainami i lizyno-specyficzną – lys-gingipainę [29, 62, 101, 142]. Istnieją dwa rodzaje gingipain arginino-specyficznych: gingipaina RgpA posiadająca domeny proteolityczną i przylegania oraz gingipaina RgpB, która zawiera tylko domenę proteolityczną. Dotychczas znana jest jedna gingipaina lizyno-specyficzna – KGP. Gingipainy mają silny wpływ na system obronny organizmu poprzez regulowanie czynności cytokin [73, 159, 177, 189]. *P. gingivalis* silnie indukuje wytwarzanie cytokin prozapalnych interleukiny-1 (IL-1), interleukiny-6 (IL-6), interleukiny-8 (IL-8) oraz czynnika martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) przez neutrofile, monocyty i makrofagi. Wykazano, że arg-gingipaina niszczy składnik C3 dopełniacza związany z opsonizacją, dzięki czemu *P. gingivalis* staje się oporny na fagocytozę przez neutrofile. Z kolei lys-gingipaina degraduje składnik C5 dopełniacza, uwalniając składnik C5a, co stymuluje stan zapalny [67, 73, 165]. Ponadto stwierdzono, że gingipainy *P. gingivalis* są zdolne do niszczenia czynnika martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oraz, w przeciwieństwie do pozostałych periopatogenów, hamowania prozapalnej interleukiny-8 [66, 123]. Proteazy uszkadzają również zewnątrzkomórkowe macierze białek, takich jak laminina, fibronektyna czy kolagen typu 1 i 4 [5, 72]. *P. gingivalis* i metaloproteinazy macierzy gospodarza (MMP) odgrywają istotną rolę w związanym z zapaleniem przyzębia niszczeniu tkanek. Także końcowe produkty fermentacji *P. gingivalis*, jak kwas octowy, propionowy i masłowy oraz wytwarzane w dużych ilościach lotne związki siarki mogą oddziaływać cytotoksycznie na komórki gospodarza.



Produkty te zaburzają integralność tkanki, jak również prowadzą do miejscowych zmian w mikrośrodkowisku kieszonki przyzębnej. Większość szczepów *P. gingivalis* posiada otoczkę polisacharydową, która hamuje fagocytozę. Obecny w ścianie komórkowej lipopolisacharyd (LPS) – endotoksyna, spełnia rolę antygeny i aktywuje cytokiny [4, 73, 81].

Oprócz *P. gingivalis*, najczęściej izolowanymi z tkanek przyzębia gatunkami są: *P. asaccharolytica* i *P. endodontalis*. Częstość występowania *P. gingivalis* jest niższa u osób ze zdrowym przyzęciem w porównaniu do pacjentów z chorobą przyzębia. *P. gingivalis* może być izolowany z kieszonek przyzębnych, płytki naddziąsłowej, kanałów korzeniowych, śliny, języka, błony śluzowej policzka, a także migdałków [216].

Aktualnie, na podstawie badań zespołu Socranskyego [172] wyróżnia się specyficzne grupy gatunków bakterii (nazywane kompleksami) o szczególnym znaczeniu w etiopatogenezie przewlekłego zapalenia przyzębia (Ryc. 1.). *P. gingivalis* tworzy wraz z gatunkami: *T. forsythia* i *T. denticola* tzw. kompleks czerwony, który wydaje się być związany z objawami chorobowymi chronic periodontitis u dorosłych [63-65, 172, 173]. Synergistycznie z *P. gingivalis* oddziałują szczepy z gatunku *T. forsythia* rodzaju *Tannerella*, również sklasyfikowane w obrębie rodziny *Porphyromonadaceae*. Pałeczki *T. forsythia* posiadają nad błoną zewnętrzną dodatkową strukturę ochronną – powierzchniową warstwę S, utworzoną przez regularnie ułożone dwie podjednostki białkowe (o m. cz. 200 i 210 kDa). Badania doświadczalne wskazują, że warstwa S szczepów *T. forsythia* może zapewniać ich adherencję do komórek gospodarza, a także inwazyjność. Jednocześnie, ważnym czynnikiem ich zjadliwości są wytwarzane enzymy: trypsyno-podobna proteaza (PrTH) i glikozydazy. Także końcowe produkty fermentacji *T. forsythia*, jak kwas octowy, propionowy i masłowy mogą oddziaływać cytotoksycznie na komórki gospodarza [188, 199].

Z badań mikrobiologicznych wynika, że istnieje statystyczna zależność (korelacja dodatnia) współwystępowania krętków jamy ustnej – *Treponema denticola* z *P. gingivalis* i *T. forsythia*, stąd ich przynależność do kompleksu czerwonego [129]. Szczepy z gatunku *T. denticola* rodzaju *Treponema* są sklasyfikowane w obrębie rodziny *Spirochaetaceae*, bakterii spiralnych, charakteryzujących się aktywnym ruchem [163]. Krętki te posiadają zdolność migracji i penetracji do nieuszkodzonej tkanki przyzębia. Jednocześnie, ważnym czynnikiem ich zjadliwości są wytwarzane enzymy: trypsyna, chymotrypsyna, alkaliczna fosfataza i esteraza umożliwiające synergistyczne oddziaływanie szczepów *T. denticola* z pozostałymi dwoma gatunkami kompleksu czerwonego [33, 161].

Druga istotna grupa bakterii tworzy tzw. kompleks pomarańczowy, obejmujący 13 gatunków, w tym *Fusobacterium nucleatum* i *Prevotella intermedia*

mające szczególne znaczenie patogenetyczne. Przyjmuje się, że kompleks ten w bezpośredni sposób warunkuje formowanie kompleksu czerwonego [63]. Z badań mikrobiologicznych wynika, że bakterie kompleksu pomarańczowego są niezbędnym ogniwem pozwalającym na kolonizację tkanek przyzębia przez kompleks czerwony. Istotną rolę w tym procesie spełniają szczepy *F. nucleatum* i *P. intermedia*. Gatunek *F. nucleatum* należy do rodziny *Fusobacteriaceae*, wytwarza DNazę, enzym degradujący DNA. Z kolei, gatunek *P. intermedia* należy do rodziny *Prevotellaceae* i charakteryzuje się aktywnością hemolityczną. Proteazy gatunku *Prevotella* są zdolne do niszczenia licznych białek, w tym kolagenu oraz fibronektyny. Wykazano, że proteazy te posiadają właściwości trypsynopodobne, charakterystyczne dla proteinaz cysteinowych [118]. Aktywność trypsynopodobna jest znacznie słabsza w porównaniu z *P. gingivalis*. Trypsynopodobne proteazy *Prevotella* sp. są zdolne do uszkodzenia przeciwciał, zwłaszcza IgG i fibrynogenu, co zmniejsza skuteczność obrony immunologicznej i zapalnej gospodarza [120, 184, 217].

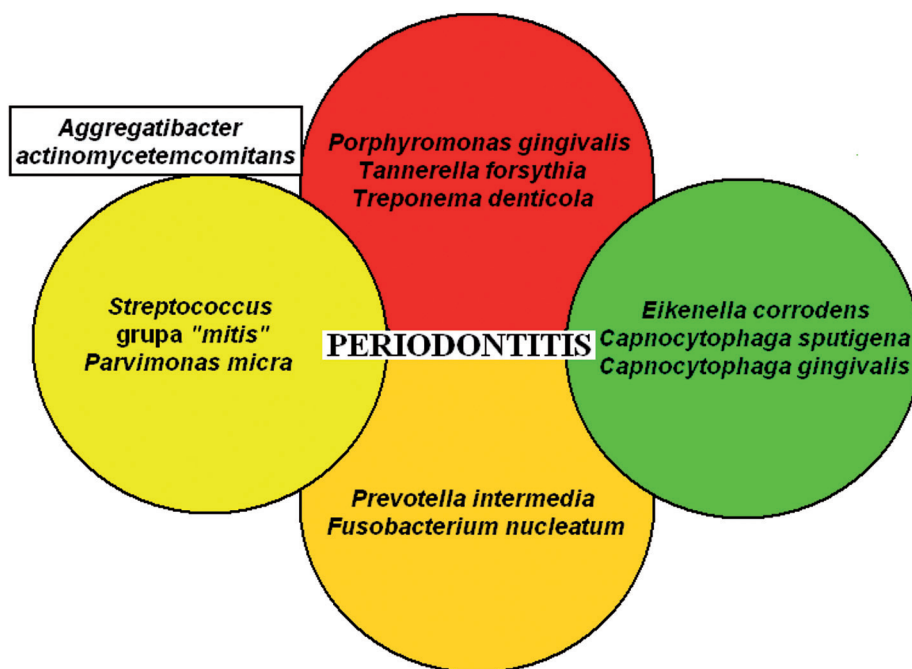
Odrębna grupa bakterii tworzy tzw. kompleks zielony, obejmujący trzy gatunki: *Capnocytophaga sputigena*, *C. gingivalis* i *Eikenella corrodens* [63-65]. Gatunki te również są związane z objawami chorobowymi przewlekłego zapalenia przyzębia u dorosłych, jednak o łagodniejszym przebiegu klinicznym w porównaniu do objawów wywołanych bakteriami kompleksu czerwonego. Gatunki z rodzaju *Capnocytophaga* są aktualnie sklasyfikowane w obrębie rodziny *Flavobacteriaceae* i należą do bakterii względnie beztlenowych, kapnofilnych, a ich rola patogenna nadal jest niepewna [208]. *E. corrodens* jest gatunkiem obecnie sklasyfikowanym w obrębie rodziny *Neisseriaceae*, należy do względnych beztlenowców i charakteryzuje się szczególnymi właściwościami koagregacji z innymi gatunkami bakterii, a zwłaszcza z rodzaju *Capnocytophaga* [46]. Jednocześnie wykazano brak współwystępowania gatunków grupy zielonej i kompleksu czerwonego, co może wskazywać na dwa różne mechanizmy etiopatogenezy choroby przyzębia u dorosłych. Natomiast obserwuje się współwystępowanie grupy zielonej i kompleksu żółtego, głównie tworzonego przez gatunki paciorkowców jamy ustnej, grupy „Mitis” (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii* i *S. sanguinis*), a także z włączonym w skład tego kompleksu gatunkiem *Peptostreptococcus micros* (obecnie reklasyfikowanym do gatunku: *Parvimonas micra*) należącym do periopatogenów dominujących [195]. Gatunki kompleksów zielonego i żółtego mogą „współdziałać” i wywoływać chorobę [90, 218].

Ponadto, wyróżnia się odrębne periopatogeny, a zwłaszcza *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, który może towarzyszyć kompleksowi czerwonemu. Obecnie uznaje się szczególne znaczenie *A. actinomycetemcomitans* w etiopa-

togenezie zapalenia przyzębia [50, 52, 70, 136]. Gatunek ten ostatnio sklasyfikowano do nowego rodzaju *Aggregatibacter*, należącego do rodziny *Pasteurellaceae* [132]. Szczepy tego gatunku są względnie beztlenowymi, kapnofilnymi bakteriami, posiadającymi mikrootoczkę oraz pęczek fimbrii (BF) o właściwościach agregacyjno-adherencyjnych, co warunkuje ich szczególną zdolność przylegania do tkanek przyzębia i autoagregacji. Jednocześnie wytwarzają leukotoksynę (LtxA) o cytotoksycznym oddziaływaniu wobec neutrofilii oraz monocytów/makrofagów. Toksyna LtxA uszkadza błony komórkowe i na drodze apoptozy powoduje lizę wielojądrzastych leukocytów, monocytów i limfocytów T [69, 70, 87]. Aktywność leukotoksyny może być hamowana poprzez działanie innych periopatogenów m.in. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i *Prevotella nigrescens* [185]. Drugą ważną toksyną *A. actinomycetemcomitans* jest toksyna CDT (cytolethal distending toxin – cytoletalna toksyna rozciągająca) [149]. Toksyna CDT blokując cykl komórkowy w fazie G2 w limfocytach T indukuje proces apoptozy w tych komórkach [149, 178]. Ostatnie doniesienia potwierdzają rolę toksyny CDT w stymulowaniu protein regulujących osteoklasty (RANKL) w fibroblastach dziąsłowych oraz komórkach więzadeł ozębnej. Toksyna ta aktywuje makrofagi hamując produkcję tlenku azotu (NO); wpływa również na wytwarzanie epiteliotoksyn, fosfatazy kwaśnej i zasadowej, kolagenazy oraz czynnika hamującego proliferację fibroblastów dziąsłowych. Komórki zakażone *A. actinomycetemcomitans* ulegają apoptozie, co może być przyczyną rozwoju choroby przyzębia [69]. Tanabe i Grenier [187] wykazali, że lipopolisacharyd (LPS) *A. actinomycetemcomitans* może indukować odpowiedź prozapalną w makrofagach, które wydzielają czynnik martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukinę-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) oraz enzym metyloproteinazę-9, degradujący tkankę. Proces ten może odgrywać istotną rolę w modulacji odpowiedzi zapalnej gospodarza i progresji przewlekłego zapalenia przyzębia. *A. actinomycetemcomitans* jest uważany obecnie za dominujący czynnik etiologiczny we wczesnie rozpoczynającej się chorobie przyzębia.

Przedstawione dane wskazują, że choroba przyzębia u dorosłych jest wywołana zakażeniem bakteryjnym mieszanym. Dominującymi czynnikami etiologicznymi wydają się być gatunki kompleksu czerwonego (*P. gingivalis*, *T. forsythia* i *T. denticola*) wraz z odrębnym periopatogenem *A. actinomycetemcomitans*, jak również gatunki kompleksu zielonego (*C. sputigena*, *C. gingivalis* i *E. corrodens*). Ponadto, uznaje się ważną etiopatogenetyczną rolę periopatogenu *P. micros* z kompleksu żółtego oraz gatunków kompleksu pomarańczowego (głównie *F. nucleatum* i *P. intermedia*), które mogą determinować formowanie kompleksu czerwonego. Jednak periopatogeny mogą także stanowić składnik fizjologiczny mikroflory jamy ustnej u ludzi zdrowych [105]. Rzeczywisty udział

określonych gatunków bakterii w przebiegu przewlekłego zapalenia przyzębia u dorosłych nadal nie jest znany, szczególnie w kontekście aktywności choroby. Jednocześnie brak jest wiedzy w zakresie roli bakterii z rodzaju *Lactobacillus* mikroflory jamy ustnej w patogenezie choroby przyzębia. Wiadomo jednak, że pałeczki *Lactobacillus*, poprzez wytwarzanie substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (kwasy organiczne, nadtlenek wodoru oraz laktocyny), mogą ograniczać lub zapobiegać kolonizacji patologicznej mikroflory. Bakterie mogą zatem „chronić” tkanki przyzębia przed skolonizowaniem przez bakterie chorobotwórcze poprzez bezpośrednie blokowanie adherencji periopatogenów lub antagonizm metaboliczny [182, 183].



**Ryc. 1.** Periopatogeny – najważniejsze kompleksy, opracowano wg Haffajee i wsp. [63].

Badania cytokin występujących w płynie dziąsłowym mają dużą wartość diagnostyczną, gdyż płyn dziąsłowy może zawierać wiele czynników biorących udział w reakcji immunologiczno-zapalnej. Przebieg procesów immunologiczno-zapalnych i ich intensywność w tkankach przyzębia są regulowane przez cytokiny, w tym chemokiny [60, 96, 143, 215].

Czynnik martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) jest wytwarzany głównie przez makrofagi. Może być też syntetyzowany przez komórki cytotoksyczne NK, komórki tuczne i komórki niektórych linii nowotworowych. Cytokina ta ma właściwości prozapalne i działa synergistycznie z interleukiną-1 (IL-1). Aktywuje również komórki NK, zwiększa fagocytarność neutrofilów, wzmacnia proliferację i różnicowanie limfocytów T i B. Ponadto zwiększa zdolność komórek endotelialnych do adhezji limfocytów, stymuluje wzrost fibroblastów i reguluje syntezę kolagenu, fibronektyny i kwasu hialuronowego. Czynnikiem martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) indukuje wytwarzanie kolagenaz i innych proteaz oraz aktywuje osteoklastogenezę, dojrzewanie osteoklastów i resorpcję kości. Jest miejscowym moderatorem przebudowy kości w stanach zapalnych. Cytokina ta inicjuje proces zapalny i uruchamia mechanizm destrukcji tkanek przyzębia [12, 19, 29, 100, 152, 206].

Interleukina-1 (IL-1) jest głównie produkowana przez monocyty/makrofagi. Ponadto, zdolność wytwarzania tej cytokiny posiadają fibroblasty, komórki mięśni gładkich, komórki epitelialne, a także neutrofile oraz płytki krwi. Interleukina-1 (IL-1) jest cytokiną wielofunkcyjną, jednak podstawowa jej rola wiąże się ze strategią obronną organizmu wobec różnych czynników uszkodzających [180]. Spełnia więc funkcję hormonu „alarmowego”, który stanowi bardzo często sygnał konieczny do indukcji odpowiedzi odpornościowej i zapoczątkowania oraz rozwoju procesu zapalnego. Dość dobrze znany jest obecnie udział tej cytokiny w indukcji lokalnego odczynu zapalnego, który w sensie biologicznym stanowi wyraz obrony organizmu wobec działania bodźców uszkodzających, np. drobnoustrojów chorobotwórczych. Interleukina-1 (IL-1) oddziałuje synergistycznie z czynnikiem martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [31]. Interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) jest cytokiną wytwarzaną głównie przez aktywowane monocyty i makrofagi. Określa się ją jako czynnik aktywujący limfocyty. Receptory dla tej cytokiny stwierdzono na spoczynkowych limfocytach T i B, fibroblastach, keratynocytach, komórkach śródbłonna i hepatocytach. IL-1 $\beta$  jest kostymulatorem limfocytów T nasilając wytwarzanie interleukiny-2 (IL-2), zwłaszcza w obecności antygenów, miogenów lub jonoforów wapnia. Interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) działa stymulująco na układ krwiotwórczy indukując wytwarzanie krwiotwórczych czynników wzrostowych oraz czynnika martwicy guza (TNF), interleukiny-2 (IL-2) i interleukiny-6 (IL-6) [42, 48, 75].

Interleukina-6 (IL-6) wytwarzana jest przez wiele różnych komórek organizmu, takich jak: monocyty, makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłonna i mezangium, keratynocyty, a także limfocyty B i T oraz eozynofile [198]. Najważniejszą rolą interleukiny-6 (IL-6) jest indukcja i uwalnianie białek ostrej fazy m.in. białka C-reaktywnego (CRP – C Reactive Protein) z hepatocytów. Cytokina ta wywołuje resorpcję kości oraz stymuluje syntezę chemokin, metaloproteinaz

i prostaglandyn  $E_2$  ( $PGE_2$ ) [11, 54]. Interleukina-6 (IL-6) jest jedną z ważniejszych cytokin w odpowiedzi zapalnej [146].

Interleukina 12 (IL-12) jest produkowana przez fagocyty, komórki dendrytyczne i inne komórki prezentujące antygen, w tym limfocyty B. Synteza interleukiny-12 (IL-12) zachodzi pod wpływem różnych patogenów w sposób niezależny od limfocytów T, jak i zależny od tych komórek. Cytokina ta aktywuje komórki NK, monocyty i makrofagi oraz pobudza komórki do produkcji interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Ponadto, inicjuje różnicowanie limfocytów T w kierunku komórek typu Th1 i hamuje aktywność limfocytów Th2 [36, 56].

Ludzka interleukina-17 (IL-17) opisana została po raz pierwszy w 1995 roku. Odgrywa istotną rolę w regulacji miejscowej odpowiedzi zapalnej [214]. Jednocześnie kooperuje z innymi cytokinami zapalnymi, głównie czynnikiem martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interleukiną-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [85]. Dobrze już udokumentowano, że interleukina-17 (IL-17) umożliwia rekrutację neutrofilów w ognisku zapalnym, co indukuje naturalną odpowiedź immunologiczną wobec zakażeń wywołanych patogenami, zwłaszcza bakteryjnymi i grzybiczymi. Cytokina ta produkowana jest przez komórki prozapalne Th17 [13, 55, 124, 147].

Interleukina-10 (IL-10) produkowana jest przede wszystkim przez limfocyty Th2 i monocyty/makrofagi. Główną jej rolą jest hamowanie aktywności komórek Th1 i monocytów/makrofagów. Ludzka interleukina-10 (IL-10) hamuje wytwarzanie cytokin przez limfocyty Th1 – interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukiny-2 (IL-2) oraz przez monocyty/makrofagi – interleukiny-1 (IL-1), interleukiny-6 (IL-6), interleukiny-8 (IL-8) i czynnika martwicy guza- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Interleukina-10 (IL-10) powoduje redukcję syntezy metaloprotein, głównych czynników degradujących macierz zewnątrzkomórkową, zwiększając jednocześnie uwalnianie tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP) [35, 122].

Z dotychczasowych badań wynika, że pałeczki *Lactobacillus spp.* mogą modyfikować skład mikroflory jamy ustnej poprzez antagonistyczne działanie wobec potencjalnie patogennych gatunków [162, 175, 190, 193, 194, 197].

Dla pełniejszego zanalizowania etiopatogenezy przewlekłego zapalenia przyzębia celowe są zatem badania dotyczące występowania pałeczek z rodzaju *Lactobacillus* oraz gatunków periopatogenów zarówno w postaci umiarkowanej jak i ciężkiej tej choroby. Do chwili obecnej brak jest danych w literaturze światowej analizujących to zagadnienie. Ponadto, badania *in vitro* wpływu supernatantów z hodowli wybranych periopatogenów (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), jak również z hodowli izolatów klinicznych *Lactobacillus* na fibroblasty dziąsłowe oraz ocena ekspresji genu *BTG2* wydają się istotne dla zanalizowania oddziaływania produktów metabolizmu bakterii na komórki. Gen *BTG2* reprezentuje rodziny

genów *BTG* kodujących białka regulacyjne o aktywności antyproliferacyjnej, preferencyjnie wytwarzane w fazie G1 cyklu [44, 148]. Jednocześnie uzyskana w tym zakresie wiedza może mieć znaczenie praktyczne nie tylko dla diagnostyki chorób przyzębia, ale także może przyczynić się do zoptymalizowania strategii terapii choroby.

Podjęcie zatem badań przedstawionych w niniejszej pracy uzasadniają: powszechność występowania przewlekłego zapalenia przyzębia u dorosłych, trudności w leczeniu, zwłaszcza postaci ciężkich, a także bardzo poważne następstwa tej choroby, głównie utrata zębów oraz zespoły uogólnionych zakażeń organizmu. Badania epidemiologiczne wskazują na ścisłe powiązanie zdrowia jamy ustnej z całym organizmem, co Seymour i wsp. [164] określili w konkluzji następująco: „Nie można mieć dobrego zdrowia ogólnego bez dobrego zdrowia jamy ustnej”. W wielu dotychczasowych badaniach scharakteryzowano już poszczególne gatunki periopatogenów i ich czynniki zjadliwości, a także najczęściej współwystępujące grupy gatunków bakteryjnych (nazywane kompleksami) o szczególnym znaczeniu w etiopatogenezie periodontitis. Jednak nadal nie jest znany rzeczywisty udział periopatogenów i rola bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w aktywności choroby przyzębia, co jest szczególnie ważne dla pełniejszego poznania etiopatogenezy tej choroby.

## 2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie możliwości antagonistycznego oddziaływania ważnych klinicznie periopatogenów i szczepów *Lactobacillus* mikroflory jamy ustnej w przewlekłej chorobie przyzębia u dorosłych w badaniach *in vivo* i *in vitro*. W kontekście powyższego celu istotne było także zanalizowanie efektywności zastosowania u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia doustnych tabletek probiotycznych zawierających szczep *Lactobacillus reuteri*, produkujący nadtlenek wodoru.

Cel ten był realizowany w następujących zadaniach badawczych:

1. Ocena występowania periopatogenów i bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ze szczególnym uwzględnieniem wytwarzania nadtlenu wodoru, u osób z umiarkowanym i ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.
2. Ocena prozapalnej odpowiedzi cytokinowej (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) u chorych z umiarkowanym i ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.
3. Ocena ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i IL-17) i cytokiny przeciwzapalnej IL-10 oraz genu czynnika antyproliferycyjnego *BTG2* w ludzkich fibroblastach dziąsłowych pod wpływem supernatantów z hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) oraz supernatantów z hodowli szczepów klinicznych *Lactobacillus acidophilus*.
4. Ocena wpływu supernatantów z hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) na poziom adenozyntroójfosforanu (ATP) w ludzkich fibroblastach dziąsłowych i ich żywotność.
5. Ocena wpływu supernatantów z hodowli szczepów klinicznych *Lactobacillus acidophilus* na poziom adenozyntroójfosforanu (ATP) w ludzkich fibroblastach dziąsłowych i ich żywotność.
6. Ocena prozapalnej odpowiedzi cytokinowej (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia otrzymujących suplement diety – tabletki probiotyczne zawierające szczep *Lactobacillus reuteri*, produkujący nadtlenek wodoru.



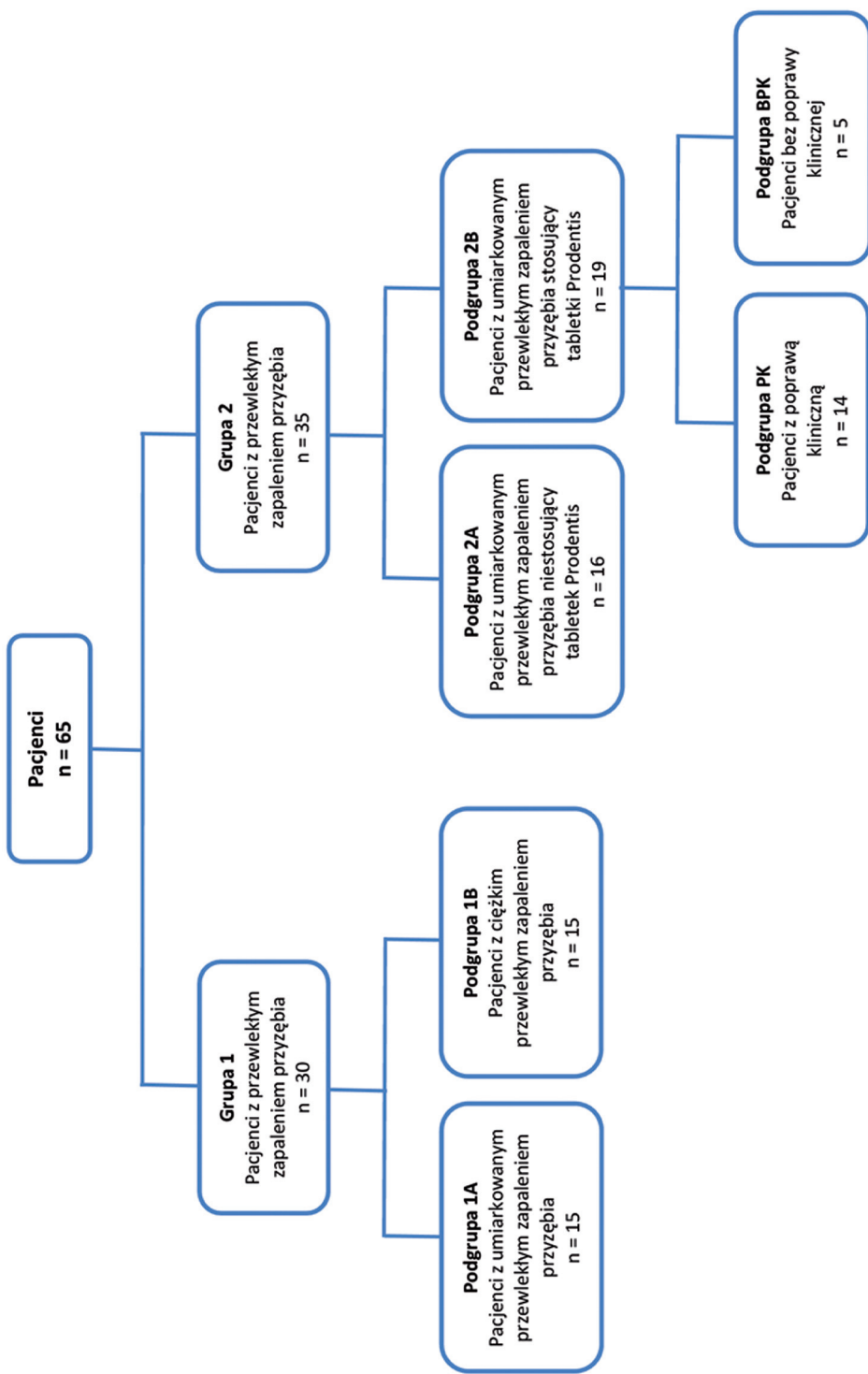
## 3. MATERIAŁ I METODY

### 3.1. Pacjenci i badanie stomatologiczne

Badaniami objęto 112 osób zgłaszających się do leczenia w Klinice Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Ostatecznie do zaplanowanych badań wyłoniono 65 chorych (32 kobiety i 33 mężczyzn), u których w oparciu o przeprowadzone badanie periodontologiczne rozpoznano umiarkowane lub ciężkie przewlekłe zapalenie przyzębia. Grupę badawczą stanowiły osoby z przewlekłą chorobą przyzębia w wieku 30–50 lat. Do badań zostali zakwalifikowani pacjenci ogólnie zdrowi, niepodający w wywiadzie występowania chorób ogólnych, nieotrzymujący leków przeciwbakteryjnych w ostatnich 3 tygodniach oraz niepalący papierosów. Ww. pacjenci nie użytkowali ruchomych uzupełnień protetycznych, nie byli leczeni periodontologicznie w ciągu roku poprzedzającego badania, a także nie stosowali dodatkowych środków higieny jamy ustnej (nitka dentystyczna, płyny antyseptyczne, irygatory). Szczegółowy opis badania klinicznego przedstawiono w podrozdz. 3.1.

Spośród 65 pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia do Grupy 1 włączono w zależności od stopnia zaawansowania choroby 30 osób. Podgrupa 1A obejmowała 15 pacjentów (8 kobiet i 7 mężczyzn) w wieku 30–45 lat z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia, średni czas trwania choroby wynosił  $20,1 \pm 2,1$  miesięcy (18–25 miesięcy). Podgrupę 1B stanowiło 15 pacjentów (6 kobiet i 9 mężczyzn) w wieku 30–50 lat z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia; średni czas trwania choroby wynosił  $28,1 \pm 4,1$  miesięcy (22–35 miesięcy).

Drugą grupę badawczą (Grupa 2) stanowiło 35 pacjentów w wieku 31–46 lat (18 kobiet i 17 mężczyzn) u których w oparciu o badanie kliniczne (I termin badania) rozpoznano umiarkowane przewlekłe zapalenie przyzębia; średni czas trwania choroby wynosił  $19,4 \pm 2,8$  miesięcy (18–27 miesięcy). Następnie wykonano profesjonalne oczyszczenie zębów wraz z wygładzeniem powierzchni korzeni oraz instruktaż higieny jamy ustnej. Po 2 tygodniach od przeprowadzonych zabiegów higienizacyjnych wyodrębniono na podstawie badania klinicznego (II termin badania) podgrupę 16 osób (Podgrupa 2A), u których nie zastosowano tabletek probiotycznych (z uwagi na istotną poprawę parametrów klinicznych – podrozdz. 4.2.) oraz 19 osób (Podgrupa 2B), które otrzymały tabletki probiotyczne. Suplement diety, tabletki probiotyczne do ssania zawierające szczep *Lactobacillus reuteri*, produkujący nadtlenek wodoru ( $10^8$  CFU *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 5289, Prodentis), był stosowany przez pacjentów dwa razy



Ryc. 2. Grupy i podgrupy badanych pacjentów.

dziennie po szczotkowaniu zębów. Po 2 tygodniach od zakończenia stosowania tabletek probiotycznych przeprowadzono badanie kliniczne kontrolne (III termin badania). Grupy badawcze przedstawiono schematycznie na rycinie 2.

Niniejszą pracę wykonano w następujących jednostkach naukowych:

- Katedrze i Klinice Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej, przy UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu: Uchwała nr 488/12 oraz Uchwała nr 146/13.

Badania zostały sfinansowane z uczelnianego projektu badawczego A. K. Szkaradkiewicz-Karpińskiej (nr 502-14-02209324-08456).

Kliniczne badanie stomatologiczne obejmowało badanie podmiotowe oraz przedmiotowe. Badanie podmiotowe dotyczyło występowania chorób układuowych oraz stosowania leków przeciwbakteryjnych w ostatnich 3 tygodniach i palenia papierosów przez pacjentów. U każdego pacjenta oceniano higienę jamy ustnej, stan dziąseł, głębokość kieszonek przyzębnych oraz utratę przyczepu łącznotkankowego.

Do oceny stanu higieny jamy ustnej zastosowano wskaźnik płytki nazębnej – Plaque Index (PI.I) według Silness i Løe [169].

Wskaźnik PI.I pozwala na określenie grubości miękkich złogów umiejscowionych w okolicy szyjki zębów. Ocenę przeprowadzono na 4 powierzchniach: bliższej, dalszej, policzkowej i językowej wszystkich zębów według następującej skali punktowej:

0 – brak płytki,

1 – cienka warstwa płytki stwierdzona zgłębnikiem, ale niewidoczna gołym okiem,

2 – umiarkowane nagromadzenie płytki, widoczne gołym okiem

3 – obfite nagromadzenie płytki.

Wartości uzyskane ze wszystkich powierzchni zęba sumowano i dzielono przez 4 obliczając w ten sposób średnią wartość płytki dla danego zęba. Sumę średnich wartości podzielono przez liczbę wszystkich badanych zębów otrzymując wartość wskaźnika PI.I u danego pacjenta.

Wartość wskaźnika PI.I w granicach 0,1–0,9 świadczy o dobrym stanie higieny jamy ustnej, 1,0–1,9 o dostatecznym stanie, a 2,0–3,0 o złej higienie jamy ustnej [113].

Do oceny stanu dziąseł zastosowano wskaźnik dziąsłowy – Gingival Index (GI) według Løe i Silness [15, 113, 114] oraz wskaźnik krwawienia ze szczeliny dziąsłowej – Sulcus Bleeding Index (SBI) według Mühlemanna i Sona [128].

Wskaźnik GI pozwala na określenie stanu brzegu dziąsłowego przy czterech powierzchniach zęba. Uwzględnia on brak lub istnienie objawów zapalenia dziąseł, takich jak: obrzęk, zmiana zabarwienia, krwawienie przy zgłębnikowaniu i krwawienie samoistne.

Kryteria oceny zmian jakościowych w dziąśle według Løe i Silness [113, 114] są następujące:

- 0 – zdrowe dziąsło, kolor bladoróżowy,
- 1 – łagodne zapalenie dziąseł: niewielka zmiana zabarwienia, lekki obrzęk, brak krwawienia podczas zgłębnikowania,
- 2 – umiarkowane zapalenie dziąseł: zaczerwienienie, obrzęk i połysk dziąsła, krwawienie przy ucisku lub zgłębnikowaniu,
- 3 – ciężkie zapalenie dziąseł: wyraźne zaczerwienienie i obrzęk dziąsła, owrzodzenie, skłonność do samoistnego krwawienia.

Stan dziąsła punktuje się w obrębie czterech powierzchni otaczających każdy ząb; po dodaniu punktów i podzieleniu sumy przez 4 otrzymuje się wartości dla danego zęba. Sumując średnie wartości i dzieląc przez liczbę badanych zębów otrzymuje się wartość wskaźnika GI u danego pacjenta. Wartości wskaźnika dziąsłowego w zakresie 0,1–1,0 świadczą o łagodnym zapaleniu dziąseł, 1,1–2,0 o umiarkowanym, a 2,1–3,0 o ciężkim (zaawansowanym) zapaleniu dziąseł [114].

Wskaźnik SBI według Mühlemanna i Sona [128] obliczano w oparciu o występowanie krwawienia po wprowadzeniu sondy periodontologicznej do kieszonki dziąsłowej bez ucisku na jej dno. Oceny dokonywano na czterech jednostkach dziąsłowych: dziąsło brzeżnym wargowo, dziąsło brzeżnym językowo, brodawce międzyzębowej mezjalnie i brodawce międzyzębowej dystalnie według następujących kryteriów:

- 0 – zdrowe dziąsło, brak krwawienia podczas zgłębnikowania,
- 1 – zdrowo wyglądające dziąsło, lecz krwawiące przy zgłębnikowaniu szczeliny dziąsłowej,
- 2 – zmiana zabarwienia dziąsła, krwawienie pod wpływem czynników drażniących,
- 3 – lekka zmiana kształtu, zmiana zabarwienia, krwawienie pod wpływem drażnienia,
- 4 – znaczna zmiana kształtu, zmiana zabarwienia, krwawienie pod wpływem czynników drażniących,

5 – znaczny obrzęk, zmiana w kolorze, krwawienie dziąsła podczas zgłębnikowania, ewentualne owrzodzenie dziąsła.

Odnotowane wartości na czterech powierzchniach wokół wszystkich obecnych w jamie ustnej zębów stanowiły podstawę do obliczenia wartości wskaźnika.

Utratę tkanek przyzębia powstałą w następstwie periodontitis, określono na podstawie pomiaru głębokości kieszonek (PPD – Probing Periodontal Depth) oraz pomiaru położenia przyczepu łącznotkankowego – CAL (Clinical Attachment Level). Pomiaru klinicznej głębokości kieszonek przyzębnych dokonywano na 6 powierzchniach przy wszystkich obecnych w jamie ustnej zębach z zastosowaniem skalowanej sondy periodontologicznej WHO 621 Hu-Friedy (skala do 11,5 mm).

Część pomiarowa sondy zakończona jest kulką o średnicy 0,5 mm i zawiera strefy pomiarowe rozmieszczone w odległości 3,5; 5,5; 8,5 oraz 11,5 mm. Głębokość kieszonek przy powierzchniach badanych zębów mierzono periodontometrem wprowadzanym równolegle do długiej osi zęba, przesuwając wierzchołek sondy w ciągłym kontakcie z zębem aż do dna kieszonki [110, 140, 141, 211]. Wartości te stanowiły podstawę do obliczenia średnich głębokości kieszonek przyzębnych u poszczególnych pacjentów.

Pomiaru klinicznej utraty przyczepu łącznotkankowego dokonywano przy sześciu powierzchniach każdego z zębów z zastosowaniem sondy periodontologicznej WHO 621 Hu Friedy (skala do 11,5 mm). Wartość CAL obliczano na podstawie pomiaru odległości od połączenia szklino-cementowego do dna kieszonki dziąsłowej. W przypadku, gdy brzeg dziąsłowy przykrywał połączenie szklino-cementowe dokonywano dwóch pomiarów. Pierwszy pomiar dotyczył głębokości kieszonki dziąsłowej, drugi natomiast obejmował odległość od brzegu dziąsła do linii połączenia szklino-cementowego. Wartość wyrażającą położenie przyczepu łącznotkankowego uzyskiwano przez odjęcie wartości odpowiadającej odległości brzegu dziąsła od linii połączenia szklino-cementowego od wartości wyrażającej głębokość kieszonki dziąsłowej [3, 58, 59, 82]. Uzyskane dane stanowiły podstawę do obliczenia wartości średnich CAL u poszczególnych pacjentów.

Wyniki badania przedmiotowego stanowiły podstawę do rozpoznania choroby przyzębia. Przyjęto kryteria uproszczonej klasyfikacji chorób dziąseł i przyzębia, która uwzględnia stopień zaawansowania przewlekłego zapalenia przyzębia [58, 59].

Stopień zaawansowania choroby przyzębia określono na podstawie następujących kryteriów:

1. W umiarkowanym zapaleniu przyzębia:
  - wskaźnik dziąsłowy GI > 0
  - wskaźnik krwawienia ze szczeliny dziąsłowej SBI > 0
  - kliniczna utrata położenia przyczepu łącznotkankowego CAL > 5 mm
  - conajmniej 2 zęby niesąsiadujące ze sobą z kieszonkami o głębokości PPD > 4 mm
2. W ciężkim zapaleniu przyzębia:
  - wskaźnik dziąsłowy GI > 0
  - wskaźnik krwawienia ze szczeliny dziąsłowej SBI > 0
  - kliniczna utrata położenia przyczepu łącznotkankowego CAL > 6 mm
  - głębokości kieszonek PPD > 5 mm [58, 211].

### **3.2. Pobieranie próbek płynu dziąsłowego**

Materiał badawczy stanowiły próbki zbiorcze płynu dziąsłowego. U wszystkich badanych osób grupy 1 płyn ten pobierano po przeprowadzonym badaniu klinicznym. W grupie 2 pacjentów płyn dziąsłowy pobrany był w trzech terminach po przeprowadzonych badaniach klinicznych (terminy badania przedstawiono w podrozdz. 3.1.). Płyn ten pobierano strzykawką Hamilton 25  $\mu$ l (Hamilton, USA) z cienką igłą endodontyczną (średnica 0,3 mm, długość 25 mm) z wszystkich stwierdzonych kieszonek przyzębnych po izolacji od dostępu śliny. Przed pobieraniem próbek pacjentów nie poddawano żadnym zabiegom higienizacyjnym. Igłę wprowadzano do kieszonek przyzębnych i ostrożnie aspirowano materiał. Następnie pobrany płyn dziąsłowy umieszczano w jałowych probówkach typu Eppendorf opisanych numerami odpowiadającymi numerom kart pacjentów [24, 61].

### **3.3. Hodowle bakterii**

Badania mikrobiologiczne oraz badania cytokin zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej (kierownik: prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz) Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Bakterie z rodzaju *Prevotella* i *Porphyromonas* hodowano na podłożu Columbia Agar wzbogaconym 7% krwią baranią w warunkach beztlenowych,

stosując GENbag anaer (bioMerieux), w temperaturze 37°C przez 48–72 godziny. Do identyfikacji stosowano test rapid ID 32 A (bioMerieux).

Bakterie z rodzaju *Aggregatibacter* hodowano na Chocolate Agar na bazie Columbia Agar z 7% krwią barania, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, stosując GENbag CO<sub>2</sub> (bioMerieux), w temperaturze 37°C przez 48–72 godziny. Do identyfikacji stosowano test API NH (bioMerieux), uzupełniony o badanie zdolności wzrostu wokół czynników X i V oraz zdolności wytwarzania katalazy.

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* hodowano na agarze Rogosa w warunkach beztlenowych, w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Wyrosłe kolonie *Lactobacillus* identyfikowano przy użyciu zestawów API 50 CHL (bioMerieux) (Fot. 1.).



Fot. 1. Zestaw biochemiczny API 50 CHL (bioMerieux).

Zdolność do produkcji nadtlenu wodoru wśród szczepów *Lactobacillus* określano na podstawie hodowli uzyskanych izolatów w warunkach tlenowych w obecności 6% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C przez 48 godzin na podłożu różnicującym TMB-Plus agar, przygotowanym wg Rabe i Hillier [145].

Skład podłoża TMB-Plus:

10 mg peroksydazy chrzanowej (Sigma),

250 mg TMB (Sigma),

50 ml surowicy końskiej (Biomed),

20 g skrobi,

10 ml roztworu heminy,

0,57 g bezwodnego MgSO<sub>4</sub>,

0,12 g MnSO<sub>4</sub>,

0,2 ml roztworu witaminy K.

Wystąpienie zmiany zabarwienia wyrosłych kolonii *Lactobacillus spp.* (pojawienie się niebieskiego zabarwienia) oznaczało wytwarzanie nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

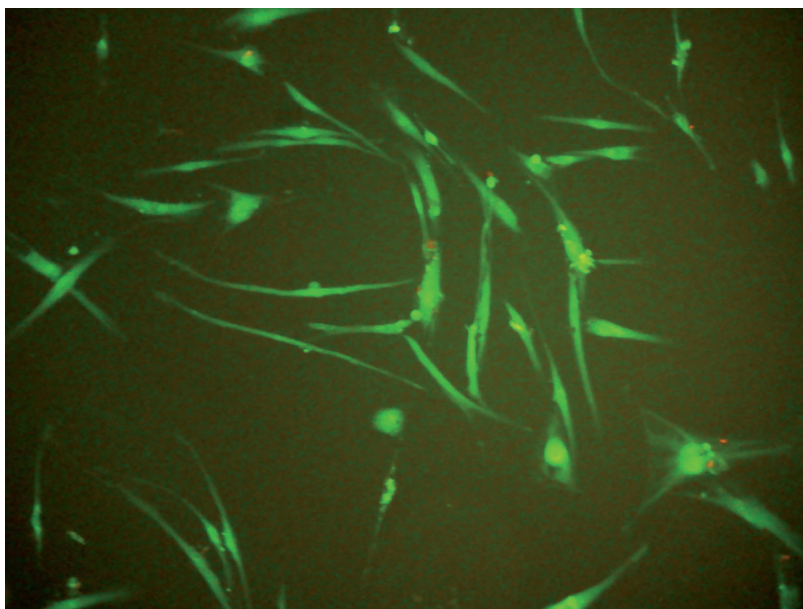
### **3.4. Otrzymywanie supernatantów z hodowli bakterii**

Z hodowli poszczególnych bakterii otrzymywano zawiesinę 0,5 McF bakterii w 2 ml soli fizjologicznej. Do 2 ml RPMI-1640 dodawano 0,1 ml zawiesiny bakterii i hodowano przez 24 godziny w 37°C w warunkach beztlenowych. Następnie hodowlę filtrowano przez sączki uzyskując supernatant. Supernatanty poddawano również inaktywacji w temp. 56°C przez 1 godzinę oraz w 100°C przez 30 minut.

### **3.5. Hodowle fibroblastów dziąsłowych**

Fibroblasty dziąsłowe HGF-1 (CRL-2014, ATCC) hodowano w naczyniach hodowlanych T-25 i T-75 (Nunc), w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Podłoże hodowlane złożone było z płynu DMEM (ATCC) wzbogaconego 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (Sigma) z dodatkiem penicyliny 100 U/ml i streptomycyny 20 mg/ml (Sigma). Podłoże wymieniano 3 razy w tygodniu.





Fot. 2. Fibroblasty dziąsłowe HGF-1 w hodowli, wybarwione kalceiną AM i homodimerem-1 etydy.

### 3.6. Oznaczenie cytokin w płynie dziąsłowym

#### Oznaczenie TNF- $\alpha$

Oznaczenie TNF- $\alpha$  wykonano w płynie dziąsłowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości – Quantikine HS ELISA Human TNF- $\alpha$  (R&D Systems) charakteryzującego się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,106 pg/ml. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali  $\lambda = 490$  nm za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux) (Fot. 3.). Wyniki obliczano z wyznaczeniem krzywej standardowej.

#### Oznaczenie IL-1 $\beta$

Oznaczenie IL-1 $\beta$  wykonano w płynie dziąsłowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przy użyciu zestawu wysokiej czułości – Quantikine HS ELISA Human IL-1 $\beta$ /IL-1F2 (R&D Systems) charakteryzującego się średnią minimalną wykrywalnością (MDD) wynoszącą 0,057 pg/ml. Wartość absorbancji odczytywano przy długości fali  $\lambda = 490$  nm za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux). Wyniki obliczano z wyznaczonej krzywej standardowej.



do badania ekspresji genów ludzkich oraz mikromacierze Affymetrix® Human Genome U219 Array Strip zawierające ponad 36 000 transkryptów i wariantów, reprezentujących ponad 20 000 genów.

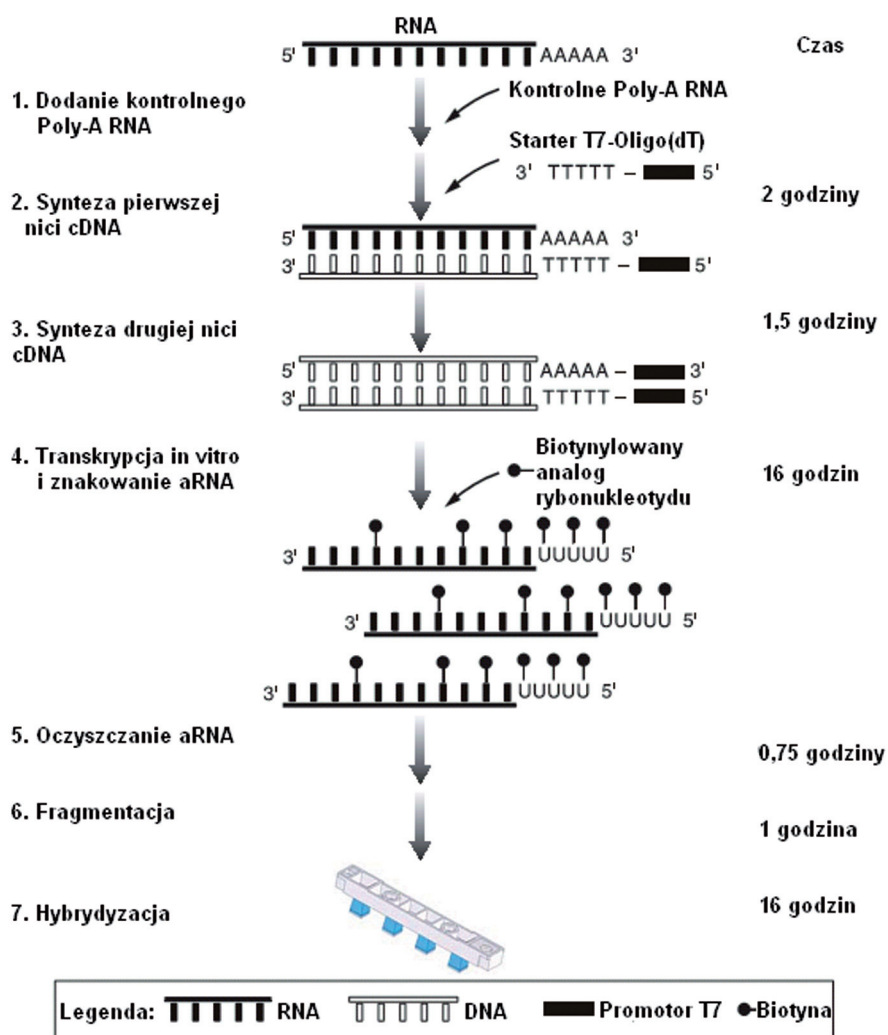
RNA badanych komórek izolowano stosując TRI Reagent (Sigma-Aldrich), zgodnie z zaleceniami producenta, po czym oczyszczano przy użyciu kolumn NucleoSpin RNA Binding (Macherey-Nagel). Analizę ilości oraz czystości wyizolowanego RNA przeprowadzono przy użyciu NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Affymetrix).

Badania ekspresji genów przeprowadzono zgodnie z procedurą dla zestawu GeneAtlas 3' IVT Express Kit opracowaną przez Affymetrix. Pierwszym etapem badania ekspresji genów jest odwrotna transkrypcja, zainicjowana przez przyłączenie startera T7-Oligo, prowadząca do syntezy pierwszej nici cDNA zawierającej sekwencję promotora T7. Następnie przy udziale polimerazy DNA i RNazy H dochodzi do równoczesnej degradacji RNA oraz syntezy drugiej nici cDNA. Kolejny etap to transkrypcja *in vitro* (IVT) przy udziale biotynylowanych analogów rybonukleotydów prowadząca do amplifikacji kopii modyfikowanego biotyną aRNA. Zamplifikowane znakowane aRNA jest oczyszczane oraz fragmentowane. Następnie przeprowadza się hybrydyzację na mikromacierzach Affymetrix Human Genome U219 Array Strip.

Do wykonania hybrydyzacji oraz odczytu ekspresji genów zastosowano blok cieplny AccuBlock (Labnet), aparat GeneAtlas Personal Microarray System (Affymetrix) (Fot. 4.) oraz oprogramowanie Partek Express i Ariadne Pathway Express (Affymetrix Edition). Schemat procedury amplifikacji aRNA przedstawiono na rycinie 3.



Fot. 4. Blok cieplny AccuBlock (u góry) oraz zestaw GeneAtlas Personal Microarray System (na dole) stosowane w badaniach ekspresji genów.



Ryc. 3. Schemat procedury amplifikacji aRNA w badaniu ekspresji genów.

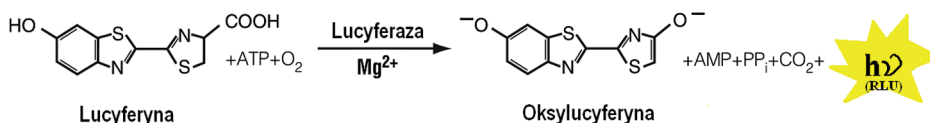
### 3.8. Ocena obecności ATP

Oceny obecności adozynotrójfosforanu (ATP) w hodowlach fibroblastów dziąsłowych HGF-1 dokonywano przy użyciu testu luminescencyjnego (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega). Badania przeprowadzono w obecności zbuforowanej soli fizjologicznej PBS ( $15 \mu\text{l}/10^5$  komórek HGF-1/ $135 \mu\text{l}$  podłoża) oraz w obecności supernatantu uzyskanego z hodowli poszczególnych bakterii ( $15 \mu\text{l}/10^5$  komórek HGF-1/ $135 \mu\text{l}$  podłoża). Badania poziomu ATP w fibroblastach dziąsłowych HGF-1 przeprowadzono z supernatantem każdego z wyizolowanych szczepów bakterii, w trzech powtórzeniach. Badano wpływ supernatantów nieogrzewanych oraz supernatantów ogrzewanych w temp.  $56^\circ\text{C}$  przez 30 minut oraz w  $100^\circ\text{C}$  przez 30 minut. Podłoże stanowił płyn DMEM (ATCC) wzbogacony 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (Sigma). Przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze w  $37^\circ\text{C}$  z 5%  $\text{CO}_2$ . Następnie przepłukiwano płynem hodowlanym i przeprowadzano test oceny obecności ATP. Do próbek dodawano po  $150 \mu\text{l}$  przygotowanego odczynnika (substrat + bufor), mieszano przez 2 minuty i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej.



Fot. 5. Luminometr GloMax (Promega).

Wyniki odczytywano przy użyciu luminometru (GloMax, Promega) (Fot. 5.). W obecności ATP emitowane jest światło (Ryc. 4.) i następnie odczytywane jako relatywne jednostki świetlne (RLU). Intensywność wydzielonych kwantów światła jest proporcjonalna do ilości ATP obecnego w danym badaniu [18].



Ryc. 4. Reakcja zachodząca w badaniu luminometrycznym.

### 3.9. Badanie żywotności fibroblastów dziąsłowych

W badaniu żywotności fibroblastów dziąsłowych HGF-1 zastosowano test fluorescencyjny Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA) (Fot. 6.). W teście tym komórki żywe wybarwione zostają na kolor zielony (kalceina-AM wykazująca aktywność wewnątrzkomórkowej esterazy), a komórki martwe – na kolor czerwony (homodimer-1 etydyny wykazujący utratę integralności błony komórkowej).

Badania przeprowadzano w komorach hodowlanych Lab-Tek Chamber Slide (Nunc) w obecności zbuforowanej soli fizjologicznej PBS (50  $\mu$ l/0,5 $\times$ 10<sup>6</sup> komórek HGF-1/450  $\mu$ l podłoża) oraz w obecności supernatantu uzyskanego z hodowli poszczególnych bakterii (50  $\mu$ l/0,5 $\times$ 10<sup>6</sup> komórek HGF-1/450  $\mu$ l podłoża). Badania żywotności fibroblastów dziąsłowych HGF-1 przeprowadzano z supernatantem każdego z wyizolowanych szczepów bakterii, w trzech powtórzeniach. Badano wpływ supernatantów nieogrzewanych oraz supernatantów ogrzewanych w temp. 56°C przez 30 minut oraz w 100°C przez 30 minut. Podłoże stanowił płyn DMEM (ATCC) wzbogacony 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (Sigma).

Przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny w inkubatorze w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>. Następnie przepłukiwano płynem hodowlanym i przeprowadzano test oceny żywotności. Odczytu dokonywano w czasie zerowym, po 6, 12, 18 i 24 godzinach przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E200 (pow. 1000 $\times$ ).



Fot. 6. Zestaw Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit zastosowany do oceny żywotności fibroblastów dziąsłowych.

### 3.10. Metody statystyczne

Uzyskane w badaniach wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 8 dla systemu operacyjnego Windows. W analizie statystycznej zastosowano testy nieparametryczne, które pozwalają na wyliczenie szerokiego zakresu różnych miar położenia (średnia, mediana itd.) i dyspersji (odchylenie standardowe) dając w ten sposób pełny obraz danych. Są to metody niezależne od parametrów lub niezależne od rozkładu.

W analizie wskaźników klinicznych (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya oraz test Kruskala-Wallisa. W analizie porównawczej poziomów ATP zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA) z testem Tukeya-Kramera. W analizie porównawczej aktywności proliferacyjnej oraz żywotności fibroblastów dziąsłowych zastosowano test nieparametryczny Manna-Whitneya oraz test Kruskala-Wallisa. W analizie porównawczej poziomów cytokin w badanych grupach zastosowano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa z testem Dunn'a. W badaniu ekspresji genów zastosowano test ANOVA.



Poziom istotności (poziom p) stanowi malejący wskaźnik wiarygodności rezultatu. Im mniejsza liczba p (poziom istotności) tym jest większa różnica między grupami. Wartością graniczną poziomu istotności jest  $p < 0,05$ . Różnicę uznawano za istotną statystycznie jeśli  $p < 0,05$ , natomiast wysoce istotne różnice weryfikowano przy poziomie istotności  $p < 0,001$ .

W pracy zastosowano następujące symbole związane z analizą statystyczną:  
 $\bar{x}$  – średnia arytmetyczna,  
n – liczba badanych pacjentów,  
NS – nieistotne statystycznie,  
p – poziom istotności,  
SD – odchylenie standardowe.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Wyniki badania stomatologicznego pacjentów grupy 1A i 1B

Przeprowadzając badanie stomatologiczne jamy ustnej u 30 pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia dokonano oceny następujących wskaźników: płytki nazębnej (PI.I), dziąsłowego (GI), krwawienia ze szczeliny dziąsłowej (SBI), głębokości kieszonek (PPD) oraz klinicznej utraty przyczepu łącznotkankowego (CAL). Na podstawie uzyskanych wyników oraz w oparciu o analizę wskaźników wyznaczających kryteria zaawansowania choroby przyzębia wyodrębniono dwie grupy: grupę pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia (grupa 1A) w wieku 30–45 lat liczącą 15 pacjentów (8 kobiet i 7 mężczyzn) oraz grupę pacjentów z ciężkim zapaleniem przyzębia (grupa 1B) w wieku 30–50 lat liczącą 15 pacjentów (6 kobiet i 9 mężczyzn).

Uzyskane średnie wyników badanych wskaźników klinicznych zestawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Wartości wskaźników klinicznych (średnia  $\pm$  SD) u pacjentów z przewlekłym umiarkowanym (grupa 1A) i ciężkim (grupa 1B) zapaleniem przyzębia

Wskaźniki kliniczne	Grupa 1A n = 15	Grupa 1B n = 15
PI.I	2,22 $\pm$ 0,17	2,16 $\pm$ 0,22
GI	1,73 $\pm$ 0,29	2,35 $\pm$ 0,27*
SBI	1,89 $\pm$ 0,33	2,92 $\pm$ 0,41*
PPD	4,36 $\pm$ 0,22	7,03 $\pm$ 1,39*
CAL	3,84 $\pm$ 0,61	6,94 $\pm$ 1,23*

\* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupami

Analizując wyniki wskaźnika płytki nazębnej (PI.I) wykazano, że średnia wartość wskaźnika PI.I u pacjentów z umiarkowanym zapaleniem przyzębia (grupa 1A) wynosiła 2,22  $\pm$  0,17, a w grupie pacjentów z ciężkim zapaleniem przyzębia (grupa 1B) 2,16  $\pm$  0,22. Wartości te nie różniły się statystycznie.

Analizując wyniki wskaźnika dziąsłowego (GI) wykazano, że średnia wartość wskaźnika GI u pacjentów grupy 1A wynosiła 1,73  $\pm$  0,29, natomiast w grupie 1B 2,35  $\pm$  0,27. Wyniki te różniły się istotnie statystycznie.

Analizując wyniki wskaźnika krwawienia ze szczeliny dziąsłowej (SBI) wykazano, że średnia wartość wskaźnika SBI u pacjentów grupy 1A wynosiła  $1,89 \pm 0,33$ , natomiast w grupie 1B  $2,92 \pm 0,41$ . Wyniki te różniły się istotnie statystycznie.

Średnia głębokość kieszonek przyzębnych (PPD) oraz średnia utrata przyczepu łącznotkankowego (CAL) u pacjentów grupy 1A odpowiednio wynosiły:  $4,36 \pm 0,22$  i  $3,84 \pm 0,61$ . Średnia głębokość kieszonek przyzębnych (PPD) oraz średnia utrata przyczepu łącznotkankowego (CAL) u pacjentów grupy 1B odpowiednio wynosiły:  $7,03 \pm 1,39$  i  $6,94 \pm 1,23$ . Wyniki te różniły się istotnie statystycznie.

## 4.2. Wyniki badania stomatologicznego pacjentów grupy 2A i 2B

Przeprowadzając badanie stomatologiczne jamy ustnej u zakwalifikowanych 35 pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia dokonano oceny wskaźników: wskaźnika płytki nazębnej (Pl.I), wskaźnika dziąsłowego (GI), wskaźnika krwawienia ze szczeliny dziąsłowej (SBI) oraz głębokości kieszonek (PPD) i klinicznej utraty położenia przyczepu łącznotkankowego (CAL). Po dwóch tygodniach od wykonania zabiegów higienizacyjnych (skaling, root planing) wyodrębniono, na podstawie badania klinicznego, podgrupę 16 osób (podgrupa 2A), u których nie zastosowano tabletek probiotycznych oraz 19 osób (podgrupa 2B), które stosowały następnie dwa razy dziennie przez dziesięć dni tabletki do ssania zawierające szczep *Lactobacillus reuteri*, produkujący nadtlenek wodoru. Po dwóch tygodniach przeprowadzono trzecie badanie kliniczne, na podstawie którego wyodrębniono 14 osób z poprawą kliniczną (podgrupa PK) oraz 5 osób bez poprawy klinicznej (podgrupa BPK).

W grupie 2A stwierdzono istotne statystycznie obniżenie średnich wartości wszystkich ocenianych parametrów klinicznych (Pl.I, GI, SBI, PPD, CAL) w II terminie badania, po dwóch tygodniach od przeprowadzonych zabiegów higienizacyjnych. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w średnich wartościach pomiędzy II i III terminem badania klinicznego, co świadczy o utrzymywaniu się obniżonych wartości ocenianych parametrów. Uzyskane średnie wartości badanych Pl.I, GI, SBI, PPD, CAL zestawiono w tabelach 2. i 3.

W grupie 2B stwierdzono istotny statystycznie spadek średnich wartości wskaźników Pl.I oraz GI w II terminie badania klinicznego, natomiast nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w średnich wartościach parametrów klinicznych SBI, PPD i CAL. Obniżenie istotne statystycznie średnich wartości SBI, PPD i CAL uzyskano po 2 tygodniach od zastosowania przez pacjentów suplementu diety tabletek probiotycznych.

**Tabela 2.** Wartości wskaźników klinicznych (średnia  $\pm$  SD) u pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia grupy 2 i podgrupy 2A (pacjenci niestosujący tabletek probiotycznych)

Wskaźniki kliniczne	Termin badania		
	I	II	III
	Grupa 2 n = 35	Podgrupa 2A n = 16	Podgrupa 2A n = 16
PL.I	2,11 $\pm$ 0,26	1,35 $\pm$ 0,31*	1,61 $\pm$ 0,35*
GI	1,61 $\pm$ 0,27	1,21 $\pm$ 0,31*	1,08 $\pm$ 0,32*
SBI	1,89 $\pm$ 0,33	1,28 $\pm$ 0,34*	1,31 $\pm$ 0,32*
PPD	3,54 $\pm$ 0,35	3,09 $\pm$ 0,44*	3,02 $\pm$ 0,45*
CAL	3,62 $\pm$ 0,42	3,19 $\pm$ 0,35*	3,08 $\pm$ 0,33*

\* różnica istotna statystycznie względem terminu I.

**Tabela 3.** Wartości wskaźników klinicznych (średnia  $\pm$  SD) u pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia grupy 2 i podgrup: 2B, PK i PBK (pacjenci stosujący tabletki probiotyczne)

Wskaźniki kliniczne	Termin badania			
	I	II	III	
	Grupa 2 n = 35	Podgrupa 2B n = 19	Podgrupa PK n = 14	Podgrupa PBK n = 5
PL.I	2,11 $\pm$ 0,26	1,56 $\pm$ 0,26*	1,67 $\pm$ 0,23*	1,72 $\pm$ 0,31*
GI	1,61 $\pm$ 0,27	1,31 $\pm$ 0,32*	1,19 $\pm$ 0,33*	1,24 $\pm$ 0,28*
SBI	1,89 $\pm$ 0,33	1,66 $\pm$ 0,36	1,27 $\pm$ 0,34**	1,62 $\pm$ 0,41
PPD	3,54 $\pm$ 0,35	3,23 $\pm$ 0,28	3,01 $\pm$ 0,38*	3,19 $\pm$ 0,36
CAL	3,62 $\pm$ 0,42	3,45 $\pm$ 0,38	3,11 $\pm$ 0,24*	3,51 $\pm$ 0,29

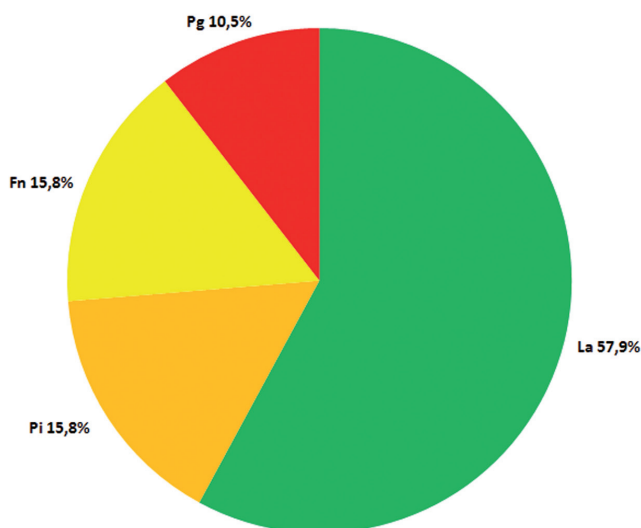
\* różnica istotna statystycznie względem terminu I.

\*\* różnica istotna statystycznie względem terminu I oraz pomiędzy terminem II i III w danej grupie pacjentów

### 4.3. Wyniki badań mikrobiologicznych

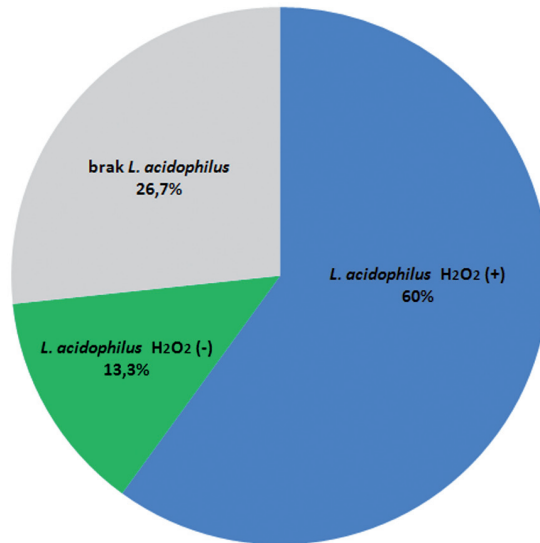
W grupie 1A (pacjenci z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia) pałeczki *Lactobacillus spp.* łącznie występowały u 11 osób (73,3%). U 9 pacjentów stwierdzono *Lactobacillus* produkujący nadtlenek wodoru. Jedynie u 5 z tych osób wykazano obecność periopatogenów, w tym *Porphyromonas gingivalis* u 2 osób (13,3%), przy czym u jednej osoby występował *Lactobacillus* nieprodukujący nadtlenku wodoru, zaś u drugiej nie stwierdzono *Lactobacillus*. *Prevotella intermedia* i *Fusobacterium nucleatum* stwierdzono u 3 osób (odpowiednio po 20%), w tym u jednej współwystępował *Lactobacillus* nieprodukujący nadtlenku wodoru.

Wyniki oceny występowania i identyfikacji gatunkowej periopatogenów oraz bakterii *Lactobacillus spp.* w kieszonkach przyzębnych pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia przedstawiono na rycinach 5. i 6.



**Pg** – *Porphyromonas gingivalis*, **Fn** – *Fusobacterium nucleatum*,  
**Pi** – *Prevotella intermedia*, **La** – *Lactobacillus acidophilus*

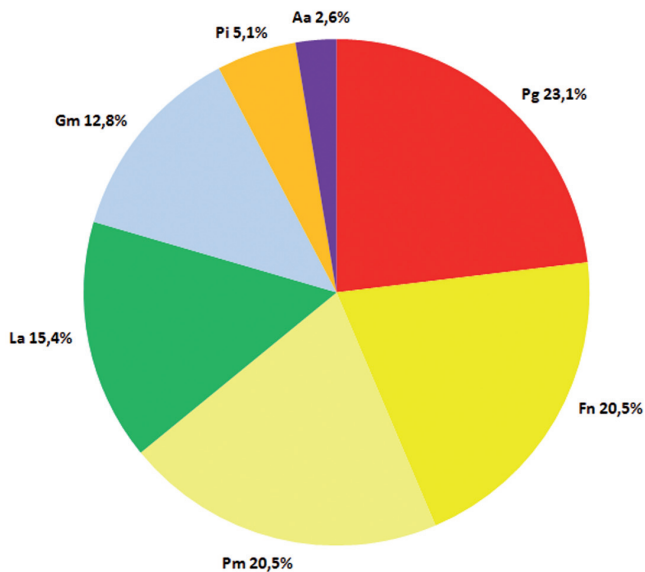
**Ryc. 5.** Odsetki poszczególnych gatunków bakterii w stosunku do całkowitej liczby gatunków wykrywanych w kieszonkach przyzębnych pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia.



**Ryc. 6.** Występowanie *Lactobacillus* spp. w kieszonkach przyzębnych oraz identyfikacja gatunkowa i zdolność do wytwarzania nadtlenu wodoru u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia.

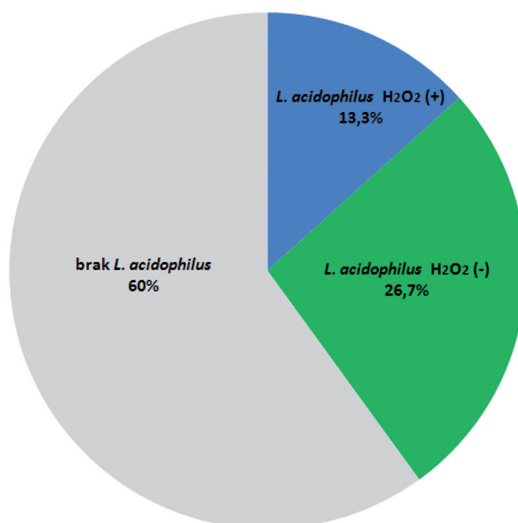
W grupie 1B (pacjenci z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia) występowanie *Lactobacillus* stwierdzono u 6 osób (40%), przy czym tylko u 2 z nich był to szczep produkujący nadtlenek wodoru. Z kolei występowanie periopato-genów stwierdzono w tej grupie pacjentów u 11 osób, w tym *Porphyromonas gingivalis* u 9 osób (60%), z czego u 2 z *Lactobacillus* nieprodukującym nadtlenu wodoru, *Prevotella intermedia* u 2 osób (13,3%) z *Lactobacillus* nieprodukującym nadtlenu wodoru oraz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u 1 osoby (6,7%). W grupie 1B stwierdzono również obecność *Fusobacterium nucleatum* u 8 osób (53,3%), *Parvimonas micra* u 8 osób (53,3%) oraz *Gemella morbillorum* u 5 osób (33,3%).

Wyniki oceny występowania i identyfikacji gatunkowej periopato-genów oraz bakterii *Lactobacillus* spp. w kieszonkach przyzębnych pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia przedstawiono na rycinach 7. i 8.



**Pg** – *Porphyromonas gingivalis*, **Fn** – *Fusobacterium nucleatum*,  
**Pm** – *Parvimonas micra*, **La** – *Lactobacillus acidophilus*,  
**Gm** – *Gemella morbillorum*, **Pi** – *Prevotella intermedia*,  
**Aa** – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

**Ryc. 7.** Odsetki poszczególnych gatunków bakterii w stosunku do całkowitej liczby gatunków wykrywanych w kieszonkach przyzębnych pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.



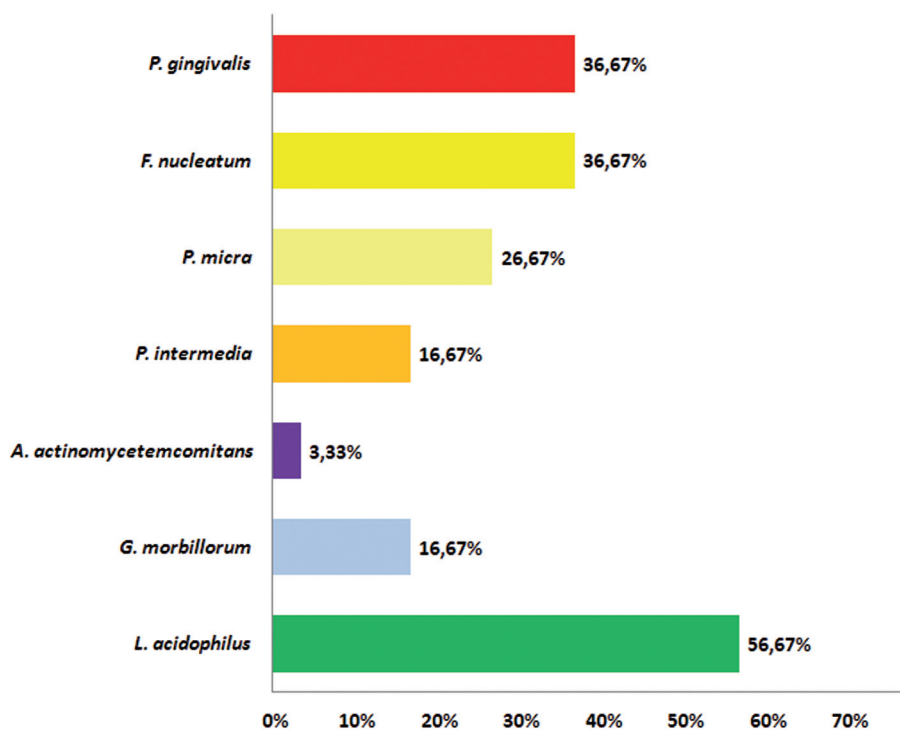
**Ryc. 8.** Występowanie *Lactobacillus* spp. w kieszonkach przyzębnych oraz identyfikacja gatunkowa i zdolność do wytwarzania nadtlenu wodoru u chorych z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.

Wśród badanych pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia największy odsetek bakterii patogennych stanowiły *Porphyromonas gingivalis* (36,67%), *Fusobacterium nucleatum* (36,67%) oraz *Parvomonas micra* (26,67%). Natomiast sporadycznie występowały gatunki: *Prevotella intermedia* (16,67%), *Gemella morbillorum* (16,67%) oraz *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* (3,33%).

Zestawienie procentowe występowania poszczególnych gatunków bakterii w kieszonkach przyzębnych pacjentów z umiarkowanym i ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia przedstawiono na rycinie 9.

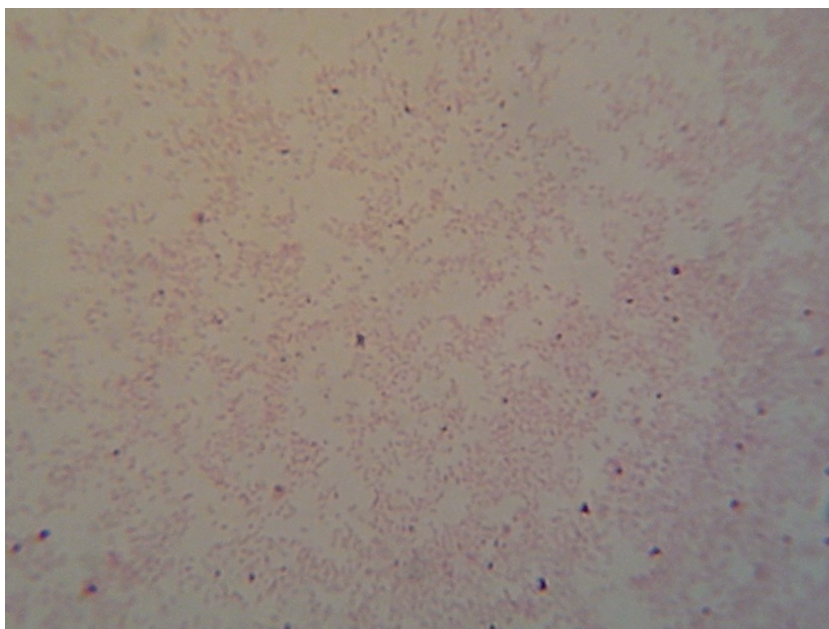
Na fotografiach 7–15 przedstawiono obrazy mikroskopowe oraz hodowle bakterii.

Fotografia 14. przedstawia *L. acidophilus* produkujący nadtlenek wodoru, natomiast na fotografii 15. pokazano *L. acidophilus* niewytwarzający nadtlenu wodoru.

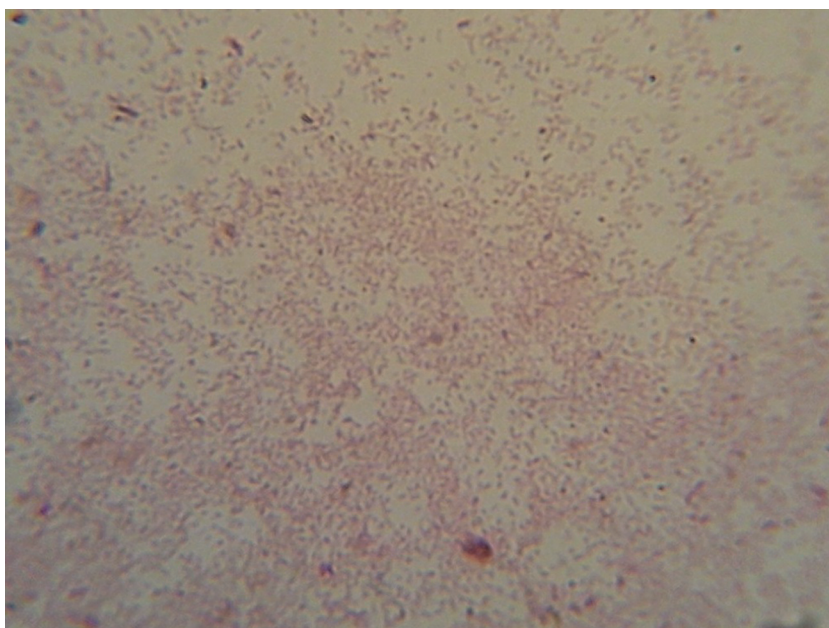


Ryc. 9. Graficzne zestawienie występowania (w %) poszczególnych gatunków bakterii w kieszonkach przyzębnych u chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia.

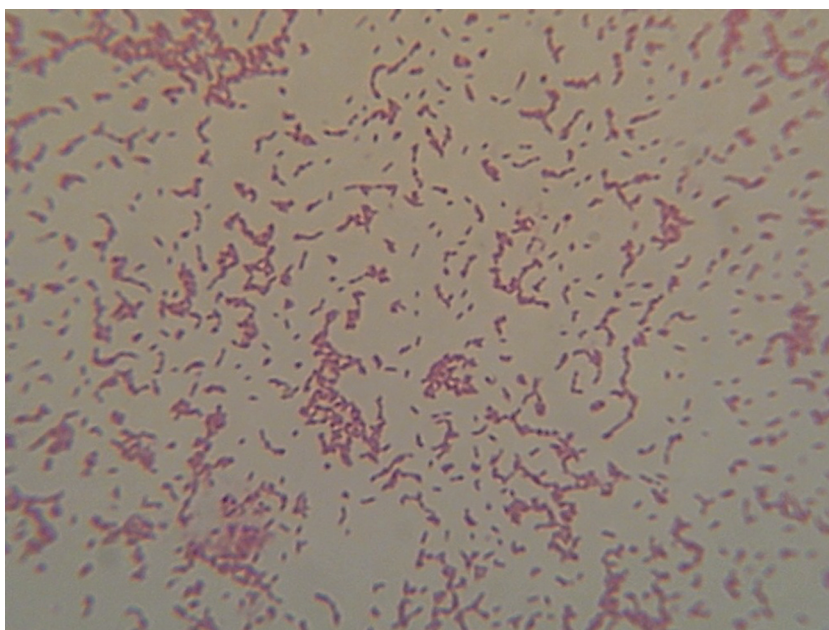




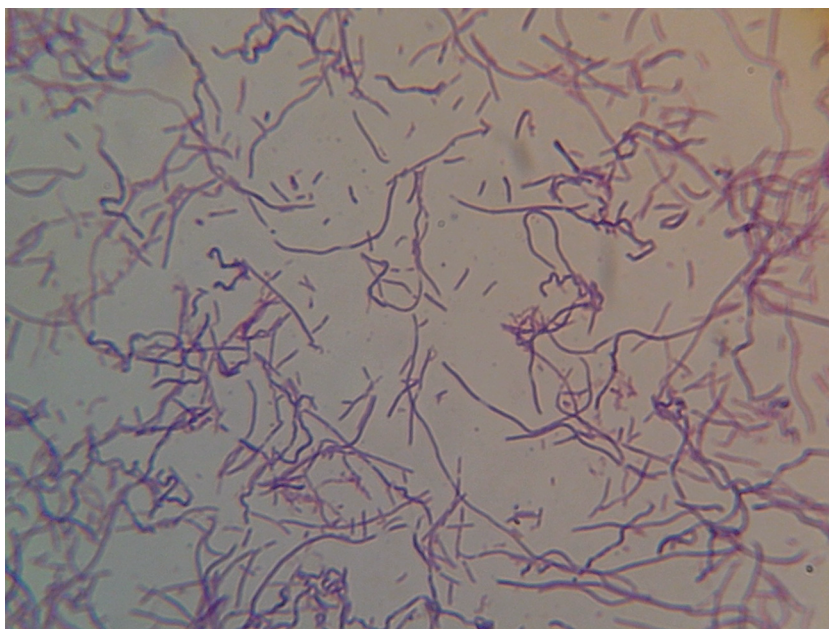
**Fot. 7.** *Porphyromonas gingivalis* w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama (pow. 1000×).



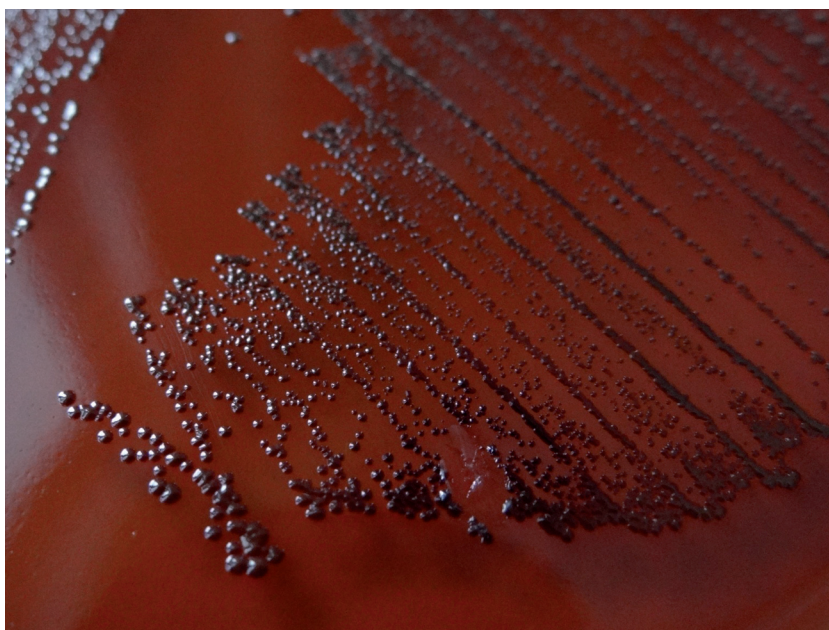
**Fot. 8.** *Prevotella intermedia* w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama (pow. 1000×).



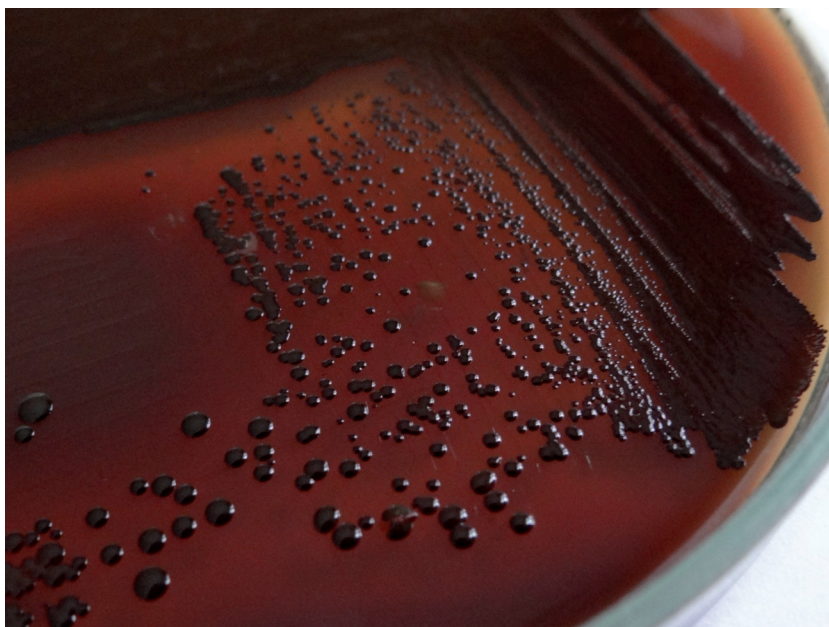
**Fot. 9.** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama (pow. 1000×).



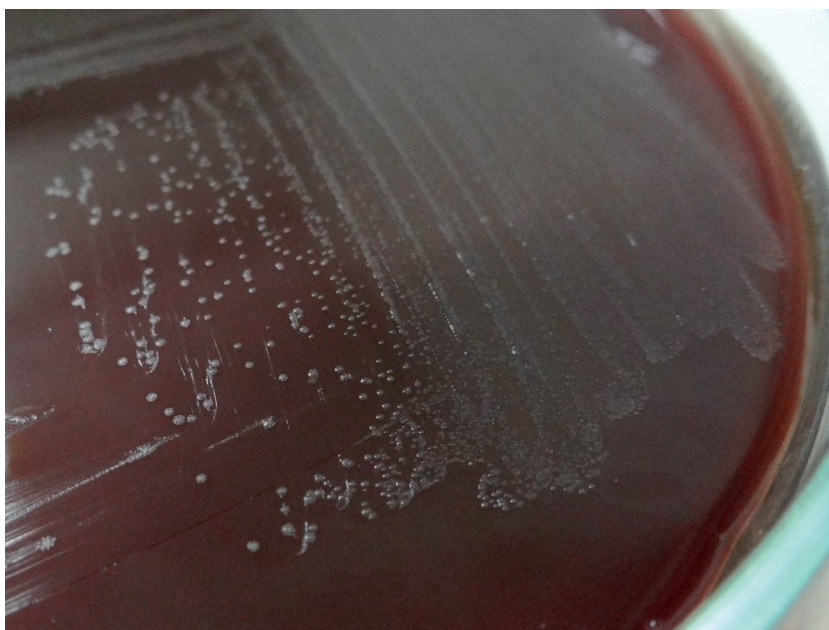
**Fot. 10.** *Lactobacillus acidophilus* w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama (pow. 1000×).



Fot. 11. Szczep *Prevotella intermedia* na podłożu Columbia Agar.



Fot. 12. Szczep *Porphyromonas gingivalis* na podłożu Columbia Agar.



Fot. 13. Szczep *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na podłożu Columbia Agar.



Fot. 14. Szczep *Lactobacillus acidophilus* wytwarzający nadtlenek wodoru na podłożu różnicującym TMB-Plus.



Fot. 15. Szczep *Lactobacillus acidophilus* niewytwarzający nadtlenu wodoru na podłożu różniującym TMB-Plus.

#### 4.4. Wyniki badań poziomu cytokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ i IL-17 u chorych z przewlekłym zapaleniem przyzębia

W grupie 1 poziomy cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) w płynie dziąsłowym były istotnie wyższe w grupie pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia (grupa 1B) niż w grupie pacjentów z umiarkowanym zapaleniem (grupa 1A). Wyniki poziomów TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17 w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 1 przedstawiono w tabeli 4.

W grupie 2 po zabiegach higienizacyjnych u 16 pacjentów (podgrupa 2A) stwierdzono istotne statystycznie obniżenie średnich wartości poziomów cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) w płynie dziąsłowym. U pozostałych 19 pacjentów (podgrupa 2B) nie stwierdzono statystycznych zmian w poziomach cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) w płynie dziąsłowym. Po 2 tygodniach od zastosowania tabletek probiotycznych u 14 osób (74%) stwierdzono istotne statystycznie obniżenie średnich wartości poziomów badanych cytokin. Wyniki poziomów TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17 w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2 przedstawiono w tabelach 5., 6. i 7. oraz na rycinach 10., 11. i 12. Na podstawie uzyskanych

wyników badania płynu dziąsłowego w terminie I wyznaczono wartości graniczne dla badanych cytokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17, które wynosiły odpowiednio 4,01, 16,3 i 12,04 (stanowiąc liczby uzyskane przez odjęcie dwukrotnego odchylenia standardowego od wartości średniej w I terminie badania).

**Tabela 4.** Poziomy cytokin w pg/ml (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 1

Badane grupy	TNF- $\alpha$ pg/ml	IL-1 $\beta$ pg/ml	IL-17 pg/ml
Pacjenci z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia (podgrupa 1A, n = 15)	4,95 $\pm$ 0,91	20,3 $\pm$ 3,1	19,66 $\pm$ 6,1
Pacjenci z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia (podgrupa 1B, n = 15)	6,94 $\pm$ 0,78	26,7 $\pm$ 3,8	34,7 $\pm$ 6,65

**Tabela 5.** Poziomy TNF- $\alpha$  w pg/ml w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2

Termin badania	Grupy pacjentów	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Termin I	Grupa 2	6,0 $\pm$ 0,98
Termin II	Podgrupa 2A	4,12 $\pm$ 0,72*
	Podgrupa 2B	5,48 $\pm$ 0,96
Termin III	Podgrupa PK	2,37 $\pm$ 0,83*
	Podgrupa BPK	5,44 $\pm$ 0,7

\*różnica istotna statystycznie względem terminu I.

**Tabela 6.** Poziomy IL-1 $\beta$  w pg/ml w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2

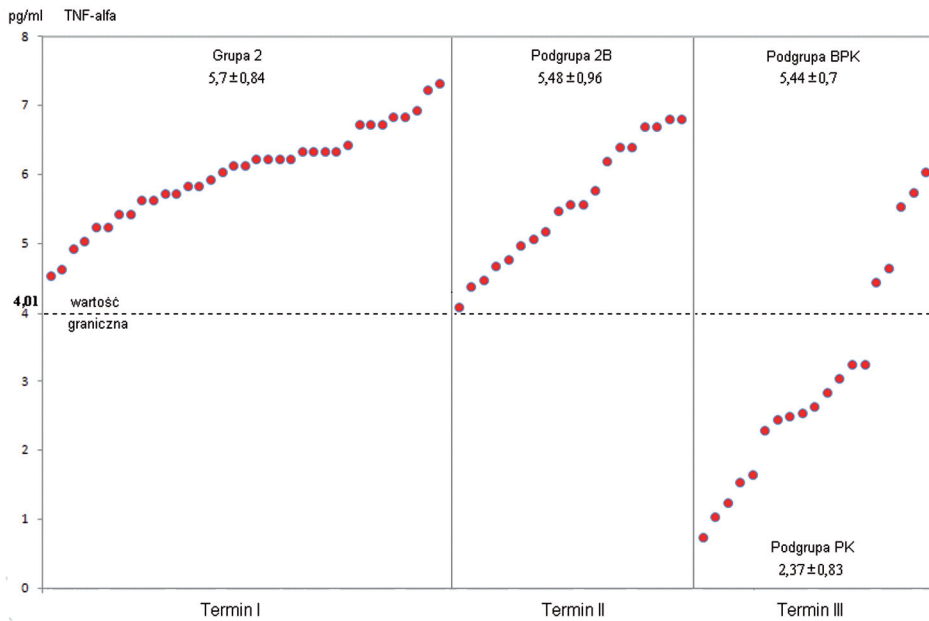
Termin badania	Grupy pacjentów	IL-1 $\beta$ (pg/ml)
Termin I	Grupa 2	21,1 $\pm$ 2,5
Termin II	Podgrupa 2A	11,5 $\pm$ 2,21*
	Podgrupa 2B	20,6 $\pm$ 2,67
Termin III	Podgrupa PK	6,96 $\pm$ 1,45*
	Podgrupa BPK	19,8 $\pm$ 1,83

\*różnica istotna statystycznie względem terminu I.

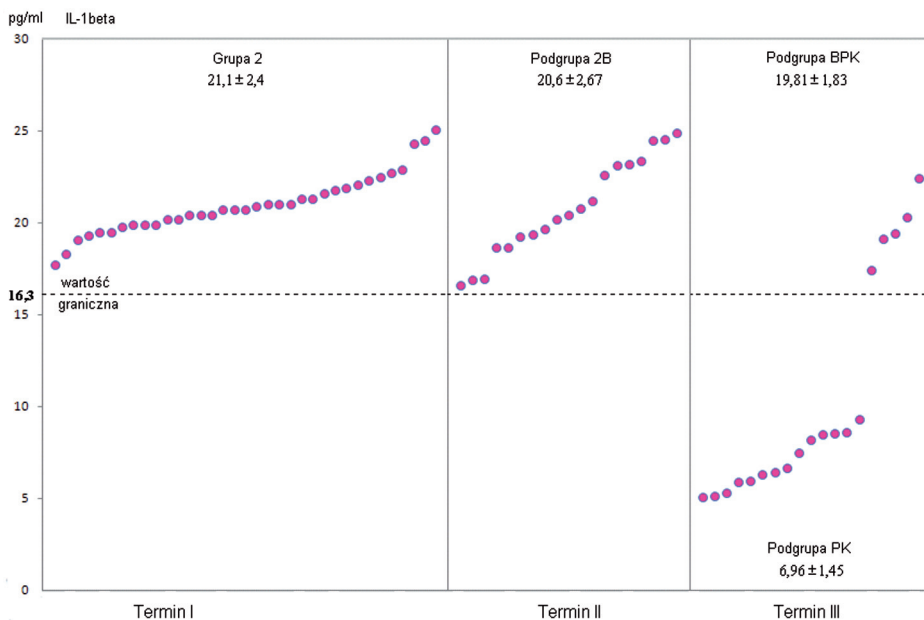
**Tabela 7.** Poziomy IL-17 w pg/ml w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2

Termin badania	Grupy pacjentów	IL-17 (pg/ml)
Termin I	Grupa 2	18,88 $\pm$ 3,37
Termin II	Podgrupa 2A	12,3 $\pm$ 2,17*
	Podgrupa 2B	17,63 $\pm$ 3,27
Termin III	Podgrupa PK	9,23 $\pm$ 1,8*
	Podgrupa BPK	16,36 $\pm$ 2,34

\*różnica istotna statystycznie względem terminu I.

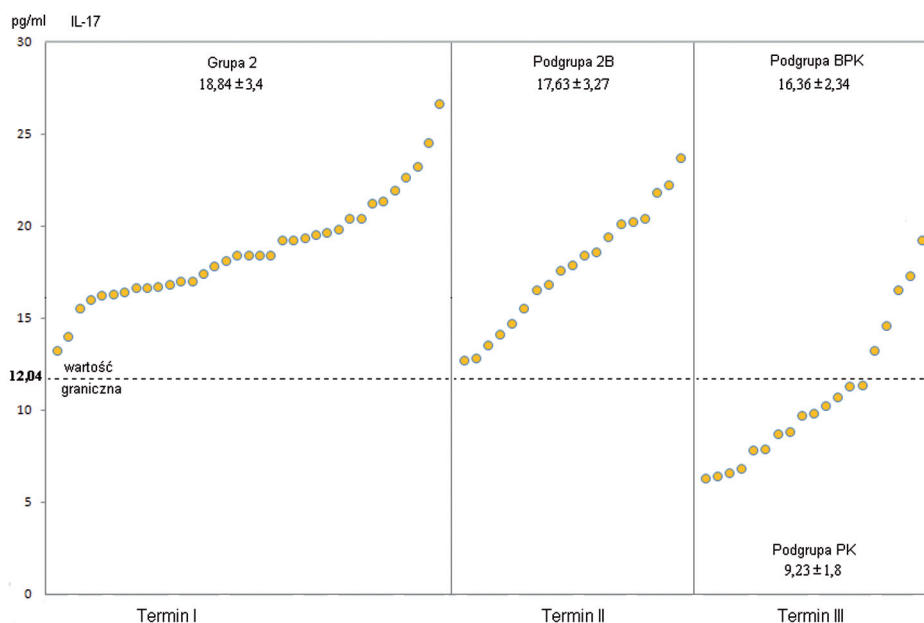


**Ryc. 10.** Poziomy cytokiny TNF- $\alpha$  w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2 w poszczególnych terminach badania.



**Ryc. 11.** Poziomy cytokiny IL-1 $\beta$  w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2 w poszczególnych terminach badania.





**Ryc. 12.** Poziomy cytokiny IL-17 w płynie dziąsłowym pacjentów grupy 2 w poszczególnych terminach badania.

#### 4.5. Wyniki badania wpływu supernatantów z hodowli wybranych szczepów periopatogenów na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych

Do badań wpływu supernatantów z hodowli bakterii na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych wykorzystano 15 szczepów periopatogenów wyizolowanych od pacjentów, w tym 10 szczepów *Porphyromonas gingivalis*, 4 szczep *Prevotella intermedia* i 1 szczep *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Zmiany w poziomie ATP w fibroblastach dziąsłowych HGF-1 pod wpływem supernatantów każdego z wyizolowanych szczepów bakterii przedstawiono jako średnie uzyskanych wyników.

W badaniach stwierdzono istotny statystycznie spadek poziomu ATP pod wpływem supernatantów ze szczepów *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nieogrzewanych oraz ogrzewanych w temp. 56°C. Supernatanty uzyskane z hodowli tych bakterii poddane ogrzewaniu w 100°C nie powodowały zmniejszenia poziomu ATP w fibroblastach dziąsłowych. Z kolei,

poziom ATP pod wpływem supernatantów ze szczepów *Prevotella intermedia* nie różnił się istotnie od wartości kontrolnych (Tab. 8., Ryc. 13.).

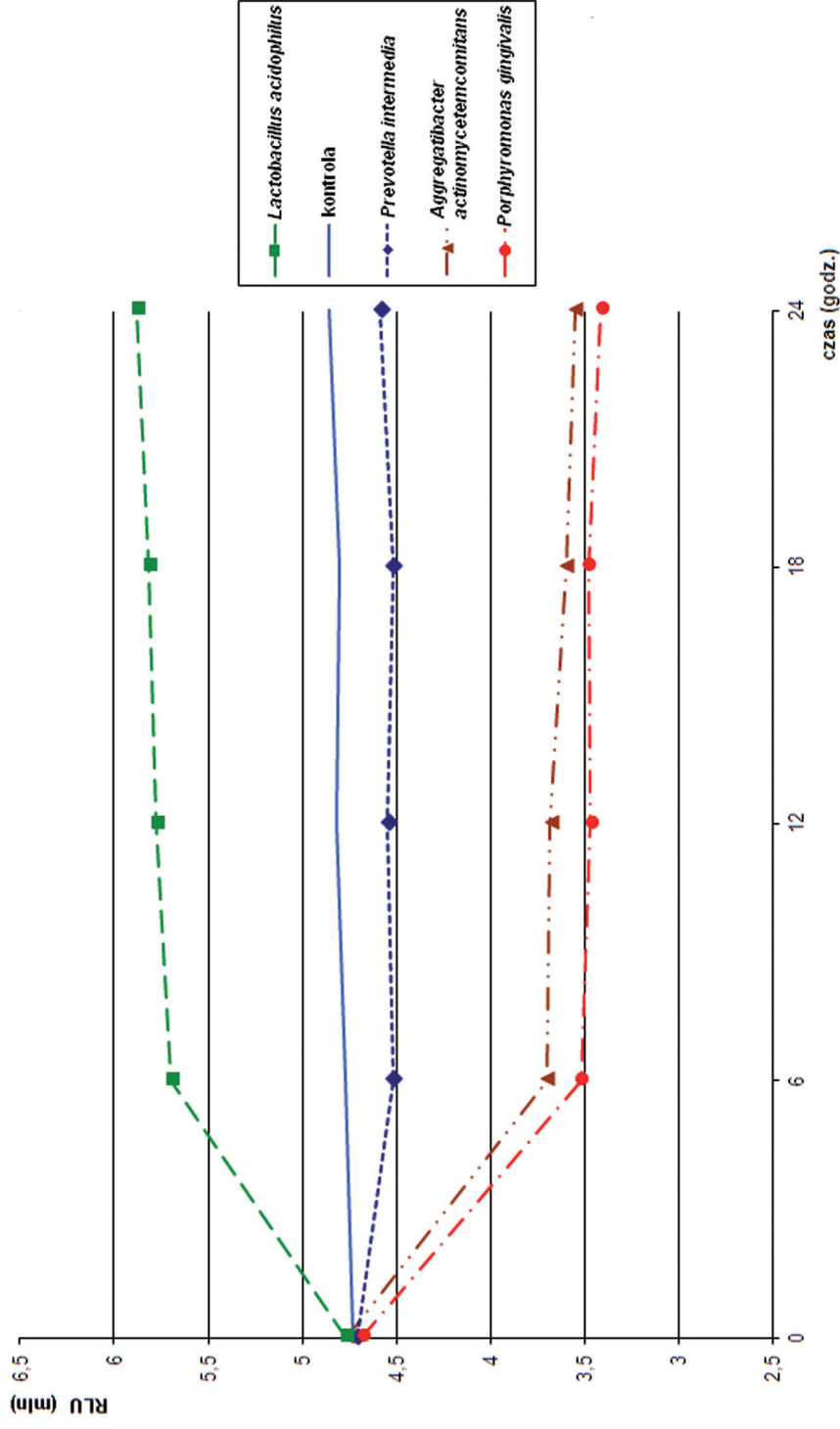
**Tabela 8.** Średnie poziomy ATP (luminescencja w mln RLU) w hodowlach fibroblastów dziąsłowych HGF-1 po 24 h inkubacji z supernatantami badanych periopatogenów

Badane komórki	Supernatanty nieogrzewane	Supernatanty ogrzewane w temp. 56°C przez 30 minut	Supernatanty ogrzewane w temp. 100°C przez 30 minut
	Średnia ± SD		
Kontrola (fibroblasty dziąsłowe HGF-1) z 10% PBS	4,90 ± 0,32	4,86 ± 0,31	4,79 ± 0,28
HGF-1 z 10% supernatantem <i>P. intermedia</i>	4,59 ± 0,27	4,78 ± 0,29	4,81 ± 0,26
HGF-1 z 10% supernatantem <i>A. actinomycetemcomitans</i>	3,55* ± 0,3	3,61* ± 0,25	4,64 ± 0,34
HGF-1 z 10% supernatantem <i>P. gingivalis</i>	3,41* ± 0,33	3,48* ± 0,31	4,57 ± 0,29

\* różnica istotna statystycznie względem grupy kontrolnej.

#### 4.6. Wyniki badania wpływu supernatantów z hodowli szczepów klinicznych *Lactobacillus acidophilus* na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych

Do badań wpływu supernatantów z hodowli bakterii na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych wykorzystano 10 szczepów *Lactobacillus acidophilus* wyizolowanych od pacjentów, w tym 4 szczepy produkujące nadtlenek wodoru i 6 szczepów nieprodukujących nadtlenku wodoru. Supernatanty nieogrzewane oraz ogrzewane w temp. 56°C, uzyskane ze szczepów *Lactobacillus acidophilus*, spowodowały istotny statystycznie wzrost poziomu ATP, natomiast supernatanty ogrzewane w temp. 100°C nie powodowały wzrostu poziomu ATP w fibroblastach dziąsłowych HGF-1 (Tab. 9., Ryc. 13.). Jednocześnie dokonano oceny dynamiki zmian poziomów ATP w fibroblastach dziąsłowych w następstwie ich inkubacji z supernatantami z hodowli analizowanych bakterii. Stwierdzono, że pod wpływem supernatantów z hodowli



**Ryc. 13.** Średnie poziomy ATP (luminescencja w mln RLU) w hodowlach fibroblastów dziąsłowych HGF-1 w czasie zerowym oraz po 6-, 12-, 18- i 24-godzinnej inkubacji z supernatantami otrzymanymi z hodowli badanych bakterii.

*A. actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis* następuje istotne obniżenie poziomu ATP już po 6 godzinach i utrzymuje się przez okres 24 godzin (Ryc. 13.). Z drugiej strony supernatanty z hodowli *P. intermedia* nie wykazywały wpływu na poziomy ATP w fibroblastach dziąsłowych. Z kolei supernatanty z hodowli *L. acidophilus* istotnie zwiększały poziom ATP w fibroblastach dziąsłowych już po 6 godzinach, a efekt ten utrzymywał się przez okres 24 godzin.

**Tabela 9.** Średnie poziomy ATP (luminescencja w mln RLU) w hodowlach fibroblastów dziąsłowych HGF-1 po 24 h inkubacji z supernatantami *Lactobacillus acidophilus*

Badane komórki	Supernatanty nieogrzewane	Supernatanty ogrzewane w temp. 56°C przez 30 minut	Supernatanty ogrzewane w temp. 100°C przez 30 minut
	Średnia ± SD		
Kontrola (fibroblasty dziąsłowe HGF-1) z 10% PBS	4,90 ± 0,32	4,86 ± 0,31	4,79 ± 0,28
HGF-1 z 10% supernatantem <i>L. acidophilus</i> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (+)	5,94* ± 0,31	5,87* ± 0,29	4,29 ± 0,35
HGF-1 z 10% supernatantem <i>L. acidophilus</i> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (-)	5,88* ± 0,28	5,94* ± 0,34	4,37 ± 0,38

\* różnica istotna statystycznie względem grupy kontrolnej.

## 4.7. Wyniki analizy ekspresji wybranych genów

Wyniki analizy ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (*TNFAIP*, *IL1β*, *IL6*, *IL12* i *IL17*) oraz cytokiny przeciwzapalnej (*IL10*) zestawiono w tabeli 10. Nie stwierdzono wpływu supernatantów z hodowli bakterii na zmianę poziomu ekspresji badanych genów związanych z cytokinami.

W badaniach wykazano wzrost ekspresji genu antyproliferacyjnego *BTG2* pod wpływem supernatantów z hodowli bakterii *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* oraz *P. gingivalis*.

**Tabela 10.** Wpływ supernatantów z hodowli bakterii na zmianę poziomu ekspresji genów związanych z cytokinami w badanych fibroblastach dziąsłowych HGF-1

Supernatant z hodowli bakterii	Badane geny dla cytokin					
	<i>TNFAIP</i>	<i>IL1<math>\beta</math></i>	<i>IL6</i>	<i>IL12</i>	<i>IL17</i>	<i>IL10</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
<i>Prevotella intermedia</i>	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Wyniki analizy ekspresji genu *BTG2* związanego z proliferacją badanych fibroblastów dziąsłowych HGF-1 przedstawiono w tabeli 11.

**Tabela 11.** Wpływ supernatantów z hodowli bakterii na zmianę poziomu ekspresji genu związanego z proliferacją badanych fibroblastów dziąsłowych HGF-1

Supernatant z hodowli bakterii	Gen <i>BTG2</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	↑3,3 (+ 330%) wzrost ekspresji p = 0,011
<i>Prevotella intermedia</i>	↑2,9 (+ 290%) wzrost ekspresji p = 0,009
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	↑4,2 (+420%) wzrost ekspresji p = 0,004
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NS p > 0,05

## 5. DYSKUSJA

W jamie ustnej występuje blisko 700 gatunków bakterii, grzyby z rodzaju *Candida*, a także sporadycznie pierwotniaki. W populacji bakterii jamy ustnej bakterie beztlenowe przewyższają liczebnie bakterie tlenowe w stosunku 10:1. Dominującymi są następujące bakterie: *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, dyfteroidy, *Lactobacillus spp.* i *Actinomyces spp.* [119, 205]. Różnorodność powierzchni, powodowana fizycznymi i biologicznymi właściwościami, stwarza warunki do powstania odrębnych środowisk. Obejmują one czerwień wargową, nabłonek policzkowy, powierzchnię języka, ślinę, powierzchnie naddziąsłowe, powierzchnie poddziąsłowe zębów oraz nabłonka szczelin i kieszonek poddziąsłowych. Jakość i liczebność flory bakteryjnej jamy ustnej jest zależna w znacznym stopniu od składu i ilości wytwarzanej śliny. Ogromne znaczenie mają także wzajemne stosunki antagonistyczne i synergiczne między poszczególnymi rodzajami i gatunkami tworzącymi stałą mikroflorę jamy ustnej.

Skład mikroflory jamy ustnej jest różny w poszczególnych częściach jamy ustnej. Na błonach śluzowych czerwieni wargowej występują głównie ziarenkowce z rodzaju *Micrococcus* i *Staphylococcus*. Na powierzchniach błony śluzowej przedsionka jamy ustnej występują najczęściej paciorkowce, pałeczki Gram-dodatnie z rodzaju *Actinomyces*. Przyjmuje się, że na pojedynczej komórce nabłonka policzka występuje od 5 do 25 drobnoustrojów. Powierzchnia języka wykazuje duże zróżnicowanie mikroflory bakteryjnej; na jednej komórce nabłonka języka może występować ok. 100 bakterii. Dominującą rolę odgrywają tu paciorkowce, beztlenowce z rodzaju *Parvimonas* oraz beztlenowce czarno pigmentujące *P. intermedia*, jak również pałeczki Gram-ujemne z rodzaju *Haemophilus*. Mikroflora śliny jest szczególnie zróżnicowana, występuje w niej  $10^8$  bakterii/1 ml. Powierzchnie zębów wykazują różnice w podatności na kolonizację przez określoną mikroflorę jamy ustnej. Występują tu przede wszystkim paciorkowce, bakterie z rodzaju *Actinomyces* oraz sporadycznie pałeczki Gram-ujemne z rodzaju *Haemophilus*. W szczelinie dziąsłowej stwierdza się natomiast więcej gatunków drobnoustrojów niż w innych miejscach jamy ustnej, ale liczba bakterii jest mniejsza ( $10^3$ – $10^6$  bakterii/szczelina dziąsłowa). Dominują głównie bezwzględne beztlenowce w większości Gram-ujemne [1, 40, 105, 120, 138].

W etiologii chronic periodontitis uznaje się istotny udział bakterii beztlenowych jamy ustnej, w szczególności *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* oraz *Treponema denticola* [72]. Do ważnych klinicznie periopatogenów zalicza się również *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, gatunek fakultatywnych beztlenowców [69,

70]. Dotychczasowe badania wykazały, że bakterie płytki wywierają toksyczne działanie na fibroblasty, komórki nabłonka i śródbłonka oraz na elementy substancji pozakomórkowej. Mogą również oddziaływać na komórki układu immunologicznego, pobudzają je do uwalniania mediatorów reakcji zapalnych [176, 191, 192, 212].

Identyfikacja bakterii patogennych w chorobie przyzębia jest trudna. W wykrywaniu periopatogenów zwykle stosowane są metody biologii molekularnej, najczęściej metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Najważniejszą zaletą techniki PCR jest bardzo duża czułość. Wynik pozytywny można już uzyskać z ok. 1 fg DNA [86, 123, 131, 137, 150].

Ponadto, metodą PCR wykrywa się periopatogeny trudne w hodowli lub wymagające specjalistycznych podłoży (np. *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) [170]. Jednak wyniki badań za pomocą PCR mogą być także fałszywie negatywne lub fałszywie dodatnie. Fałszywie negatywne wyniki są najczęściej rezultatem hamowania aktywności polimerazy *Thermus aquaticus* (Taq) przez inhibitory zawarte w badanej próbce. Bardzo duża czułość metody PCR jest jednocześnie najczęstszą przyczyną uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich poprzez wykrywanie „obcego” DNA wprowadzonego do próbki. Dobrze już udokumentowano, że ok. 20% próbek śliny pochodzących od pacjentów zawiera inhibitory reakcji PCR [127, 133]. Dlatego metoda PCR nadal nie jest powszechnie stosowana w diagnostyce chorób przyzębia. Z kolei rozpoznanie choroby i jej aktywności opiera się nadal na ocenie wskaźników klinicznych (GI, PPD, CAL), których międzynarodowe kryteria stanowią rekomendacje diagnostyczne [154, 211].

W mojej pracy do wykrywania periopatogenów i bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w przewlekłym zapaleniu przyzębia zastosowałam metodę hodowli. Metodę tę uznaje się jako „złoty standard” w diagnostyce bakteriologicznej, gdyż charakteryzuje się wprawdzie tylko około 50% czułością, jednak blisko 100% swoistością. W badaniach porównujących czułość i swoistość techniki PCR oraz metody hodowli w odniesieniu do czterech istotnych periopatogenów (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* i *A. actinomycetemcomitans*) wykazano, że średnia czułość techniki PCR wynosi 79,4% (zakres 46,3–99,6) a specyficzność 63,4% (zakres 28,6–90,1). Natomiast metoda hodowli charakteryzuje się rzeczywiście niższą czułością, która wynosi 59,6% (zakres 23,8–98,4), ale jednak wyższą specyficznością 85,1% (zakres 62,5–98,7) [17, 39, 83, 103, 127]. W związku z tym w badaniach metodą PCR uzyskuje się wyższy odsetek i szerszy zakres wykrywanych periopatogenów. W badaniach Nędzy-Góry i wsp. [129] w kieszonkach przyzębnych pacjentów wykryto wszystkie z 9 badanych periopatogenów (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *E. corrodens*, *C. rectus*,

*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. micros*, *T. denticola*). W kieszonkach przyzębnych badanych pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia najczęściej wykrywano *Fusobacterium nucleatum* (37,35%), *Porphyromonas gingivalis* (15,67%) oraz *Peptostreptococcus micros* (14,74%). Natomiast sporadycznie wykrywano *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (1,93%). W badaniach Abiko i wsp. najczęściej wykrywanymi periopatogenami był *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythia* (43%) [2].

W mojej pracy przeprowadziłam badania bakteriologiczne w kontekście aktywności procesu chorobowego z uwzględnieniem bakterii *Lactobacillus spp.* W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia najczęściej wykrywanymi periopatogenami w stosunku do całkowitej liczby wykrywanych bakterii były gatunki bezwzględnych beztlenowców: *Prevotella intermedia* (15,8%), *Fusobacterium nucleatum* (15,8%). Z kolei w ciężkim przewlekłym zapaleniu przyzębia najczęściej wykrywanymi periopatogenami w stosunku do całkowitej liczby wykrywanych bakterii były gatunki bezwzględnych beztlenowców: *Porphyromonas gingivalis* (23,1%), *Fusobacterium nucleatum* (20,5%) oraz *Parvimonas micra* (20,5%). Ponadto wykrywano również *Gemella morbillorum* (12,8%), *Prevotella intermedia* (5,1%) oraz *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (2,6%). Uzyskane dane wskazują, że w ciężkim przewlekłym zapaleniu przyzębia szerszy jest zakres wykrywanych periopatogenów, wśród których dominuje *P. gingivalis*. W tej postaci choroby stwierdzono także obecność gatunku *Gemella morbillorum* (12,8%). Występowanie tego patogenu w chronic periodontitis opisali także inni autorzy [98, 99]. Szczepy tego patogenu należą do rodzaju *Gemella*, względnych beztlenowców, które jednak preferują warunki atmosfery beztlenowej; posiadają zdolność wytwarzania fosfatazy alkalicznej. Dobrze znane są już wyniki badań klinicznych wykazujące dodatnią korelację pomiędzy zawartością tego enzymu w płynie dziąsłowym a głębokością kieszonki [80]. Uzyskane zatem wyniki w tej pracy potwierdzają zasadność uznania gatunku *Gemella morbillorum* jako periopatogenu.

W zestawieniu łącznym obu badanych postaci przewlekłego zapalenia przyzębia najczęściej wykrywanymi bakteriami w kieszonkach przyzębnych u chorych były gatunki: *P. gingivalis* (36,67%), *F. nucleatum* (36,67%) oraz *P. micra* (26,67%). Wyniki te są częściowo zgodne z rezultatami badań molekularnych. W kontraście do tych danych, Nędzi-Góra i wsp. [129] wykrywali występowanie *P. gingivalis* jedynie u 15,67% chorych. Jednak w cytowanej pracy przeprowadzono badania materiału uzyskiwanego jedynie z dwóch kieszonek przyzębnych pacjenta. W mojej pracy materiał badawczy stanowił próbkę zbiorczą płynu dziąsłowego z wszystkich kieszonek przyzębnych pacjenta. Możliwym jest więc, że poszczególne kieszonki przyzębne są kolonizowane przez różne periopatogeny,



które mogą zostać wykryte w badaniach pobranego płynu dziąsłowego z wszystkich kieszonek przyzębnych.

Ponadto, w doświadczeniach *in vitro* stwierdzono, że szczepy kliniczne *Lactobacillus acidophilus* oddziałują antagonistycznie wobec periopatogenów *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* i *Prevotella intermedia*, hamując ich wzrost [6, 95]. Jednocześnie w tej pracy poddano ocenie występowanie szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* w kieszonkach przyzębnych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, szczególnie w kontekście aktywności procesu chorobowego. Stwierdzono zróżnicowanie występowania pałeczek *Lactobacillus acidophilus* u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz u chorych z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia. W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia stwierdzono wysoki odsetek (57,9%) pałeczek *Lactobacillus acidophilus*. Nadtlenek wodoru produkowało 60% pałeczek kwasu mlekowego. Natomiast w ciężkim przewlekłym zapaleniu pałeczki *Lactobacillus acidophilus* stanowiły 15,4% wszystkich wyhodowanych bakterii. Jednocześnie 13,3% pałeczek produkowało nadtlenek wodoru. Wykazane różnice w odsetkach szczepów *Lactobacillus acidophilus* produkujących nadtlenek wodoru w obu postaciach choroby były statystycznie istotne.

Dane te wskazują, że rozwój chronic periodontitis może być determinowany nie tylko kolonizacją przyzębia przez potencjalne patogeny – periopatogeny, ale także brakiem obecności szczepów *Lactobacillus* wytwarzających nadtlenek wodoru. Pałeczki *Lactobacillus* mogą zatem stanowić „bakterie ochronne” ograniczające rozwój przewlekłego zapalenia przyzębia [182, 183].

Jednocześnie prezentowane są dane wskazujące, że w patogenezie chronic periodontitis istotną rolę spełnia prozapalna odpowiedź cytokinowa Th17 wyrażająca się wysokim poziomem IL-17 i TNF- $\alpha$  w płynie dziąsłowym pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia [22, 153, 201]. IL-17 indukuje aktywację neutrofilii wraz z reakcją zapalną, którą dodatkowo wzmacnia synergistyczne oddziaływanie TNF- $\alpha$ , IL-22 i IL-26. Ponadto, IL-17 wyzwała neutrofilie, a IL-22 indukuje peptydy przeciwbakteryjne, co stanowi niespecyficzną odpowiedź immunologiczną przeciw patogenom bakteryjnym i grzybom [25, 209, 219] Odpowiedź cytokinowa Th17 spełnia zatem ważną rolę w obronie immunologicznej gospodarza, a także może stanowić główny mediator patogenezy wielu chorób zapalnych, co potwierdzają dane z ostatnich lat [43, 91, 155, 184].

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach wykazano zwiększone poziomy TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17, przy czym poziomy tych cytokin w postaci ciężkiej były statystycznie wyższe niż w postaci umiarkowanej. Zwiększone poziomy

IL-17, a także TNF- $\alpha$  oraz IL-1 $\beta$  w przewlekłym zapaleniu przyzębia opisywali wcześniej inni autorzy [22, 49, 153, 201]. Jednak po raz pierwszy w tej pracy wykazano, że nadprodukcja IL-17 i TNF- $\alpha$  oraz IL-1 $\beta$  jest charakterystyczna dla obu postaci klinicznych przewlekłego zapalenia przyzębia. Jednocześnie na podstawie uzyskanych wyników można wyróżnić pacjentów z wysoką oraz umiarkowaną cytokinową odpowiedzią prozapalną. Intensywność odpowiedzi cytokinowej prozapalnej – wysoka i umiarkowana, odpowiada ciężkiej i umiarkowanej postaci klinicznej przewlekłego zapalenia przyzębia. Wnioskować zatem można, że przewlekłe zapalenie przyzębia determinuje utrzymująca się odpowiedź cytokinowa prozapalna, której intensywność może mieć znaczenie dla klinicznego przebiegu choroby. Wniosek ten częściowo wspierają dane wykazujące zależność progresji uszkodzenia stawów u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów od wysokiej produkcji IL-17 i TNF- $\alpha$  [93].

W badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez Oda i wsp. [134] oraz Monetti i wsp. [126] wykazano, że periopatogeny mogą indukować odpowiedź cytokinową Th17. Możliwe jest więc, że komórki Th17 odgrywają ważną fizjologiczną funkcję kontrolując kolonizację przyzębia drobnoustrojami, a zwłaszcza periopatogenami. Prawdopodobnie efektem tej funkcji są znacznie niższe wartości poziomów IL-17 wykrywane u osób z zapaleniem dziąseł, co stwierdziłam we wcześniejszych badaniach [181]. Natomiast znaczne zwiększenie cytokinowej odpowiedzi prozapalnej wydaje się być efektem zaburzeń jej regulacji wewnątrzkomórkowej lub silnej ekspresji genów docelowych w następstwie aktywacji ich transkrypcji przez periopatogeny [151, 158]. Wysokie koncentracje IL-17, TNF- $\alpha$  oraz IL-1 $\beta$  w płynie dziąsłowym wykazano u wszystkich chorych z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia. Wnioskować więc można, że bardzo silna odpowiedź cytokinowa związana z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia, wywierając prozapalny i przeciwbakteryjny efekt, wtórnie redukuje występowanie i aktywność metaboliczną *Lactobacillus* mikroflory jamy ustnej. Z kolei umiarkowana odpowiedź cytokinowa komórek Th17 oraz monocytów/makrofagów może nie być wystarczająca dla eliminacji *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru, których występowanie wydaje się ograniczać aktywność sekrecyjną komórek Th17 oraz monocytów/makrofagów, co w następstwie może zapobiegać progresji przewlekłego zapalenia przyzębia. Sugestię tę uprawdopodobniają badania doświadczalne wykazujące, że szczepy *Lactobacillus* mogą wywierać potencjalny efekt immunomodulujący, oddziałując supresyjnie na ekspresję genów cytokin prozapalnych [111, 162, 203].

Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują, że rozwój przewlekłego zapalenia przyzębia jest związany z utrzymującą się odpowiedzią cytokinową komórek Th17, której intensywność może mieć znaczenie dla przebiegu klinicznego

choroby. Jednocześnie wytwarzające nadtlenek wodoru pałeczki *Lactobacillus* mogą zapobiegać progresji przewlekłego zapalenia przyzębia, najprawdopodobniej ograniczając aktywność sekrecyjną komórek Th17.

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach *in vitro* zaanalizowano oddziaływanie supernatantów hodowli szczepów bakterii: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* oraz szczepów *Lactobacillus acidophilus* na ekspresję cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17), cytokiny przeciwzapalnej (IL-10) i genu *BTG2*, a także na aktywność metaboliczną komórek. Badania te zostały przeprowadzone w ludzkich fibroblastach dziąsłowych, które stanowią dominujące komórki tkanki łącznej przyzębia i zapewniają integralność jego struktury [7, 94].

Uzyskane dane nie wykazały zwiększonej ekspresji żadnej z badanych cytokin pod wpływem supernatantów z hodowli wybranych periopatogenów oraz pałeczek *Lactobacillus*.

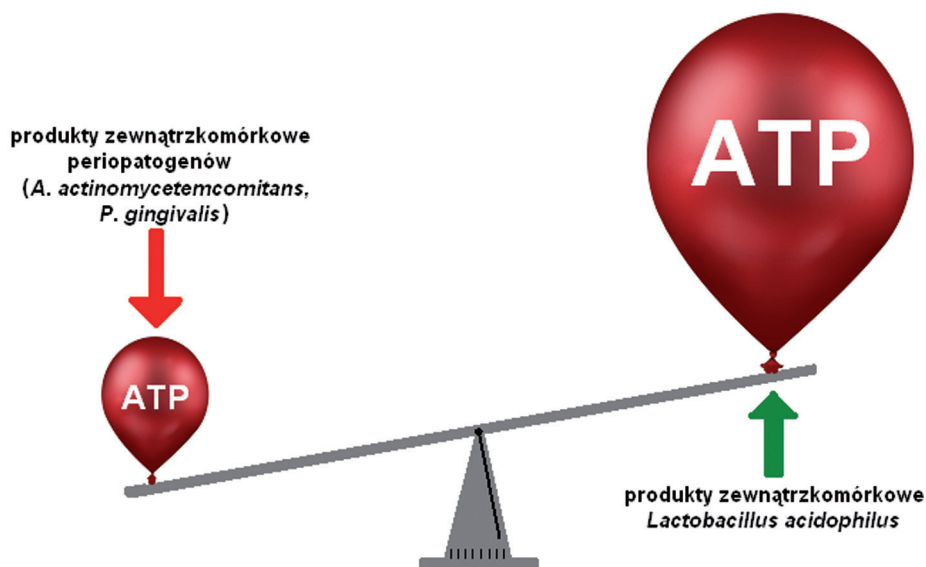
Natomiast supernatanty z hodowli wybranych periopatogenów istotnie zwiększały ekspresję genu *BTG2*. Gen ten reprezentuje rodziny genów *BTG* kodujących białka regulacyjne o aktywności antyproliferacyjnej preferencyjnie wytwarzane w fazie G1 cyklu [44, 148]. Następstwem zwiększonej ekspresji genu *BTG2* może być częściowe zahamowanie proliferacji komórek. Na podstawie badań przeprowadzonych w mojej pracy ustalono, że żywotność fibroblastów nie zmienia się pod wpływem supernatantów z hodowli periopatogenów. Oznacza to, że nie dochodzi do redukcji żywotności komórek mimo zwiększonej ekspresji genu *BTG2*. Wniosek ten wspierają inne badania [89]. Jednak utrzymywanie się wysokiej ekspresji genu *BTG2* w komórkach może powodować ich śmierć na drodze apoptozy [210]. Z drugiej strony supernatanty z hodowli *Lactobacillus acidophilus* nie oddziaływały na ekspresję genu *BTG2* w fibroblastach. Wnioskować zatem można, że produkty zewnątrzkomórkowe z hodowli *Lactobacillus* nie powodują odpowiedzi antyproliferacyjnej w fibroblastach.

Produkowany, głównie w mitochondriach wszystkich komórek eukariotycznych, ATP jest konieczny do większości funkcji komórkowych [41]. Jednocześnie, zmniejszenie komórkowej produkcji ATP stwarza metaboliczne warunki prowadzące do śmierci komórki na drodze różnych mechanizmów, włączając apoptozę, autofagię lub martwicę. Obniżenie poziomów ATP, głównie wskutek zaburzeń mitochondrialnych, aktywuje apoptozę. W autofagii, procesie samodegradacji, niski poziom energii, w tym niedobór ATP poprzedza śmierć komórki [20, 106, 171]. Podczas martwicy komórkowej nadmierna utrata ATP występuje wskutek zmiany przepuszczalności mitochondriów [200]. ATP stanowi więc jedną cząsteczkę, której deficyt jest zaangażowany w procesy mediujące wszystkie rodzaje śmierci komórki. Dlatego poziom ATP w komórkach jest istotnym

wykładnikiem ich aktywności metabolicznej i żywotności. Do oznaczeń koncentracji ATP w komórkach stosuje się wiele metod, włączając enzymatyczne, fluorometryczne i chromatograficzne [34, 57, 115]. Jednak najbardziej czułym i specyficznym jest pomiar bioluminescencyjny [28, 71, 207]. W metodzie bioluminescencji stosuje się enzym – lucyferazę, który katalizuje powstawanie światła z ATP i lucyferyny. Dobrze już udokumentowano, że intensywność emitowanego światła jest liniowo zależna od stężenia ATP [28].

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach wykazano, że supernatanty 24 godz. hodowli *P. gingivalis*, jak również *A. actinomycetemcomitans* oddziałują na ludzkie fibroblasty dziąsłowe, istotnie zmniejszając produkcję ATP. Efektu redukcji poziomów ATP w komórkach nie obserwowano w następstwie stosowania supernatantów *P. intermedia*. Jednocześnie stwierdzono, że aktywność supernatantów *P. gingivalis*, jak również *A. actinomycetemcomitans*, ogrzewanych w 56°C przez 30 min, nie uległa zmniejszeniu. Natomiast supernatanty te po ogrzaniu w 100°C przez 30 min nie wykazywały aktywności. W odróżnieniu od polisacharydów i termostabilnych peptydów, duże białka zwykle ulegają zniszczeniu po ogrzaniu w 56°C przez 30 min. Dobrze już udokumentowano fakt, że szczepy *P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans* produkują toksyny, które jednak należą do dużych białek. Są to wydzielane przez *P. gingivalis* proteazy cysteinowe (gingipainy: HRgpA-95kDa, RgpB-50kDa i Kgp-110kDa), które odgrywają istotne znaczenie w destrukcji tkanek oraz produkowana przez *A. actinomycetemcomitans* toksyna CDT (cytolethal distending toxin; zbudowana z 3 podjednostek o masach cząsteczkowych 24-35 kDa), która hamuje podział ludzkich fibroblastów dziąsłowych, a szczególnie cyklu komórkowego w fazie progresji G<sub>2</sub> do mitozy [14, 77, 167]. Z kolei polisacharydy nie są wydzielane przez badane periopatogeny, stanowią bowiem komponentę lipopolisacharydu (LPS) wchodzą w skład struktury ściany komórkowej tych bakterii. Uzyskane dane pozwalają więc wnioskować, że uwalniane przez *P. gingivalis*, jak również *A. actinomycetemcomitans* substancje redukujące poziomy ATP w fibroblastach dziąsłowych mogą być termostabilnymi peptydami. Rezultatem ich aktywności cytotoksycznej mógłby być spadek produkcji ATP. Z drugiej jednak strony nie stwierdzono wzrostu odsetka komórek martwych w następstwie działania badanych supernatantów. Te dane wskazują raczej, że substancje wytwarzane przez *P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans*, najprawdopodobniej będące peptydami, nie działają litycznie na błonę plazmatyczną, a ich toksyczność związana jest bezpośrednio z uszkodzeniem mitochondrialnym. Tę unikalną aktywność peptydów potwierdzają dane wykazujące, że przepuszczalne peptydy skutecznie wnikają do ludzkich komórek i mogą z wysoką specyficznością oddziaływać na mitochondria [51, 74]. W następstwie obniżenia potencjału energetycznego

komórki może dochodzić wtórnie do zahamowania proliferacji fibroblastów i indukcji śmierci komórki na drodze apoptozy [107]. Z kolei poziom ATP w fibroblastach dziąsłowych nie zmieniały supernatanty *P. intermedia*, zatem periopatogen ten najprawdopodobniej nie wytwarza substancji indukujących zaburzenia wewnątrzkomórkowe. Powyższy wniosek mogą wspierać wcześniejsze dane wykazujące, że ekstrakty bakteryjne *P. intermedia* poddane działaniu ultradźwięków nie hamują wzrostu fibroblastów [213]. Natomiast badając w tej pracy supernatanty 24-godz. hodowli szczepów *L. acidophilus* stwierdzono, w następstwie ich stosowania, istotne zwiększenie poziomów ATP fibroblastach dziąsłowych. Jednocześnie wzrost poziomów ATP nie był zależny od wytwarzanego nadtlenu wodoru przez szczepy *L. acidophilus*. Wpływ produktów zewnątrzkomórkowych periopatogenów oraz *Lactobacillus acidophilus* na poziom ATP w fibroblastach dziąsłowych HGF-1 przedstawiono na rycinie 14.



**Ryc. 14.** Wpływ produktów zewnątrzkomórkowych periopatogenów oraz *Lactobacillus acidophilus* na poziom ATP w fibroblastach dziąsłowych HGF-1.

Do chwili obecnej identyfikacja tego czynnika (-ów) stymulującego produkcję ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych pozostaje nieznaną. Jednakże stwierdzana w tej pracy termostabilność tego czynnika (-ów) wskazuje na jego naturę polisacharydu. Wniosek ten wspierają badania potwierdzające, że *Lacto-*

*bacillus* spp., włączając *L. acidophilus*, mogą uwalniać w dużych ilościach egzopolisacharydy (EPS) [23, 104, 111]. Dotychczas opisano różnorodne funkcje EPS, m.in. jako promujące kolonizację, jako czynniki chroniące przed wpływem środowiska oraz stabilizujące strukturę biofilmu i jako cząsteczki sygnalizacyjne [10]. W tej pracy, po raz pierwszy stwierdzono, że uwalniane przez szczepy *L. acidophilus*, prawdopodobnie EPS, mogą wykazywać pro-oksydacyjną aktywność, zwiększając tym samym syntezę ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych. Uzyskane wyniki korespondują z wcześniejszymi obserwacjami *in vivo* dokumentującymi stymulujące działanie supernatantów *L. acidophilus* na proliferację fibroblastów [68] oraz na wzrost i rozwój embrionalnych komórek *in vitro* [108].

Z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika, że szczepy pałeczek *Lactobacillus* produkujące nadtlenek wodoru występują istotnie częściej u chorych z umiarkowanym aniżeli ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia. Wskazuje to, że wyżej wymienione szczepy mogą zapobiegać rozwojowi choroby. Z kolei w badaniach *in vitro* wykazałam zróżnicowany efekt oddziaływania supernatantów z hodowli wybranych periopatogenów oraz szczepów *Lactobacillus acidophilus* na potencjał energetyczny fibroblastów dziąsłowych. Te dane uzasadniały zatem podjęcie w tej pracy próby oceny zastosowania terapeutycznego u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia doustnych tabletek probiotycznych, zawierających szczep *Lactobacillus reuteri* produkujący nadtlenek wodoru. *Lactobacillus reuteri* jest jednym z dobrze już poznanych gatunków bakterii probiotycznych o udokumentowanym działaniu w wielu zakażeniach bakteryjnych [21, 27, 47, 53, 76, 78, 112, 144, 156, 160, 179]. Reuteryna, którą produkuje, jest 3-hydroksypropionaldehydem o szerokim spectrum działania przeciwbakteryjnego [16, 88, 186, 220]. Działa w szerokim zakresie pH i jest oporna na działanie enzymów lipo- i proteolitycznych. Oddziałuje także supresyjnie na produkcję cytokin prozapalnych. Reuteryna blokuje adherencję i zapobiega kolonizacji patogenów [84, 116].

W tej pracy zastosowano doustne tabletki probiotyczne zawierające szczep *Lactobacillus reuteri* produkujący nadtlenek wodoru u 19 dorosłych osób z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia (podgrupa 2B). Podgrupę tę wyłoniono z grupy liczącej 35 pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia (grupa 2). U wszystkich pacjentów stanowiących grupę 2 wykonano zabiegi higienizacyjne (skaling i root-planing – SRP) i oceniono parametry kliniczne. U 19 pacjentów (54,3%) nie stwierdzono istotnej poprawy parametrów klinicznych: SBI, PPD, CAL. Natomiast po zakończeniu kuracji w tej podgrupie badanych stwierdzono istotną poprawę kliniczną u 14 pacjentów (73,7%) wyrażającą się zmniejszeniem wartości parametrów klinicznych:

SBI, PPD, CAL. Ponadto, wykazano obniżenie poziomów oznaczanych cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17). Wyniki te korespondują z wynikami Vivekanandy i wsp. [204] oraz Vicario i wsp. [202] dokumentującymi redukcję wartości wskaźników u pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia stosujących zabiegi higienizacyjne oraz tabletki probiotyczne. Twetman i wsp. [196] stosując gumę do żucia zawierającą szczepy *Lactobacillus reuteri* także wykazali zmniejszenie wartości wskaźników GI i SBI oraz redukcję poziomu cytokin TNF- $\alpha$  i IL-8. Z kolei inni autorzy wskazali poprawę wskaźników klinicznych u pacjentów z zapaleniem dziąseł [79, 97]. Lin i wsp. wykazali ponadto, że *L. reuteri* hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych [109].

W moich badaniach u 5 pacjentów tworzących podgrupę BPK nie stwierdzono jednak poprawy klinicznej, a poziomy oznaczanych cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) nie zmieniły się istotnie statystycznie. Wskazywać to może na brak skutecznej kolonizacji kieszonek przyzębnych przez zastosowany szczep probiotyczny *Lactobacillus reuteri*. Możliwe jest, że proces kolonizacji przyzębia u niektórych pacjentów wymaga dłuższego stosowania tabletek probiotycznych zawierających szczep *Lactobacillus reuteri*.

Liczne publikacje przedstawiają właściwości oraz dokumentują wpływ pałeczek kwasu mlekowego (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* oraz *Lactobacillus brevis*) na stan przyzębia jamy ustnej [37, 168, 174]. Spadek wartości wskaźnika płytki nazębnej (Pl.I) u pacjentów z chorobami przyzębia, związany ze stosowaniem probiotyku, był obserwowany w badaniach zespołów Della Riccia [37], Shimauchi [168], Staab [174] oraz Vivekananda [204]. Oceniany wskaźnik dziąsłowy (GI) był również obniżony w porównaniu do wartości początkowych w badaniach Della Riccia i wsp. [37] oraz Shimauchi i wsp. [168]. Z kolei Staab i wsp. uzyskali istotne statystycznie zwiększenie wartości GI po zastosowaniu probiotyku [174]. Zmiany w głębokości kieszonek przyzębnych (PPD) oraz obniżenie wartości średniej utraty klinicznego przyczepu łącznotkankowego (CAL) były obserwowane w badaniach klinicznych Matsuoka i wsp. [120] oraz Vivekananda i wsp. [204]. Shimauchi i wsp. uzyskali istotne statystycznie obniżenie wartości głębokości kieszeni przyzębnych (PPD) jedynie u osób palących z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia [168].

Przedstawione w tej pracy dane wskazują, że w następstwie stosowania tabletek probiotycznych, zawierających szczep *Lactobacillus reuteri* produkujący nadtlenek wodoru, dochodzi do istotnej poprawy parametrów klinicznych i zmniejszenia poziomu cytokin prozapalnych u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia. Obserwacje te mają znaczenie dla praktyki stomatologicznej, gdyż pozwalają na zmodyfikowanie postępowania leczniczego w przewlekłym zapaleniu przyzębia.

## 6. WNIOSKI

1. W przewlekłym zapaleniu przyzębia u dorosłych najczęściej wykrywanymi periopatogenami w kieszonkach przyzębnych są: *Porphyromonas gingivalis* (36,67%), *Fusobacterium nucleatum* (36,67%) oraz *Parvimonas micra* (26,67%). Jednocześnie pałeczki *Lactobacillus* wytwarzające nadtlenek wodoru występują istotnie częściej w kieszonkach przyzębnych u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia niż u chorych z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.
2. W płynie dziąsłowym kieszonek przyzębnych występuje znaczna koncentracja cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17), przy czym poziomy tych cytokin są statystycznie wyższe w ciężkim niż w umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia.
3. Supernatanty hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* oraz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) nie zwiększają ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i IL-17) oraz cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.
4. Supernatanty hodowli szczepów klinicznych *Lactobacillus acidophilus* nie zwiększają ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i IL-17) oraz cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.
5. Supernatanty hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) istotnie zwiększają ekspresję genu czynnika antyproliferacyjnego *BTG2* w ludzkich fibroblastach dziąsłowych, podczas gdy ekspresja tego genu nie zmienia się w następstwie działania supernatantów hodowli szczepów klinicznych *Lactobacillus acidophilus*.
6. Zewnątrzkomórkowe produkty periopatogenów (*Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), będące najprawdopodobniej peptydami docelowymi dla mitochondriów, redukują syntezę ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych, co może hamować ich proliferację i indukować śmierć komórki w wyniku apoptozy.



7. Zewnątrzkomórkowe produkty *Lactobacillus acidophilus*, będące najprawdopodobniej egzopolisacharydami z aktywnością prooksydacyjną, zwiększają syntezę ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.
8. W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia u ponad połowy chorych (54%) zabiegi higienizacyjne nie są wystarczająco skuteczne dla poprawy parametrów klinicznych (w zakresie wskaźników SBI, PPD, CAL) i w ich wyniku nie dochodzi również do zmniejszenia poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17).
9. Tabletki probiotyczne zawierające szczep *Lactobacillus reuteri* istotnie wpływają na poprawę parametrów klinicznych (w zakresie wskaźników SBI, PPD, CAL) i zmniejszenie poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia.

## 7. PIŚMIENICTWO

- [1] Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N. i wsp. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-5732.
- [2] Abiko Y., Sato T., Mayanagi G., Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J. Periodont. Res.* 2010; 45: 389-395.
- [3] Albandar J.M., Rams T.E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol. 2000.* 2002; 29: 7-10.
- [4] Al-Shibani N., Windsor L.J. Effects of *Porphyromonas gingivalis* on human gingival fibroblasts from healthy and inflamed tissues. *J. Periodont. Res.* 2008; 43: 465-470.
- [5] Andrian E., Grenier D., Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 2004; 72(8): 4689-4698.
- [6] Andrzejewska E., Szkaradkiewicz A.K. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus* to selected periodontopathogens. XXVII Congress of the Polish Society of Microbiologists. September 5-8, 2012; Lublin, Poland. Scientific Materials.
- [7] Ara T., Kurata K., Hirai K. i wsp. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 2009; 44: 21-27.
- [8] Armitage G.C. Classifying periodontal diseases – a long-standing dilemma. *Periodontol. 2000.* 2002; 30: 9-23.
- [9] Armitage G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
- [10] Badel S., Bernardi T., Michaud P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 2011; 29: 54-66.
- [11] Bascones A., Noronha S., Gomez M. i wsp. Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintess. Int.* 2005; 36: 299-306.
- [12] Bastos M.F., Lima J.A., Vieira P.M. i wsp. TNF- $\alpha$  and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis.* 2009; 15: 82-87.
- [13] Beklen A., Ainola M., Hukkanen M. i wsp. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J. Dent. Res.* 2007; 86(4): 347-351.
- [14] Belibasakis G.N., Mattsson A., Wang Y. i wsp. Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. *APMIS.* 2004; 112: 675-685.

- [15] Benamghar L., Penaud J., Kaminsky P. i wsp. Comparison of gingival index and sulcus bleeding index as indicators of periodontal status. *Bull. World Health Org.* 1982; 60(1): 147-151.
- [16] Bian L., Molan A.L., Maddox I. i wsp. Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 27: 991-998.
- [17] Boutaga K., van Winkelhoff A.J., Vandenbrouche-Grauls C.M.J.E. i wsp. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 45: 191-199.
- [18] Bradbury D.A., Simmons T.D., Slater K.J. i wsp. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J. Immunol. Methods.* 2000; 240: 79-92.
- [19] Braddley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 2008; 214: 149-160.
- [20] Bullon P., Cordero M.D., Quiles J.L. i wsp. Autophagy in periodontitis patients and gingival fibroblasts: unraveling the link between chronic diseases and inflammation. *BMC Med.* 2012; 10: 122-134.
- [21] Cadieux P., Wind A., Sommer P. i wsp. Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(15): 4645-4649.
- [22] Cardoso C.R., Garlet G.P., Crippa G.E. i wsp. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009; 24: 1-6.
- [23] Cerning J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait.* 1995; 75: 463-472.
- [24] Champagne C.M.E., Buchanan W., Reddy M.S. i wsp. **Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases.** *Periodontol.* 2000. 2003; 31: 167-180.
- [25] Cho J.S., Pietras E.M., Garcia N.C. i wsp. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 2010; 120: 1762-1773.
- [26] Colombo A.V., Silva C.M., Haffajee A. i wsp. Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55: 609-615.
- [27] Connolly E., Abrahamsson T., Björkstén B. Safety of D(-)-lactic acid producing bacteria in the human infant. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2005; 41(4): 489-492.

- [28] Crouch S. Biocompatibility testing ATP bioluminescence. *Med. Device Technol.* 2000; 11: 12-15.
- [29] Curtis M.A., Thickett A., Slaney J.M., *i wsp.* Variable carbohydrate modifications to the catalytic chains of the RgpA and RgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect. Immun.* 1999; 67: 3816-3823.
- [30] Cutler C.W., Kalmar J.R., Genco C.A. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* 1995; 3: 45-51.
- [31] Czaplin D.D., Houguist K.A. Interactions between TFN and interleukin-1. W: Tumor necrosis factor: the molecules and their emerging role in medicine. Beutler B. (red.), Raven Press Ltd., New York 1992: 197-220.
- [32] Darveau R.P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Rev. Microbiol.* 2010; 8: 481-490.
- [33] Dashper S.G., Seers C.A., Tan K.H. *i wsp.* Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J. Dent. Res.* 2011; 90: 691-703.
- [34] De Korte D., Haverkort W.A., van Gennip A.H. *i wsp.* Nucleotide profiles of normal human blood cells determined by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1985; 15: 197-209.
- [35] De Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H. *i wsp.* Interleukin-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 1991; 174: 915-924.
- [36] Del Vecchio M., Bajetta E., Canova S. *i wsp.* Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(16): 4677-4685.
- [37] Della Riccia D.N., Bizzini F., Perilli M.G. *i wsp.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Dis.* 2007; 13(4): 376-385.
- [38] Dentino A., Lee S., Mailhot J. *i wsp.* Principles of periodontology. *Periodontol.* 2000. 2013; 61(1): 16-53.
- [39] D'Ercole S., Catamo G., Tripodi D., Piccolomini R. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *New Microbiol.* 2008; 31(3): 383-391.
- [40] Dewhirst F.E., Chen T., Izard J. *i wsp.* The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 2010; 192(19): 5002-5017.
- [41] Dietrich M.O., Horvath T.L. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch.* 2010; 459: 269-275.

- [42] Dinarello C.S. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 1991; 77: 1621-1652.
- [43] Duarte P.M., da Rocha M., Sampaio E. i wsp. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J. Periodontol.* 2010; 81: 1056-1063.
- [44] Duriez C., Moyret-Lalle C., Falette N. i wsp. BTG2, its family and its tutor. *Bull. Cancer*. 2004; 91(7-8): E242-253.
- [45] Ebersole J.L. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol. 2000.* 2003; 31: 135-166.
- [46] Ebisu S., Nakae H., Okada H. Coaggregation of *Eikenella corrodens* with oral bacteria mediated by bacterial lectin – like substance. *Adv. Dent. Res.* 1988; 2: 323-327.
- [47] Efrati C., Nicolini G., Cannaviello C. i wsp. *Helicobacter pylori* eradication: sequential therapy and *Lactobacillus reuteri* supplementation. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18(43): 6250-6254.
- [48] Engebretson S.P., Grbic J.T., Singer R. i wsp. GCF IL-1 $\beta$  profiles in periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 2002; 29: 48-53.
- [49] Figueredo C.M., Ribeiro M.S., Fischer R.G. i wsp. Increased interleukin-1 $\beta$  concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J. Periodontol.* 1999; 70: 1457-1463.
- [50] Fine D.H., Markowitz K., Furgang D. i wsp. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an early colonizer of oral tissues: epithelium as a reservoir? *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 4464-4473.
- [51] Fischer R., Fotin-Mleczek M., Hufnagel H. Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *ChemBioChem*. 2005; 6: 2126-2142.
- [52] Fives-Taylor P.M., Meyer D.H., Mintz K.P. i wsp. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol. 2000.* 1999; 20: 136–167.
- [53] Francavilla R., Lionetti E., Castellaneta S.P. i wsp. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection in humans by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and effect on eradication therapy: a pilot study. *Helicobacter*. 2008; 13(2): 127-134.
- [54] Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 2006; 8: S3.
- [55] Gaffen S.L. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr. Opin. Immunol.* 2011; 23(5): 613-619.

- [56] Gee K., Guzzo C., Che Mat N.F. i wsp. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2009; 8(1): 40-52.
- [57] Gordon J.L., Drummond A.H. A simple fluorimetric microassay for adenine compounds in platelets and plasma and its application to studies on the platelet release reaction. *Biochem. J*. 1974; 138: 165-169.
- [58] Górska R. Nowe wytyczne Amerykańskiej Akademii Periodontologii. *Dent. Med. Probl*. 2012; 49(1): 47-51.
- [59] Górska R. Wytyczne do diagnozowania chorób przyzębia. *Dent. Med. Probl*. 2007; 44(4): 429-432.
- [60] Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontol*. 2008; 79(Suppl.8): 1585-1591.
- [61] Griffiths G.S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol. 2000*. 2003; 31: 32-42.
- [62] Guo Y., Nguyen K.A., Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol. 2000*. 2010; 54: 15-44.
- [63] Haffajee A.D., Socransky S.S., Patel M.R. i wsp. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol*. 2008; 23: 196-205.
- [64] Haffajee A.D., Socransky S.S. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol. 2000*. 2006; 42: 7-12.
- [65] Haffajee A.D., Teles R.P., Socransky S.S. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol. 2000*. 2006; 42: 219-258.
- [66] Hajishengallis G., Krauss J.L., Liang S. i wsp. Pathogenic microbes and community service through manipulation of innate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2012; 946: 69-85.
- [67] Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral Biosci*. 2011; 53(3): 233-240.
- [68] Halper J., Leshin L.S., Lewis S.J., Li W.I. Wound healing and angiogenic properties of supernatants from *Lactobacillus* cultures. *Exp. Biol. Med*. 2003; 228: 1329-1337.
- [69] Henderson B., Ward J.M., Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A periodontopathogen? *Periodontol. 2000*. 2010; 54(1): 78-105.

- [70] Henderson B., Wilson M., Sharp L. i wsp. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51: 1013-1020.
- [71] Higashi T., Isomoto A., Tyuma E. i wsp. Quantitative and continuous analysis of ATP release from blood platelets with firefly luciferase luminescence. *Thromb. Haemost.* 1985; 53: 65-70.
- [72] Holt S.C., Ebersole J.L. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: 'the red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol. 2000.* 2005; 38: 72-122.
- [73] Holt S.C., Kesavalu L., Walker S., Genco C.A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol. 2000.* 1999; 20: 168-238.
- [74] Horton K.L., Stewart K.M., Fonseca S.B. i wsp. Mitochondria-penetrating peptides. *Chem. Biol.* 2008; 15: 375-382.
- [75] Hou L.T., Liu C.M., Liu B.Y. i wsp. Interleukin-1 $\beta$ , clinical parameters and matched cellular-histopathologic changes of biopsied gingival tissue from periodontitis patients. *J. Periodont. Res.* 2003; 38: 247-254.
- [76] Hunter C., Dimaguila M.A., Gal P. i wsp. Effect of routine probiotic, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, use on rates of necrotizing enterocolitis in neonates with birth-weight < 1000 grams: a sequential analysis. *BMC Pediatr.* 2012; 12(142): 1-6.
- [77] Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol.* 2003; 74: 111-118.
- [78] Imase K., Tanaka A., Tokunaga K. i wsp. *Lactobacillus reuteri* tablets suppress *Helicobacter pylori* infection – a double-blind randomised placebo-controlled cross-over clinical study. *Kansenshogaku zasshi.* 2007; 81(4): 387-393.
- [79] Iniesta M., Herrera D., Montero E. i wsp. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized trial. *J. Clin. Periodontol.* 2012; 39: 736-744.
- [80] Ishikawa I., Cimasoni G. Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relationship to periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 1970; 15: 1401-1404.
- [81] Jain S., Darveau R.P. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol. 2000.* 2010; 54(1): 53-70.
- [82] Jańczuk Z. Praktyczna periodontologia kliniczna. Wyd. Kwintesencja 2004.
- [83] Jervøe-Storm P.-M., Koltzsch M., Falk W. i wsp. **Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples.** *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32: 778-783.

- [84] Jones S.E., Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 35.
- [85] Jovanovic D.V., Di Battista J.A., Martel-Pelletier J. i wsp. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , by human macrophages. *J. Immunol.* 1998; 160(7): 3513-3521.
- [86] Jung M., Condotti D., Hurauks J.M., Agut H. Polymerase chain reaction in human immunodeficiency virus diagnosis: principles, parameters, applications and pitfalls. *Bull. Inst. Pasteur.* 1992; 90: 31-43.
- [87] Kachlany S.C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J. Dent. Res.* 2010; 89(6): 561-570.
- [88] Kang M.S., Oh J.S., Lee H.C. i wsp. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J. Microbiol.* 2011; 49(2): 193-199.
- [89] Karve T.M., Rosen E.M. B-cell translocation gene 2 (BTG2) stimulates cellular antioxidant defenses through the antioxidant transcription factor NFE2L2 in human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(37): 31503-31514.
- [90] Kebschull M., Papapanou P.N. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses. *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38(Suppl.11): 17-27.
- [91] Khader S.A., Gaffen S.L., Kolls J.K. Th 17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2009; 2: 403-411.
- [92] Kim Y.C., Ko Y., Hong S.D. i wsp. Presence of *Porphyromonas gingivalis* and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis.* 2010; 16: 375-381.
- [93] Kirkham B.W., Lassere M.N., Edmonds J.P. i wsp. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum.* 2006; 54(4): 1122-1131.
- [94] Koka S., Reinhardt R.A. Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament: implications for oral health disease. *J. Prosthet. Dent.* 1997; 77: 191-196.
- [95] Koll-Klais P., Mandar R., Leibur E. i wsp. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol. Immunol.* 2005; 20: 354-361.



- [96] Konopka T., Ziętek M., Radwan-Oczko M. Rola interleukin w etiopatogenezie zapaleń przyzębia. *Mag. Stom.* 1995; 5(6): 24-30.
- [97] Krasse P., Carlsson B., Dahl C. i wsp. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swedish Dent. J.* 2006; 30: 55-60.
- [98] Kumar P.S., Griffen A.L., Moeschberger M.L. i wsp. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 3944-3955.
- [99] Kuriyama T., Karasawa T., Nakagawa K. Bacteriology and antimicrobial susceptibility of gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol. Immunol.* 2002; 17(2): 132-135.
- [100] Kurtis B., Tüter G., Serdar M. i wsp. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J. Periodontol.* 2005; 76: 1849-1855.
- [101] Lamont R.J., Jenkinson H.F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(4): 1244-1263.
- [102] Lamster I.B., Novak M.J. Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1992; 3(1/2): 31-60.
- [103] Lau L., Sanz M., Herrera D. i wsp. **Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples.** *J. Clin. Periodontol.* 2004; 31: 1061-1069.
- [104] Laws A.P., Chadha M.J., Chacon-Romero M. i wsp. Determination of the structure and molecular weights of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* 5e2 when grown on different carbon feeds. *Carbohydrate Res.* 2008, 343: 301-307.
- [105] Ledder R.G., Gilbert P., Huws S.A. i wsp. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 516-523.
- [106] Lemasters J.J., Qian T., He L. i wsp. Role of mitochondrial inner membrane permeabilisation in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* 2002; 4: 769-781.
- [107] Letzelter C., Croute F., Pianezzi B. i wsp. Supernatant cytotoxicity and proteolytic activity of selected oral bacteria against human gingival fibroblasts in vitro. *Arch. Oral Biol.* 1998; 43(1): 15-23.
- [108] Li W.I., Brackett B.G., Halper J. Culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* stimulates proliferation of embryonic cells. *Exp. Biol Med.* 2005; 230: 494-501.

- [109] Lin Y.P., Thibodeaux C.H., Pena J.A. i wsp. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-jun. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008; 14(8):1068-1083.
- [110] Listgarten M.A., Mao R., Robertson P. Periodontal probing and the relationship of the probe tip to periodontal tissues. *J. Periodontol.* 1976; 47:511- 513.
- [111] Liu C.-F., Tseng K.-C., Chiang S.-S. i wsp. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 2011; 91: 2284-2291.
- [112] Liu Y., Fatheree N.Y., Mangalat N. i wsp. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010; 299: G1087-G1096.
- [113] Løe H., Silness J. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont. Scand.* 1963; 22: 121-134.
- [114] Løe H. The gingival index, the plaque index and the retention index system. *J. Periodontol.* 1967; 38: 610-616.
- [115] Lundin A., Hasenson M., Persson J. i wsp. Estimation of biomass in growing cell lines by ATP assay. *Methods Enzymol.* 1986; 133: 27-42.
- [116] Ma D., Forsythe P., Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect. Immunol.* 2004; 72: 5308-5322.
- [117] Madianos P.N., Bobetsis Y.A., Kinane D.F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingival. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32(suppl.6): 57-71.
- [118] Mallorquí-Fernández N., Manandhar S.P., Mallorquí-Fernández G. i wsp. A new autocatalytic activation mechanism for cysteine proteases revealed by *Prevotella intermedia* interpain A. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(5): 2871-2882.
- [119] Marsh P.D., Devine D.A. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38(Suppl.11): 28-35.
- [120] Marsh P.D., Martin M.V. Oral microbiology. Churchill Livingstone Elsevier, Wyd.5, 2010.
- [121] Matsuoka T., Sugano N., Takigawa S. i wsp. Effect of oral *Lactobacillus salivarius* TI2711(LS1) administration on periodontopathogenic bacteria in sugingival plaque. *J. Jpn. Soc. Periodontol.* 2006; 48: 315-324.
- [122] Mege J.L., Meghari S., Honstetterre A. i wsp. The two faces of interleukin-10 in human infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.* 2006; 6: 557-569.

- [123] Mężyk-Kopeć R., Bzowska M., Potempa J. i wsp. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 2005; 73(3): 1506-1514.
- [124] Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect.* 2009; 11: 625-630.
- [125] Mombelli A. Clinical parameters: biological validity and clinical utility. *Periodontol.* 2000. 2005; 39: 30-39.
- [126] Monetti M., Usin M.M., Tabares S. i wsp. The presence of periodontopathogens associated with the tumour necrosis factor-alpha expression in patients with different periodontal status. *Acta Odontol. Latinoam.* 2012; 25(1): 82-88.
- [127] Mättö J., Saarela M., Alaluusua S. i wsp. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample – processing method. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(1): 157-160.
- [128] Mühlemann H.R., Son S. Gingival sulcus bleeding a leading symptom in initial gingivitis. *Helv. Odont. Acta.* 1971; 15: 107-113.
- [129] Nędzi-Góra M., Kowalski J., Krajewski J. i wsp. Analiza mikrobiologiczna głębokich kieszonek przyzębnych u osób z przewlekłym zapaleniem przyzębia metodą PCR. *Czas. Stomatol.* 2007; LX(11): 717-725.
- [130] Nonnenmacher C., Dalpke A., Mutters R. i wsp. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2004; 59: 117-125.
- [131] Nonnenmacher C., Dalpke A., Rochon J. i wsp. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J. Periodontol.* 2005; 76: 1542-1549.
- [132] Norkov-Laritsen N., Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov. and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor - dependent and V factor - independent isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56: 2135-2146.
- [133] Ochert A.S., Boulter A.W., Birnbaum W. i wsp. Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Methods Appl.* 1994; 3(6): 365-368.
- [134] Oda T., Yoshie H., Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis* antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro. *Oral Microbiol. Immunol.* 2003; 18: 30-36.

- [135] Ohlrich E.J., Cullinan M.P., Seymour G.J. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust. Dent. J.* 2009; 54(suppl 1): S2-S10.
- [136] Olsen I., Shah H.N., Gharbia S.E. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000. 1999; 20: 14-52.
- [137] Ozbek S.M., Ozbek A. Real-time polymerase chain reaction of “red complex” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2010; 110: 670-674.
- [138] Paster B.J., Olsen I., Aas J.A. i wsp. **The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites.** *Periodontol.* 2000. 2006; 42: 80-87.
- [139] Pihlström B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 366: 1809-1820.
- [140] Pihlström B.L. Measurement of attachment level in clinical trials: probing methods. *J. Periodontol.* 1992; 63: 1072-1077.
- [141] Pihlström B.L. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol.* 2000. 2001; 25: 37-58.
- [142] Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 2009; 1: 70-87.
- [143] Preshaw P.M., Taylor J.J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38(Suppl.11): 60-84.
- [144] Prince T., McBain A.J., O’Neill C.A. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(15): 5119-5126.
- [145] Rabe L.K., Hillier S.L. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 3260-3264.
- [146] Rahbar A., Bostrom L., Lagerstedt U. i wsp. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patient with inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2003; 9(3): 154-161.
- [147] Reynolds J.M., Angkasekwinai P., Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(6): 413-423.

- [148] Rouault J.P., Falette N., Guéhenneux F. i wsp. Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat. Genet.* 1996; 14(4): 482-486.
- [149] Saiki K., Gomi T., Konishi K. Deletion and purification studies to elucidate the structure of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *J. Biochem.* 2004; 136: 335-342.
- [150] Saito D., Coutinho L.L., Saito C.P.B. i wsp. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J. Endod.* 2009; 35: 1518-1524.
- [151] Sandros J., Karlsson C., Lappin D.F. i wsp. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J. Dent. Res.* 2000; 79(10): 1808-1814.
- [152] Sands B.E., Kaplan G.G. The role of TNF(alpha) in ulcerative colitis. *J. Clin. Pharmacol.* 2007; 47: 930-941.
- [153] Santos V.R., Ribeiro F.V., Lima J.A. i wsp. Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37: 1049-1058.
- [154] Sanz M., van Winkelhoff A.J. Periodontal infections: understanding the complexity- Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38 (Suppl. 11): 3-6.
- [155] Sato K., Suematsu A., Okamoto K. i wsp. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* 2006; 27: 2673-2682.
- [156] Savino F., Cordisco L., Tarasco V. i wsp. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics.* 2010; 126(3): e526-533.
- [157] Sbordone L., DiGenio M., Bortolaia C. Bacterial virulence in the etiology of periodontal diseases. *Minerva Stomatol.* 2000; 49: 485-500.
- [158] Schenkein H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2006; 40: 77-93.
- [159] Scheres N., Crielaard W. Gingival fibroblast responsiveness is differentially affected by *Porphyromonas gingivalis*: implications for the pathogenesis of periodontitis. *Mol. Oral Microbiol.* 2012; 12: 1-15.
- [160] Schreiber O., Petersson J., Phillipson M. i wsp. *Lactobacillus reuteri* prevents colitis by reducing P-selectin-associated leukocyte- and platelet- endothelial cell interactions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 296(3): G534-542.

- [161] Sela M.N. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2001; 12: 399-413.
- [162] Servin A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28: 405-440.
- [163] Seshadri R., Myers G.S., Tettelin H. i wsp. Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 5646-5651.
- [164] Seymour G.J., Ford P.J., Cullinan M.P. i wsp. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 13(Suppl. 4): 3-10.
- [165] Sheets S.M., Robles-Price A.G., McKenzie R.M.E. i wsp. Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of *Porphyromonas gingivalis*. *Front. Biosci.* 2012; 13: 3215-3238.
- [166] Sheiham A., Netuveli G.S. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol.* 2000. 2002; 29: 104-121.
- [167] Shenker B.J., Besack D., McKay T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (Cdt): evidence that the holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. *J. Immunol.* 2004; 172: 410-417.
- [168] Shimauchi H., Mayanagi G., Nakaya S. i wsp. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Periodontol.* 2008; 35: 897-905.
- [169] Silness J., Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol. Scand.* 1964; 22(1): 121-135.
- [170] Sizova M.V., Hohmann T., Hazen A. i wsp. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(1): 194-203.
- [171] Skulachev V.P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis.* 2006; 11: 473-485.
- [172] Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A. i wsp. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 1998; 25: 134-144.
- [173] Socransky S.S., Haffajee A.D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol.* 2000. 2005; 38: 135-187.
- [174] Staab B., Eick S., Knofler G. i wsp. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J. Clin. Periodontol.* 2009; 36:850-856.
- [175] Stamatova I., Meurman J.H. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2009; 51: 141-151.

- [176] Stathopoulou P.G., Benakanakere M.R., Galicia J.C. i wsp. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37(1): 24-29.
- [177] Stathopoulou P.G., Benakanakere M.R., Galicia J.C. i wsp. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009; 24: 11-17
- [178] Sugai M., Kawamoto T., Péres S.Y. i wsp. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 1998; 66(10): 5008-5019.
- [179] Szajewska H., Gyrczuk E., Horvath A. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the management of infantile colic in breastfed infants: a randomized, double-blind, placebo- controlled trial. *J. Pediatr.* 2013; 162(2): 257-262.
- [180] Szkaradkiewicz A. Interleukina 1 in vivo - aspekty patogenetyczne, zastosowania kliniczne. *Pol. J. Immunol.* 1993; 18: 291-301.
- [181] Szkaradkiewicz A.K., Karpiński T.M., Zeidler A. i wsp. Protective effect of oral lactobacilli in pathogenesis of chronic periodontitis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2011; 62: 685-689.
- [182] Szkaradkiewicz A.K., Stopa J. *Lactobacillus* spp. of oral cavity microflora in chronic periodontitis. *Pol. J. Environ. Stud.* 2008; 17: 236-242.
- [183] Szkaradkiewicz A.K., Tukiendorf B., Stopa J. Oral lactobacilli and periodontitis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12: 0371.
- [184] Takahashi N., Sato T. Dipeptide utilization by the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol. Immunol.* 2002; 17: 50-54.
- [185] Takasaki K., Fujise O., Miura M. i wsp. *Porphyromonas gingivalis* displays a competitive advantage over *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in co-cultured biofilm. *J. Periodont. Res.* 2012; doi: 10.1111/jre.12006.
- [186] Talarico T.L., Dobrogosz W.J. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33(5): 674-679.
- [187] Tanabe S.I., Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J. Periodont. Res.* 2008; 43: 372-377.
- [188] Tanner A.C., Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol. 2000.* 2006; 42: 88-113.

- [189] Taylor J.J. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000; 54: 160-194.
- [190] Teanpaisan R., Piwat S., Dahlèn G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 2011; 53: 452-459.
- [191] Teles R., Sakellari D., Teles F. i wsp. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J. Periodontol.* 2010; 81: 89-98.
- [192] Teles R.P., Gursky L.C., Faveri M. i wsp. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37: 313-323.
- [193] Testa M.M., de Valladares R., de Cardenas I.L. Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral lactobacilli. *Res. Microbiol.* 2003; 154: 669-675.
- [194] Teughels W., Loozen G., Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38 (Suppl.11): 159-177.
- [195] Tindall B.J., Euzéby J.P. Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatrionococcus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadricoccus* Maszenan et al. 2002, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56: 2711-2730.
- [196] Twetman S., Derawi B., Keller M. i wsp. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol. Scand.* 2009; 67: 19-24.
- [197] Van Hoogmoed C.G., Geertsema-Doornbush G.I., Teughels W. i wsp. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008; 23: 43-48.
- [198] Van Snick J. Interleukin-6 an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 253-278.
- [199] van Winkelhoff A.J., Loos B.G., van der Reijden W.A. i wsp. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.* 2002; 29: 1023-1028.
- [200] Vanlangenakker N., Vanden Berghe T., Krysko D.V. i wsp. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 2008; 8: 207-220.
- [201] Vernal R., Dutzan N., Chaparro A. i wsp. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32: 383-389.



- [202] Vicario M., Santos A., Violant D. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontol. Scand.* 2012. doi: 10.3109/00016357.2012.734404
- [203] Vissers Y.M., Snel J., Zuurendonk P.F. i wsp. *Lactobacillus* strains differentially modulate cytokine production by *Lactobacillus* hPBMC from pollen-allergic patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011; 61: 28-40.
- [204] Vivekananda M.R., Vandana K.L., Bhat K.G. Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J. Oral. Microbiol.* 2010; 2: 5344-5353.
- [205] Wade W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res.* 2013; 69(1): 137-143.
- [206] Wasilewska A.M., Słotwińska S.M. Rola czynnika martwicy nowotworów (TNF) i jego receptorów w zapaleniu przyzębia na podstawie piśmiennictwa. *Nowa Stomatol.* 2003; 23(1): 49-51.
- [207] Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharmac.* 2005; 288: 369-376.
- [208] Williams B.L., Hammond B.F. *Capnocytophaga*: new genus of Gram-negative gliding bacteria. *Arch. Microbiol.* 1979; 122: 35-39.
- [209] Wilson R.H., Whitehead G.S., Nakano H. i wsp. Allergic sensitization through the airway primes Th17- dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 180: 720-730.
- [210] Winkler G.S. The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family. *J. Cell Physiol.* 2010; 222: 66-72.
- [211] World Health Organization. Oral Health Surveys: basic methods. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: WHO, 1997; 26-39.
- [212] Ximenèz-Fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S. Comparison of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2000; 27: 648-657.
- [213] Yamasaki M., Nakata K., Imaizumi I. i wsp. Cytotoxic effect of endodontic bacteria on periapical fibroblasts. *J. Endod.* 1998; 24: 534-539.
- [214] Yao Z., Painter S.L., Fanslow W.C. i wsp. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 1995; 155: 5483-5486.
- [215] Yen-Chun G.L., Ulf H.L., Yen-Tung A.T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol.* 2000. 2010; 52: 163-206.
- [216] Yilmaz Ö. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiol.* 2008; 154(Pt 10): 2897-2903.

- [217] Zaremba M.L., Borowski J. Mikrobiologia lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wyd. 3, 2003.
- [218] Zaremba M.L. Choroby przyzębia a wzrost odpowiedzi zapalnej. *Czas. Stomatol.* 2009; 62: 531-548.
- [219] Zenewicz L.A., Flavell R.A. IL-22 and inflammation: Leukin' through a glass onion. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38: 3265-3268.
- [220] Zhao Q., Maddox I.S., Mutukumira A. i wsp. The effect of cell immobilization on the antibacterial activity of *Lactobacillus reuteri* DPC16 cells during passage through a simulated gastrointestinal tract system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 28(10): 3025-3027.

## 8. STRESZCZENIE

Przewlekłe zapalenie przyzębia należy do najczęstszych chorób zapalnych występujących u ludzi. Prowadzi do destrukcji dziąseł, cementu korzeniowego, ozębnej oraz wyrostka zębodołowego kości. Częstość występowania i nasilenie choroby przyzębia wzrasta wraz z wiekiem.

W etiopatogenezie przewlekłego zapalenia przyzębia podstawową rolę odgrywają bakterie beztlenowe, określane jako periopatogeny lub periodontopatogeny. Najważniejszymi periopatogenami są: *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* i względny beztlenowiec – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie możliwości antagonistycznego oddziaływania ważnych klinicznie periopatogenów i szczepów *Lactobacillus* mikroflory jamy ustnej w przewlekłej chorobie przyzębia u dorosłych w badaniach *in vivo* i *in vitro*.

Cel ten był realizowany w następujących zadaniach badawczych:

1. Ocena występowania periopatogenów i bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ze szczególnym uwzględnieniem wytwarzania nadtlenu wodoru, u osób z umiarkowanym i ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.
2. Ocena prozapalnej odpowiedzi cytokinowej (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) u chorych z umiarkowanym i ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.
3. Ocena ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i IL-17) i cytokiny przeciwzapalnej IL-10 oraz genu czynnika antyproliferacyjnego *BTG2* w ludzkich fibroblastach dziąsłowych pod wpływem supernatantów z hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*P. gingivalis*, *P. intermedia* i *A. actinomycetemcomitans*) oraz supernatantów z hodowli szczepów klinicznych *L. acidophilus*.
4. Ocena wpływu supernatantów z hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*P. gingivalis*, *P. intermedia* i *A. actinomycetemcomitans*) na poziom adenosynotrójfosforanu (ATP) w ludzkich fibroblastach dziąsłowych i ich żywotność.
5. Ocena wpływu supernatantów z hodowli szczepów klinicznych *L. acidophilus* na poziom ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych i ich żywotność.
6. Ocena prozapalnej odpowiedzi cytokinowej (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia otrzymujących suplement diety – tabletki probiotyczne zawierające szczep *Lactobacillus reuteri*, produkujący nadtlenek wodoru.

Badaniami objęto 65 osób, w wieku 30–50 lat, wyłonionych spośród 112 pacjentów zgłaszających się do leczenia w Klinice Stomatologii Zachowawczej

i Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Z badanej grupy pacjentów wybrano 30 osób (Grupa 1), spośród których na podstawie badania klinicznego wyłoniono podgrupę 1A, obejmującą 15 pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia i podgrupę 1B, obejmującą 15 pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.

Następną grupę badawczą (Grupa 2) stanowiło 35 pacjentów z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia, u których wykonano profesjonalne oczyszczenie zębów. Po 2 tygodniach od przeprowadzonych zabiegów higienizacyjnych wyodrębniono, na podstawie badania klinicznego, podgrupę 16 osób (Podgrupa 2A), u których nie zastosowano tabletek probiotycznych oraz 19 osób (Podgrupa 2B), które stosowały dwa razy dziennie tabletki doustne zawierające szczep *Lactobacillus reuteri*. U każdego pacjenta oceniano higienę jamy ustnej (wskaźnik płytki nazębnej PI.I), stan dziąseł (wskaźnik dziąsłowy GI, wskaźnik krwawienia ze szczeliny dziąsłowej SBI), głębokość kieszonek przyzębnych (PPD) oraz utratę przyzęczepu łącznotkankowego (CAL).

Materiał badawczy stanowiły próbki zbiorcze płynu dziąsłowego posiewane na wzbogaconym agarze Columbia, agarze Rogosa (inkubowane w temp. 37°C w warunkach beztlenowych) oraz agarze czekoladowym (inkubowane w temp. 37°C w warunkach tlenowych z 5% CO<sub>2</sub>). Wyrosłe bakterie identyfikowano stosując test rapid ID 32 A, API NH i API 50 CHL (bioMerieux). Zdolność do produkcji nadtlenu wodoru wśród szczepów *Lactobacillus* określano na podłożu różnicującym TMB-Plus agar.

Z hodowli poszczególnych bakterii przygotowywano supernatanty. Fibroblasty dziąsłowe HGF-1 (CRL-2014, ATCC) hodowano na podłożu hodowlanym złożonym z płynu DMEM wzbogaconego 10% płodową surowicą bydlęcą FBS. Oceny obecności ATP w hodowlach fibroblastów dziąsłowych HGF-1 dokonywano przy użyciu testu luminescencyjnego (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega). W badaniu żywotności fibroblastów dziąsłowych HGF-1 zastosowano test fluorescencyjny Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA). Badano wpływ supernatantów nieogrzewanych oraz supernatantów ogrzewanych w temp. 56°C przez 30 minut oraz w 100°C przez 30 minut.

Oznaczanie poziomu cytokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17 w płynie dziąsłowym wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Wartość absorbancji odczytywano za pomocą czytnika Reader 250 (bioMerieux). Zmiany w ekspresji genów w hodowlach fibroblastów dziąsłowych, następujące pod wpływem supernatantów uzyskanych z badanych bakterii, badano przy użyciu metody mikromacieży, na platformie Affymetrix.

Wśród badanych pacjentów grupy 1 największy odsetek bakterii patogenych stanowiły *P. gingivalis* 36,67% oraz *F. nucleatum* 36,67%. Odsetek po-

zostałych bakterii wynosił: *Parvimonas micra* 26,67%, *P. intermedia* 16,67%, *Gemella morbillorum* 16,67%, *A. actinomycetemcomitans* 3,33%. Bakterie *L. acidophilus* wykazano u 56,67% pacjentów grupy 1. Wartości wskaźników klinicznych (GI, SBI, PPD i CAL) oraz poziomy cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) w płynie dziąsłowym były istotnie wyższe w grupie pacjentów z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia (grupa 1B) niż w grupie pacjentów z umiarkowanym zapaleniem (grupa 1A).

W grupie 2, po zabiegu higienizacyjnym, u 16 pacjentów (podgrupa 2A) stwierdzono istotne statystycznie obniżenie średnich wartości wszystkich wskaźników klinicznych (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) oraz poziomów cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) w płynie dziąsłowym. U pozostałych 19 pacjentów (podgrupa 2B) nie stwierdzono poprawy klinicznej po zabiegu higienizacyjnym. Nie stwierdzono statystycznych zmian w wartościach wskaźników SBI, PPD i CAL oraz poziomach cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17) w płynie dziąsłowym. U pacjentów podgrupy 2B zastosowano tabletki probiotyczne zawierające szczep *Lactobacillus reuteri*. Po 2 tygodniach od zastosowania tabletek u 14 (74%) osób wykazano istotne statystycznie obniżenie średnich wartości wskaźników SBI, PPD i CAL oraz poziomów cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-17). U 4 osób nie stwierdzono poprawy klinicznej.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że supernatanty 24 godz. hodowli *P. gingivalis* oraz *A. actinomycetemcomitans* wpływają na istotne zmniejszenie produkcji ATP przez ludzkie fibroblasty dziąsłowe. Supernatanty *P. intermedia* nie mają wpływu na zmianę poziomów ATP w fibroblastach. Jednocześnie wykazano aktywność supernatantów *P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans* ogrzewanych w 56°C przez 30 min, natomiast ogrzewanie supernatantów w 100°C przez 30 min doprowadziło do zaniku ich aktywności. Badając supernatanty 24-godz. hodowli szczepów *L. acidophilus* stwierdzono istotne zwiększenie poziomów ATP w fibroblastach dziąsłowych. Jednocześnie wzrost poziomów ATP nie był zależny od wytwarzanego przez szczepy *L. acidophilus* nadtlenu wodoru.

W badaniach nie stwierdzono wpływu supernatantów z hodowli bakterii na zmianę poziomu ekspresji genów związanych z cytokinami (*TNFAIP*, *IL1 $\beta$* , *IL6*, *IL12*, *IL17*, *IL10*) w fibroblastach dziąsłowych HGF-1. Wykazano zaś wzrost ekspresji genu antyproliferacyjnego *BTG2* pod wpływem supernatantów z hodowli bakterii *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* i *P. gingivalis*.

Uzyskane wyniki determinują następujące wnioski:

1. W przewlekłym zapaleniu przyzębia u dorosłych najczęściej wykrywanymi periopatogenami w kieszonkach przyzębnych są: *P. gingivalis* (36,67%), *F. nucleatum* (36,67%) oraz *Parvimonas micra* (26,67%). Jednocześnie pa-

łeczki *Lactobacillus* wytwarzające nadtlenek wodoru występują istotnie częściej w kieszonkach przyzębnych u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia, aniżeli u chorych z ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia.

2. W płynie dziąsłowym kieszonek przyzębnych występuje znaczna koncentracja cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17), przy czym poziomy tych cytokin są statystycznie wyższe w ciężkim niż w umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia.
3. Supernatanty hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*P. gingivalis*, *P. intermedia* oraz *A. actinomycetemcomitans*) nie zwiększają ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i IL-17) oraz cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.
4. Supernatanty hodowli szczepów klinicznych *L. acidophilus* nie zwiększają ekspresji genów dla cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 i IL-17) oraz cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.
5. Supernatanty hodowli wybranych szczepów periopatogenów (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*) istotnie zwiększają ekspresję genu czynnika antyproliferacyjnego *BTG2* w ludzkich fibroblastach dziąsłowych, podczas gdy ekspresja tego genu nie zmienia się w następstwie działania supernatantów hodowli szczepów klinicznych *L. acidophilus*.
6. Zewnątrzkomórkowe produkty periopatogenów (*P. gingivalis* i *A. actinomycetemcomitans*), będące najprawdopodobniej peptydami docelowymi dla mitochondriów, redukują syntezę ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych, co może hamować ich proliferację i indukować śmierć komórek w wyniku apoptozy.
7. Zewnątrzkomórkowe produkty *L. acidophilus*, będące najprawdopodobniej egzopolisacharydami z aktywnością prooksydacyjną, zwiększają syntezę ATP w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.
8. W umiarkowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia u ponad połowy chorych (54%) zabiegi higienizacyjne nie są wystarczająco skuteczne dla poprawy parametrów klinicznych (w zakresie wskaźników SBI, PPD, CAL) i w ich wyniku nie dochodzi również do zmniejszenia poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17).
9. Tabletki probiotyczne zawierające szczep *L. reuteri* istotnie wpływają na poprawę parametrów klinicznych (w zakresie wskaźników SBI, PPD, CAL) i zmniejszenie poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-17) u chorych z umiarkowanym przewlekłym zapaleniem przyzębia.

## 9. SUMMARY

Chronic periodontitis belongs to the most frequent inflammatory diseases in humans, leading to destruction of periodontium, radicular cement, and osseous alveolar process. Frequency and severity of chronic periodontitis increases with progressing age.

In etiopathogenesis of chronic periodontitis the principal role is played by anaerobic bacteria, defined as periopathogens or periodontopathogens. The most important periopathogenes include *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and the relative anaerobe of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Present study aimed at clarification of the potential for an antagonistic interaction between clinically important periopathogens and *Lactobacillus* strains present in oral cavity microflora in chronic periodontitis in *in vivo* and *in vitro* studies.

The aim was implemented in the following research tasks:

1. Evaluation of periopathogens and bacteria of *Lactobacillus* genus manifestation with particular attention given to hydrogen peroxide producing ability in persons with moderate and severe chronic periodontitis;
2. Evaluation of pro-inflammatory cytokines response (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) in patients with moderate or severe chronic periodontitis;
3. Evaluation of expression manifested by genes of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-17) and of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and by the gene of an anti-proliferative factor, BTG2 in human gingival fibroblasts under effect of supernatants obtained from cultures of selected periopathogen strains (*P. gingivalis*, *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans*) and supernatants obtained from cultures of clinical *L. acidophilus* strains.
4. Evaluation of effects exerted by supernatants isolated in cultures of selected periopathogen strains (*P. gingivalis*, *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans*) on levels of adenosin-triphosphate (ATP) in human gingival fibroblasts and on their viability;
5. Evaluation of effects exerted by supernatants obtained from cultures of clinical *L. acidophilus* strains on ATP level in human gingival fibroblasts and on their viability;
6. Evaluation of pro-inflammatory cytokine response (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) in patients with moderate chronic periodontitis receiving a probiotic dietary supplement, probiotic tablets containing *Lactobacillus reuteri* strain.

The studies were conducted on 65 individuals, 30 to 50 years of age, selected from among 112 patients of the Department of Conservative Dentistry and Periodontology, Poznan University of Medical Sciences in Poznań. Among the examined group of patients 30 persons (Group1) were selected among which clinical examination allowed to distinguish the subgroup of 1A, including 15 patients with moderate chronic periodontitis and the subgroup of 1B, including 15 patients with severe chronic periodontitis.

The subsequent research group (Group 2) included 35 patients with chronic moderate chronic periodontitis, subjected to professional cleaning of teeth. After two weeks of hygienization procedures clinical examination allowed to distinguish a subgroup of 16 persons (subgroup 2A) administered with no probiotic tablets and a subgroup of 19 persons (subgroup 2B) given twice daily oral tablets containing *Lactobacillus reuteri* strain. Every patients was subjected to evaluation of oral cavity hygiene ( plaque index, PI.I), condition of gingivae (gingival index, GI; sulcus bleeding index, SBI), periodontal pocket depth (PPD) clinical attachment loss (CAL).

The research material involved samples of gingival fluid plated on Columbia agar, Rogosa agar (incubated at the temperature of 37°C, in anoxic conditions) and on chocolate agar (incubated at the temperature of 37°C, in aerobic conditions, in presence of 5% CO<sub>2</sub>). The growing bacterial strains were identified using ID 32 A, API NH and API 50 CHL rapid tests (bioMerieux). Ability of the *Lactobacillus* strains to produce hydrogen peroxide was tested on the differentiating TMB-Plus agar.

Cultures of individual bacteria produced supernatants. Gingival fibroblast line of HGF-1 (CRL-2014, ATCC) was cultured in a culture medium consisting of DMEM enriched with 10% foetal bovine serum (FBS). Presence of ATP in cultures of HGF-1 fibroblasts was evaluated using a luminescence test (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega). In studies on viability of gingival HGF-1 fibroblasts the fluorescence Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, USA) was used. Effects were tested of unheated supernatants and supernatants heated at the temperature of 56°C for 30 minutes and at 100°C for 30 minutes.

Levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17 cytokines in gingival fluid were established using the immunoenzymatic ELISA) technique while the absorbance values were read out using Reader 250 instrument (BioMerieux). Changes in gene expression in cultures of gingival fibroblasts under effects of supernatants obtained from studied bacterial cultures were established using microarrays and the Affymetrix platform.



In the studied patients of Group 1 the highest proportion of pathogenic cultures was formed by *P. gingivalis* (36.67%), *F. nucleatum* (36.67%) and *Parvimonas micra* (26.67%). The species of *P. intermedia* (16.67%), *Gemella morbillorum* (16.67%), *A. actinomycetemcomitans* (3.33%) were detected sporadically only. Bacteria of *L. acidophilus* were demonstrated in 56.67% patients of Group 1. Values of clinical indices (GI, SBI, PPD and CAL) and cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) in the gingival fluid were significantly higher in the group of patients with severe chronic periodontitis (Group 1B) than in patients with moderate chronic periodontitis (Group 1A).

Following hygienization procedure in Group 2, in 16 patients (subgroup 2A) a significant decrease was noted in all clinical indices (PI.I, GI, SBI, PPD, CAL) and in cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) in gingival fluid. In the remaining 19 patients (subgroup 2B) no clinical improvement could be noted following the hygienization procedure and no significant alterations could be detected in values of SBI, PPD and CAL indices or in cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) levels in gingival fluid. In patients of the 2B subgroup probiotic tablets were applied, containing the *Lactobacillus reuteri* strain. After 2 weeks of administration of the tablets in 14 (74%) persons a significant decrease was detected in mean values of SBI, PPD and CAL indices and in levels of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17). In 4 persons no clinical improvement was detected.

In the conducted studies supernatants of 24 cultures of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* were found to significantly reduce ATP production in human gingival fibroblasts while supernatants of *P. intermedia* induced no alterations in ATP levels in fibroblasts. In parallel, the activity was demonstrated in supernatants of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* heated at the temperature of 56°C for 30 min, while heating of the supernatants at the temperature of 100°C for 30 min abolished their activity. Testing of supernatants obtained from 24 hour cultures of *L. acidophilus* strains disclosed a significant increase in ATP level in gingival fibroblasts. The increase in ATP levels manifested no relationship to hydrogen peroxide produced by the strains of *L. acidophilus*.

The studies demonstrated no effect of the bacterial culture supernatants on expression of genes linked to cytokines (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12, IL17, IL10) in gingival fibroblast line of HGF-1. On the other hand, an increased expression was detected of the anti-proliferative gene, *BTG2* under effect of supernatants from cultures of *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* and *P. gingivalis* bacteria.

The obtained results allow for drawing the following conclusions:

1. In chronic periodontitis of adults the periopathogens most frequently detected in periodontal pockets include *P. gingivalis* (36.67%), *F. nucleatum*

(36.67%) and *P. micra* (26,67%). The hydrogen peroxide-producing bacilli of *Lactobacillus* are manifested significantly more frequently in periodontal pockets of patients with moderate chronic periodontitis than in patients with severe chronic periodontitis.

2. Gingival fluid of periodontal pockets contains significant concentrations of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17), and levels of the cytokines are significantly higher in patients with severe than in patients with moderate chronic periodontitis.
3. Supernatants in cultures of selected periopathogen strains (*P. gingivalis*, *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans*) induce no increase in expression of genes for pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-17) or for the anti-inflammatory cytokine of IL-10 in human gingival fibroblasts.
4. Supernatants in cultures of clinical *L. acidophilus* strains induce no increase in expression of genes for pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and IL-17) or for the anti-inflammatory cytokine, IL-10, in human gingival fibroblasts.
5. Supernatants in cultures of selected periopathogen strains (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*) significantly increase expression of the anti-proliferative factor, *BTG2*, in human gingival fibroblasts while expression of the gene manifests no alterations under effect of supernatant obtained from clinical strains of *L. acidophilus*.
6. Extracellullar products of periopathogens (*P. gingivalis* and *A. actinomyce-temcomitans*), representing most probably target peptides for mitochondria, reduce synthesis of ATP in human gingival fibroblasts, which may inhibit their proliferation and induce cell death due to apoptosis.
7. Extracellular products of *L. acidophilus*, representing most probably exopolysaccharides with pro-oxidative activity, stimulate synthesis of ATP in human gingival fibroblasts.
8. In moderate chronic periodontitis in almost every other patient (54%) hygienization procedures prove to be insufficiently effective for improvement of clinical parameters (in the scope of SBI, PPD, CAL indices) or for reduction of pro-inflammatory cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17).
9. Probiotic tablets containing *L. reuteri* strain significantly improve clinical parameters (indices of SBI, PPD, CAL) and reduce pro-inflammatory cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17) in patients with moderate chronic periodontitis.