

Kryspin Uram

**Możliwości zastosowania nieorganicznych związków soli
sodowych w stomatologii**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Dr hab.n.med. Anna Szkaradkiewicz-Karpińska
Zakład Przedklinicznej Stomatologii Zachowawczej
i Przedklinicznej Endodoncji UMP

Poznań 2021

Wielce Szanownej
Pani Dr hab. Annie Szkaradkiewicz-Karpińskiej
Promotorowi
składam serdeczne podziękowania
za wszechstronną pomoc w realizacji tej pracy

Spis treści:

1. WSTĘP.....	5
1.1 Próchnica zębów i choroby przyzębia oraz ich następstwa.....	5
1.2 Antyseptyki stosowane w profilaktyce chorób jamy ustnej.....	11
1.3 Charakterystyka nieorganicznych związków soli sodowych (wodorowęglanu sodu i tiosiarczanu sodu).....	16
2. CEL PRACY.....	19
3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ.....	20
3.1 Szczepy bakterii: <i>Streptococcus mutans</i> i <i>Porphyromonas gingivalis</i> oraz ich hodowle.....	20
3.2 Badania aktywności przeciwbakteryjnej soli – wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu.....	22
3.3 Metody statystyczne.....	26
4. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE.....	27
4.1 Aktywność przeciwbakteryjna wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu wobec <i>Streptococcus mutans</i>	27
4.2 Aktywność przeciwbakteryjna wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu wobec <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
5. DYSKUSJA.....	43
6. WNIOSKI.....	53
7. STRESZCZENIE.....	54
8. SUMMARY.....	57
9. PIŚMIENNICTWO.....	60
10. SPIS FOTOGRAFII, RYCIN I TABEL.....	71
11. ANEKS.....	74

WYKAZ SKRÓTÓW

ACFF - Polski Oddział Sojuszu dla Przyszłości Wolnej od Próchnicy (ang. *Alliance for a Cavity-Free Future*)

APRP – kwaśne białka bogate w prolinę (ang. *Proline rich acid proteins*)

BOP – krwawienie przy zgłębnikowaniu (ang. *Bleeding on Probing*)

CAL – kliniczna utrata położenia przyczepu łącznotkankowego (ang. *Clinical Attachment Loss*)

CFU – Jednostki Tworzące Kolonie (ang. *Colony Forming Unit*)

CHX – chlorheksydyna (ang. *chlorhexidine*)

CPC – chlorek cetylpirydyny (ang. *cetylpyridine chloride*)

EPS - Egzopolisacharydy (ang. *Exopolysaccharides*)

FDI – Światowa Federacja Dentystyczna (ang. *World Dental Federation*)

FMD – całościowe odkażanie jamy ustnej (ang. *full mouth disinfection*)

IL-1 – Interleukina-1 (ang. *Interleukin-1*)

IL-6 – Interleukina-6 (ang. *Interleukin-6*)

IL- 8 – Interleukina-8 (ang. *Interleukin-8*)

LDD – dokieszonkowe podawanie chemioterapetyku (ang. *local drug delivery*)

LPS – Lipopolisacharyd (ang. *Lipopolysaccharide*)

MMP – Metaloproteinazy macierzy (ang. *Matrix metalloproteinases*)

OE – olejki eteryczne (ang. *essential oils*)

PD – głębokość sondowania (ang. *Probing Depth*)

PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. *buffered saline solution*)

PRP – białka bogate w prolinę (ang. *Proline-rich polypeptide*)

PVP – jodopowidon (ang. *povidone iodine*)

TNF-alfa – Czynn timer martwicy guza-α (ang. *Tumor necrosis factor – alpha*)

US FDA – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *US Food and Drug Administration*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

1. WSTĘP

1.1. Próchnica zębów i choroby przyzębia oraz ich następstwa

Próchnica zębów (ang. *dental caries*) jest wieloprzyczynową, przewlekłą chorobą bakteryjną, zlokalizowanym, patologicznym procesem prowadzącym do demineralizacji i proteolitycznego rozpadu tkanek twardych zęba [Pitts i wsp., 2017]. Próchnica jest procesem postępującym, w następstwie może prowadzić do utraty zębów. Globalne badania populacyjne dokumentują, że powszechnie występująca na świecie próchnica zębów, stanowi najczęstszą chorobę cywilizacyjną. Według najnowszych danych choroba próchnicowa obecnie dotyczy prawie 2,4 miliarda ludzi na świecie [Pitts i wsp., 2017, Peres i wsp., 2019]. Jej występowanie notowane jest we wszystkich grupach wiekowych. W grupie dorosłych Polaków próchnica zębów stanowi poważny problem zdrowotny, obejmując blisko 100% populacji [Gaszyńska i wsp., 2014, Mielczarek i wsp., 2017].

Etiopatogeneza próchnicy zębów jest wieloprzyczynowa i nadal nie do końca wyjaśniona. Wiadomo obecnie, że zasadniczym czynnikiem etiologicznym zapoczątkowującym próchnicę są bakterie próchnicotwórcze, tzw. kariopatogeny, głównie paciorkowce jamy ustnej, przede wszystkim *Streptococcus mutans* (Fot.1). Gatunek ten charakteryzuje się wysoką adherencją do powierzchni hydroksyapatytu szkliwa zębów. Szczepy tego gatunku charakteryzują się także zdolnością wytwarzania rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych zewnątrzkomórkowych wielocukrów, tzw. egzopolisacharydu (EPS), tworzących zrąb (matriks) powstającej płytki nazębnej [Banas i wsp., 2018, Chen i wsp., 2020]. Jednocześnie, kariopatogeny fermentując cukry wytwarzają kwasy organiczne, szczególnie kwas mlekowy, które akumulowane w płytce nazębnej, powodują obniżenie jej pH (<5,5). Dochodzi do zapoczątkowania demineralizacji szkliwa, co w następstwie może prowadzić do powstania ubytku w szkliwie zębów. W rozwoju próchnicy zębów, dobrze jest znana rola także innego kariopatogenu – pałeczek *Lactobacillus* spp., spośród których dominującym gatunkiem jest *Lactobacillus acidophilus* (Fot.2). Pałeczki kwasu mlekowego charakteryzuje znaczna kwasolubność i intensywna kwasotwórczość. Optymalne pH dla ich wzrostu mieści się w zakresie 5,5 – 5,8 [Caufield i wsp., 2015, Zaremba 2019]. Pałeczki te nie wykazują właściwości adherencyjnych do hydroksyapatytów szkliwa i dlatego tylko nieliczne występują w bakteryjnej płytce nazębnej. Natomiast wskazuje się, że powstające ubytki

próchnicowe mogą stanowić tzw. nisze retencyjne dla akumulacji i wzrostu *Lactobacillus* spp., co powoduje rozwój procesu próchnicowego, w następstwie prowadząc do ubytku w zębinie [Caufield i wsp., 2015].

Płytkę nazębną (ang. *dental plaque*), dawniej określaną jako płytkę bakteryjną (ang. *microbial plaque*) tworzy się już w kilka minut po oczyszczeniu zębów [Socransky i wsp., 2002]. Na powierzchni szkliwa, będącego w kontakcie ze śliną, odkłada się najpierw bezbakteryjna, amorficzna błonka, zwana błonką nabytą (ang. *pellicle*). Błonka nabyta jest formowana poprzez adsorpcję białek śliny, głównie białek bogatych w prolinę (PRP) i mucyn, przy czym dominują białka bogate w prolinę (PRP) [Gibbins 2014, Valente 2018]. Stanowi warstwę o grubości około 0,01-1µm. Przyłączające się do tworzonej błonki nabytej kariopatogeny odpowiadają za inicjowanie procesu próchnicowego. Z kolei w błonce długoterminowej, tzw. dojrzałej, dominują mucyny, a zawartość białek bogatych w prolinę jest minimalna wskutek ich degradacji. W ciągu 2 tygodni błonka nabyta staje się dojrzałą płytką nazębną. W dojrzałej płytce dominują bakterie względnie beztlenowe oraz beztlenowe. Kilikutygodniowa dojrzała płytka nazębna składa się z organicznej matrycy (białka śliny, przede wszystkim mucyny i zewnątrzkomórkowe produkty przemiany bakteryjnej – glukany i fruktany), a także z bakterii, złuszczonych komórek nabłonka i leukocytów. Jak wskazują badania Liczba bakterii w płytce wynosi 10^{11} /g masy [Strużycka 2014, Yamashita i wsp., 2017]. Płytkę nazębną może ulec mineralizacji. Jeśli ślina jest bardzo przesycona jonami wapniowymi i fosforanowymi, to jony te mogą zostać odłożone w warstwy płytki nazębnej. Mineralizacja płytki nazębnej składa się z fazy krystalizacji pierwotnej (tworzenie ognisk krystalizacyjnych) oraz fazy krystalizacji wtórnej (dojrzewanie wytworzonych kryształów fosforanu wapnia). Tworzą się nierozpuszczalne kryształki fosforanu wapnia i płytka nazębna ulega zwapnieniu – powstaje kamień nazębny. W skład dojrzałego kamienia nazębnego wchodzi 80% zmineralizowanego materiału, a 20% to składniki organiczne [Pasich 2013]. Inicjacja procesu próchnicowego ma miejsce na poziomie ultrastrukturalnym (kryształ apatytu) i nie jest dostrzegalna klinicznie. Zapoczątkowanie próchnicy związane jest z bakteryjną fermentacją węglowodanów, w wyniku której powstają kwasy organiczne powodujące spadek pH. Obniżenie pH płytki poniżej wartości krytycznej (dla hydroksyapatytu wartość ta wynosi 5,5, dla fluoroapatytu 4,5, dla szkliwa 4,5-5,5, dla zębiny ok. 6,0, dla cementu korzeniowego 6,7) powoduje rozpuszczanie fosforanów wapnia hydroksyapatytu inicjując utratę substancji mineralnych zęba. Powtarzające się spadki pH w odpowiednio długim czasie doprowadzają do demineralizacji podatnego miejsca na powierzchni zęba, a zatem zapoczątkowują proces próchnicowy [Pitts i wsp., 2017].

Pierwotna zmiana próchnicowa, ograniczona do szkliwa definiowana jest jako próchnica początkowa i charakteryzuje się nienaruszoną powierzchnią. Jednak okolica podpowierzchniowa jest porowata. W tym stadium utrata substancji mineralnych nie może być wykryta, ponieważ szkliwo jest twarde i nie wykazuje ubytku. Początkowe zmiany próchnicowe mogą ulec odwróceniu dzięki remineralizacji powodującej przywrócenie szkliwa do stanu zdrowia. Remineralizacja stanowi proces odbudowy częściowo rozpuszczonych kryształów szkliwa. Warunkiem niezbędnym do jej przebiegu jest przesycenie śliny solami wapnia i fosforu. Umożliwia to przepływ jonów w kierunku szkliwa, tzn. rozpuszczone kryształy mogą pobierać ze śliny wapń i fosforany. Wapń związany przez białka ślinowe utrzymuje równowagę pomiędzy hydroksyapatytem a Ca^{2+} śliny. Na tę równowagę wpływają jony fluorkowe, które zmniejszają demineralizację, a zwiększają remineralizację. Fluorki dyfundują do podpowierzchniowego szkliwa i adsorbując się na powierzchni kryształu chronią przed dalszym jego rozpuszczaniem. Niezmieniona powierzchnia nad początkową zmianą próchnicową stanowi decydujący czynnik dla procesu remineralizacji, ponieważ chroni wytrawione kryształy hydroksyapatytów w szkliwie przed pokryciem białkami śliny. Istotą postępowania remineralizacyjnego jest ponowne wbudowanie utraconych minerałów do podpowierzchniowej warstwy szkliwa. Ślina nasycona jonami wapnia i jonami fosforanowymi przyczynia się do dyfuzji wcześniej rozpuszczonych minerałów zęba z powrotem do szkliwa. Dochodzi do odbudowy powierzchni częściowo rozpuszczonego kryształu w obrębie zmiany. Obecność niskich stężeń fluorków wśród kryształów szkliwa silnie hamuje proces rozpuszczania substancji mineralnej. Przebieg procesu próchnicowego jest modyfikowany zatem przez ilość i składniki śliny oraz obecność jonów fluorkowych [Jańczuk i wsp., 2014, Pitts i wsp., 2017]. Z kolei, wystąpienie ubytków w szkliwie jest procesem nieodwracalnym. W momencie uszkodzenia tkanek twardych dochodzi do zapoczątkowania procesów destrukcyjnych w miazdze, a następnie do jej obumarcia. Powstanie ognisk martwicy sprzyja dalszej kolonizacji bakterii i prowadzi do zakażenia tkanek okołowierzchołkowych [Jurczak i wsp., 2014, Jańczuk 2014].

Zapalenie przyzębia (ang. *periodontitis*) jest przewlekłą, wieloczynnikową chorobą zapalną związaną z biofilmem nazębnym i charakteryzuje się postępującą destrukcją, a następnie kliniczną utratą przyczepu łącznotkankowego oraz kości wyrostka zębodołowego, obecnością pogłębionych kieszonek i krwawieniem z dziąseł. Główną cechą kliniczną zapalenia przyzębia jest utrata przyczepu łącznotkankowego wskutek procesu zapalnego. Zapalenie przyzębia można scharakteryzować pod względem rozległości i ciężkości. Stopień zaawansowania zapalenia przyzębia określa się na podstawie klinicznej utraty przyczepu

(CAL), głębokości kieszonek (pocket depth, PD), krwawienia przy zgłębnikowaniu (bleeding on probing, BOP) i utraty kości. Obecnie przyjętymi podstawowymi kryteriami rozpoznania zapalenia przyzębia są : stwierdzenie CAL na powierzchniach stycznych ≥ 2 zębów, które nie sąsiadują ze sobą lub stwierdzenie CAL ≥ 3 mm i kieszonki > 3 mm na powierzchniach przedśionkowych lub językowych ≥ 2 zębów. Obecnie obowiązującą klasyfikacją chorób przyzębia jest klasyfikacja z 2017 roku (Tabela 1). Obecnie wyróżnia się cztery stadia zapalenia przyzębia, oceniane na podstawie klinicznej utraty przyczepu (CAL), ilościowej i procentowej utraty kości, głębokości sondowania (ang. *probing depth* – PD), obecności i rozległości pionowych ubytków kostnych i objęcia furkacji, rozchwiania zębów i utraty zębów. Stadium klasyfikuje nasilenie i zakres bieżącej utraty tkanek w tym utraty zębów z powodu zapalenia przyzębia oraz poziom złożoności leczenia choroby. Początkowe zapalenie przyzębia (stadium I) jest stanem przejściowym pomiędzy zapaleniem dziąseł a zapaleniem przyzębia i odpowiada bardzo wczesnym fazom utraty przyczepu. Stadium II stanowi umiarkowane zapalenie przyzębia, klinicznie można stwierdzić obecność CAL 3-4 mm oraz obecność kieszonek przyzębnych o głębokości 5 mm lub mniej. W stadium III (ciężkie zapalenie przyzębia) występuje już znaczne zniszczenie aparatu zawieszeniowego. Charakterystyczne jest występowanie głębokich zmian, sięgających środkowej części korzenia. W stadium IV zapalenia przyzębia dochodzi do znacznej destrukcji tkanek przyzębia pełniących funkcje podporowe z możliwością utraty uzębienia. Stadium to charakteryzuje się obecnością głębokich ubytków kostnych, które sięgają do części wierzchołkowej korzenia, i/lub utratą wielu zębów. Niezależnie od stadium choroby zapalenie przyzębia może postępować z różną szybkością [Górska i wsp., 2013, Górska 2018].

Badania mikrobiologiczne i doświadczalne na modelu zwierzęcym wskazują, że w etiopatogenezie zapalenia przyzębia podstawową rolę odgrywają patogenne beztlenowe bakterie nieprzetrwalnikujące, określane jako periopatogeny, wśród których dominującym jest *Porphyromonas gingivalis*. *P. gingivalis* jest gatunkiem bakterii z rodzaju *Porphyromonas*, sklasyfikowanym w obrębie rodziny *Porphyromonadaceae* i stwierdzanym u ponad 40% chorych z chorobą przyzębia [Cutler i wsp., 1995]. Szczepy *P. gingivalis* posiadają fimbrie z licznymi adhezynami, które zapewniają adherencję bakterii do tkanek przyzębia oraz umożliwiają koagregację z innymi gatunkami, a ponadto indukują prozapalną odpowiedź cytokinową. Jednocześnie wytwarzają egzoenzymy – proteazy (tzw. gingipainy) o właściwościach podobnych do trypsyny, powodujące destrukcję tkanki. Gingipainy silnie wpływają na system obronny organizmu poprzez niszczenie niektórych cytokin, składników dopełniacza i wielu receptorów komórek układu odpornościowego [Taylor 2010].

Tabela 1. Klasyfikacja chorób i zmian w obrębie tkanek przyzębia oraz tkanek wokół implantów (World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions, 2017) [Górska 2018]

Choroby i zmiany w obrębie tkanek przyzębia	
Zdrowe przyzębie, choroby i zmiany w obrębie tkanek dziąseł	Zdrowe przyzębie i dziąsła Zapalenie dziąseł wywołane przez biofilm nazębny Choroby dziąseł nie wywołane przez biofilm nazębny
Zapalenie przyzębia	Martwicze choroby przyzębia Zapalenie przyzębia Zapalenie przyzębia jako objaw chorób ogólnoustrojowych
Inne stany mające wpływ na przyzębie	Choroby ogólnoustrojowe wpływające na tkanki przyzębia Ropnie przyzębne i zmiany endodontyczno-periodontologiczne Nieprawidłowości śluzówkowo-dziąsłowe Nadmierne siły zgryzowe Czynniki związane z zębami i uzupełnieniami protetycznymi
Choroby i zmiany w obrębie tkanek wokół implantów:	
Zdrowe tkanki wokół implantów	
Zapalenie błony śluzowej wokół implantów	
Peri-implantitis	
Ubytek tkanek miękkich i twardych wokół implantów	

P. gingivalis silnie indukuje wytwarzanie cytokin prozapalnych IL-1, IL-6, IL-8 oraz TNF-alfa przez neutrofile, monocyty i makrofagi. Wykazano, że proteazy *P. gingivalis* mają zdolność niszczenia składników układu dopełniacza. Arg-gingipaina niszczy C3 związane z opsonizacją, dzięki czemu *P. gingivalis* staje się opornym na fagocytozę przez neutrofile. Z kolei lys-gingipaina degradowuje C5, uwalniając składnik C5a stymuluje stan zapalny [Zaremba 2009, Hajishengallis 2011]. Ponadto stwierdzono, że gingipainy *P. gingivalis* są zdolne do niszczenia TNF alfa oraz, w przeciwieństwie do pozostałych periopatogenów, hamowania prozapalnej interleukiny 8 (IL-8) [Mężyk-Kopeć i wsp., 2005, Hajishengallis i wsp., 2011]. Proteazy uszkadzają również zewnątrzkomórkowe macierze białek takich jak, laminina, fibronektyna. Rozkładają kolagen typu 1 i 4 [Andrian i wsp., 2004]. *P. gingivalis* i metaloproteinazy macierzy gospodarza (MMP) odgrywają istotną rolę w niszczeniu tkanek związanym z zapaleniem przyzębia. 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 miejscowe mikrośrodowisko kieszonki przyzębnej. Większość szczepów *P. gingivalis* posiada otoczkę polisacharydową, która hamuje fagocytozę. Lipopolisacharyd (LPS), endotoksyna, spełnia rolę antygeny i aktywuje cytokiny [Al-Shibani i wsp., 2008, Scheres i wsp., 2013]. Najczęściej poza *P. gingivalis* 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 [Zaremba 2019].

Zdrowe zęby stanowią pierwszą barierę ochronną przed wtargnięciem drobnoustrojów z jamy ustnej do wnętrza organizmu. Następstwami nieleczonych chorób jamy ustnej – próchnicy zębów oraz chorób przyzębia są utrata uzębienia oraz zespoły uogólnionych zakażeń organizmu [Slots 2019, Schmalz i wsp., 2020]. Udowodniono, że patogeny w biofilmie, obecne w zapaleniu przyzębia, są odpowiedzialne za powstawanie nawracającej bakteriemii, która może rozprzestrzeniać się do odległych tkanek i narządów. Światowa Federacja Dentystyczna (World Dental Federation – FDI) wskazuje na ścisłe powiązanie zdrowia jamy ustnej z całym organizmem [Glick i wsp., 2021]. Biorąc pod uwagę powyższe, niezwykle ważna jest profilaktyka nie tylko próchnicy zębów, chorób przyzębia, ale wszystkich chorób występujących w jamie ustnej [Glick i wsp., 2017, Glick i wsp., 2021].

1.2. Antyseptyki stosowane w profilaktyce chorób jamy ustnej

Celem działania leczniczo-profilaktycznego jest skuteczna eliminacja płytki nazębnej poprzez zabiegi higieniczne, jak również leczenie próchnicy oraz korektę nieprawidłowych wypełnień i uzupełnień protetycznych. Zabiegi higienizacyjne obejmują indywidualny instruktaż i motywację pacjenta do właściwego oczyszczania wszystkich powierzchni zębowych, a także skaling naddziąsłowy z polerowaniem powierzchni zębowych. W postępowaniu leczniczo-profilaktycznym próchnicy zębów i chorób przyzębia konieczne jest miejscowe zastosowanie preparatów odkażających, głównie w postaci płukanek do jamy ustnej. Stosowanie antyseptyku jest standardem w leczeniu chorób przyzębia, gdy stwierdza się obecność stałego lub zdejmowanego aparatu ortodontycznego, jak również w postępowaniu po skalingu, kiedy higiena jamy ustnej pozostaje niewłaściwa lub ząb wykazuje zwiększoną wrażliwość po skalingu. Ponadto, w ramach fazy higienizacyjnej leczenia należy usunąć źle rokujące zęby, przeprowadzić korektę zgryzu urazowego i leczenie endodontyczne [Górska i wsp., 2013, Graziani i wsp., 2017, Górska 2018].

Do grupy antyseptyków zalicza się produkty lecznicze, które niszczą drobnoustroje i hamują ich wzrost. Stosuje się je w celu ograniczenia infekcji oraz zapobiegania zakażeniom [Dziennik Ustaw Nr 160, Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 sierpnia 2005 r. rozdz.6]. Aktualnie w Polsce jest dostępnych około 190 różnych preparatów do odkażania jamy ustnej. Jednak każdy z nich jest przygotowywany na bazie przynajmniej jednego z pięciu typów związków (są to: biguanidy, w tym oktenidyna, związki jodu, fluorki, związki amoniowe oraz preparaty roślinne, w tym fenolowe olejki eteryczne). Płyny do płukania jamy ustnej umożliwiają usuwanie resztek pokarmowych, zapobiegają lub redukują gromadzenie się już istniejącej płytki bakteryjnej, działają przeciwbakteryjnie oraz przeciwpróchnicowo [Gunsolley 2010, Chrzęszczuk i wsp., 2013].

Do antyseptyków wciąż stosowanych niezwykle często w profilaktyce zarówno chorób przyzębia, jak i próchnicy zębów należy chlorheksydyna, czyli 1.1'-heksymetylen – bid (5-[pchlorfenyl] biguanid. Wykazuje aktywność przeciwbakteryjną zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Związek ten łączy się z ujemnie naładowaną błoną cytoplazmatyczną drobnoustrojów neutralizując jej ładunek powierzchniowy, co prowadzi do zaburzenia jej ciągłości [Malicka i wsp., 2005]. Antyseptyk wykazuje działanie bakteriostatyczne w stężeniu 1 µg/ml, a bakteriobójcze przy ≥ 20 µg/ml [James i wsp., 2017, Thangavelu i wsp., 2020]. Chlorheksydyna zmniejsza

odkładanie się płytki nazębnej, sprzyja remineralizacji i zaburza demineralizację tkanek twardych zęba [Richards 2017]. Zdolność adsorbowania i łączenia się CHX z tkankami miękkimi i twardymi (substatywność chlorheksydyny) związana jest z utrzymywaniem odpowiedniego stężenia przez dłuższy czas [Bonesvoll i wsp., 1978, van der Weijden i wsp., 2015]. Jednocześnie, CHX może wywoływać zaburzenia smaku oraz trudne do usunięcia przebarwienia na zębach. Przebarwienia mogą także występować na błonie śluzowej i języku, co może być związane barwnikowych składników diety. Zatem, ze względu na miejscowe objawy niepożądane w jamie ustnej należy unikać długotrwałego stosowania chlorheksydyny. Płukanki zawierające chlorheksydynę są szczególnie polecane pacjentom z wysokim ryzykiem choroby próchnicowej i pomagają w usuwaniu płytki oraz w kontroli poziomu bakterii. Stanowią jeden z elementów wielokierunkowej profilaktyki u osób z wysokim ryzykiem próchnicy, zwłaszcza zaś u osób z obciążeniami ogólnomedycznymi [Guerra 2019].

Obecnie antyseptykiem, szeroko stosowanym jest oktenidyna (dichlorowodorek oktenidyny, dichlorowodorek [N,N'-(1,10 dekanedildi-1[4H]-pirydinylo-4-ilideno) bis-91-oktanaminowy). Preparat ten cechuje się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową, spektrum której obejmuje bakterie Gram-ujemne, Gram-dodatnie oraz grzyby, wirusy otoczkowe (np. HBV, HSV), a także pierwotniaki. Dichlorowodorek oktenidyny wykazuje także wysoką aktywność względem drobnoustrojów w formie biofilmowej. Dodatkowo działa regenerująco na tkanki miękkie. Substancja należy do kationowych związków powierzchniowo czynnych. Posiada dwa miejsca aktywne dzięki którym zmienia strukturę błony lipidowej mikroorganizmów oraz wirusów prowadząc do zniszczenia ich komórek. W swoim składzie płukanka ta nie zawiera alkoholu i jest skuteczna już po 30 sekundach od zastosowania. Występowanie działań niepożądanych jest rzadsze w porównaniu z chlorheksydyną i są to głównie zaburzenia smaku oraz suchość jamy ustnej [Hübner i wsp., 2010, Python i wsp., 2015, Jockel-Schneider i wsp., 2021].

Kolejnym związkiem stosowanym szczególnie w profilaktyce i terapii chorób przyzębia jest powidon jodu (PVP). Mechanizm działania tego antyseptyku opiera się na przenikaniu wolnych cząsteczek jodu przez ścianę komórkową drobnoustrojów i na nieodwracalnym ich łączeniu z białkami, lipidami i kwasami nukleinowymi. Inaktywacja enzymów jest wynikiem reakcji jodu z grupami tiolowymi i sulfohydrolowymi w białkach (reakcja utlenienia). Wiązanie się jodu z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi fosfolipidów powoduje zmiany w ich strukturze, a w efekcie uszkodzenie błony komórkowej i wpływ

cytoplazmy z komórki. Powstanie jodowanych pochodnych aminokwasów, jak również zasad pirymidynowych, prowadzi do zaburzeń w strukturze bakteryjnego DNA. PVP cechuje się wysoką skutecznością przeciwdrobnoustrojową względem wegetatywnych form bakterii oraz grzybów [Górska i wsp., 2013]. Najnowsze dane wskazują na szczególne zastosowanie powidonu jodu w profilaktyce i leczeniu próchnicy wczesnego dzieciństwa [Fux-Zalewska 2017]. Jednocześnie, może wywoływać objawy niepożądane u osób uczulonych na jod.

Z kolei, mechanizm profilaktycznego działania fluoru jest wielokierunkowy. Obecność fluoru w niskich stężeniach w ślinie lub płynie tkankowym powoduje powstawanie fluoroapatytów, które zmniejszają rozpuszczalność szkliwa i zwiększają odporność na próchnicę [Marinho i wsp., 2016]. Ponadto, fluor wykazuje także działanie bakteriostatyczne poprzez hamowanie enzymu bakteryjnego – enolazy w płytce nazębnej. Działanie hamujące jonów fluorkowych występuje już przy stężeniu $6\mu\text{g/g}$ w warunkach *in vitro*. Fluor utrudnia także transport glukozy przez błonę komórkową paciorkowców kwasotwórczych oraz hamuje zdolność syntezy wielocukrów przez te bakterie. Obserwuje się trzy rodzaje efektów związanych z podawaniem fluoru: zahamowanie demineralizacji (zmniejszenie rozpuszczalności szkliwa w kwaśnym środowisku), aktywację mineralizacji szkliwa w przebiegu procesu próchnicowego oraz bakteriobójcze działanie na drobnoustroje wywołujące zmiany próchnicze. Ten efekt powoduje zahamowanie proliferacji drobnoustrojów tworzących płytkę bakteryjną i wytwarzanie kwaśnego odczynu powodującego próchnicę [Jańczuk i wsp., 2014]. Płukanki zawierające fluorki rekomendowane są u osób powyżej 6. roku życia, zwłaszcza użytkujących aparaty ortodontyczne, uzupełnienia protetyczne oraz w przypadku zmniejszonego wydzielania śliny. Umożliwiają utrzymanie odpowiedniego stężenia jonów fluorkowych w ślinie i płytce nazębnej zapewnionego przez użycie pasty do zębów z fluorem i zwiększają skuteczność oczyszczania powierzchni międzyzębowych. Powinny być stosowane wyłącznie przez dzieci potrafiące płukać jamę ustną, pod nadzorem rodziców do czasu uzyskania pewności, że nie są połykane. Nadmierne dostarczenie fluoru może być przyczyną fluorozy zębów, przewlekłego lub ostrego zatrucia oraz niewydolności nerek. Ponadto, fluor jest silnie neurotoksyczny [Ullah i wsp., 2017]. Obecnie ogólnie przyjętymi zasadami stosowania związków fluoru w profilaktyce choroby próchnicowej zgodnie z wytycznymi polskich ekspertów są unikanie nadmiernej endogennej ekspozycji na fluor, preferowanie metod egzogennych, wybór metod i środków profilaktycznych o udowodnionej naukowo skuteczności w zależności od indywidualnych potrzeb pacjenta [Olczak-Kowalczyk i wsp., 2016, Kaczmarek i wsp., 2019].

Innym środkiem hamującym powstawanie płytki nazębnej i uznanym przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków za bezpieczny jest cetylpirydyna. Cetylpirydyna (chlorek cetylpirydyny) jest czwartorzędownym związkiem amoniowym o działaniu odkażającym. Wykazuje działanie bakteriobójcze wobec bakterii Gram-dodatnich i słabsze wobec Gram-ujemnych oraz grzybobójcze oraz przeciwzapalne [Lee i wsp., 2010, Teng i wsp., 2016]. Jednak w porównaniu z chlorheksydyną jest mniej skuteczna w hamowaniu powstawania płytki nazębnej ze względu na natychmiastowe uwalnianie się tych związków z błony śluzowej, co związane jest z ich monokationową budową [Bonesvoll i wsp., 1978].

Jednocześnie, w ostatnich latach coraz częściej jako naturalne substancje przeciwbakteryjne wykorzystywane są produkty naturalne. Najważniejsze wśród nich są: liście z drzewa herbacianego, eukaliptus, olejki z lawendy i rozmarynu. W preparatach do płukania jamy ustnej wykorzystywane są najczęściej cztery olejki eteryczne: miętowy, tymiankowy, eukaliptusowy i olejek wintergrinowy (naturalne źródło salicylanu metylu). Działanie bakteriobójcze olejków eterycznych wynika z ich składu, w tym zawartości frakcji lotnych (m.in. monoterpeny i fenylopropany) i proporcji składników biologicznie czynnych (m.in. eukaliptolu, tymolu, mentolu, naturalnego salicylanu metylu, eugenolu, geraniolu, cytronelolu) [Whitaker i wsp., 2000]. Preparaty te inhibują kariogenezę. Wykazano, że hamują adhezję *Streptococcus mutans* do szkliwa, a ponadto działają przeciwdrobnoustrojowo wobec beztlenowców jamy ustnej. Mechanizm przeciwbakteryjnego działania płukanek z olejkami eterycznymi jest wielokierunkowy. Płyny zawierające OE przenikają do głębokich warstw płytki nazębnej i w zależności od swojego stężenia niszczą ściany komórek bakteryjnych, powodują strącanie się białek komórkowych i hamują aktywność niezbędnych enzymów. Ten mechanizm działania powoduje destrukcję biofilmu bakteryjnego, rozluźniając i rozpuszczając jego strukturę w miejscach trudno dostępnych dla szczoteczki do zębów i narzędzi przeznaczonych do oczyszczania przestrzeni międzyzębowych [Kaim i wsp., 1998, Kwiatkowska i wsp., 2017]. Jednym z powszechnie stosowanych od wielu lat preparatów do płukania jamy ustnej na bazie olejków eterycznych jest Listerine®. Obecna formuła preparatu zawiera między innymi tymol, eukaliptus, salicylan metylu i mentol. Tymol i eukaliptus wykazują aktywność przeciwbakteryjną, podczas gdy salicylan metylu i mentol stanowią lokalne czynniki anestetyczne. Preparat ten zapobiega agregacji bakterii i powstawaniu wczesnej zmiany próchnicowej. Amerykańska Agencja Żywności i Leków w 2003 roku uznała Listerine® jako substancję skuteczną i bezpieczną do stosowania w jamie ustnej [Alshehri 2018].

Tabela 2. Zestawienie najczęściej aktualnie stosowanych w Polsce preparatów antyseptycznych w profilaktyce próchnicy i chorób przyzębia oraz ich główne działania niepożądane.

Grupa	Antyseptyk	Forma stosowania Przykładowe preparaty	Działanie niepożądane
Biguanidy	Chlorheksydyna	Płukanki: 0,1% Eludril Classic 0,12% Kin Gingival 0,12% Curasept ADS 0,2 % Corsodyl, 0,05% PerioPlus Balance Żele: 0,2% Elugel , 0,5% Curasept ADS Pasty do zębów: Lacalut activ , 0,12% Curasept ADS, Elgydium Antiplaque Spray 0,2 Perio Kin	Miejscowo: przebarwienia zębów oraz wypełnień, podrażnienia błony śluzowej, zaburzenia smaku, przerost brodawek nitkowatych; Ogólne: właściwości alergizujące, mutagenne, oddziaływanie neurotoksyczne. Nie należy dopuszczać do połykania preparatu, wymaga ostrożności stosowania (jest źródłem fenyloalaniny, zawiera 21,6% alkoholu metylowego)
	Oktenidyna	Płukanka: Octenidol	
Jod i polimer poliwinylo-pyrolidon	PVP-jodopowidon	Jodowany polimer poliwinylowy (PVP-J 10%)	Nadwrażliwość na preparat, skórne reakcje nadwrażliwości, reakcje anafilaktyczne, indukowana jodem nadczynność tarczycy
Fluorki	Aminofluorek z fluorkiem cynawym	Płukanka: Elmex Sensitive Meridol	Związki fluoru mają tendencje do kumulacji w organizmie; wykazują działanie neurotoksyczne, a ponadto mogą wywoływać miejscowe działania niepożądane.
Czwartorzędowe zasady amoniowe	CPC - Chlorek cetylpirydyny	Płukanki: 0,05% Colgate Plax	Podrażnienia skóry, kontaktowe zapalenia skóry, podrażnienia błony śluzowej jamy ustnej, a także złuszczające uszkodzenia śluzówki.
Preparaty roślinne/ Fenolowe olejki eteryczne	Kompozycja 4 fenolowych olejków eterycznych Kompozycja wyciągów roślinnych	Płukanka: Listerine Total Care Dentosept płyn	Uczucie suchości w jamie ustnej, pieczenie powierzchni języka, przebarwienia zębów. Możliwość miejscowego działania niepożądanego.

1.3. Charakterystyka nieorganicznych związków soli sodowych

(wodorowęglanu sodu i tiosiarcznanu sodu)

Od blisko 100 lat wskazuje się na korzystne oddziaływanie nieorganicznych soli sodowych na organizm człowieka. Wśród nich, wodorowęglan sodu oraz tiosiarczan sodu występują w środowisku naturalnym i są powszechnie znane w chemii ogólnej [Danikow 2015, Brozdowska 2017, Sircus 2020]. Wodorowęglan sodu, czyli soda oczyszczona (wzór chemiczny – NaHCO_3) o masie cząsteczkowej 84 g/mol ma odczyn słabo alkaliczny. Wodorowęglan sodu jest całkowicie biodegradowalny, rozkłada się w temperaturze około 60 stopni Celsjusza, jest substancją niepalną. Występuje naturalnie w złożach mineralnych, osadach wód słodkich i wodach gruntowych, a także w oceanach, gdzie pełni rolę stabilizatora zawartości dwutlenku węgla w atmosferze. W Europie wodorowęglan sodu jest syntetycznie wytwarzany z rodzimych minerałów metodą Solvaya, polegająca na rafinacji węglanu sodowego do wodorowęglanu sodu z użyciem amoniaku. Soda oczyszczona w medycynie ma ponad 150 letnią tradycję i jest cenionym środkiem leczniczym na oddziałach ratunkowych i intensywnej terapii, ze względu na bezpieczeństwo oraz szybkość działania w stanach zagrożenia zdrowia, a nawet życia. Amerykańska Agencja Żywności i Leków uznała wodorowęglan sodu jako bezpieczną substancję czynną w 1981 roku [Danikow 2015, Sircus 2020]. Wodorowęglan stanowi jon odpowiedzialny za zasadowość czy też zdolność wody do neutralizacji kwasów, co skutkuje zahamowaniem zmian poziomu pH. HCO_3^- nie przenika przez błony biologiczne. Za transport jonów odpowiadają wyspecjalizowane białka w membranach plazmatycznych, które umożliwiają jonom przedostanie się do komórek, jak i wydostanie się z ich wnętrza. Ponieważ jony HCO_3^- są zasadowe, napływ wodorowęglanu sodu do komórek powoduje ich alkalizację, podczas gdy jego utrata przesuwą równowagę pH komórek w kierunku kwasowej. System transportu wodorowęglanu reguluje pH komórek i całego organizmu oraz wielkość komórki i wydzielanie płynów, usuwa z organizmu główne produkty przemian metabolicznych ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$). Z kolei, sód jest podstawowym składnikiem odżywczym, niezbędnym do utrzymania płynów wewnątrz organizmu na odpowiednich poziomach. Jest także nośnikiem energii. Właściwości chemiczne i fizyczne wodorowęglanu sodu sprawiają, że ma niezwykle szerokie zastosowanie. Wodorowęglan sodu neutralizuje kwasy i chroni enzymy trawienne. Reguluje podstawowe mechanizmy fizjologiczne organizmu człowieka. Rozszerza naczynia krwionośne (jest wazodylatatorem), zwiększa płynność krwi, ułatwia jej przepływ i bierze udział w uwalnianiu tlenu z

hemoglobiny, co powoduje, że więcej tlenu wnika do naczyń włosowatych i komórek. Soda oczyszczona wykazuje silne działanie przeciwzapalne. Wspomaga proces oddychania, przenosząc dwutlenek węgla z tkanek do płuc. W chemioterapii soda oczyszczona, odgrywa istotną rolę, z uwagi na zmniejszenie negatywnych skutków oddziaływania toksycznych chemikaliów pozostałych po terapii nowotworowej. W medycynie soda oczyszczona jest stosowana w leczeniu kwasicy metabolicznej, która występuje w chorobach przewlekłych takich jak: niewydolność nerek, wieloletnie cukrzyca oraz sytuacjach zagrożenia życia spowodowanych zatrzymaniem akcji serca, niewydolnością krążeniową. Wodorowęglan sodu jest stosowany w leczeniu skutków zatruc środków farmaceutycznymi oraz związkami chemicznymi, dzięki właściwościom neutralizującym. Soda oczyszczona w medycynie rutynowo jest stosowana, także w hemodializach, dializach otrzewnowych, hepatopatii, toksykozie farmakologicznej oraz podczas operacji chirurgii naczyniowej. Wodorowęglan sodu jest także skutecznym środkiem zobojętniającym kwasy oraz przynoszącym doraźną ulgę w dolegliwościach mających wpływ na zachwianie równowagi kwasowo-zasadowej w żołądku. Soda oczyszczona jest wytwarzana przez komórki nabłonkowe żołądka, które pełnią funkcję ochronną. Wodorowęglan sodu będący zasadą neutralizuje kwasy wydzielane przez komórki ochraniające ściany żołądka. Podczas neutralizacji kwasów żołądkowych, z wodorowęglanu powstaje dwutlenek węgla [Sircus 2020]. Udowodniono, że wodorowęglan sodu zmniejsza kwasowość płytki nazębnej. Badania wykazały także, że hamuje powstawanie płytki nazębnej oraz zwiększa wchłanianie wapnia przez szkliwo zębów. Soda zwiększa pH wewnątrz jamy ustnej, neutralizując szkodliwe skutki działania bakteryjnych kwasów metabolicznych [Rams i wsp., 1984, Valkenburg i wsp., 2016].

Z kolei, tiosiarczany nieorganiczne są solami kwasu tiosiarkowego. Tiosiarczany występują w środowisku naturalnym, stanowiąc produkt metabolizmu mikroorganizmów odpowiedzialnych za obieg siarki w przyrodzie. Siarka posiada właściwości przeciwdrobnoustrojowe, stąd tiosiarczany jako źródło aktywnej siarki, mogą wykazywać aktywność przeciwbakteryjną. W środowisku kwasowym są nietrwałe, ulegają rozkładowi do siarki elementarnej oraz tlenku siarki oraz jony siarczanowe i siarczkowe. Tiosiarczany ulegają również rozkładowi w środowisku obojętnym i zasadowym w podwyższonej temperaturze lub w obecności bakterii katalizujących degradację tych związków. Do najbardziej znanych soli należy tiosiarczan sodu. Tiosiarczan sodu występuje w formie pięciowodnej ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$). Pentahydrat tiosiarczanu sodu już w temperaturze 48°C rozpuszcza się w swojej wodzie krystalizacyjnej [Brozdowska 2017]. Tiosiarczan sodu

znajduje się na liście leków podstawowych WHO jako związek stosowany w zatruciach cyjankami [WHO's Model List of Essential Drugs]. Pełni funkcję osłonową przy leczeniu nowotworów chemioterapeutykami z grupy kompleksowych związków platyny [Uozumi i wsp., 1986]. Obecnie używany jest do leczenia osłonowego, zapobiegającego utracie słuchu, przy podawaniu karboplatyny pacjentom z nowotworami mózgu. Tiosiarczan sodu działa również kardioprotekcyjne u osób z przewlekłą niewydolnością serca [Sen i wsp., 2008].

Jednak, nadal nie jest jasna aktywność przeciwbakteryjna powyższych związków wobec patogenów jamy ustnej: *Streptococcus mutans* i *Porphyromonas gingivalis*.

2. CEL PRACY

Od blisko 100 lat uznaje się korzystne oddziaływanie na organizm człowieka nieorganicznych związków soli sodowych: wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) oraz tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). W dotychczasowych obserwacjach wskazuje się na oddziaływanie przeciwbakteryjne i przeciwzapalne wodorowęglanu sodu oraz własności przeciwdrobnoustrojowe pochodnych tiosiarczanu sodu. Jednak, nadal nie jest jasna aktywność przeciwbakteryjna powyższych związków wobec patogenów jamy ustnej: *Streptococcus mutans* i *Porphyromonas gingivalis*.

Celem niniejszej pracy było zatem wyjaśnienie powyższego zagadnienia w oparciu o następujące zadania badawcze :

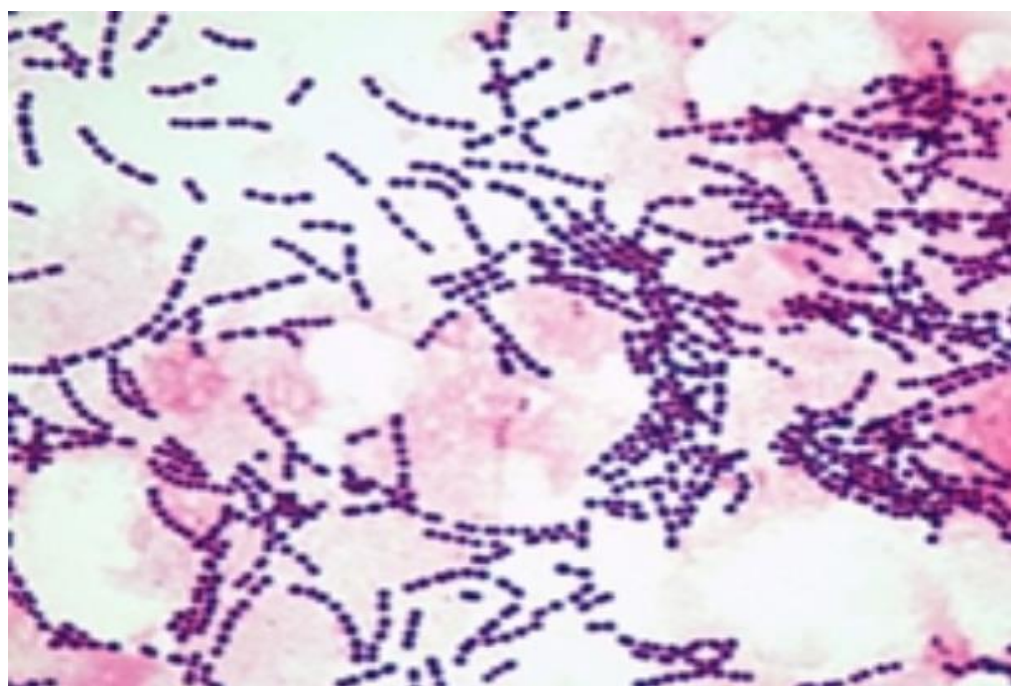
1. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro wodorowęglanu sodu wobec kariopatogenu *Streptococcus mutans*
2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro tiosiarczanu sodu wobec kariopatogenu *Streptococcus mutans*
3. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro wodorowęglanu sodu wobec periopatogenu *Porphyromonas gingivalis*
4. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro tiosiarczanu sodu wobec periopatogenu *Porphyromonas gingivalis*

3. MATERIAŁ I METODY

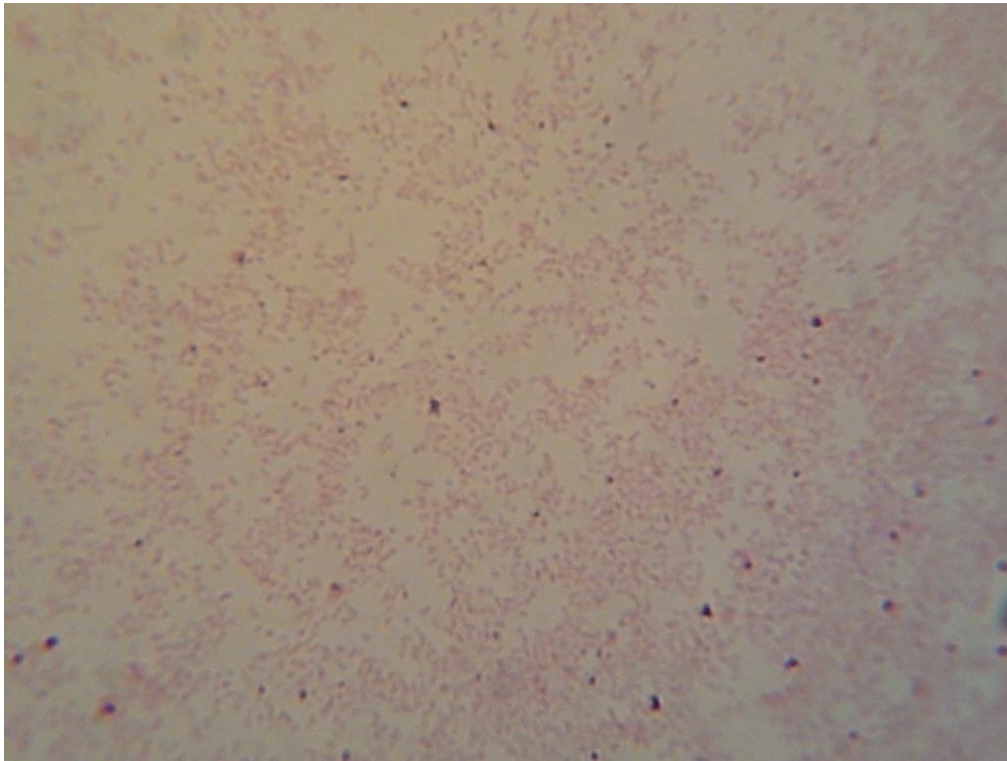
Badania mikrobiologiczne zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej UM w Poznaniu. Autor serdecznie dziękuje Panu Prof. dr hab. Andrzejowi Szkaradkiewiczowi za cenne wskazówki metodyczne i Pani dr Oldze Goślińskiej za pomoc techniczną. Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu w swojej decyzji z dnia 30 maja 2018 roku uznała, że prowadzone badania nie noszą cech eksperymentu medycznego i tym samym wyraziła zgodę na przeprowadzenie stosownych prac.

3.1 Szczepy bakterii: *Streptococcus mutans* i *Porphyromonas gingivalis* oraz ich hodowle

W badaniach użyto szczepów wzorcowych bakterii: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) oraz *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) – Fotografie 1, 2.



Fotografia 1. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (pow.1000x) (© A. Szkaradkiewicz-Karpińska)

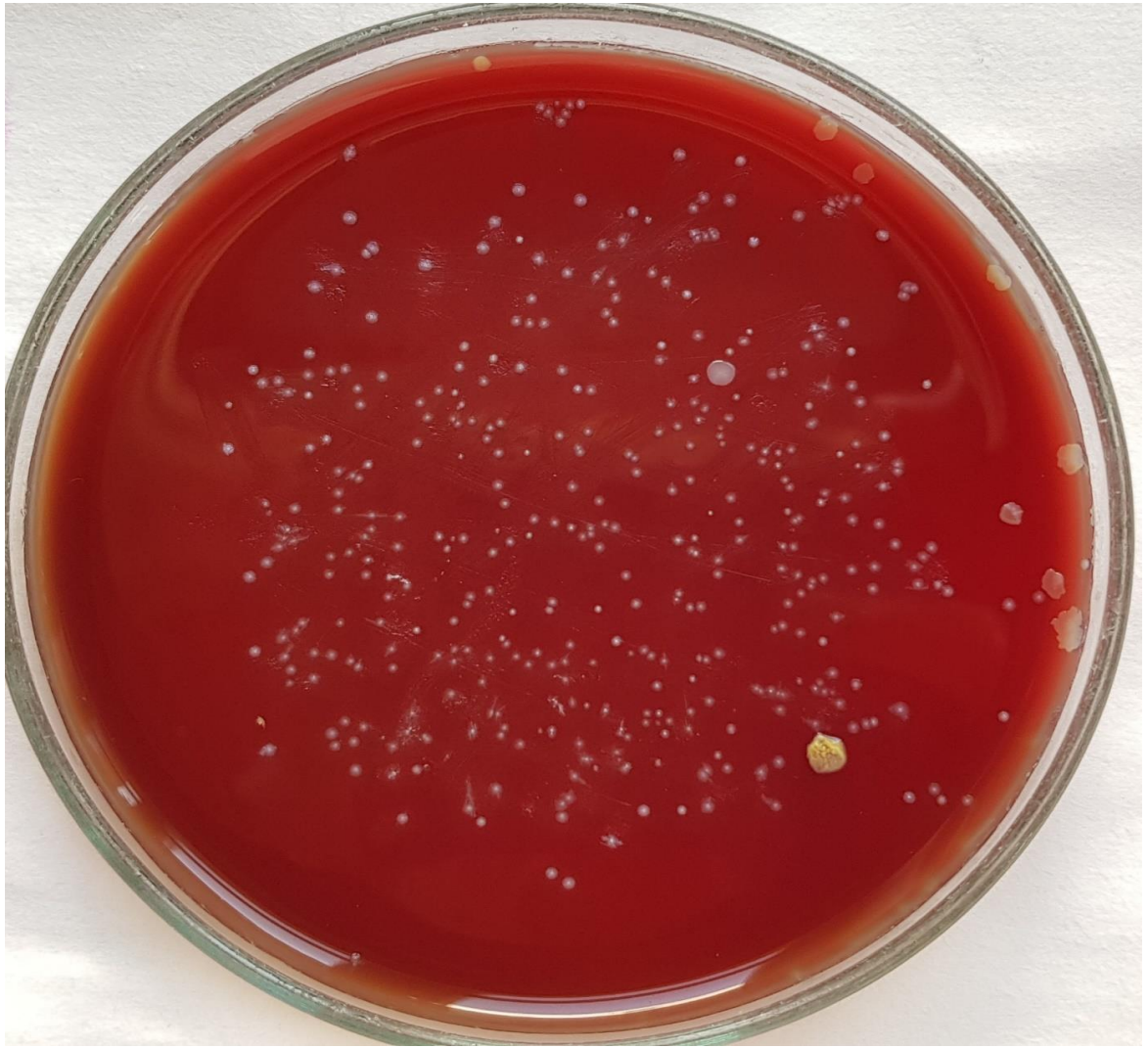


Fotografia 2. *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (pow.1000x) (© A. Szkaradkiewicz-Karpińska)

Bakterie te izolowano od pacjentów: *S. mutans* z zębiny próchnicowej i *P. gingivalis* ze szczeliny dziąsłowej. Hodowle bakterii prowadzono na podłożu Columbia Agar wzbogaconym 5% krwią baranią w warunkach beztlenowych, stosując GENbag anaer (bioMerieux), w temperaturze 37⁰C przez 24 godziny (*S. mutans*) oraz 72 godziny (*P. gingivalis*), uzyskując fazę wzrostu stacjonarnego.

3.2. Badania aktywności przeciwbakteryjnej soli - wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) oraz tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

Oceny tej dokonywano metodą ilościową, analizując redukcję liczby wzrostu badanych bakterii - CFU (Colony Forming Units – jednostki tworzące kolonie) w podłożu hodowlanym pod wpływem wzrastających dawek NaHCO_3 lub $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ według techniki stosowanej przez Routsias i wsp [Routsias i wsp., 2010] oraz Nakra i wsp. [Nakra i wsp., 2016]. Z uzyskanych hodowli badanego szczepu – *S. mutans* oraz *P. gingivalis*, będących w fazie wzrostu stacjonarnego, sporządzano zawiesiny komórek w inokulum kontrolnym, zawierającym zbuforowaną sól fizjologiczną wzbogaconą albuminą (0,2 mg/ml) o gęstości $1,5 \times 10^8$ bakterii/1ml zawiesiny, tj. 0,5 w skali McFarlanda (kontrola). Jednocześnie, na bazie inokulum kontrolnego przygotowywano pelety inokulum testowych, zawierające wzrastające dawki NaHCO_3 lub $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1, 10, 20, 40 mg/ml). Przygotowane zawiesiny bakterii były preinkubowane w temperaturze 37°C przez dwie godziny w warunkach beztlenowych. Następnie 100 μl każdej zawiesiny bakterii rozcieńczano 5 tys. - krotnie PBS i posiewano na płytki hodowlane z podłożem Columbia Agar wzbogaconym 5% krwią baranią; hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych, stosując GENbag anaer (bioMerieux), w temperaturze 37°C przez 24 godziny (*S. mutans*) oraz 72 godziny (*P. gingivalis*), uzyskując fazę wzrostu stacjonarnego. Stosowane rozcieńczenie warunkowało wzrost w kontrolnych płytkach hodowlanych CFU w zakresie liczbowym: 700-1200 (Fotografia 3 i 4).



**Fotografia 3. Wzrost *S. mutans* w hodowli na podłożu stałym (kontrola)
- badania własne**



**Fotografia 4. Wzrost *P. gingivalis* w hodowli na podłożu stałym (kontrola)
– badania własne**

W badaniach oceniano redukcję wzrostu analizowanych bakterii preinkubowanych z testowanymi związkami względem kontroli. Doświadczenia 5-krotnie powtarzano, dokonując każdorazowo 3-krotnych odczytów.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych wyników wyznaczono dla badanych związków wartości wirtualnej dawki inhibującej wzrost 50% bakterii – vID_{50} i 90% bakterii – vID_{90} .

Badania żywotności CFU

W przeprowadzonych badaniach dodatkowo oceniano żywotność bakterii tworzących CFU, stosując test fluorescencyjny Live/Dead BacLight Bacterial Viability and Counting Kit (Molecular Probes). W teście tym komórki żywe wybarwione zostają na kolor zielony (barwnik SYTO 9), natomiast komórki martwe – na kolor czerwony (barwnik jodek propidyny wykazuje utratę integralności osłon komórkowych). Badania przeprowadzono z użyciem przygotowanych zawiesin CFU/1 ml PBS. Próbkę inkubowano z komponentami Live/Dead BacLight Bacterial Viability and Counting Kit w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Odczytu dokonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E200 (pow. 1000x). Stwierdzono, że we wszystkich badaniach żywotność komórek tworzących CFU wynosiła 95-99%.



Fotografia 5. Test fluorescencyjny Live/Dead BacLight Bacterial Viability and Counting Kit (Molecular Probes) (© A. Szkaradkiewicz-Karpińska)

3.3. Metody statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Dell Statistica 2016, v13. Analizowane parametry opisano za pomocą średniej arytmetycznej, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej, odchylenia standardowego oraz błędu standardowego. Testem Shapiro-Wilka badano zgodność analizowanych zmiennych z rozkładem normalnym. Jednak takiej zgodności nie potwierdzono u wszystkich zmiennych wykorzystanych do porównań wielokrotnych. Dlatego, w analizie różnic między zmiennymi użyto nieparametryczny test Kruskala-Wallisa oraz wyznaczono wartości p dla porównań wielokrotnych. W celu przeprowadzenia obliczeń związanych z ustaleniem wirtualnej minimalnej dawki związku inhibującego wzrost 50% bakterii (vID_{50}) oraz 90% bakterii (vID_{90}) użyto programu statystycznego R (GNU R v 4.0.3). Zastosowano model regresji logistycznej, stosując uogólniony model liniowy wykorzystujący rozkład dwumianowy dla dopasowywania krzywej do uzyskanych wyników. Jednocześnie, użyto transformacji logarytmicznej ze względu na szeroki zakres stężeń badanych związków. Średnie wartości vID_{50} i vID_{90} wyznaczono wykorzystując funkcję : `dose.p` w bibliotece MASS (program statystyczny R). Dla wszystkich obliczeń przyjęto poziom istotności $p=0.05$.

W prezentowanej analizie statystycznej zastosowano następujące symbole:

$\bar{X}$ - średnia arytmetyczna

$X_{\min}$ – wartość minimalna

$X_{\max}$ – wartość maksymalna

Me – mediana

SD – odchylenie standardowe

SE – błąd standardowy

p – poziom istotności

4. WYNIKI

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nieorganicznych związków soli sodowych – wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) oraz tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) przeprowadzono wobec szczepów bakterii wzorcowych *S. mutans*, jak również *P. gingivalis* w oparciu o analizę przeżywalności komórek in vitro w odstępach czasowych, przy wzrastających stężeniach użytych związków.

4.1. Aktywność przeciwbakteryjna wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu wobec *Streptococcus mutans*

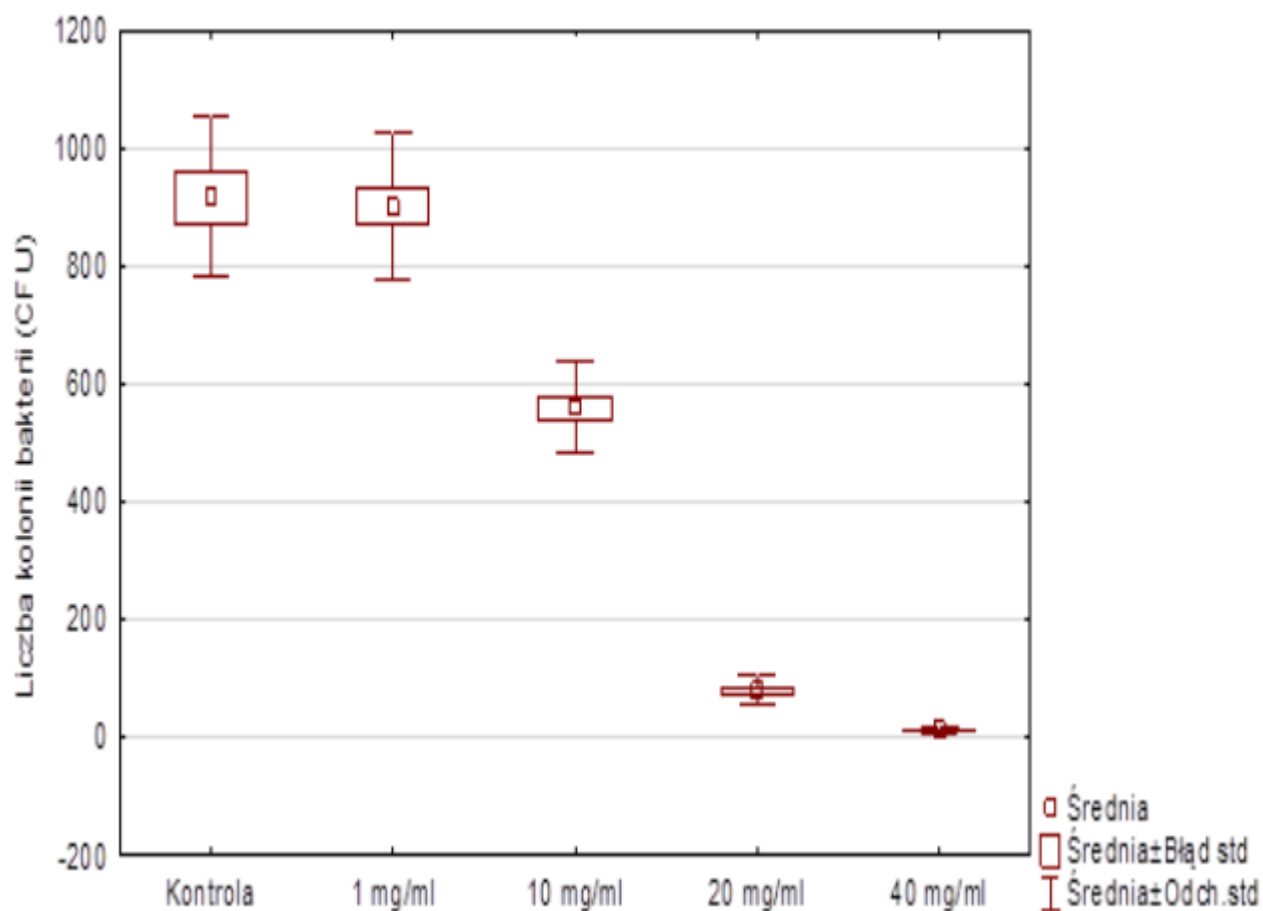
Wyniki badań przeżywalności *S. mutans* pod wpływem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) przedstawiono w Tabeli 3 oraz graficznie na Rycinie 1, a także załączono w Aneksie. Wykazano, że średnia liczba wyrosłych kolonii bakterii (CFU), preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) wynosiła $916 \pm 136,24$. Natomiast, średnie liczby wyrosłych CFU preinkubowanych we wzrastających dawkach NaHCO_3 (1, 10, 20, 40 mg/ml) wynosiły odpowiednio : $918 \pm 91,98$; $558 \pm 78,94$; $78 \pm 25,33$ i $12 \pm 4,66$. Średnie liczby wyrosłych CFU, preinkubowanych z NaHCO_3 z użyciem dawek 20 mg/ml i 40 mg/ml były istotnie mniejsze względem kontroli przy wartościach p dla porównań wielokrotnych.

W analizie statystycznej, na podstawie modelu regresji logistycznej z użyciem uogólnionego modelu liniowego wyznaczono krzywą zależności odsetka wyrosłych bakterii przy wzrastających dawkach NaHCO_3 względem kontroli (Rycina 2). Wykorzystując funkcję dose.p w bibliotece MASS (pakiet R), obliczono vID_{50} - wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 50% bakterii oraz vID_{90} – wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 90% bakterii. vID_{50} i vID_{90} NaHCO_3 dla *S. mutans* wynosiły odpowiednio: 11,16 mg/ml $\pm 1,003996$ błąd standardowy oraz 19,74 mg/ml $\pm 1,006428$ błąd standardowy.

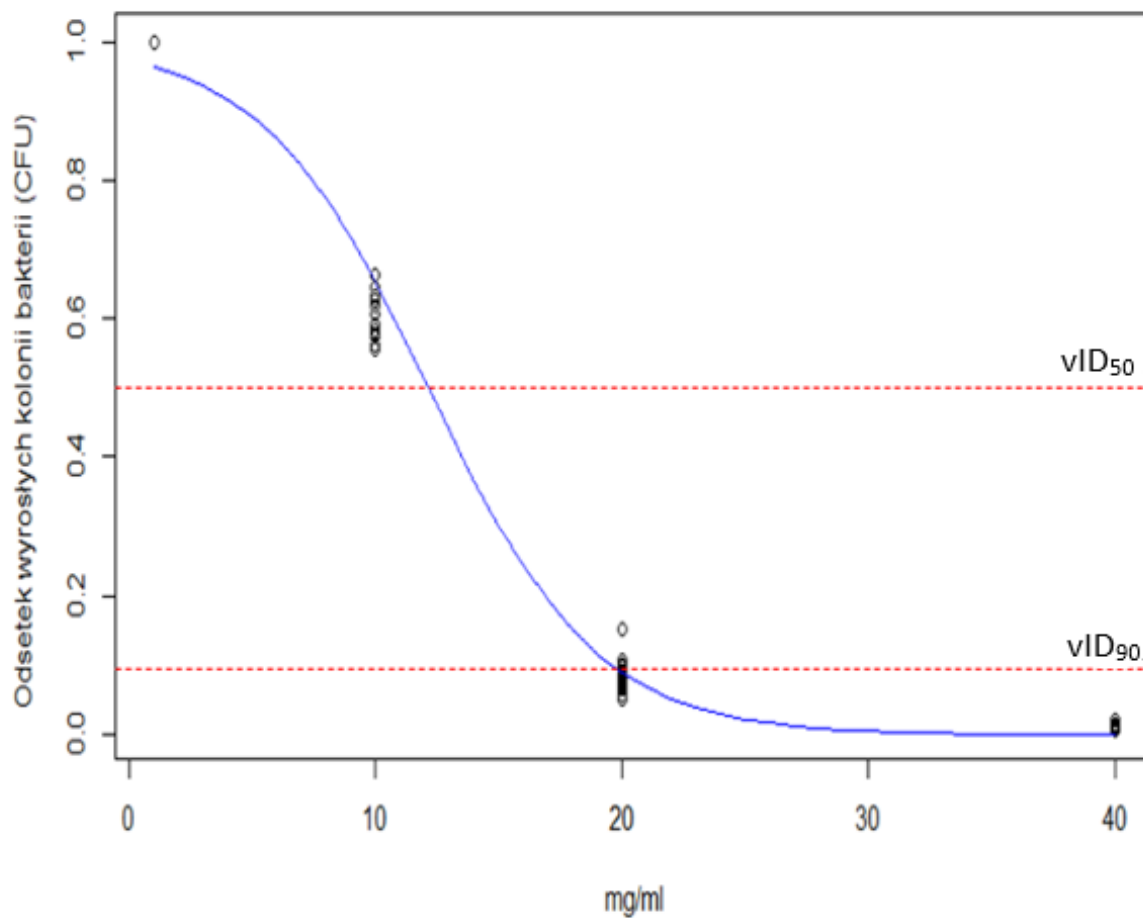
Tabela 3. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO₃

CFU <i>S.mutans</i>	$\bar{X}$	Me	X _{min}	X _{max}	SD
Kontrola	916	900	750	1150	136,24
NaHCO ₃ – dawka:					
1mg/ml	918	920	750	1100	91,98
10 mg/ml	558	550	450	700	78,94
20 mg/ml	78*	72	45	150	25,33
40 mg/ml	12*	10	5	20	4,66

* oznaczono istotną różnicę statystyczną względem kontroli, przy p dla porównań wielokrotnych



Rycina 1. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO_3



Rycina 2. Krzywa zależności odsetka wyrosłych bakterii *S. mutans*, przy wzrastających dawkach NaHCO_3 względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio: 11,16 mg/ml $\pm$ 1,003996 SE oraz 19,74 mg/ml $\pm$ 1,006428 SE)

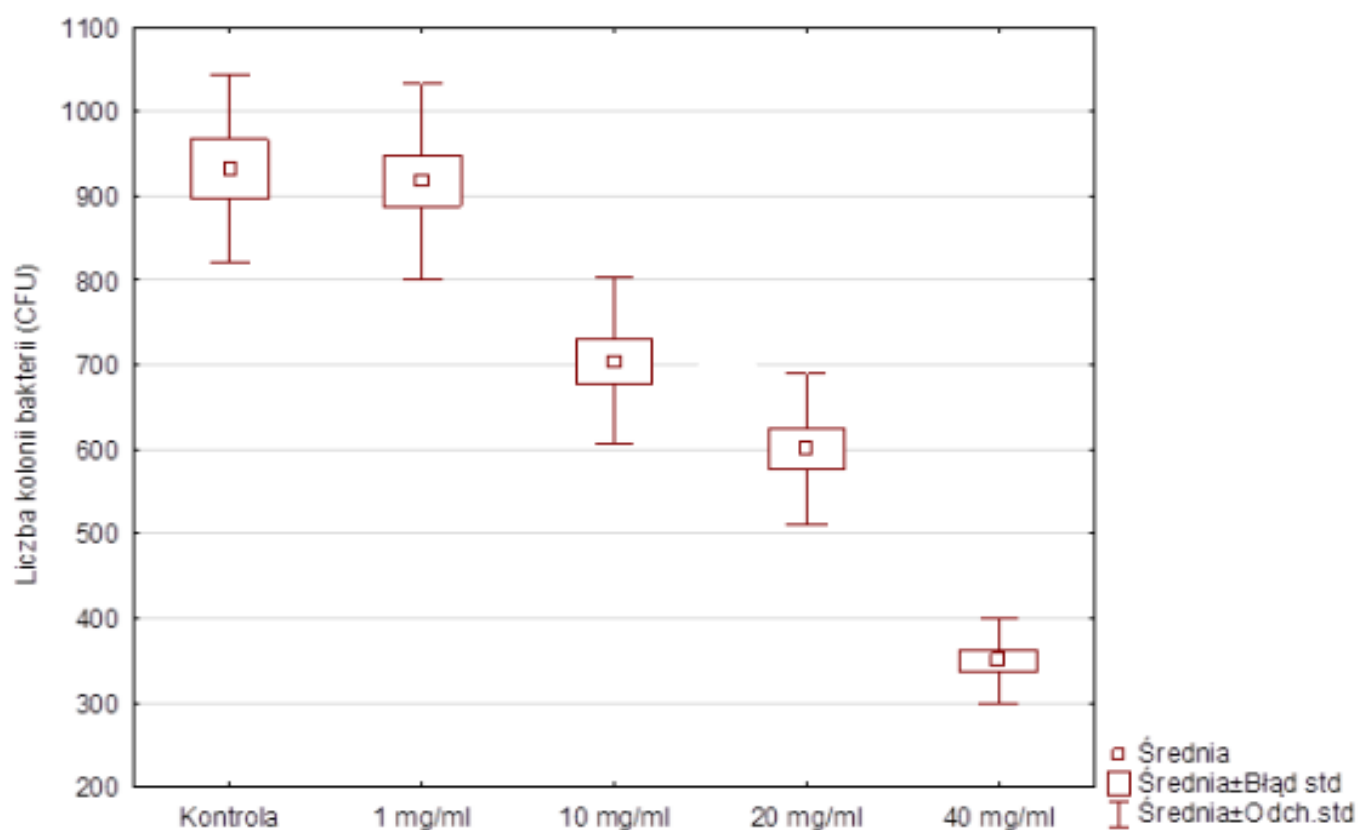
Wyniki badań przeżywalności *S. mutans* pod wpływem tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) przedstawiono w Tabeli 4 oraz graficznie na Rycinie 3, a także załączono w Aneksie. Wykazano, że średnia liczba wyrosłych kolonii bakterii (CFU), preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) wynosiła $932 \pm 110,63$. Natomiast, średnie liczby wyrosłych CFU preinkubowanych we wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1, 10, 20, 40 mg/ml) wynosiły odpowiednio : $917 \pm 115,73$; $704 \pm 98,26$; $601 \pm 89,88$ i $349 \pm 49,49$. Średnie liczby wyrosłych CFU, preinkubowanych z $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ z użyciem dawek 20 mg/ml i 40 mg/ml były istotnie mniejsze względem kontroli przy wartościach p dla porównań wielokrotnych.

W analizie statystycznej, na podstawie modelu regresji logistycznej z użyciem uogólnionego modelu liniowego wyznaczono krzywą zależności odsetka wyrosłych bakterii przy wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ względem kontroli (Rycina 4). Wykorzystując funkcję `dose.p` w bibliotece MASS (pakiet R), obliczono vID_{50} - wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 50% bakterii oraz vID_{90} – wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 90% bakterii. vID_{50} i vID_{90} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dla *S. mutans* wynosiły odpowiednio : 28,13 mg/ml $\pm 1,009482$ błąd standardowy oraz 171,06 mg/ml $\pm 1,027132$ błąd standardowy.

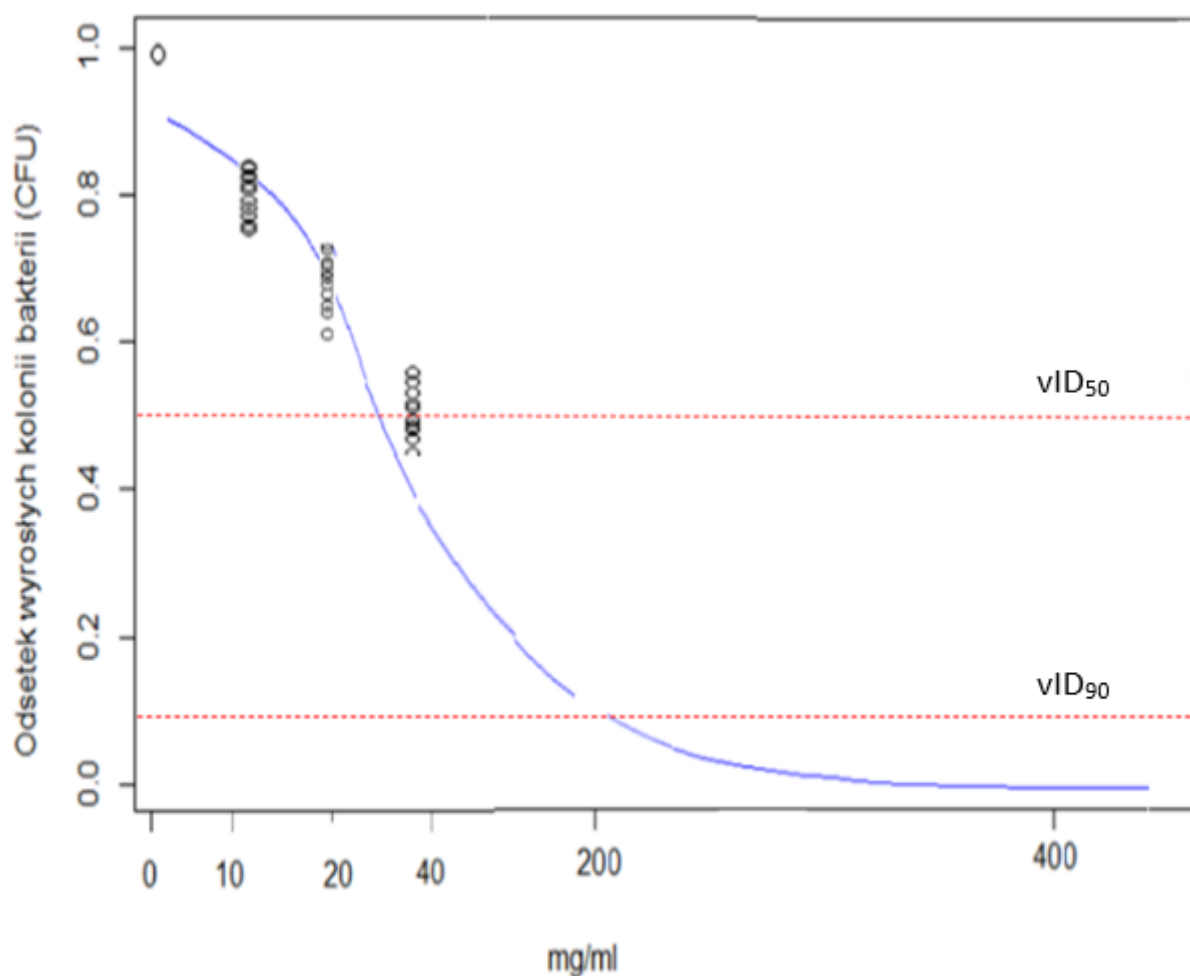
Tabela 4. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – Na₂S₂O₃

CFU <i>S.mutans</i>	$\bar{X}$	Me	X _{min}	X _{max}	SD
Kontrola	932	935	750	1100	110,63
Na ₂ S ₂ O ₃ – dawka:					
1mg/ml	917	920	700	1100	115,73
10 mg/ml	704	700	550	860	98,26
20 mg/ml	601*	600	450	780	89,88
40 mg/ml	349*	350	260	420	49,49

* oznaczono istotną różnicę statystyczną względem kontroli, przy p dla porównań wielokrotnych



Rycina 3. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$



Rycina 4. Krzywa zależności odsetka wyrosłych bakterii *S. mutans*, przy wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio: 28,13 mg/ml $\pm$ 1,009482 SE oraz 171,06 mg/ml $\pm$ 1,027132 SE)

4.2. Aktywność przeciwbakteryjna wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu wobec *Porphyromonas gingivalis*

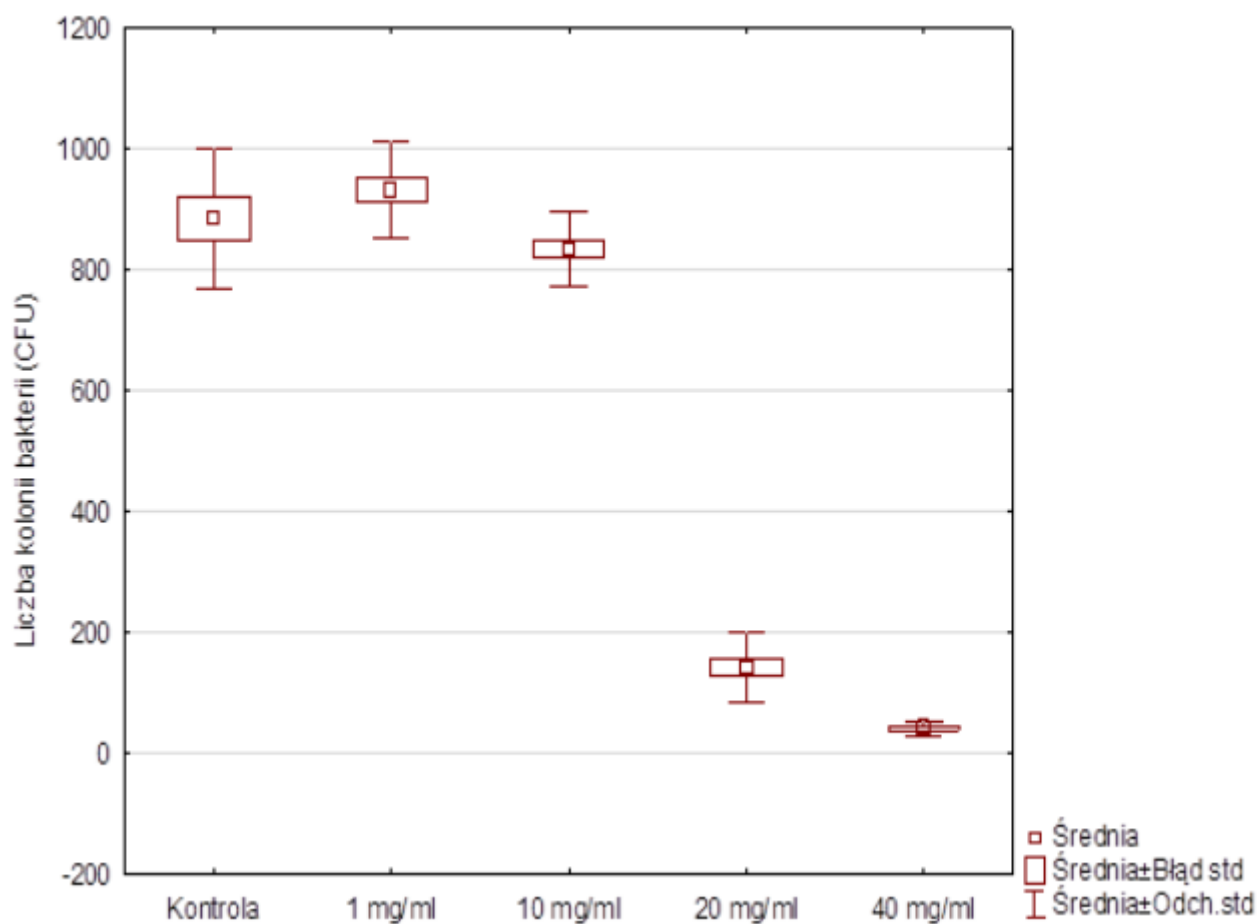
Z kolei wyniki badań przeżywalności *P. gingivalis* pod wpływem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) przedstawiono w Tabeli 5 oraz graficznie na Rycinie 5, a także załączono w Aneksie. Wykazano, że średnia liczba wyrosłych kolonii bakterii (CFU), preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) wynosiła $885 \pm 115,59$. Natomiast, średnie liczby wyrosłych CFU preinkubowanych we wzrastających dawkach NaHCO_3 (1, 10, 20, 40 mg/ml) wynosiły odpowiednio : $933 \pm 79,68$; $835 \pm 61,16$; $142 \pm 58,37$ i $41 \pm 11,65$. Średnie liczby wyrosłych CFU, preinkubowanych z NaHCO_3 z użyciem dawek 20 mg/ml i 40 mg/ml były istotnie mniejsze względem kontroli przy wartościach p dla porównań wielokrotnych.

W analizie statystycznej, na podstawie modelu regresji logistycznej z użyciem uogólnionego modelu liniowego wyznaczono krzywą zależności odsetka wyrosłych bakterii przy wzrastających dawkach NaHCO_3 względem kontroli (Rycina 6). Wykorzystując funkcję `dose.p` w bibliotece MASS (pakiet R), obliczono vID_{50} - wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 50% bakterii oraz vID_{90} – wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 90% bakterii. vID_{50} i vID_{90} NaHCO_3 dla *P.gingivalis* wynosiły odpowiednio : 15,74 mg/ml $\pm 1,003375$ błąd standardowy oraz 24,56 mg/ml $\pm 1,004993$ błąd standardowy.

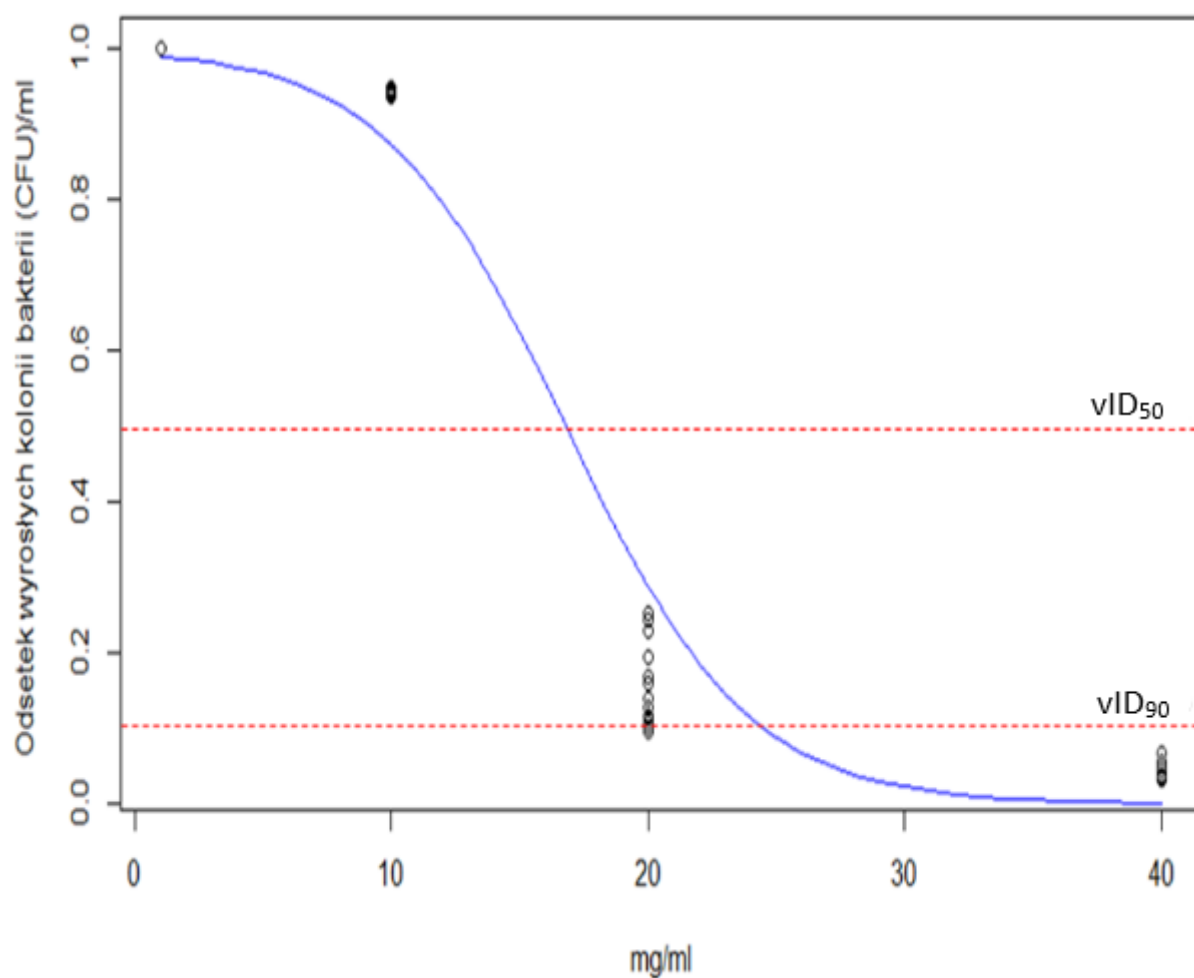
Tabela 5. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO₃

CFU <i>P.gingivalis</i>	$\bar{X}$	Me	X _{min}	X _{max}	SD
Kontrola	885	875	700	1050	115,59
NaHCO ₃ – dawka:					
1mg/ml	933	920	820	1100	79,68
10 mg/ml	835	820	750	950	61,16
20 mg/ml	142*	120	80	250	58,37
40 mg/ml	41*	40	28	60	11,65

* oznaczono istotną różnicę statystyczną względem kontroli, przy p dla porównań wielokrotnych



Rycina 5. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO_3



Rycina 6. Krzywą zależności odsetka wyrosłych bakterii *P.gingivalis* przy wzrastających dawkach NaHCO_3 względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio: 15,74 mg/ml $\pm$ 1,003375 SE oraz 24,56 mg/ml $\pm$ 1,004993 SE)

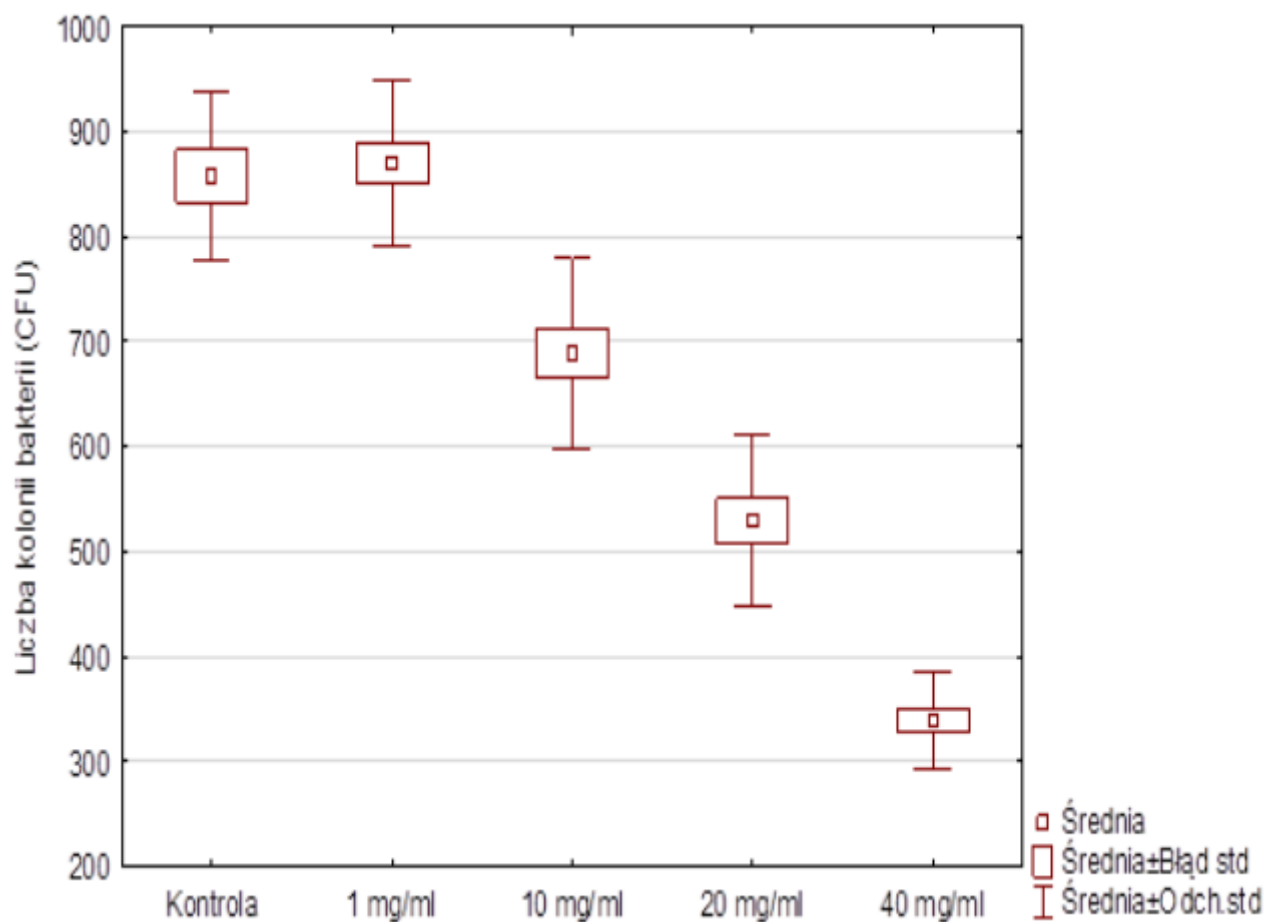
Wyniki badań przeżywalności *P.gingivalis* pod wpływem tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) przedstawiono w Tabeli 6 oraz graficznie na Rycinie 7, a także załączono w Aneksie. Wykazano, że średnia liczba wyrosłych kolonii bakterii (CFU), preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) wynosiła $858 \pm 79,41$. Natomiast, średnie liczby wyrosłych CFU preinkubowanych we wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1, 10, 20, 40 mg/ml) wynosiły odpowiednio : $870 \pm 78,65$; $689 \pm 90,94$; $540 \pm 58,68$ i $339 \pm 46,12$. Średnie liczby wyrosłych CFU, preinkubowanych z $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ z użyciem dawek 20 mg/ml i 40 mg/ml były istotnie mniejsze względem kontroli przy wartościach p dla porównań wielokrotnych.

W analizie statystycznej, na podstawie modelu regresji logistycznej z użyciem uogólnionego modelu liniowego wyznaczono krzywą zależności odsetka wyrosłych bakterii przy wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ względem kontroli (Rycina 8). Wykorzystując funkcję `dose.p` w bibliotece MASS (pakiet R), obliczono vID_{50} - wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 50% bakterii oraz vID_{90} – wirtualną dawkę związku/ml inhibującą wzrost 90% bakterii. vID_{50} i vID_{90} $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dla *P.gingivalis* wynosiły odpowiednio : 28,39 mg/ml $\pm 1,008481$ błąd standardowy oraz 128,89 mg/ml $\pm 1,023423$ błąd standardowy.

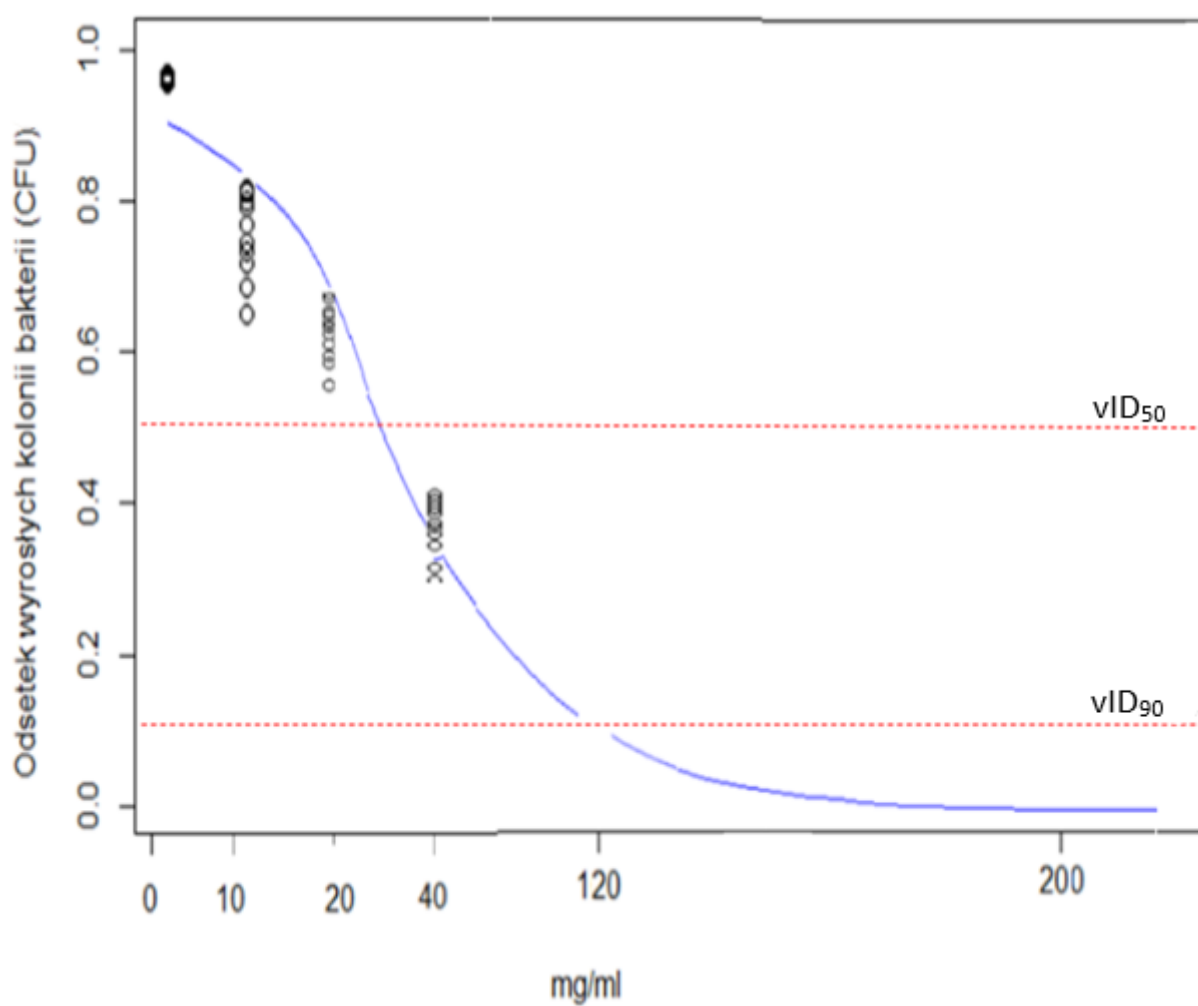
Tabela 6. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – Na₂S₂O₃

CFU <i>P.gingivalis</i>	$\bar{X}$	Me	X _{min}	X _{max}	SD
Kontrola	858	850	750	1000	79,41
Na ₂ S ₂ O ₃ – dawka:					
1mg/ml	870	890	700	1000	78,65
10 mg/ml	689	700	550	820	90,94
20 mg/ml	540*	520	450	650	58,68
40 mg/ml	339*	340	280	410	46,12

* oznaczono istotną różnicę statystyczną względem kontroli, przy p dla porównań wielokrotnych



Rycina 7. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$



Rycina 8. Krzywa zależności odsetka wyrosłych bakterii *P.gingivalis* przy wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio : 28,39 mg/ml $\pm$ 1,008481 SE oraz 128,89 mg/ml $\pm$ 1,023423 SE

5. DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że nieorganiczne związki soli sodowych – wodorowęglan sodu oraz tiosiarczany sodu wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec gatunków bakterii - *Streptococcus mutans* i *Porphyromonas gingivalis*. Aktualnie uznaje się, że *Streptococcus mutans* jest głównym czynnikiem etiologicznym zapoczątkowującym próchnicę zębów [Banas i wsp., 2018] natomiast *Porphyromonas gingivalis* stanowi dominujący gatunek bakterii w etiopatogenezie chorób przyzębia u dorosłych [Xu i wsp., 2020]. Próchnica zębów i choroby przyzębia występują powszechnie i stanowią bardzo poważny problem zdrowotny. W patomechanizmie tych chorób szczególne znaczenie odgrywa płytką nazębną (dental plaque) głównie formowana przez bakterie i ich produkty – egzopolisacharydy (EPS) [Szkaradkiewicz i wsp., 2021]. Wyróżnia się płytkę naddziąsłową i poddziąsłową. Płytką naddziąsłową jest tworzona w bruzdach, głównie zębów trzonowych, na powierzchniach stycznych zębów oraz powierzchniach gładkich na powierzchniach zębów przez biofilm bakterii próchnicotwórczych - kariopatogeny, zwłaszcza *Streptococcus mutans*. Badania wskazują, że liczba bakterii w płytce nazębnej może przekraczać 10^9 na jednej powierzchni zęba [Philstrom i wsp., 2005]. Z kolei, płytką poddziąsłową jest tworzona poniżej linii dziąseł i w szczelinie dziąsłowej przez gatunki bakterii o szczególnym znaczeniu w etiopatogenezie chorób przyzębia – periopatogeny, wśród których dominuje *Porphyromonas gingivalis*. Liczba bakterii w jednej kieszoncie dziąsłowej może przekraczać 10^8 bakterii [Philstrom i wsp., 2005].

Chorobom przyzębia bardzo często (w ponad 99% u pacjentów w wieku 35-44 lat) towarzyszy próchnica zębów, która prowadzi do demineralizacji szkliwa, a później zębiny, w następstwie przyczyniając się do utraty zębów [Górska 2018, Monitorowanie stanu zdrowia jamy ustnej w populacji polskiej]. Mimo, że choroby przyzębia często przebiegają bez dolegliwości bólowych, to nieleczone mogą prowadzić do przedwczesnej utraty zębów. Choroby przyzębia są najczęściej występującym przewlekłym stanem zapalnym u dorosłych osób, prowadzącym do destrukcji przyzębia, w tym głównie kości wyrostka zębodołowego. W ich następstwie dochodzi zatem do przedwczesnej utraty zębów. We współczesnej periodontologii zwalczanie chorób przyzębia jest kompleksowe, obejmuje działania profilaktyczne i głównie leczenie niechirurgiczne. Leczenie niechirurgiczne stanowi

najważniejszą metodę terapii i jej najważniejszym celem jest ograniczenie przewlekłego zakażenia bakteryjnego w jamie ustnej, a przede wszystkim – redukcja występujących periopatogenów w kieszonkach przyzębnych. Występujące przewlekłe zakażenie bakteryjne w jamie ustnej zwiększa ryzyko innych poważnych chorób, a zwłaszcza choroby sercowo-naczyniowej, chorób reumatycznych i nerek. Podkreśla się również, że zdrowie jamy ustnej jest ściśle powiązane z całym organizmem, co wyraża następująca konkluzja „Nie można mieć dobrego zdrowia ogólnego bez dobrego zdrowia jamy ustnej” [Seymour i wsp., 2009].

W rozwoju chorób przyzębia i próchnicy zębów dominującą rolę spełnia więc obecność płytki nazębnej. Wskazuje się, że stosowanie tylko czyszczenia zębów nie jest wystarczające dla usunięcia masy płytki nazębnej [Lang i wsp., 1973]. Zgodnie zatem ze współczesną wiedzą stomatologiczną konieczne jest stosowanie działań profilaktycznych i bardzo często terapeutycznych zmierzających do redukcji bakterii patogennych w jamie ustnej nie tylko w przewlekłych stanach zapalnych przyzębia i aktywnej próchnicy zębów, ale także w grupach osób z podwyższonym ryzykiem tych stanów chorobowych. Zapalenie przyzębia i próchnica zębów są więc ze sobą ściśle powiązane, i niejednokrotnie przy jednoczesnym ich występowaniu leczenie każdej z tych chorób ma kluczowy wpływ na sukces terapeutyczny w leczeniu drugiej. Szczególną uwagę zatem należy zwrócić na rolę profilaktyki obu tych schorzeń, jako najprostszej i najtańszej metody ograniczenia występowania obu chorób w populacji. Jednakże działanie takie jest często skomplikowane i wymaga zaangażowania wielospecjalistycznego zespołu stomatologicznego [Chapple i wsp., 2017, Sanz i wsp., 2017].

Podstawą profilaktyki i leczenia obu chorób jest skuteczne oczyszczanie uzębienia. Jednak nawet po bardzo dobrym mechanicznym usunięciu biofilmu, część jego pozostaje w miejscach trudno dostępnych, dlatego niezwykle ważne jest stosowanie środków przeciwbakteryjnych, które zawarte są w pastach do zębów lub płukankach. Współczesne preparaty do codziennej higieny jamy ustnej mają szerokie zastosowanie, nie tylko jako preparaty do oczyszczania powierzchni zębów z miękkich osadów nazębnych, ale także jako zabezpieczenie tkanek zęba przed czynnikami kariogennymi, a przyzębie przed bakteriami wywołującymi stany zapalne.

Biorąc pod uwagę powyższe uznaje się znaczenie profilaktyki periodontologicznej, której działania powinny dotyczyć osób zarówno ze zdrowym jak i chorobowo zmienionym przyzęciem. Z kolei najważniejszą metodą terapii chorób przyzębia we współczesnej periodontologii jest leczenie niechirurgiczne [Figuero i wsp., 2017, Górska 2018]. Jego zasadniczym celem jest znacząca redukcja liczby periopatogenów w jamie ustnej w bardzo

krótkim czasie. Obejmuje zatem postępowanie kompleksowe, tj. profesjonalne zabiegi instrumentacyjne ręczne lub maszynowe oraz miejscowe stosowanie antyseptyków i/lub antybiotyków w protokole całościowego odkażania jamy ustnej (full-mouth disinfection – FMD) z uwzględnieniem płukanek, a także w połączeniu z dokieszonkowym podawaniem chemioterapeutyków (local drug delivery – LDD) [Eberhard i wsp., 2015]. Z porównawczych analiz dotyczących różnych protokołów leczenia z zastosowaniem odkażania jamy ustnej wynika, że miejscowe stosowanie antyseptyków uznaje się za metodę wspomagającą leczenie przewlekłego zapalenia przyzębia, chociaż brak jest jednoznacznych informacji dotyczących ich skuteczności [Sender-Janeczek i wsp., 2007, Kaczyński i wsp., 2014]. W prezentowanych protokołach wskazuje się na znamienne statystyczną poprawę wskaźników higieny jamy ustnej oraz zmniejszenie średniej głębokości kieszonek przyzębnych. Jednocześnie z publikowanych danych wynika, że zastosowanie preparatów z użyciem 0,2% roztworu chlorheksydyny wykazuje najwyższą skuteczność. Jednak, zmiany najważniejszego dla oceny stopnia zaawansowania choroby przyzębia – klinicznego położenia przyczepu (CAL) nie były jednoznaczne w następstwie użycia tej płukanki 2 x dziennie przez dwa tygodnie (Świerkot i wsp., 2009; Konopka i wsp., 2012). Wcześniejsze badania Zanatta i wsp. [Zannatta i wsp., 2007] potwierdzają mniejszy wpływ takiego płukania na ukształtowany już biofilm oraz wskazują na konieczność wcześniejszego usunięcia biofilmu przed rozpoczęciem płukania. Chlorheksydyna jest bardziej efektywna w zapobieganiu gromadzeniu się płytki nazębnej na oczyszczonych powierzchniach zębowych natomiast nieznaczco zmniejsza płytkę na nieoczyszczonych zębach. Ponadto, na aktywność przeciwbakteryjną płukanek z chlorheksydyną ma wpływ zawartość alkoholu. Badania wskazują na słabsze działanie płukanek CHX bez alkoholu [James i wsp., 2017].

Stosowanie płukanek z chlorheksydyną może również obniżyć w znacznym stopniu poziom kariopatogenów. Badania Mielnik-Błaszczak i wsp. [2001] potwierdziły znaczną redukcję kolonii bakterii *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus sp.* w ślinie u dzieci po 14 dniach kuracji, zahamowanie powstawania płytki nazębnej oraz zapalenia dziąseł. Emilson i wsp. [1999] wykazali, że niezależnie od metody aplikacji chlorheksydyna w postaci 1% żelu powoduje znaczne obniżenie bakterii *Streptococcus mutans* w ślinie i płytce nazębnej i zmniejszenie kolonizacji bakterii na powierzchniach zębów. Jednak najczęściej stosowanymi preparatami chlorheksydynowymi do zapobiegania próchnicy są lakiery, ze względu na przedłużone działanie przeciwbakteryjne, nawet do kilku tygodni po zastosowaniu [Walsh i wsp., 2015]. Klepacka i wsp. [2002] porównywali skuteczność lakierów zawierających fluor oraz lakierów z chlorheksydyną. Zastosowanie tych preparatów zmniejszyło przyrost

próchnicy, ale lepsze wyniki uzyskano przy aplikacji fluoru niż chlorheksydyny. Z kolei, Fennis-Le i wsp. [1998] po 6 miesiącach od aplikacji chlorheksydyny nie stwierdzili spadku przyrostu próchnicy pierwszych stałych zębów trzonowych u dzieci, choć należy podkreślić, że badania dotyczyły pacjentów z grupy o małym ryzyku próchnicy. Obecnie są już dostępne preparaty, m.in. płyny do płukania jamy ustnej zawierające zarówno związki fluoru (0,05%), jak i chlorheksydynę (0,05%) Zapobiegają tworzeniu się płytki nazębnej oraz powstawaniu próchnicy poprzez remineralizację szkliwa. Specjalna formuła ADS płukanek chlorheksydyny zapobiega brunatnym przebarwieniom na zębach i śluzówce, nawet przy dłuższym użytkowaniu. Jej stosowanie nie skutkuje też występowaniu, tak charakterystycznych dla innych roztworów chlorheksydynowych zaburzeń smakowych u pacjentów. Opatentowany system ADS reaguje z diketozaminą i poprzez usunięcie diketozaminy zapobiega tworzeniu się melanoidyn, odpowiedzialnych za przebarwienia zębów. Inne mechanizmy przebarwień dotyczą denaturacji białek przez CHX. Prowadzi to do powstawania organicznych żółto-brązowych siarczków żelaza w wyniku reakcji połączenia wodoru i siarki z żelazem obecnym w ślinie. Ta reakcja, z kolei jest hamowana przez składnik ADS, który obniża poziom żelaza [van Swaaij i wsp., 2020].

Z kolei, w badaniach *in vitro* wykazano, że już 0,1% roztwór chlorheksydyny redukuje żywotność fibroblastów dziąsłowych, a także zaburza produkcję nadtlenu wodoru przez pałeczki *Lactobacillus*, które oddziałują antagonistycznie wobec periopatogenów [Wyganowska-Świątkowska i wsp., 2016, de Oliveira i wsp. 2018, Coelho i wsp., 2020, Szkaradkiewicz i wsp., 2009]. Te dane rozszerzają listę działań niepożądanych chlorheksydyny, co znacznie ogranicza jej długotrwałe stosowanie.

Chlorek cetylpirydyny ma większą zdolność do retencji w jamie ustnej i porównywalną aktywność przeciwbakteryjną do chlorheksydyny jednak jest mniej skuteczny w hamowaniu powstawania płytki nazębnej. Wynika to z natychmiastowego uwalniania się z błony śluzowej, co związane jest z budową monokationową tego związku [Bonesvoll i wsp., 1978]. W celu wydłużenia czasu retencji zastosowano system powolnego uwalniania chlorku cetylpirydyny. Jednak, nie zaobserwowano poprawy skuteczności działania. Badania Vandekerckhove i wsp. [1995] wykazały brak różnic między sposobami podawania chlorku cetylpirydyny. Jednocześnie, wszystkie formuły podawania CPC wywoływały przebarwienia zębów. Na skuteczność wszystkich antyseptyków kationowych, w tym chlorheksydyny oraz chlorku cetylpirydyny, niekorzystny wpływ mają pasty do zębów [Sheen i wsp., 2001]. Wykazano, że pasta do zębów stosowana przed, a szczególnie po płukaniu jamy ustnej, znacząco zmniejsza przebarwienia zębów oraz hamowanie płytki przez te związki.

Chlorheksydyna i chlorek cetylpirydyny są niezgodne z substancjami anionowymi, które stanowią, między innymi składniki past do zębów. Dlatego przed zastosowaniem antyseptyku CHX lub CPC należy dokładnie wypłukać jamę ustną po szczotkowaniu zębów lub też stosować o innej porze dnia, w odpowiednim czasie (2-3 godz.) po szczotkowaniu zębów.

W ostatnich latach wskazuje się na przydatność probiotyków w stomatologii, w szczególności w profilaktyce i terapii chorób przyzębia. Liczne publikacje przedstawiają właściwości oraz dokumentują wpływ pałeczek kwasu mlekowego na stan przyzębia jamy ustnej [Jayaram i wsp., 2016, Martin-Cabezas i wsp., 2016, Vives-Soler i wsp., 2020, Yang i wsp., 2021]. Jednak, przedstawione dane wskazują, że najlepsze efekty działania zapewniają irygacja poddziąsłowa oraz stosowanie tabletek probiotycznych. Dlatego, nieustannie są podejmowane próby poprawienia wyników klinicznych leczenia niechirurgicznego poprzez modyfikację protokołów postępowania, a także poszukiwania nowych preparatów do terapii przeciwbakteryjnej w chorobach przyzębia.

Z kolei, stosowanie płukanek zawierających fluorki wzmacnia ochronę przeciwpróchnicową. Skuteczność profilaktyczną płukanek fluorkowych szacuje się na około 26% [Kaczmarek i wsp., 2019]. Badania wykazują, że płukanki z wyższą zawartością fluorków są bardziej efektywne w remineralizacji plam próchnicowych [Aleksander i wsp., 2000]. Płukanki fluorkowe rekomendowane są u osób powyżej 6. roku życia z ryzykiem próchnicy ocenionym jako umiarkowane i wysokie [Marinho i wsp., 2016]. Szczególnie zalecane są u dzieci użytkujących aparaty ortodontyczne, uzupełnienia protetyczne oraz w przypadku zmniejszonego wydzielania śliny [Kaczmarek i wsp., 2019]. Brak jest jednolitych zaleceń dotyczących pory ich stosowania w odniesieniu do szczotkowania zębów. Płukanka zawierająca co najmniej 100 ppm F zastosowana po szczotkowaniu zębów pozwala na utrzymanie odpowiedniego stężenia jonów fluoru w ślinie i płytce nazębnej zapewnionego przez użycie pasty do zębów z fluorem. Zwiększa także skuteczność oczyszczania powierzchni międzyzębowych. Płukanki fluorkowe mogą być stosowane po szczotkowaniu zębów, a także w innym czasie niż szczotkowanie, co przynosi dodatkowe korzyści zdrowotne. Zaleca się używać około 10 ml płukanki. Płyny do płukania jamy ustnej zawierające około 100 ppm F stosuje się co najmniej 2 razy dziennie, około 225 ppm F raz dziennie, około 900 ppm F raz w tygodniu [Olczak-Kowalczyk i wsp., 2016, Kaczmarek i wsp., 2019]. Obecnie rekomendowane jest zatem egzogenne stosowanie preparatów fluorkowych, ale i ono jest obciążone ryzykiem fluorozy oraz zatruc ostrych. Opracowane rekomendacje dotyczące stosowania profilaktyki fluorkowej mają na celu

osiągnięcie maksymalnego efektu kariostatycznego i zminimalizowanie ryzyka działań niepożądanych [Kaczmarek i wsp., 2019].

Z kolei, chlorowodorek oktenidyny cechuje się szerokim spectrum działania przeciwbakteryjnego, a także przeciwwirusowego i przeciwgrzybiczego oraz działa regenerująco na tkanki miękkie. Eliminuje biofilm bakteryjny, jest skuteczny już po 30 sekundach od zastosowania. Badania potwierdzają hamujący wpływ płukanki z oktenidyną na formowanie się płytki nazębnej. Efekt działania płukanki utrzymuje się do pięciu dni [Jockel-Schneider i wsp., 2021]. W przeciwieństwie do preparatów z chlorheksydyną nie wywołuje przebarwień zębów czy też błony śluzowej. Najnowsze badania *in vitro* [Schmidt i wsp., 2018] wykazały, że oktenidyna indukuje odpowiednio niższą apoptozę w fibroblastach dziąsłowych w porównaniu z chlorheksydyną. Jednak, preparat ten nie jest zalecany do codziennego stosowania w przypadku zdrowej jamy ustnej. Polecany jest wspomagająco w leczeniu zapalenia przyzębia oraz infekcyjnego zapalenia błony śluzowej.

W licznych badaniach klinicznych *in vivo* i *in vitro* podjęto próby oceny skuteczności antybakteryjnej innych związków, w tym olejków eterycznych. Mimo iż badania wykazały ich nieco niższą skuteczność przeciwbakteryjną w porównaniu do chlorheksydyny, to w przeciwieństwie do antyseptyków z chlorheksydyną, płukanki zawierające olejki eteryczne nie wywołują zbyt wielu miejscowych skutków niepożądanych. W przeciwieństwie do leków chemicznych olejki eteryczne nie odkładają się w organizmie i nie inicjują powstawania toksycznych składników. Część autorów uznaje je więc za alternatywę dla płukanek z chlorheksydyną, stosowanych w celu kontroli płytki nazębnej i zapalenia dziąseł [Haffajee i wsp., 2008, Martin i wsp., 2016]. W badaniach *in vitro* liczni autorzy wykazali, że płukanki zawierające olejki eteryczne hamują agregację bakterii tworzących biofilm [Kaim i wsp., 1998, Whitaker i wsp., 2000, Fine i wsp., 2007, Alshehri 2018]. Badania Kusiak i wsp. [2010] dokumentują, że olejek z mięty pieprzowej jest wysoko aktywny wobec *Streptococcus mutans* oraz *Porphyromonas gingivalis*. Potwierdzono jego skuteczność wobec ponad połowy (55%) szczepów bakterii beztlenowych, nawet w małych stężeniach. Wyniki metaanalizy Araujo i wsp. [2015] wykazały istotne korzyści kliniczne wynikające ze stosowania dwa razy dziennie płynu do płukania z olejkami eterycznymi (Listerine®), w porównaniu ze stosowaniem samych mechanicznych metod czyszczenia zębów. Po 6 miesiącach obserwacji u pacjentów stosujących płukankę z olejkami eterycznymi stwierdzono prawie 5 razy więcej powierzchni wolnych od płytki nazębnej oraz ponad 2 razy więcej powierzchni bez zapalenia dziąseł, niż u pacjentów stosujących wyłącznie szczotkowanie zębów. Badania Pan i wsp. [2010] określiły skuteczność antybakteryjną płukanek do jamy ustnej z zawartością chlorheksydyny, olejków

eterycznych i chlorku cetylpirydyny, wykorzystując w eksperymencie model biofilmu w warunkach *in vitro*. Płukanki z chlorheksydyną i olejkami eterycznymi wykazały porównywalną skuteczność, znacznie wyższą niż płukanka z cetylpirydyną. Nieliczne publikacje odnoszą się do porównania skuteczności różnych wariantów dostępnej na rynku Listerine®, zawierających dodatkowe składniki z dodatkiem alkoholu lub bez. Cortelli i wsp. [2013] w swoich 6-miesięcznych badaniach na grupie 337 pacjentów udowodnili, że płukanka z olejkami eterycznymi (Listerine® Zero) jest bardziej skuteczna w redukcji płytki i zapalenia dziąseł niż płukanki w grupach kontrolnych z cetylpirydyną i 5% etanolem. Podobne rezultaty uzyskali w swoich dwutygodniowych badaniach Charles i wsp. [2012]. Jednocześnie w badaniach Pizzo i wsp. [2013] okazało się, że płukanka z olejkami eterycznymi bez alkoholu była mniej skuteczna niż chlorheksydyna i olejki eteryczne z alkoholem. Badania Wiken Albertsson i wsp. [2013] również potwierdzają znaczną przewagę działania przeciwbakteryjnego chlorheksydyny w porównaniu do olejków eterycznych – istotna redukcja kariopatogenów w ślinie pacjentów występowała po 16 dniach stosowania płukanek. Z kolei, badania Lyncha i wsp. [2018] dotyczące działania płukanek z olejkami eterycznymi z zawartością alkoholu i bez zawartości alkoholu dokumentują brak istotnych różnic w redukowaniu płytki nazębnej na powierzchni zębów oraz stanu zapalnego dziąseł w ciągu 6 miesięcy ich stosowania. Badania Dolińskiej i wsp. [2007] wykazały, że zarówno płyn z olejkami eterycznymi jak i płyn z aminofluorkiem oraz fluorkiem cynowym (Meridol) okazały się skuteczne w redukcji płytki nazębnej i zapalenia dziąseł. Uzyskana redukcja średnich wartości ocenianych wskaźników była jednak najwyższa w grupie osób używających płukanek z olejkami eterycznymi (Listerine®). Skuteczność kliniczną płukanek z olejkami eterycznymi ocenili w swoich badaniach Konopka i wsp. [2013]. Uzyskano wyniki działania płukanek w odniesieniu do efektu hamowania rozwoju płytki i istotnego zmniejszenia intensywności stanu zapalnego dziąseł. Dodatkowo, po 4 tygodniach stosowania płukanek autorzy nie obserwowali żadnych miejscowych efektów niepożądanych.

Wiadomym jest obecnie, że zdrowa jama ustna jest ważna nie tylko ze względów estetycznych, lecz również stanowi klucz dla zdrowia ogólnego oraz dla jakości i długości życia. Aktualnie w Polsce jest dostępnych około 190 różnych preparatów do odkażania jamy ustnej. Jednak, wszystkie dotychczas używane antyseptyki w stomatologii mogą wykazywać działania niepożądane, a najczęściej posiadają właściwości alergizujące, co znacznie ogranicza ich stosowanie. Dlatego w mojej pracy badałem możliwości zastosowania nieorganicznych związków soli sodowych – wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) i tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) jako płukanek odkażających. Od blisko 100 lat wskazuje się na korzystne

oddziaływanie tych związków na organizm człowieka. Jednocześnie, wodorowęglan sodu został określony przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków jako związek o statusie bezpiecznym i uznanym za produkt spożywczy [Medical Device Databases – US FDA]. Z kolei, tiosiarczan sodu jest wpisany na liście leków podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia [WHO's Model List of Essential Drugs]. Formalne potwierdzenie przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków bezpieczeństwa stosowania wodorowęglanu sodu, otworzyło drogę jego zastosowań we współczesnej medycynie, zwłaszcza w leczeniu stanów zapalnych, a także w protekcji ryzyka związanego z toksycznością chemoterapii i radioterapii [Medical Device Databases – US FDA]. Wskazuje się również na przeciwzapalne właściwości tiosiarczanu sodu, co może być rezultatem oddziaływania uwalnianej siarki. Pierwiastek ten posiada właściwości antyseptyczne i jest wykorzystywany jako składnik maści leczniczych [Brozdowska 2017].

Obserwowane oddziaływanie przeciwzapalne wodorowęglanu sodu, a także jego właściwości regulujące równowagę kwasowo-zasadową motywowały podjęcie stosowania tego związku w leczeniu chorób przyzębia. Pierwsze raporty kliniczne opublikowano w tym zakresie w 1978 roku, wykazując metodą mikroskopową szybką redukcję mikroflory poddziąsłowej przyzębia, a także stanu zapalnego dziąseł pod wpływem miejscowego leczenia nadtlenkiem wodoru i wodorowęglanem sodu [Keyes i wsp., 1978]. Jednak w długoterminowych badaniach leczenia periodontitis u dorosłych, monitorowanych klinicznie i bakteriologicznie nie wykazano jednoznacznego związku pomiędzy zastosowaniem tylko wodorowęglanu sodu i stwierdzanym zmniejszeniem liczebności periopatogenów. U wszystkich pacjentów konieczne było, przynajmniej jednokrotne zastosowanie dwutygodniowej kuracji tetracyklinowej w celu redukcji wysokiej liczby bakterii [Keyes i wsp., 1978].

Wykazano również, iż wodorowęglan sodu hamuje powstawanie płytki nazębnej i zmniejsza jej kwasowość, zatem może przeciwdziałać próchnicy zębów [Chandel i wsp., 2017, Valkenburg i wsp. 2020]. W świetle obecnej wiedzy, rozwój próchnicy jest następstwem zachwiania równowagi pomiędzy procesami demineralizacji i remineralizacji tkanki zęba [Pitts i wsp., 2017]. Demineralizacja zachodzi w wyniku lokalnego zakwaszenia środowiska, czego efektem jest rozpuszczanie hydroksyapatytu i proteoliza tkanki zęba. Z kolei, proces odbudowy, częściowo rozpuszczonych kryształów szkliwa, określa się remineralizacją. Warunkiem niezbędnym do jej przebiegu jest przesycenie śliny solami wapnia i fosforu [Zalewska i wsp., 2001]. Stan ten umożliwia przepływ jonów w kierunku szkliwa, tzn. rozpuszczone kryształy mogą ulegać „restauracji” poprzez pobieranie ze śliny

wapnia i fosforanów. Jednak, hydroksyapatyty mogą utworzyć się tylko wtedy, gdy w szkliwie znajdują się jeszcze kryształy. Remineralizacja, zatem odgrywa istotne znaczenie w próchnicy nieubytkowej, bowiem warunkuje jej odwracalność poprzez naprawę początkowych uszkodzeń szkliwa. Jednocześnie, dobrze jest wiadomym, że w procesie tym biorą udział kwasy białka bogate w prolinę (APRP). APRP stanowią około 30% wszystkich białek śliny i charakteryzują się około 26% zawartością proliny. Strukturę APRP stanowi łańcuch polipeptydowy o długości 150 aminokwasów, który zawiera dwie funkcjonalnie różniące się domeny. N-terminalna domena zawiera specyficzne aminokwasy: fosfoseryny oraz reszty kwasu asparaginowego. Charakteryzuje się zdolnością adsorpcji do hydroksyapatytu oraz tworzenia błonki nabytej. Z kolei, domena C-terminalna o długości 120 aminokwasów pośredniczy w adherencji bakterii jamy ustnej do szkliwa zębów. Ponadto wskazuje się, że APRP będąc rezerwuarem jonów wapnia, może uczestniczyć w remineralizacji, czyli w procesie odbudowy częściowo rozpuszczonych kryształów szkliwa [Lendenmann i wsp., 2000]. Białko to jednocześnie stanowi jeden z czynników zabezpieczających przed demineralizacją powierzchni zębów. W kontekście tych danych ważne jest stwierdzenie, że wodorowęglan sodu zwiększa wchłanianie wapnia przez szkliwo zębów, a więc może nasilać remineralizację [Feagin i wsp. 1977].

Z kolei, w badaniach *in vitro* z zastosowaniem mikroskopii fazowo-kontrastowej, a także z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazano, że nieorganiczne związki soli sodowych, w tym wodorowęglan sodu) wywołują efekt cytotoksyczny wobec periopatogenów – krętków i pałeczek beztlenowych, głównie powodując destrukcję ich ściany komórkowej. Opisywany efekt wykazuje podobieństwo do zmian wywoływanych przez antybiotyki beta-laktamowe i jego mechanizm nie jest jasny. Jednocześnie, w innych badaniach nie wykazano istotnego wpływu wodorowęglanu sodu na żywotność wybranych periopatogenów, a także kariopatogenów – *S. mutans* i *S. salivarius* [Fletcher i wsp., 1984]. Ze względu na brak jednoznacznych danych dotyczących oddziaływania przeciwbakteryjnego wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu wobec *S. mutans*, głównego kariopatogenu i *P. gingivalis*, dominującego periopatogenu, to zagadnienie badawcze podjąłem w prezentowanej pracy doktorskiej. W leczniczym zastosowaniu nieorganicznych soli sodowych rekomendowane są w stanach zapalnych wysokie dawki dla wodorowęglanu sodu (w szerokim zakresie dawek 10-20 mg/ml). Dlatego, w moich badaniach wrażliwości badanych patogenów wobec wodorowęglanu sodu oraz tiosiarczanu sodu użyłem procedury opartej na analizie liczebności wzrostu bakterii na podłożu stałym, wcześniej preinkubowanych we wzrastających stężeniach tych związków. Uzyskane wyniki w oparciu o przeprowadzoną

analizę statystyczną pozwoliły na wyznaczenie wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii (vID_{50} , vID_{90}). Wartości vID_{50} oraz vID_{90} dla wodorowęglanu sodu względem *S. mutans* wynosiły odpowiednio: 11,16 mg/ml oraz 19,74 mg/ml. Jednocześnie wartości vID_{50} oraz vID_{90} względem *P. gingivalis* nie wykazywały istotnych różnic i wynosiły odpowiednio: 15,74 mg/ml oraz 24,56 mg/ml. Natomiast wartości vID_{50} oraz vID_{90} tiosiarczanu sodu dla *S. mutans* wynosiły odpowiednio : 28,13 mg/ml oraz 171,06 mg/ml i były 2,5-krotnie (dla vID_{50}) oraz 8,7-krotnie (dla vID_{90}) wyższe względem wirtualnych dawek wodorowęglanu sodu. Z kolei, wartości vID_{50} i vID_{90} tiosiarczanu sodu dla *P. gingivalis* wynosiły odpowiednio : 28,39 mg/ml oraz 128,89 mg/ml i były 1,8-krotnie (dla vID_{50}) oraz 5,2-krotnie (dla vID_{90}) wyższe względem wirtualnych dawek wodorowęglanu sodu. Uzyskane w tej pracy wyniki, pozwalają na zanalizowanie porównawcze aktywności przeciwbakteryjnej badanych związków. Z przedstawionych danych wynika, że obydwa badane związki nieorganicznych soli sodowych posiadają właściwości przeciwbakteryjne wobec *S. mutans* i *P. gingivalis*. Jednak, wodorowęglań sodu charakteryzuje się znacznie wyższą aktywnością przeciwbakteryjną niż tiosiarczan sodu.

Biorąc pod uwagę powyższe, wodorowęglań sodu może stanowić skuteczny i bezpieczny środek antyseptyczny w higienie jamy ustnej zapewniający skuteczną profilaktykę próchnicy zębów i chorób przyzębia.

6. WNIOSKI

1. Wodorowęglan sodu (NaHCO_3) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans*, oddziałując bakteriostatycznie (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 11,16 mg/ml oraz 19,74 mg/ml).
2. Tiosiarczan sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans*, oddziałując bakteriostatycznie. Jednak jego aktywność inhibująca jest znacznie mniejsza niż wodorowęglanu sodu (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 28,13 mg/ml oraz 171,06 mg/ml).
3. Wodorowęglan sodu (NaHCO_3) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Porphyromonas gingivalis*, oddziałując bakteriostatycznie (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 15,74 mg/ml oraz 24,56 mg/ml).
4. Tiosiarczan sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Porphyromonas gingivalis*, oddziałując bakteriostatycznie. Jednak jego aktywność inhibująca jest znacznie mniejsza niż wodorowęglanu sodu (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 28,39 mg/ml oraz 128,89 mg/ml).
5. Wodorowęglan sodu charakteryzuje się wyższą niż tiosiarczan sodu aktywnością przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans* oraz *Porphyromonas gingivalis*, co uzasadnia jego zastosowanie w profilaktyce próchnicy zębów i chorób przyzębia.

7. STRESZCZENIE

„Możliwości zastosowania związków nieorganicznych soli sodowych w stomatologii”

Próchnica zębów i zapalenia przyzębia u dorosłych należą do najczęstszych chorób jamy ustnej. W ich następstwie dochodzi do przedwczesnej utraty zębów, destrukcji przyzębia, a także – uogólnionych zakażeń organizmu. Dobrze już udokumentowano, że w etiopatogenezie powyższych chorób zasadniczą rolę odgrywają bakterie jamy ustnej, głównie *Streptococcus mutans*, uznany za klasyczny kariopatogen oraz *Porphyromonas gingivalis* – dominujący periopatogen. Współczesna wiedza stomatologiczna wskazuje zatem na konieczność działań profilaktycznych i bardzo często terapeutycznych zmierzających do redukcji bakterii patogennych w jamie ustnej nie tylko w przewlekłych stanach zapalnych przyzębia i aktywnej próchnicy zębów, ale także w grupach osób z podwyższonym ryzykiem tych stanów chorobowych. Wiadomym jest obecnie, że zdrowa jama ustna jest ważna nie tylko ze względów estetycznych, lecz również stanowi klucz dla zdrowia ogólnego oraz dla jakości i długości życia. W postępowaniu leczniczo-profilaktycznym próchnicy zębów i chorób przyzębia konieczne jest miejscowe zastosowanie preparatów odkażających, głównie w postaci płukanek do jamy ustnej. Miejscowe stosowanie antyseptyków uznaje się za metodę wspomagającą leczenie chorób przyzębia. Jednak, wszystkie dotychczas stosowane antyseptyki w stomatologii mogą wykazywać działania niepożądane, a najczęściej posiadają właściwości alergizujące. Z kolei, wiadomym jest, że pomiędzy 1 a 6 miesiącem od zakończenia leczenia miejscowego prawie u wszystkich pacjentów występują reinfekcje. Dlatego, zasadnym jest stosowanie preparatów odkażających (w tym płukanek) do codziennej higieny jamy ustnej. Z tego względu prowadzone są nadal badania poszukujące preparatu do odkażania jamy ustnej skutecznego i bezpiecznego, pozbawionego działania podrażniającego błonę śluzową jamy ustnej dla pacjentów z chorobami przyzębia i próchnicą zębów.

W dotychczasowych obserwacjach wskazuje się na oddziaływanie przeciwbakteryjne i przeciwzapalne wodorowęglanu sodu oraz własności przeciwdrobnoustrojowe pochodnych tiosiarczanu sodu. Jednocześnie, wodorowęglan sodu został określony przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków jako związek o statusie bezpiecznym i uznanym za produkt spożywczy.

Jednak, nadal nie jest jasna aktywność przeciwbakteryjna powyższych związków wobec patogenów jamy ustnej: *Streptococcus mutans* i *Porphyromonas gingivalis*.

Celem niniejszej pracy było zatem wyjaśnienie powyższego zagadnienia w oparciu o następujące zadania badawcze :

1. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro wodorowęglanu sodu wobec kariopatogenu *Streptococcus mutans*
2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro tiosiarczanu sodu wobec kariopatogenu *Streptococcus mutans*
3. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro wodorowęglanu sodu wobec periopatogenu *Porphyromonas gingivalis*
4. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej in vitro tiosiarczanu sodu wobec periopatogenu *Porphyromonas gingivalis*.

Badania przeprowadzono in vitro z użyciem szczepów wzorcowych bakterii: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) oraz *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). Oceny aktywności przeciwbakteryjnej soli - wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) oraz tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dokonywano metodą ilościową, analizując redukcję liczby wzrostu badanych bakterii - CFU (Colony Forming Units – jednostki tworzące kolonie) w warunkach beztlenowych w stałym podłożu hodowlanym, pod wpływem wzrastających dawek NaHCO_3 lub $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1, 10, 20, 40 mg/ml). Jednocześnie, oceniano żywotność bakterii tworzących CFU, stosując test fluoroscencyjny. Wszystkie doświadczenia powtarzano 5-krotnie, dokonując każdorazowo 3-krotnych odczytów. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych wyników (z zastosowaniem modelu regresji logistycznej), wyznaczono dla badanych związków wartości wirtualnej dawki inhibującej wzrost 50% bakterii – vID_{50} i 90% bakterii – vID_{90} .

Uzyskane wyniki, pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

1. Wodorowęglan sodu (NaHCO_3) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans*, oddziałując bakteriostatycznie (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 11,16 mg/ml oraz 19,74 mg/ml).
2. Tiosiarczan sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans*, oddziałując bakteriostatycznie. Jednak jego aktywność inhibująca jest znacznie mniejsza niż wodorowęglanu sodu (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 28,13 mg/ml oraz 171,06 mg/ml).
3. Wodorowęglan sodu (NaHCO_3) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Porphyromonas gingivalis*, oddziałując bakteriostatycznie (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 15,74 mg/ml oraz 24,56 mg/ml).
4. Tiosiarczan sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) wykazuje aktywność przeciwbakteryjną wobec *Porphyromonas gingivalis*, oddziałując bakteriostatycznie. Jednak jego aktywność inhibująca jest znacznie mniejsza niż wodorowęglanu sodu (wartości wirtualnych dawek inhibujących wzrost 50% i 90% bakterii: 28,39 mg/ml oraz 128,89 mg/ml).
5. Wodorowęglan sodu charakteryzuje się wyższą niż tiosiarczan sodu aktywnością przeciwbakteryjną wobec *Streptococcus mutans* oraz *Porphyromonas gingivalis*, co uzasadnia jego zastosowanie w profilaktyce próchnicy zębów i chorób przyzębia.

8. SUMMARY

“Sodium salts inorganic compounds applicability in dentistry”

Dental caries and periodontitis in adults are the most frequent oral cavity diseases. Their consequences may include a premature loss of teeth, destruction of periodontium, and systemic infections. It is well-documented that the key role in the etiopathogenesis of the above-mentioned diseases is played by oral cavity bacteria, mainly *Streptococcus mutans*, considered a classic cariopathogen, and *Porphyromonas gingivalis* – a dominant periopathogen. Therefore, the contemporary stomatological knowledge indicates the need to take preventive, and quite frequently therapeutic actions in order to reduce the count of pathogenic bacteria in the oral cavity not only in chronic periodontitis and active dental caries, but also in the groups of people with the elevated risk of developing those medical conditions. It is known now that a healthy oral cavity is important not only for aesthetic reasons but it is also a key to general health and to the quality and length of life. In preventive and treatment procedures concerning dental caries and periodontitis, it is required to locally use disinfecting preparations, mainly in the form of mouthwashes. Local use of antiseptics is considered the method supporting periodontal diseases treatment. However, all antiseptics applied in dentistry so far may cause some undesired effects, and most frequently demonstrate allergenic properties. On the other hand, it is known that between 1st and 6th month after the conclusion of local therapy, a reinfection takes place in nearly all patients. Therefore, it is reasonable to use disinfecting preparations (including mouthwash) in daily oral cavity hygiene. That is why research is still pending to find an effective and safe preparation for oral cavity disinfection which does not irritate the oral cavity mucous membrane for patients suffering from periodontitis and dental caries.

The observations made so far, indicate the antibacterial and anti-inflammatory effect of sodium bicarbonate, and antimicrobial properties of sodium thiosulfate derivatives. At the same time, sodium bicarbonate was granted the status of a safe compound and was considered a food product by the American Food and Drug Administration.

Still, it is not clear the antibacterial activity of the above-mentioned compounds against oral cavity pathogens: *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*.

Therefore, the purpose of this paper was to clarify the above issue on the basis of the following research tasks:

1. The assessment of in vitro antibacterial activity of sodium bicarbonate against cariopathogen *Streptococcus mutans*
2. The assessment of in vitro antibacterial activity of sodium thiosulfate against cariopathogen *Streptococcus mutans*
3. The assessment of in vitro antibacterial activity of sodium bicarbonate against periopathogen *Porphyromonas gingivalis*
4. The assessment of in vitro antibacterial activity of sodium thiosulfate against periopathogen *Porphyromonas gingivalis*

Tests were performed in vitro with the use of bacterial strains of bacteria: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). Antibacterial activity of salts - sodium bicarbonate (NaHCO_3) and sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) was assessed by qualitative method, through the analysis of the reduction of the growth of the bacteria count - CFU (Colony Forming Units) under anaerobic conditions in solid culture medium with the increasing doses of NaHCO_3 or $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1, 10, 20, 40 mg/ml). At the same time CFU forming bacteria viability was assessed with the use of fluorescent test. All experiments were repeated 5 times, with 3 readings for each. On the basis of statistical analysis of the results (with the use of logistic regression model) for the compounds subject to tests the virtual dose inhibiting 50% of bacterial growth – vID_{50} and 90% of bacterial growth – vID_{90} was determined.

The results allowed reaching the following conclusions:

1. Sodium bicarbonate (NaHCO_3) demonstrates antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, and acts bacteriostatically (values of virtual doses inhibiting 50% and 90% of bacterial growth: 11.16 mg/ml and 19.74 mg/ml).
2. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) demonstrates antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, and acts bacteriostatically. However, its inhibiting activity is

considerably lower than the activity of sodium bicarbonate (values of virtual doses inhibiting 50% and 90% of bacterial growth: 28.13 mg/ml and 171.06 mg/ml).

3. Sodium bicarbonate (NaHCO_3) demonstrates antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis*, and acts bacteriostatically (values of virtual doses inhibiting 50% and 90% of bacterial growth: 15.74 mg/ml and 24.56 mg/ml).
4. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) demonstrates antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis*, and acts bacteriostatically. However, its inhibiting activity is considerably lower than the activity of sodium bicarbonate (values of virtual doses inhibiting 50% and 90% of bacterial growth: 28.39 mg/ml and 128.89 mg/ml).
5. Sodium bicarbonate characterises with higher antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* than sodium thiosulfate which justifies its use in prevention of dental caries and periodontitis.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Alexander S.A., Ripa L.W. Effects of self-applied topical fluoride preparations in orthodontic patients. *Angle Orthod.* 2000; 70: 424-430.
2. Alshehri F.A. The use of mouthwash containing essential oils (LISTERINE®) to improve oral health: A systematic review. *Saudi Dent. J.* 2018; 30(1): 2-6.
3. Al-Shibani N., Windsor L.J. Effects of on human gingival fibroblasts from healthy and inflamed tissues. *J. Periodont. Res.* 2008; 43: 465-470.
4. Ancuceanu R., Anghel A.I., Ionescu C., Hovanet M.V., Cojocaru-Toma M., Dinu M. Clinical Trials with Herbal Products for the Prevention of Dental Caries and Their Quality: A Scoping Study. *Biomolecules.* 2019; 9(12): 884. doi: 10.3390/biom9120884.
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. Araujo M.W.B., Charles C.A., Weinstein R.B., McGuire J.A., Parikh-Das A.M., Du Q., Zhang J., Berlin J.A., Gunsolley J.C. Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. *J. Am. Dent. Assoc.* 2015; 146(8): 610-622.
7. Banas J.A., Drake D.R. Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? *BMC Oral Health.* 2018; 18(1):129. doi: 10.1186/s12903-018-0595-2.
8. Bonesvoll P., Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol.* 1978; 23(4): 289-94.
9. Brozdowska A. Otrzymywanie, właściwości i struktura w ciele stałym tiosiarczanów amoniowych oraz związków pokrewnych. Rozprawa doktorska. Gdańsk 2017.
10. Chapple I.L., Bouchard P., Cagetti M.G., Campus G., Carra M.C., Cocco F., Nibali L., Hujoel P., Laine M.L., Lingstrom P., Manton D.J., Montero E., Pitts N., Rangé H., Schlueter N., Teughels W., Twetman S., Van Loveren C., Van der Weijden F., Vieira A.R., Schulte A.G. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 2017; 44(Suppl 18): S39-S51. doi: 10.1111/jcpe.12685

11. Chandel S., Khan M.A., Singh N., Agrawal A., Khare V. The effect of sodium bicarbonate oral rinse on salivary pH and oral microflora: A prospective cohort study. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* 2017; 8(2): 106-109.
12. Charles C.A., Amini P., Gallob J., Shang H., McGuire J.A., Costa R. Antiplatelet and anti-gingivitis efficacy of an alcohol-free essential-oil containing mouthrinse: a 2-week clinical trial. *Am. J. Dent.* 2012; 25(4): 195-198.
13. Caufield P.W., Schön C.N., Saraithong P., Li Y., Argimón S. Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *J. Dent. Res.* 2015; 94: 110S-8S. doi: 10.1177/0022034515576052.
14. Chen X., Daliri E.B., Kim N., Kim J.R., Yoo D., Oh D.H. Microbial etiology and prevention of dental caries: exploiting natural products to inhibit cariogenic biofilms. *Pathogens.* 2020; 9(7): 569. doi: 10.3390/pathogens9070569.
15. Coelho A.S., Laranjo M., Gonçalves A.C., Paula A., Paulo S., Abrantes A.M., Caramelo F., Ferreira M.M., Silva M.J., Carrilho E., Botelho M.F. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology.* 2020; 108(2): 260-270.
16. Cortelli S.C., Cortelli J.R., Shang H., McGuire J.A., Charles C.A. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial. *Am. J. Dent.* 2013; 26(3): 149-55.
17. Chrzęszczyk D., Konopka T., Zawada Ł. Comparative analysis of mouthrinses efficacy when used as plaque inhibitory agents. *J. Stoma.* 2013; 66 (1): 37-53.
18. Cutler C.W., Kalmar J.R., Genco C.A. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* 1995; 3: 45-51.
19. Danikow N. Uzdrawiająca moc sody. Hartigrama. Warszawa 2016.
20. de Oliveira J.R., Belato K.K., de Oliveira F.E., Jorge A.O.C., Camargo S.E.A., de Oliveira L.D. Mouthwashes: an in vitro study of their action on microbial biofilms and cytotoxicity to gingival fibroblasts. *Gen. Dent.* 2018; 66(2): 28-34.
21. Dolińska E., Pietruska M., Paniczko A., Skurska A., Stokowska W. Ocena wpływu płukanek Meridol i Listerine na stan przyzębia ogólnie zdrowych osób dorosłych z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Ann. Acad. Med. Stetin* 2007; 53(Suppl.3): 28-33.
22. Dziennik Ustaw Nr 160, Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 sierpnia 2005 r. w sprawie określenia grup produktów leczniczych oraz wymagań dotyczących dokumentacji wyników badań tych produktów.

23. Eberhard J., Jepsen S., Jervøe-Storm P.M., Needleman I., Worthington H.V. Full-mouth treatment modalities (within 24 hours) for chronic periodontitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 17(4):CD004622. doi: 10.1002/14651858.CD004622.pub3.
24. Emilson C.G., Gisselsson H., Birkhed D. Recolonisations pattern of mutans streptococci after supression by three different models of chlorhexidine gel application. *Eur. J. Oral. Sci.* 1999; 107: 170-175.
25. Feagin F.F., Thiradilok S., Aponte-Merced L., Bradley E. Effects of bicarbonate on remineralization of enamel. *J. Oral Pathol.* 1977; 6(6): 331-337.
26. Fennice-Le Y.L., Verdonshot E.H., Burgersdijk R.C.W., Konig K.G. Effect of 6-monthly applications of chlorhexidine varnish on incidence of occlusal caries in permanent molars: a 3-year study. *J. Dent.* 1998; 26: 233-238.
27. Figuero E., Nóbrega D.F., García-Gargallo M., Tenuta L.M., Herrera D., Carvalho J.C. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J. Clin. Periodontol.* 2017; 44(Suppl 18): S116-S134. doi: 10.1111/jcpe.12674.
28. Fine D.H., Markowitz K., Furgang D., Goldsmith D., Ricci-Nittel D., Charles C.H., Peng P., Lynch M.C. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. *J. Periodontol.* 2007; 78(10): 1935-1942.
29. Fletcher R.D., Brastins E.D., Albers A.C., Conway J. The effect of the Keyes procedure in vitro on microbial agents associated with periodontal disease. *Quintessence Int. Dent. Dig.* 1984; 15(3): 329-334.
30. Fux-Zalewska K., Szymańska J. The antibacterial effectiveness of povidone-iodine (PVP-I) in early childhood caries. *Pediatrica Polska* 2017; 92(2): 173-177.
31. Garcia S.S., Blackledge M.S., Michalek S., Su L., Ptacek T., Eipers P., Morrow C., Lefkowitz E.J., Melander C., Wu H. Targeting of *Streptococcus mutans* biofilms by a novel small molecule prevents dental caries and preserves the oral microbiome. *J. Dent. Res.* 2017; 96(7): 807-814.
32. Gaszyńska E. , M. Wierzbicka, M. Marczak F. Szatko. Thirty years of evolution of oral heath behaviours and dental caries In urban and rural areas in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2014; 21(3): 557- 561.
33. Gibbins H.L., Proctor G.B., Yakubov G.E., Wilson S., Carpenter G.H. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. *Oral Dis.* 2014; 20: 707-713.

34. Glick M., Williams D.M., Kleinman D.V., Vujicic M., Watt R.G., Weyant R.J. A new definition for oral health developed by the FDI World Dental Federation opens the door to a universal definition of oral health. *J. Public Health Dent.* 2017; 77(1): 3-5.
35. Glick M., Williams D.M. FDI Vision 2030: Delivering optimal oral health for all. *Int. Dent. J.* 2021; 71(1): 3-4.
36. Górská R., Konopka T. (red.) *Periodontologia współczesna*. Med Tour Press International. Otwock 2013.
37. Górská R. *Choroby przyzębia. Klasyfikacja 2017*. PZWL. Warszawa 2018.
38. Górská R., Górski B. Self-reported oral status and habits related to oral care in adult Poles: A questionnaire study. *Dent. Med. Probl.* 2018; 55(3): 313-320.
39. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000.* 2017;75(1):152-188.
40. Guerra F., Pasqualotto D., Rinaldo F., Mazur M., Corridore D., Nofroni I., Ottolenghi L., Nardi G.M. Therapeutic efficacy of chlorhexidine-based mouthwashes and its adverse events: Performance-related evaluation of mouthwashes added with Anti-Discoloration System and cetylpyridinium chloride. *Int. J. Dent. Hyg.* 2019; 17(3): 229-236.
41. Gunsolley J.C. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J. Dent.* 2010; 38(Suppl 1): S6-10. doi: 10.1016/S0300-5712(10)70004-X.
42. Haffajee A.D., Yaskell T., Socransky S.S. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *J. Am. Dent. Assoc.* 2008; 139(5): 606-611.
43. Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral Biosci.* 2011;53(3): 233-240.
44. Hübner N.O., Siebert J., Kramer A. Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010; 23(5): 244-258.
45. Jain S., Darveau R.P. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol. 2000.* 2010; 54(1): 53-70.
46. Jiao Y., Hasegawa M., Inohara N. Emerging roles of immunostimulatory oral bacteria in periodontitis development. *Trends Microbiol.* 2014; 22(3): 157-63.
47. James P., Worthington H.V., Parnell C., Harding M., Lamont T., Cheung A., Whelton H., Riley P. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 3(3):CD008676. doi: 10.1002/14651858.CD008676.pub2.

48. Jańczuk Z., Kaczmarek U., Lipski M. Stomatologia zachowawcza z endodoncją. Zarys kliniczny. PZWL. Warszawa 2014.
49. Jayaram P., Chatterjee A., Raghunathan V. Probiotics in the treatment of periodontal disease: A systematic review. J. Indian Soc. Periodontol. 2016; 20(5): 488-495.
50. Jockel-Schneider Y., Schlagenhaut U., Petsos H., Rüttermann S., Schmidt J., Ziebolz D., Wehner C., Laky M., Rott T., Noack M., Noack B., Lorenz K. Impact of 0.1% octenidine mouthwash on plaque re-growth in healthy adults: a multi-center phase 3 randomized clinical trial. Clin. Oral Investig. 2021. doi: 10.1007/s00784-021-03781-3.
51. Jurczak A., Olczak-Kowalczyk D., Bąk E., Kościelniak D., Gregorczyk- Maga I., Papież M., Krzyściak W., „Próchnica zębów- od czasów starożytnych do współczesnych. Nowa Stomatol. 2014; 2: 183-188
52. Kaim J.M., Gultz J., Do L., Scherer W. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of an herbal mouthrinse. J. Clin. Dent. 1998; 9(2): 46-48.
53. Kaczmarek U. , Jackowska T., Mielnik-Błaszczak M., Jurczak A., Olczak-Kowalczyk D. Indywidualna profilaktyka fluorkowa u dzieci i młodzieży – rekomendacje polskich ekspertów. Nowa Stomatol. 2019; 24(2): 70-85.
54. Kaczyński T., Górski B., Górka R.: Wpływ wybranych czynników ryzyka na krótkoterminowe wyniki protokołu całościowego odkażania jamy ustnej w leczeniu przewlekłego zapalenia przyzębia. Dent. Med. Probl. 2014; 51(4): 477-485.
55. Keyes P.H., Wright W.E., Howard S.A. The use of phase-contrast microscopy and chemotherapy in the diagnosis and treatment of periodontal lesions--an initial report (I). Quintessence Int. Dent. Dig. 1978; 9(1): 51-56.
56. Keyes P.H., Wright W.E., Howard S.A. The use pf phase-contrast microscopy and chemotherapy in the diagnosis and treatment of periodontal lesions--an initial report (II). Quintessence Int. Dent. Dig. 1978;9(2): 69-76.
57. Klepacka J., Choromańska M., Stokowska W. Wstępna ocena działania lakierów w profilaktyce próchnicy dzieci 12-letnich. Nowa Stomatol. 2002; 7(20): 55-57.
58. Konopka T., Karolewska E., Rzeszut A. Clinical and microbiological effects of full-mouth disinfection versus conventional treatment of chronic periodontitis. J. Stomatol. 2012; 65: 6-23.
59. Konopka T., Chrzęszczuk D., Zawada Ł. Ocena skuteczności klinicznej płukanki Dentofresh. Dental Forum 2013; 1: 27-32.

60. Kusiak A., Kędzia A., Molęda-Ciszewska B., Kędzia A.W., Maciejewska K., Włodarkiewicz A., Kwapisz E. Działanie olejku z mięty pieprzowej na bakterie beztlenowe. *Dent. Med. Probl.* 2010; 47(3): 334-338.
61. Kwiatkowska A., Mielczarek A., Gajewski T. Wykorzystanie olejków eterycznych w środkach do higieny jamy ustnej. *Nowa Stomatol* 2017; 22(3): 148-155.
62. Lang N.P., Cumming B.R., Löe H. Toothbrushing frequency as it relates to plaque development and gingival health. *J. Periodontol.* 1973; 44(7): 396-405.
63. Lee V.A., Karthikeyan R., Rawls H.R., Amaechi B.T. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloride-containing nanoemulsion. *J. Dent.* 2010; 38(9): 742-749.
64. Lendenmann U., Grogan J., Oppenheim F.G. Saliva and dental pellicle - a review. *Adv. Dent Res.* 2000;14: 22-28.
65. Lynch M.C., Cortelli S.C., McGuire J.A., Zhang J., Ricci-Nittel D., Mordas C.J., Aquino D.R., Cortelli J.R. The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. *BMC Oral Health.* 2018; 18(1): 6. doi: 10.1186/s12903-017-0454-6.
66. Malicka B., Ziętek M., Grzebieluch W. Zastosowanie chlorheksydy w stomatologii. *Dent. Med. Probl.* 2005; 42: 497-505.
67. Marinho V.C.C., Chong L.-Y., Worthington H.V., Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Syst. Rev.* 2016; 7: CD002284. DOI: 10.1002/14651858.CD002284.pub2.
68. Martin B.J., Campbell P.M., Rees T.D., Buschang P.H. A randomized controlled trial evaluating antioxidant-essential oil gel as a treatment for gingivitis in orthodontic patients. *Angle Orthod.* 2016; 86(3): 407-412.
69. Martin-Cabezas R., Davideau J.L., Tenenbaum H., Huck O. Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* 2016; 43(6): 520-530.
70. Medical Device Databases – US Food and Drug Administration. <https://www.accessdata.fda.gov>
71. Mężyk-Kopeć R., Bzowska M., Potempa J., Bzowska M., Jura N., Sroka A., Black R.A., Bereta J. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2005; 73(3): 1506-1514.
72. Mielczarek A., Bołtacz-Rzepkowska E., Bagińska J., Chałas R., Kwiatkowska A., Hajdo A., Marcinkowska-Ziemak M. Próchnica zębów – zalecenia profilaktyczne i

- terapeutyczne. Stanowisko grupy roboczej Polskiego Oddziału Sojuszu dla Przyszłości Wolnej od Próchnicy (ACFF). *Nowa Stomatol.* 2017; 22(2): 89-95.
73. Mielnik-Błaszczak M., Stanios-Śnieżyńska J. Zastosowanie 0,2% glukonianu chlorheksydyny w profilaktyce próchnicy u dzieci. *Mag. Stomat.* 2001; 11: 26-28.
 74. Monitorowanie stanu zdrowia jamy ustnej populacji polskiej w latach 2016-2020
<https://www.gov.pl/web/zdrowie/monitorowanie-stanu-zdrowia-jamy-ustnej-populacji-polskiej-w-latach-2016-2020>
 75. Nakra N.A., Madan R.P., Buckley N., Huber A.M., Freiermuth J.L., Espinoza L., Walsh J., Parikh U.M., Penrose K.J., Keller M.J., Herold B.C. Loss of innate host defense following unprotected vaginal sex. *J. Infect. Dis.* 2016; 213(5): 840-847.
 76. Olczak-Kowalczyk D., Borysewicz-Lewicka M., Adamowicz-Klepalska B., Jackowska T., Kaczmarek U. Stanowisko polskich Ekspertów dotyczące indywidualnej profilaktyki fluorkowej choroby próchnicowej u dzieci i młodzieży. *Nowa Stomatol.* 2016; 1: 47-73.
 77. Pan P.C., Harper S., Ricci-Nittel D., Lux R., Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010;38:S16-20.doi: 10.1016/S0300-5712(10)70006-3.
 78. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J. Mechanizm i czynniki ryzyka powstania biofilmu bakteryjnego w jamie ustnej. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2013; 67: 734-741.
 79. Peres M.A., Macpherson L.M.D., Weyant R.J., Daly B., Venturelli R., Mathur M.R., Listl S., Celeste R.K., Guarnizo-Herreño C.C., Kearns C., Benzian H., Allison P., Watt R.G. Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet* 2019; 394(10194): 249-260.
 80. Pihlstrom B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005; 366(9499): 1809-1820.
 81. Pithon M.M., Sant'Anna L.I., Baião F.C., dos Santos R.L., Coqueiro R.S., Maia L.C. Assessment of the effectiveness of mouthwashes in reducing cariogenic biofilm in orthodontic patients: a systematic review. *J. Dent.* 2015; 43(3): 297-308.
 82. Pitts N.B., Zero D.T., Marsh P.D., Ekstrand K., Weintraub J.A., Ramos-Gomez F., Tagami J., Twetman S., Tsakos G., Ismail A. Dental caries. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 25: 3:17030.
 83. Pizzo G., Compilato D., Di Liberto B., Pizzo I., Campisi G. Effects of two essential oil mouthrinses on 4-day supragingival plaque regrowth: a randomized cross-over study. *Am. J. Dent.* 2013; 26(3): 156-160.

84. Rams T.E., Keyes P.H., Jenson A.B. Morphological effects of inorganic salts, chloramine-T, and citric acid on subgingival plaque bacteria. Quintessence Int. Dent. Dig. 1984;15(8): 835-44.
85. Rams T.E., Keyes P.H., Wright W.E., Howard S.A. Long-term effects of microbiologically modulated periodontal therapy on advanced adult periodontitis. J. Am. Dent. Assoc. 1985; 111(3): 429-41.
86. Richards D. Chlorhexidine mouthwash plaque levels and gingival health. Evid. Based Dent. 2017; 18(2): 37-38.
87. Routsias J.G., Karagounis P., Parvulesku G., Legakis N.J., Tsakris A. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. Peptides. 2010; 31(9):1654-1660.
88. Sandros J., Karlsson C., Lappin D.F., Madianos P.N., Kinane D.F., Papapanou P.N. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. J. Dent. Res. 2000; 79(10): 1808-14.
89. Sanz M., Beighton D., Curtis M.A., Cury J.A., Dige I., Dommisch H., Ellwood R., Giacaman R.A., Herrera D., Herzberg M.C., Könönen E., Marsh P.D., Meyle J., Mira A., Molina A., Mombelli A., Quirynen M., Reynolds E.C., Shapira L., Zaura E. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 2017; 44(Suppl 18): S5-S11. doi: 10.1111/jcpe.12682.
90. Scheres N., Crielaard W. Gingival fibroblast responsiveness is differentially affected by *Porphyromonas gingivalis*: implications for the pathogenesis of periodontitis. Mol. Oral Microbiol. 2013; 28(3): 204-18.
91. Schmalz G., Ziebolz D. Changing the focus to the whole patient instead of one oral disease: the concept of individualized prevention. Adv. Prev. Med. 2020; 2020: 6752342. doi: 10.1155/2020/6752342.
92. Schmidt J., Zyba V., Jung K., Rinke S., Haak R., Mausberg R.F., Ziebolz D. Effects of octenidine mouth rinse on apoptosis and necrosis of human fibroblasts and epithelial cells - an in vitro study. Drug Chem. Toxicol. 2018; 41(2): 182-187.
93. Sen U., Vacek T.P., Hughes W.M., Kumar M., Moshal K.S., Tyagi N., Metreveli N., Hayden M.R., Tyagi S.C. Cardioprotective role of sodium thiosulfate on chronic heart failure by modulating endogenous H₂S generation. Pharmacology. 2008; 82(3): 201-213

94. Sender-Janeczek A., Ziętek M. Miejscowe zastosowanie antyseptyków i antybiotyków w leczeniu przewlekłego zapalenia przyzębia – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* 2007; 44(3): 396-402.
95. Seymour G.J., Ford P.J., Cullinan M.P., Leishman S., Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(Suppl 4):3-10
96. Sheen S., Owens J., Addy M. The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetyl pyridinium chloride to produce staining in vitro: a possible predictor of inactivation. *J. Clin. Periodontol.* 2001; 28(1): 46-51.
97. Silhacek K.J., Taake K.R. Sodium bicarbonate and hydrogen peroxide: the effect on the growth of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Hyg.* 2005; 79(4):7. Epub 2005 Oct 1. PMID: 16297309
98. Sircus M. Soda – lecznicze właściwości. Kompendium wiedzy o tanim, bezpiecznym i skutecznym środku uzdrawiającym. Vital. Białystok 2020.
99. Slots J. Focal infection of periodontal origin. *Periodontol.* 2000. 2019; 79(1): 233-235.
100. Socransky S.S., Haffajee A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000. 2002;28:12-55.
101. Strużycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol. J. Microbiol.* 2014; 63(2): 127-135.
102. Supranoto S.C., Slot D.E., Addy M., Van der Weijden G.A. The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: a systematic review. *Int. J. Dent. Hyg.* 2015; 13(2):83-92.
103. Świerkot K., Nonnenmacher C.I., Mutters R., Flores-de-Jacoby L., Mengel R.: One-stage full-mouth disinfection versus quadrant and full-mouth root planing. *J. Clin. Periodontol.* 2009, 36, 240-249;
104. Szkaradkiewicz A., Kuźma A., Karpiński T. Effects of chlorhexidine mouth-wash on presence of *Lactobacillus* spp. in saliva of patients with chronic periodontitis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009; 34(2): S72, Abstract: P145.
105. Szkaradkiewicz-Karpińska A.K., Zeidler A., Goslińska-Kuźniarek O., Uram K, Szkaradkiewicz A. Oral lactobacilli and salivary acidic proline-rich proteins (APRP-1/2) in dental caries. *J. Physiol. Pharmacol.* 2018; 69(1): 139-144.
106. Szkaradkiewicz-Karpińska AK, Szkaradkiewicz A. Effect of exopolysaccharides from cariogenic bacteria on human gingival fibroblasts. *Int J Med Sci* 2021; 18(12):2666-2672.

107. Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019; 55(1):33-40.
108. Taylor JJ. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* 2010; 54(1):160-194.
109. Teng F, He T, Huang S, Bo CP, Li Z, Chang JL, Liu JQ, Charbonneau D, Xu J, Li R, Ling JQ. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation. *Int J Oral Sci.* 2016; 8(3):182-190.
110. Thangavelu A, Kaspar SS, Kathirvelu RP, Srinivasan B, Srinivasan S, Sundram R. Chlorhexidine: An Elixir for Periodontics. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020; 12(Suppl 1):S57-S59. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_162_20.
111. Ullah R, Zafar MS, Shahani N. Potential fluoride toxicity from oral medicaments: A review. *Iran J Basic Med Sci.* 2017; 20(8):841-848.
112. Uozumi J, Litterst CL. The effect of sodium thiosulfate on subcellular localization of platinum in rat kidney after treatment with cisplatin. *Cancer Lett.* 1986;32(3):279-83.
113. Valente M.T., Moffa E.B., Crosara K.T.B., Xiao Y., de Oliveira T.M., Machado M.A.A.M., Siqueira W.L. Acquired enamel pellicle engineered peptides: Effects on Hydroxyapatite Crystal Growth. *Sci. Rep.* 2018; 8: 3766 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21854-4>
114. Valkenburg C., Slot D.E., Bakker E.W., Van der Weijden FA. Does dentifrice use help to remove plaque? A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2016; 43(12):1050-1058.
115. Valkenburg C, Kashmour Y, Dao A, Fridus Van der Weijden GA, Slot DE. The efficacy of baking soda dentifrice in controlling plaque and gingivitis: A systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2019 May;17(2):99-116. doi: 10.1111/idh.12390.
116. Vandekerckhove B.N., Van Steenberghe D., Tricio J., Rosenberg D., Encarnacion M. Efficacy on supragingival plaque control of cetylpyridinium chloride in a slow-release dosage form. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(11): 824-829.
117. Van Swaaij BWM, van der Weijden GAF, Bakker EWP, Graziani F, Slot DE. Does chlorhexidine mouthwash, with an anti-discoloration system, reduce tooth surface discoloration without losing its efficacy? A systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg.* 2020;18(1): 27-43.
118. Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control? *Dent Clin North Am.* 2015; 59(4):799-829.

119. Vives-Soler A., Chimenos-Küstner E. Effect of probiotics as a complement to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis: a systematic review. *Med. Oral Patol. Oral Cir Bucal*. 2020; 25(2): e161-e167.
120. Walsh T., Oliveira-Neto J.M., Moore D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 13(4): CD008457. doi: 10.1002/14651858.CD008457.pub2.
121. Wikén Albertsson K, Persson A, van Dijken JW. Effect of essential oils containing and alcohol-free chlorhexidine mouthrinses on cariogenic micro-organisms in human saliva. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(3-4): 883-891
122. WHO's Model List of Essential Drugs.
https://www.who.int/selection_medicines/list/en/ 7 December 2001.
123. Whitaker E.J., Pham K., Feik D., Rams T.E., Barnett M.L., Pan P. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on induction of platelet aggregation by oral bacteria in vitro. *J. Clin. Periodontol*. 2000; 27(5): 370-373.
124. Wyganowska-Świątkowska M., Urbaniak P., Szkaradkiewicz A., Jankun J., Kotwicka M. Effects of chlorhexidine, essential oils and herbal medicines on human fibroblasts in vitro. *Cent. Eur. J. Immunol*. 2016; 41: 125-131.
125. Xu W., Zhou W., Wang H., Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Adv. Protein Chem. Struct Biol*. 2020;120: 45-84.
126. Yamashita Y., Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J. Oral Sci*. 2017; 59(2): 2001-2006.
127. Yang K.M., Kim J.S., Kim H.S., Kim YY, Oh J.K., Jung H.W., Park D.S., Bae K.H. *Lactobacillus reuteri* AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria. *Sci. Rep*. 2021; 11(1):1631. doi: 10.1038/s41598-020-80921-x.
128. Zalewska A., Zwierz K., Żółkowski K., Gindzieński A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim. Pol*. 2000; 47: 1067-1079.
129. Zanatta F.B., Antoniazzi R.P, Rösing C.A. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J. Periodontol*. 2007; 78: 2127-2134.
130. Zaremba M.L. Choroby przyzębia a wzrost odpowiedzi zapalnej. *Czas. stomatol*. 2009; 62: 531-548.
131. Zaremba M.L., Borowski J. *Mikrobiologia Lekarska*. PZWL.,Warszawa 2019

10. SPIS FOTOGRAFII, RYCIN I TABEL

Fotografia 1. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (pow.1000x).....20

Fotografia 2. *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (pow.1000x)..... 21

Fotografia 3. Wzrost CFU *S. mutans* w hodowli na podłożu stałym (kontrola).....23

Fotografia 4. Wzrost CFU *P. gingivalis* w hodowli na podłożu stałym (kontrola).....24

Fotografia 5. Test fluorescencyjny Live/Dead BacLight Bacterial Viability and Counting Kit (Molecular Probes).....25

Rycina 1. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO_329

Rycina 2. Krzywa zależności odsetka wyrosłych bakterii *S. mutans*, przy wzrastających dawkach NaHCO_3 względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio: 11,16 $\text{mg/ml} \pm 1,003996 \text{ SE}$ oraz 19,74 $\text{mg/ml} \pm 1,006428 \text{ SE}$)30

Rycina 3. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$33

Rycina 4. Krzywa zależności odsetka wyrosłych bakterii *S. mutans*, przy wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio: 28,13 mg/ml $\pm$ 1,009482 SE oraz 171,06 mg/ml $\pm$ 1,027132 SE).....**34**

Rycina 5. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO_3**37**

Rycina 6. Krzywą zależności odsetka wyrosłych bakterii *P.gingivalis* przy wzrastających dawkach NaHCO_3 względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio: 15,74 mg/ml $\pm$ 1,003375 SE oraz 24,56 mg/ml $\pm$ 1,004993 SE).....**38**

Rycina 7. Graficzne przedstawienie uzyskanych wartości liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$**41**

Rycina 8. Krzywa zależności odsetka wyrosłych bakterii *P.gingivalis* przy wzrastających dawkach $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ względem kontroli (wartości vID_{50} i vID_{90} wynoszą odpowiednio : 28,39 mg/ml $\pm$ 1,008481 SE oraz 128,89 mg/ml $\pm$ 1,023423 SE).....**42**

Tabela 1. Klasyfikacja chorób i zmian w obrębie tkanek przyzębia oraz tkanek wokół implantów (World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions, 2017) [Górska 2017].....**9**

Tabela 2. Zestawienie najczęściej aktualnie stosowanych w Polsce preparatów antyseptycznych w profilaktyce próchnicy i chorób przyzębia oraz ich główne działania niepożądane.....**15**

Tabela 3. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO_3 **28**

Tabela 4. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *S.mutans* w hodowlach 24 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ **32**

Tabela 5. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek wodorowęglanu sodu – NaHCO_3 **36**

Tabela 6. Wyniki badań liczby wyrosłych kolonii bakterii (CFU) *P.gingivalis* w hodowlach 72 godz., preinkubowanych w buforze kontrolnym (kontrola) oraz z użyciem wzrastających dawek tiosiarczanu sodu – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ **40**

11. ANEKS

SM Soda	Wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych); SM Soda				
	Kontrola	1 mg	10 mg	20 mg	40 mg
Kontrola		1,000000	0,191273	0,000266	0,000000
1 mg	1,000000		0,097743	0,000032	0,000000
10 mg	0,191273	0,097743		0,378164	0,000422
20 mg	0,000266	0,000032	0,378164		0,435365
40 mg	0,000000	0,000000	0,000422	0,435365	

PG Soda	Wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych)				
	Kontrola	1 mg	10 mg	20 mg	40 mg
Kontrola		1,000000	1,000000	0,008560	0,000003
1 mg	1,000000		0,802238	0,000050	0,000000
10 mg	1,000000	0,802238		0,048480	0,000013
20 mg	0,008560	0,000050	0,048480		0,435365
40 mg	0,000003	0,000000	0,000013	0,435365	

SM Tiosiarczan	Wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych); SM Tiosiarczan				
	Kontrola	1 mg	10 mg	20 mg	40 mg
Kontrola		1,000000	0,126494	0,002181	0,000000
1 mg	1,000000		0,085745	0,000706	0,000000
10 mg	0,126494	0,085745		1,000000	0,001166
20 mg	0,002181	0,000706	1,000000		0,121603
40 mg	0,000000	0,000000	0,001166	0,121603	

PG Tiosiarczan	Wartość p dla porównań wielokrotnych (dwustronnych); PG Tiosiarczan				
	Kontrola	1 mg	10 mg	20 mg	40 mg
Kontrola		1,000000	0,401536	0,001203	0,000000
1 mg	1,000000		0,101623	0,000048	0,000000
10 mg	0,401536	0,101623		0,449557	0,000531
20 mg	0,001203	0,000048	0,449557		0,417034
40 mg	0,000000	0,000000	0,000531	0,417034	



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Poznań, 30.05.2018r.

KB nr 632/18

OŚWIADCZENIE

Badanie naukowe pt.:

„Możliwości zastosowania nieorganicznych związków soli sodowych w stomatologii”.

prowadzone przez Pana **lek. stom. Kryspin Uram**

nie nosi cech eksperymentu medycznego i zgodnie z polskim prawem
i Dobrą Praktyką Klinikzną (GCP) nie podlega opiniowaniu
Komisji Bioetycznej.

Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński