

**UNIwersytet Jagielloński**

**Collegium Medicum**

**Wydział Lekarski**

**Ewa Pasich**

**Ocena adhezji *Streptococcus mutans* do materiałów ortodontycznych  
oraz porównanie właściwości antyseptycznych chlorheksydyny i  
haloamin tauryny wobec wybranych drobnoustrojów biofilmu  
ortodontycznego.**

**Praca doktorska**

**Promotor: *Prof. zw. dr hab. med. Janusz Marcinkiewicz***

Pracę wykonano w:

Katedrze Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik Katedry: Prof. zw. dr hab. med. Janusz Marcinkiewicz

**Kraków 2014**

*Składam serdeczne podziękowania i głęboką wdzięczność  
mojemu Nauczycielowi i Promotorowi,  
Panu Prof. zw. dr hab. Januszowi Marcinkiewiczowi  
za umożliwienie napisania niniejszej pracy,  
wszechstronną pomoc i cierpliwe  
wprowadzenie mnie w tajniki immunologii  
oraz cenne wskazówki w redagowaniu niniejszej pracy.  
Dziękuję ponadto wszystkim pracownikom Katedry Immunologii CM UJ,  
a w szczególności Pani mgr Marii Walczewskiej i Angelice Peruń,  
oraz Pani dr Annie Białeckiej i dr Andrzejowi Kasprończowi  
za nieocenioną pomoc w prowadzeniu badań i życzliwość.*

# Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów.....	6
<b>1. WSTĘP.....</b>	<b>9</b>
1.1 Terapia ortodontyczna – współczesne aparaty i stosowane materiały.....	9
1.2 Skutki uboczne i ryzyko terapii ortodontycznej.....	13
1.3 Adhezja drobnoustrojów do aparatów ortodontycznych.....	15
1.4 Biofilm.....	17
1.5 Mikrobiom jamy ustnej.....	20
1.6 Płytką nazębna, biofilm bakteryjny a stany zapalne i infekcyjne jamy ustnej.....	21
1.7 Antyseptyki stosowane w ortodoncji. Chlorheksydyna (CHX).....	25
1.8 Chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr) – właściwości biologiczne i zastosowanie kliniczne.....	28
1.8.1 Właściwości biologiczne TauCl i TauBr.....	30
1.8.2 Zastosowanie kliniczne TauCl i TauBr.....	31
<b>2. CEL PRACY.....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAŁY I METODY.....</b>	<b>34</b>
3.1 Odczynniki i materiały.....	34
3.2 Przygotowanie roztworów substancji antyseptycznych.....	34
3.3 Synteza chloraminy tauryny (TauCl).....	36
3.4 Synteza bromaminy tauryny (TauBr).....	36
3.5 Przygotowanie szczepów bakteryjnych.....	36
3.6 Materiały ortodontyczne.....	37
3.7 Przygotowanie płytek do badania adhezji wybranych drobnoustrojów.....	37
3.8 Ocena adhezji <i>Streptococcus mutans</i> i <i>Candida albicans</i> i tworzenia biofilmu na powierzchni wybranego materiału ortodontycznego. Określenie ilości przylegających drobnoustrojów (CFU/płytkę) i obrazowanie biofilmu – mikroskop skaningowy.....	38
3.9 Przygotowanie płytek do mikroskopu skaningowego.....	38
3.10 Metoda tworzenia wielogatunkowego biofilmu ( <i>Candida albicans</i> i <i>Streptococcus</i>	

<i>mutans</i> ) na powierzchni płytek wybranych materiałów ortodontycznych.....	39
3.11 Określenie mikrobójczego działania CHX, TauBr, TauCl i NaOCl na formę planktoniczną badanych drobnoustrojów.....	39
3.12 Określenie mikrobójczego działania TauBr i CHX na drobnoustroje ukryte w biofilmie ortodontycznym.....	40
3.13 Zwierzęta doświadczalne.....	41
3.14 Komórki.....	41
3.15 Ocena żywotności komórek – test MTT.....	42
3.16 Ocena wpływu CHX i TauBr na produkcję cytokin i tlenku azotu przez makrofagi.....	42
3.17 Oznaczanie poziomu cytokin.....	43
3.18 Oznaczanie poziomu tlenku azotu (NO).....	43
3.19 Ocena wpływu CHX i TauBr na produkcję ROS przez aktywowane neutrofile metodą chemiluminescencji zależnej od luminolu (LCL).....	44
3.20 Statystyka.....	44
3.21 Miejsce wykonania badań.....	44
<b>4. WYNIKI.....</b>	<b>45</b>
4.1 Ocena adhezji <i>Streptococcus mutans</i> do powierzchni wybranych materiałów ortodontycznych.....	45
4.2 Porównanie mikrobójczych właściwości TauCl, TauBr, NaOCl i CHX wobec formy planktonicznej <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> i <i>Candida albicans</i> .....	51
4.3 Porównanie mikrobójczych właściwości TauBr i CHX wobec <i>Streptococcus mutans</i> i <i>Candida albicans</i> rosnących w biofilmie na powierzchni płytki kompozytowej.....	53
4.4 Wpływ TauBr i CHX za żywotność makrofagów <i>in vitro</i> .....	56
4.5 Ocena wpływu TauCl, TauBr i CHX na aktywność sekrecyjną makrofagów.....	58
4.6 Ocena wpływu TauBr i CHX na tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS) przez aktywowane neutrofile.....	61
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>64</b>
<b>6. WNIOSKI.....</b>	<b>70</b>
<b>7. STRESZCZENIE.....</b>	<b>71</b>

<b>8. SUMMARY</b> .....	74
<b>9.PIŚMIENNICTWO</b> .....	77
<b>10.ZAŁĄCZNIKI</b> .....	90

## ***Wykaz stosowanych skrótów***

**BSA** – (bovine serum albumin) - albumina bydlęca

**CA** - *Candida albicans*

**C. albicans** - *Candida albicans*

**CFU** - (colony forming unit) - jednostka tworząca kolonię bakteryjną, określająca ilość mikroorganizmów w materiale badanym

**CHX** - chlorheksydyna

**CO<sub>2</sub>** - dwutlenek węgla

**CrCo** - stal chromo-kobaltowa

**COX** – cyklooksygenaza

**DNA** - (deoxyribonucleic acid) - kwas dezoksyrybonukleinowy

**DPBS** – pozbawiona jonów wapnia i magnezu, zbuforowana fosforanami sól fizjologiczna

**EPO** – peroksydaza eozynofilów

**E. coli** - *Escherichia coli*

**ELISA** - (enzyme-linked immunosorbent assay) - test immunoenzymatyczny

**EPS** – extracellular polymeric substances

**FBS** - (fetal bovine serum) płodowa surowica bydlęca

**FCS** – (fetal calf serum) płodowa surowica cielęca

**h** – (hours) godziny

**HBSS** – (Hank's buffered saline solution) - roztwór soli Hanksa

**HO-1** – oksygenaza hemowa-1

**HRP** – peroksydaza chrzanowa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - nadtlenek wodoru

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** - kwas siarkowy

**HOCl** - kwas podchlorowy

**IFN** – interferon

**IL-6, -10, -12** – interleukina 6, 10, 12

**LCL** - chemiluminescencja zależna od luminolu

**LPS** – lipopolisacharyd

**MIC** - (minimal inhibitory concentration) - minimalne stężenie hamujące

**MPO** – mieloperoksydaza

**MTT** – bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu

**NaBr** - bromek sodu

**NaNO<sub>2</sub>** - azotyn sodu

**NaOBr** - podbromin sodu

**NaOCl** - podchloryn sodu

**NO** – tlenek azotu

**NOS** – syntaza tlenku azotu

**OZ** – opsonizowany zymosan

**PGE<sub>2</sub>** – prostaglandyna E<sub>2</sub>

**PCA** - parachloroanilina

***P. gingivalis*** - *Porphyromonas gingivalis*

**ROS** - (reactive oxygen species) - reaktywne formy tlenu

**RUL** - jednostki względnej intensywności luminescencji

***S. mutans*** - *Streptococcus mutans*

***S. sanguis*** - *Streptococcus sanguis*

**Tau** – tauryna

**TauBr** – bromamina tauryny

**TauBr<sub>2</sub>** – dibromamina tauryny

**TauCl** – chloramina tauryny

**TauCl<sub>2</sub>** – dichloramina tauryny

**TNF** - (tumor necrosis factor) - czynnik martwicy nowotworów

**TSB** - (Tryptic Soy Broth) - bulion tryptonowo sojowy



# 1. Wstęp

## 1.1 Terapia ortodontyczna – współczesne aparaty i stosowane materiały.

Współczesna ortodoncja to jedna z najszybciej i najprężniej rozwijających się dziedzin stomatologii, a zarazem jedna z najtrudniejszych metod leczniczych, wynikających ze złożoności problemów diagnostycznych, mnogości stosowanych aparatów leczniczych i metod oraz „szkół” terapeutycznych. Niezaprzeczalne korzyści funkcjonalno-estetyczne wynikające z terapii ortodontycznej, nie powinny przesłaniać skutków ubocznych takowej terapii, do której bez wątpienia należy znaczny wzrost drobnoustrojów tworzących biofilm, wynikający z obecności dodatkowego ciała obcego w jamie ustnej, którym bez wątpienia jest aparat ortodontyczny. Niniejsza praca ma na celu przyjrzenie się problemowi adhezji bakterii próchnicotwórczej *Streptococcus mutans* do powierzchni materiałów stosowanych w ortodoncji oraz sposobów zahamowania nadmiernego wzrostu patogennego biofilmu.

Pomimo mnogości materiałów i aparatów stosowanych w leczeniu ortodontycznym, należałoby podjąć próbę prostego i praktycznego uszeregowania takowych materiałów. Najbardziej pragmatycznym podziałem wydaje się być podział na aparaty zdejmowane i aparaty stałe. [Profit i wsp. 2010]

Aparaty zdejmowane podzielić można na:

- aparaty czynnościowe do modyfikacji wzrostu



**Ryc. 1. Czynnościowy aparat ortodontyczny. Regulator funkcji Frankla.**

- aparaty stosowane do przemieszczeń zębów u dzieci
- aparaty szeregujące w postaci szyn przezroczystych typu *alinger*



**Ryc. 2. Aparat szeregujący – szyna typu *alinger*.**

Do aparatów czynnościowych modyfikujących wzrost należą m.in.: bionator Baltersa, *Twin-block*, czy regulator funkcji Frankla i bez względu na nazwę każdy aparat czynnościowy jest w uproszczeniu połączeniem drutów wykonanych ze stali nierdzewnej chromo-niklowej i części akrylowych.

Głównym przedstawicielem aparatów do przemieszczania zębów u dzieci jest płytowy aparat Schwartza i jego modyfikacje, gdzie głównym elementem aparatu jest płyta akrylowa, w której osadzone są śruby-będące najczęściej elementem czynnym, oraz sprężyny i klamry(Adamsa) wykonane ze stali nierdzewnej.

Ostatnią grupą zdejmowanych aparatów stanowią przezroczyste szyny typu *aligner*, będące metodą korygowania prostych wad zgryzu przy pomocy kilku kompletów przezroczystych nakładek wykonanych ze specjalnej termoformliwej folii, indywidualnie dopasowanych do zębów pacjenta i uwzględniających ich odpowiednie przesunięcia.

Współczesne aparaty stałe [Karlowska 2009] podzielić można na aparaty gruboślukowe wykonane z drutów ze stali nierdzewnej o przekroju okrągłym o średnicy 0,8 do 1,1 mm i aparaty cienkoślukowe, które w większości są odmianami aparatu edgewise, których głównymi elementami składowymi są zamki, pierścienie(ewentualnie rurki) i łuki oraz liczne akcesoria towarzyszące.

Ze względu na materiał zamki podzielić można na [Baczyk-Łopuch i Loster 2010]:

- metalowe (głównie ze stali nierdzewnej, sporadycznie chromo-kobaltowo-molibdenowe i tytanowe, jako alternatywa u osób uczulonych na nikiel zawarty w stali nierdzewnej) [Panuszka i wsp. 2003]
- plastikowe ( z poliwęglanu – obecnie mało stosowane)
- ceramiczne (z poli- lub monokrystalicznego tlenku glinu lub z polikrystalicznego tlenku cyrkonu)
- kompozytowe [Brusca i wsp. 2007]

Pierścienie metalowe wykonane są ze stali chromoniklowej o grubości ok 0,1mm.

Jeżeli zaś chodzi o łuki stosowane w ortodoncji to ze względu na rodzaj stopu, z którego zostały wykonane podzielić je można na [Karłowska 2009]:

- łuki stalowe ze stali nierdzewnej
- łuki stalowe plecione (twist-flex)
- łuki ze stali chromokobaltowej(CrCo)
- łuki ze stopu tytanowo-molibdenowego (beta tytanowe)
- łuki ze stopu niklowo-tytanowego.

Odrębną grupę stanowią akcesoria w ortodoncji, które podzielić można zasadniczo na dwie grupy, w zależności z jakiego tworzywa zostały wykonane [Komorowska 2009]:

- pomocnicze materiały elastyczne, jako elastomery poliuretanowe, do których należą: łańcuszki elastyczne, gumki regulacyjne, nici i ligatury elastyczne, kliny rotacyjne i elastomery separacyjne,
- pomocnicze elementy metalowe wykonane z różnych stopów metali, do których zaliczyć trzeba: haczyki, guziczki, zaczepy, zaciski stopujące, sprężynki spiralne oraz ligatury metalowe.

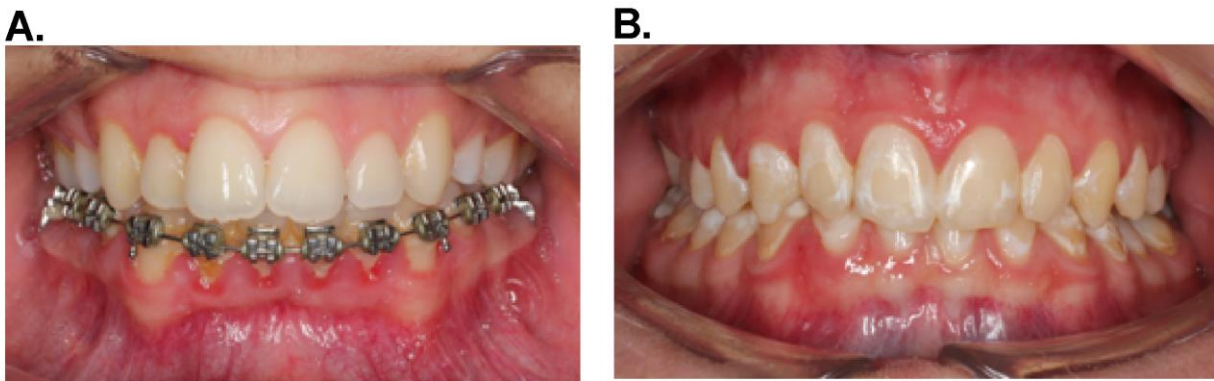
Ostatnimi czasy wzrasta również popularność tytanowych mini implantów ortodontycznych, służących wzmocnieniu zakotwienia szkieletowego podczas leczenia.

Na koniec należałoby wspomnieć o materiałach pomocniczych służących do cementowania elementów stałych aparatów ortodontycznych, do których należą cementy gładjonomerowe, fosforanowe, karboksylowe oraz materiały kompozytowe.

## 1.2 Skutki uboczne i ryzyko terapii ortodontycznej

W ostatniej dekadzie liczba pacjentów leczonych ortodontycznie wzrasta gwałtownie. Tylko w samym USA, w roku ubiegłym zarejestrowano 5 mln ortodontycznych pacjentów (w tym 1 mln dorosłych). Jednakże wraz ze wzrostem popularności i widocznych korzystnych efektów leczenia ortodontycznego wiedza o skutkach ubocznych nie jest powszechna.

Niewątpliwie najczęstszym powikłaniem wynikającym z terapii ortodontycznej jest odwapnienie(demineralizacja) szkliwa w postaci tzw. białych plam i zapalenia przyzębia brzeżnego wynikające z nadmiernego odkładania się płytki bakteryjnej i resztek pokarmowych.



**Ryc. 3. Powikłania terapii ortodontycznej: 3A - zapalenie przyzębia, 3B – białe plamy.**

W pracach [Benson i wsp. 2005] pojawiają się doniesienia, iż zjawisko odwapnienia szkliwa występuje u 50% badanych pacjentów leczonych ortodontycznie, a ryzyko zainicjowania procesu próchnicowego wynosi aż 80% u badanych pacjentów [Jabłońska-Zrobek i Śmiech-Słomkowska 2005]. Budowa aparatu ortodontycznego, a w szczególności zamków ortodontycznych, poprzez właściwości materiałów użytych do ich produkcji jak i złożoną budowę ograniczają przepływ śliny, która w naturalny sposób dzięki właściwościom buforującym oczyszcza powierzchnię zębów. Ponadto zamki utrudniają mechaniczne usuwanie złogów nazębnych obniżając tym samym znacząco stan higieny jamy ustnej.

Wiele skutków ubocznych ma pochodzenie jatrogenne, do których zaliczyć trzeba uszkodzenia przyzębia poprzez nieodpowiednio stosowane lub założone elementy aparatów ortodontycznych czy też uszkodzenia szkliwa podczas zdejmowania zamków czy pierścieni.

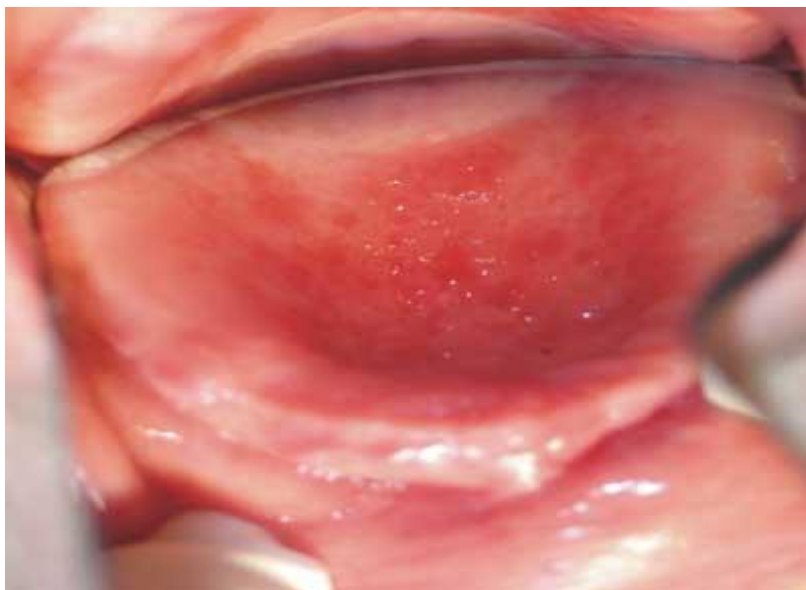
Zbyt duże siły stosowane podczas leczenia mogą być przyczyną zwiększonej ruchomości zębów a nawet powodować resorpcję korzeni, na którą głównie narażone są siekacze w szczęce górnej. Dodatkowo może mieć miejsce zwyrodnienie lub martwica miazgi zębowej. W trakcie leczenia lub nawet po latach po jego zakończeniu pojawiać się mogą również recesje przyzębia z rozstępami kostnymi i fenestracjami w blaszce kostnej.



**Ryc. 4. Liczne recesje dziąsłowe.**

Leczenie ortodontyczne narażone jest w mniejszym lub większym stopniu na duży odsetek recydywy położenia zębów do pierwotnych warunków zębowo-twarzowych.

Osobną grupę powikłań stanowią różnego rodzaju wykwity około- i wewnątrz ustne będące obrazem alergii kontaktowej na alergeny zawarte zarówno w materiałach ortodontycznych (najczęściej na nikiel zawarty w stopach używanych do wyrobu elementów metalowych aparatów oraz na akryl) jak i w pomocniczych materiałach dentystycznych takich jak chociażby lateks (wyciągi elastomerowe) czy składniki płukanek do ust. [Dietrich 2004, Mazur i wsp. 2008, Śmiech-Słomkowska i Jabłońska-Zrobek 2003]



**Ryc. 5. Zapalenie błony śluzowej podniebienia na tle alergicznym (uczulenie na akryl).**

### **1.3 Adhezja drobnoustrojów do aparatów ortodontycznych**

W piśmiennictwie dostępne są liczne opracowania poddające ocenie przyleganie patogenów do materiałów ortodontycznych, a w szczególności bakterii z rodzaju *Streptococcus mutans*, które są odpowiedzialne za inicjację procesu próchnicowego i są najczęściej izolowanym szczepem *Streptococcus* w jamie ustnej [Jańczuk 2004(A)].

Z głównych czynników wpływających na adhezję różnych cząstek do materiałów należy wymienić szorstkość materiału i swobodną energię powierzchniową (surface free energy).

Szorstkość to inaczej nierówność powierzchni materiału i im jest większa tym większa jest adhezja. Jednak głównym czynnikiem sprzyjającym przyleganiu bakterii do podłoża jest wartość swobodnej energii powierzchniowej, rozumianej jako miara siły przyciągania do podłoża, i im jest wyższa tym lepsza przyczepność między badanymi elementami. Bakterie z rodzaju *S. mutans* charakteryzujące się wysoką swobodną energią powierzchniową, preferują materiały również o wysokiej swobodnej energii powierzchniowej [Busscher i wsp. 1984, Eliades i wsp. 1995]. Badania przeprowadzone przez Lee i wsp. [Lee 2009] oceniające swobodną energię i szorstkość

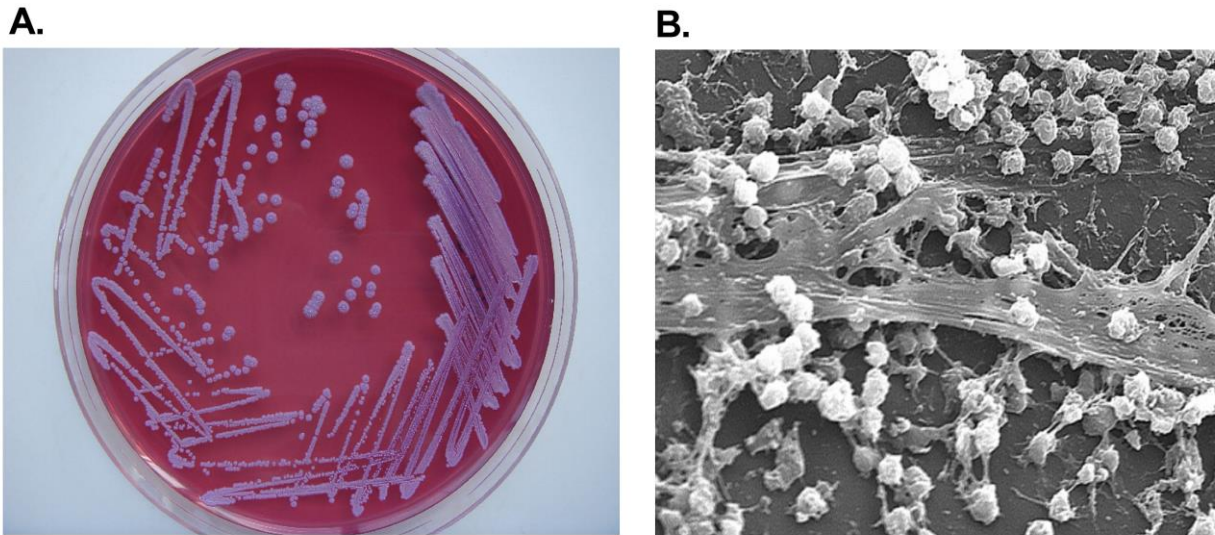
powierzchni różnych materiałów ortodontycznych stwierdziły, iż najniższą swobodną energię powierzchniową a tym samym adhezję *S. mutans* uzyskano dla stali nierdzewnej. Potwierdzenie powyższych wyników uzyskał Fournier i wsp. [Fournier i wsp. 1998] uzyskując najmniejsze przyleganie *S. mutans* do zamków metalowych w porównaniu do plastikowych czy ceramicznych i to w obecności śliny jak i jej braku. W podobnych badaniach Eliadesa i wsp. [Eliades 1995] oraz Lindla i wsp. [Lindel 2011] uzyskano sprzeczne wyniki uzyskując najniższą wartość swobodnej energii powierzchniowej dla mono- i polikrystalicznego tlenku glinu zamków ceramicznych. Wykazano ponadto, że nie tylko rodzaj materiału, ale i sam kształt zamków ma wpływ na przyleganie bakterii do powierzchni zamków [van Gastel i wsp. 2007]. Nie można zapomnieć o materiałach pomocniczych stosowanych w ortodoncji, które również mają znaczący wpływ na tworzenie się biofilmu. W badaniach Garceza i wsp. [Garcez 2011] wykazano, iż na zamkach ligatowanych przy pomocy ligatur elastycznych wzrost biofilmu jest dużo większy niż na zamkach ligatowanych przy pomocy tradycyjnych ligatur stalowych. Ciekawych wyników dostarczają badania China [Chin 2007] analizujące wpływ czterech różnych ortodontycznych materiałów do cementowania na formowanie się biofilmu. Okazała się w nich, że najmniej skolonizowanym materiałem była chemoutwardzalna żywica kompozytowa, nieznacznie gorzej wypadł chemoutwardzany cement glassionomerowy, a najbardziej skolonizowane przez bakterie okazały się być cementy glassionomerowe modyfikowane żywicą i światłoutwardzane żywice kompozytowe. Liczne badania zostały także poczynione [Pathak i Sharma 2013, Peixoto i wsp. 2011] nad znacznym wpływem akrylowych płyt aparatów zdejmowanych na wzrost tworzenia się biofilmu bakteryjnego w jamie ustnej, oraz zauważono tendencję do częstszego występowania kamienia nazębnego przy stosowaniu aparatów zdejmowanych, a płytki bakteryjnej w przypadku aparatów stałych [Wites i wsp. 2003].

Jak widać na podstawie powyższych badań, w piśmiennictwie brak jednoznacznych wniosków, do którego materiału ortodontycznego adhezja bakterii jest najslabsza. Wiele drobnych czynników wynikających zarówno z różnorodności materiałowej i fakturowej aparatów ortodontycznych jak zmieniającej się dynamiki środowiska jamy ustnej, może wpływać na wyniki badań. Dlatego też uzasadnione wydaje się być prowadzenie dalszych badań i uzyskanie najbardziej wiarygodnych wyników, pozwalających wybrać do leczenia ortodontycznego takie materiały, które ograniczają możliwość adhezji bakterii jamy ustnej i tworzenie biofilmu.



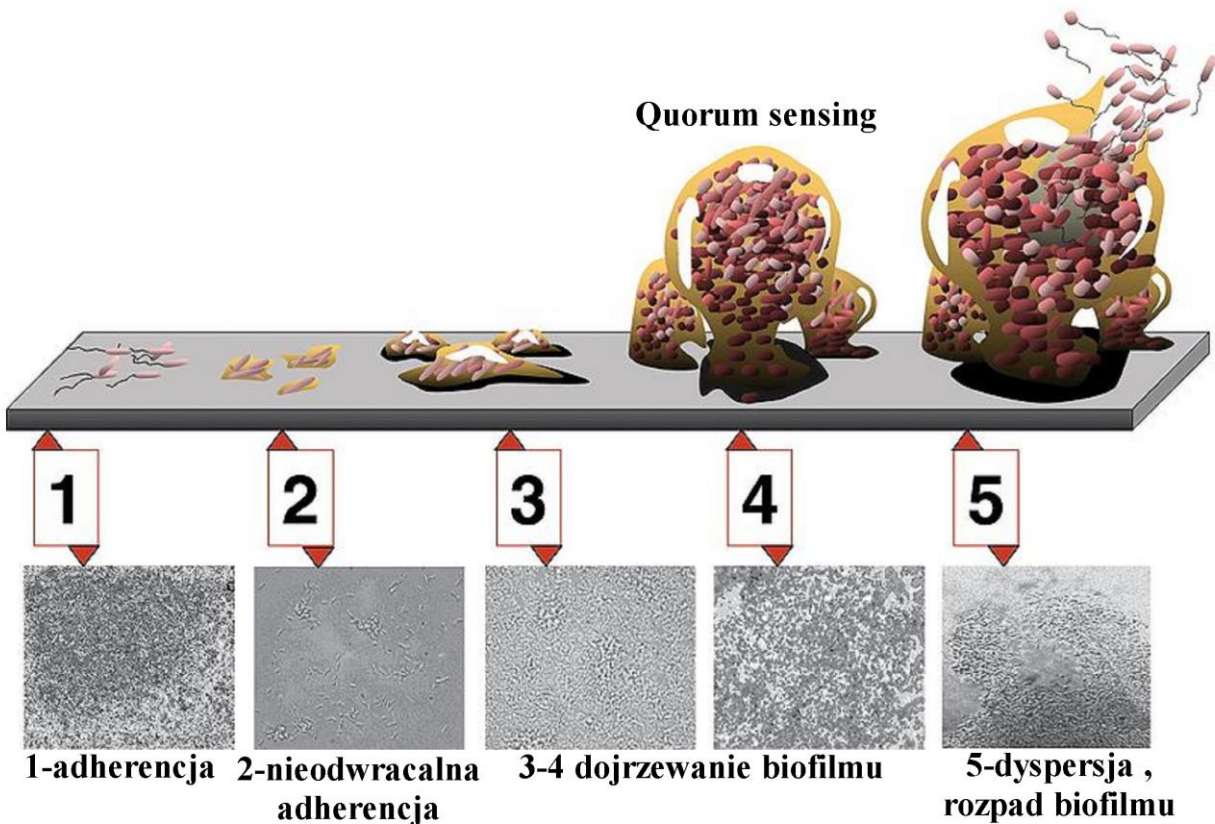
## 1.4 Biofilm

Bakterie mogą występować w formie planktonicznej (zbioru rozproszonych komórek bakteryjnych) lub w formie biofilmu, przestrzennej, zorganizowanej struktury zawierającej bakterie otoczone macierzą pozakomórkową zbudowaną głównie z polimerów cukrów i białek oraz zewnątrzkomórkowego DNA (extracellular polymeric substances – EPS).



**Ryc. 6. Formy wzrostu bakterii – a) forma planktoniczna, b) biofilm.**

Obecnie wiadomo, że biofilm (bakteryjny, grzybiczy) może powstać na powierzchni żywych komórek, a formowanie biofilmu jest cechą naturalną wszystkich bakterii tworzących mikroflorę skóry i błony śluzowej. Również bakterie chorobotwórcze wnikające do organizmu w formie planktonicznej, po wstępnym etapie adhezji do komórek gospodarza, tworzą we wrotach zakażenia biofilm.



Ryc. 7. Etapy powstawania biofilmu.

- **Faza odwracalnej adhezji (adherencji).**

Komórki bakterii (forma planktoniczna) tworzą skupiska osiadając na podłożu i przyczepiając się do niego. Poszczególne komórki łączą się ze sobą w wyniku oddziaływania elektrostatycznego i sił van der Waalsa lub za pomocą specyficznych receptorów znajdujących się na komórkach gospodarza lub biomateriału.

- **Nieodwracalna adherencja.**

W drugim etapie następuje produkcja macierzy, której głównymi składnikami są polisacharydy ściany komórkowej (EPS) zawierające reszty glikozydowe i mannozę prowadzące do nieodwracalnego związania bakterii z powierzchnią.

- **I etap dojrzewania biofilmu: kolonizacja i wzrost.**

Następuje dalsza synteza EPS do momentu całkowitego otoczenia powstałych kolonii i stworzenia przestrzennej, trójwymiarowej struktury macierzy biofilmu.

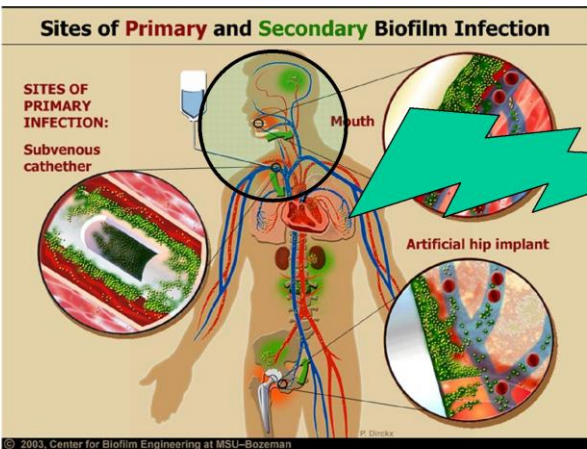
- **II etap dojrzewania biofilmu.**

Do istniejących mikrokolonii przyłączają się kolejne komórki bakteryjne i drobnoustroje innych gatunków, rodzajów. Drobnoustroje wysyłają substancje sygnałowe (*Quorum sensing*) stymulujące dalszy wzrost i rozwój biofilmu. Na tym etapie biofilm tworzą, oprócz żywych drobnoustrojów, także komórki martwe i substancje organiczne, produkty metabolizmu bakterii i wchłoniętych substancji odżywczych.

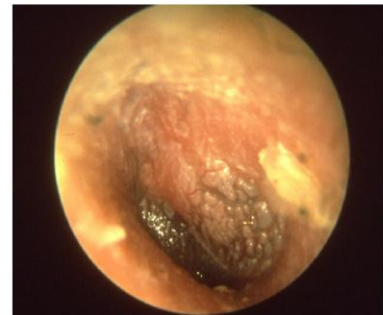
- **Rozpad biofilmu: rozproszenie bakterii i tworzenie nowych skupisk.**

Część żywych komórek odłącza się od starego biofilmu i bierze udział w tworzeniu nowych kolonii i nowego biofilmu.

Zakażenia wywołane przez drobnoustroje ukryte w biofilmie są trudne do eliminacji, także przy sprawnym funkcjonowaniu układu odpornościowego gospodarza. Składniki macierzy biofilmu (EPS) chronią bakterie przed atakiem immunologicznym (np. fagocytozą) oraz przed wnikaniem chemioterapeutyków (antybiotyków). W zależności od rodzaju bakterii EPS może zawierać polisacharydy, białka i DNA. Główną rolę w oporności bakteryjnej odgrywa egzopolisacharyd (EPS) izolujący większość bakterii od substancji mikrobójczych (antybiotyków, antyseptyków) i komórek układu immunologicznego. Sugeruje się, że EPS może tworzyć barierę dyfuzyjną lub wiązać i neutralizować niektóre substancje przeciwbakteryjne.



**Biofilm  
&  
\* peridontitis  
\* rhinosinuitis  
\* otitis media  
\* adenoids and tonsils  
\* tympanostomia**



**Ryc. 8. Przykłady przewlekłych stanów zapalnych z towarzyszącym biofilmem.**

### **1.5 Mikrobiom jamy ustnej**

Jama ustna kolonizowana jest przez różne drobnoustroje Gram dodatnie i Gram ujemne. Warunki ekologiczne w jamie ustnej nigdy nie są trwale przez dłuższy okres. Ekosystem jamy ustnej podlega znacznym wahaniom podczas wymiany uzębienia mlecznego na uzębienie stałe. Dodatkowo na ekologię jamy ustnej wpływają ekstrakcje zębów, uzupełnienia protetyczne i aparaty ortodontyczne oraz wszystkie zabiegi stomatologiczne, łącznie z usuwaniem kamienia nazębnego i osadu oraz zakładaniem wypełnień. Przejściowe zmiany stabilności ekosystemu jamy ustnej mogą być wywoływane częstotliwością spożywania i rodzajem przyjmowanego pokarmu, zmiennością przepływu śliny czy długotrwałym stosowaniem antybiotyków.[Marsh i Martin 1994]

Na zębach występują głównie bakterie Gram dodatnie, aerotolerancyjne beztlenowce takie jak *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus mutans*. W kieszonce przyzębnej mogą

występować całkowicie beztlenowe warunki, co ma duży wpływ na rodzaj drobnoustrojów kolonizujących te miejsca. Do bezwzględnych beztlenowców zalicza się bakterie z rodzaju *Actinomyces* czy *Porphyromonas gingivalis*.

*Streptococcus mutans* jest Gram dodatnim paciorkowcem, stanowiącym fizjologiczną florę jamy ustnej. Należy do głównych czynników etiologicznych odpowiedzialnych za próchnicę jamy ustnej. Jako bakteria mlekowa w obecności cukrów produkuje kwas mlekowy, który powoduje uszkodzenie szkliwa. Dieta bogata w węglowodany pozwala im na produkcję zewnątrzkomórkowych związków polisacharydowych, co umożliwia komórkom przyleganie do szkliwa i do siebie wzajemnie. Bakterie *Streptococcus mutans* na powierzchni zębów występują w formie biofilmu.

*Porphyromonas gingivalis* jest Gram ujemną pałeczką, należącą do fizjologicznej flory jamy ustnej. Jest wysoce zjadliwym gatunkiem, bytuje głównie w kieszonkach dziąsłowych. Wytwarza różne enzymy i cytotoksyczne metabolity, które odpowiedzialne są za powstawanie chorób przyzębia [Heczko 2007, Salyers i Whitt 2001, Samaranayake 2002]. *P. gingivalis* jest bakterią charakterystyczną dla środowiska jamy ustnej i poza nią praktycznie nie występuje, sporadyczne izolacje stwierdza się podczas takich infekcji, jak przewlekłe zapalenie ucha środkowego czy też perforacja w przebiegu zapalenia wyrostka robaczkowego.

## **1.6 Płytkę nazębna, biofilm bakteryjny a stany zapalne i infekcyjne jamy ustnej**

Obecnie wiadomo, że płytka nazębna jest naturalną formą kolonizacji powierzchni zębów i stanowi wielogatunkową postać biofilmu tworzonego w określonej kolejności przez różne bakterie. Interesujące jest, że te same bakterie płytki nazębnej są izolowane zarówno od osób bez próchnicy, jak i z rozwiniętą próchnicą zębów i chorobami przyzębia. Natomiast u pacjentów z chorobami jamy ustnej wzrasta liczba bakterii takich gatunków jak *Streptococcus mutans* (w próchnicy) czy *Porphyromonas gingivalis* (w zapaleniu przyzębia). Zatem bakterie flory stałej jamy ustnej w przypadku ich nadmiaru lub zachwianej równowagi z innymi bakteriami stają się czynnikiem etiologicznym próchnicy i stanów zapalnych tkanek miękkich jamy ustnej [He i Shi 2009, Marsh i wsp. 2011, Strużycka 2010].

Płytką nazębną, biofilm bakteryjny jamy ustnej (Dental plaque) jest miękkim osadem mocno przylegającym do powierzchni zębów lub innych twardych powierzchni znajdujących się w jamie ustnej, włączając w to uzupełnienia protetyczne i aparaty ortodontyczne. Płytką nazębną zbudowana jest z macierzy pozakomórkowej i komórek mikroorganizmów. Macierz składa się z elementów pochodzenia bakteryjnego (polisacharydy) oraz składników pochodzących od gospodarza (glikoproteiny śliny, obumarłe komórki, białka surowicy).

Płytką nazębną (biofilm) jest wielokomórkowym i wielogatunkowym organizmem. Składa się przede wszystkim z bakterii, ale może również zawierać grzyby z rodzaju *Candida*. Jeden gram płytki zawiera około  $2 \times 10^{11}$  drobnoustrojów. Płytką nazębną może występować jako płytka naddziąsłowa lub poddziąsłowa w zależności od położenia w stosunku do brzegu dziąsła.

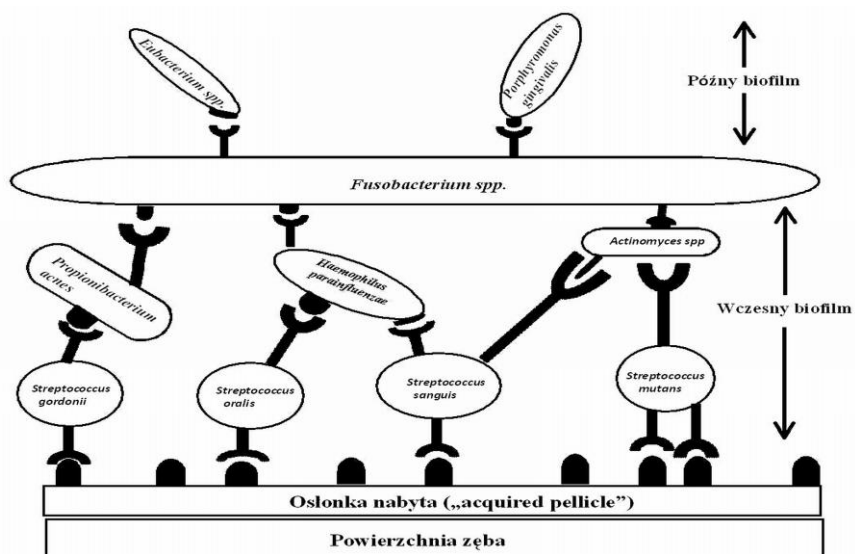
Rozwój płytki jest procesem wieloetapowym. W krótkim czasie po dokładnym oczyszczeniu zębów ich powierzchnia pokrywa się warstwą adsorbowanych ze śliny białek bogatych w prolinę, tyrozynę, histydynę oraz mucynę, które mają powinowactwo do hydroksyapatytów szkliwa. Powstająca warstwa nazwana jest osłonką nabytą (acquired pellicle), tzw. pelikulą. Osłonka stanowi doskonałe podłoże dla wzrostu wielu gatunków drobnoustrojów, bowiem już po kilku godzinach pelikulę zaczynają zasiedlać bakterie. Bakterie kolonizują ją dzięki obecnym na swojej powierzchni adhezynom, których rola polega na rozpoznawaniu receptorów znajdujących się na komórkach nabłonka szczeliny dziąsłowej i na powierzchni szkliwa (zjawisko adhezji). Nie wszystkie drobnoustroje posiadają zdolność adhezji.

Te bakterie, które tej zdolności nie posiadają wykorzystują zjawisko koagregacji, polegające na przyczepianiu mikroorganizmów do bakterii, które wcześniej się przyczepiły. Dodatkowymi czynnikami ułatwiającymi się tworzenie masy płytkowej są wypustki bakteryjne - fimbrie oraz glikokaliks - osłonka węglowodanowo-białkowa wytwarzana przez bakterie. Wyróżnia się dwa rodzaje fimbrii bakteryjnych: zwykłe, które biorą udział w kolonizacji powierzchni zęba oraz rozrodcze, odpowiedzialne za rozmnażanie. [Janczuk 2004(B)]

Przy powstawaniu płytki znaczenie mają również mechanizmy fizykochemiczne: zarówno dodatnie, jak i ujemne oddziaływania elektrodynamiczne oraz siły van der Waalsa.

W pierwszej fazie tworzenia płytki nazębnej (1-2 dni) dominują bakterie gram dodatnie, ziarniaki i pałeczki. Przy dużej podaży cukrów wczesna płytka szybko się namnaża i tworzą się warunki do jej dalszego rozwoju.

Po 3-5 dniach pojawiają się gram ujemne ziarniki i pałeczki. W okresie 7-9 dni w płytce zaczynają pojawiać się bakterie nitkowate, krętki, wrzecionowce, urzęsione bakterie obdarzone ruchem. Stopniowo rozwija się płytka poddziąsłowa, w której zaczynają dominować bakterie beztlenowe. Flora nabiera cech chorobotwórczych dla choroby przyzębia. Mówimy wtedy o dojrzałej płytce nazębnej. Nieusunięta płytka nazębna mineralizuje i tworzy kamień nazębny. Niekontrolowany dalszy wzrost biofilmu jamy ustnej prowadzi do powstania płytki poddziąsłowej.



**Ryc. 9A. Model czasoprzestrzenny tworzenia się płytki nazębnej.** Bakterie tworzące „wczesny biofilm” (*Streptococcus spp.*) posiadają adhezyny rozpoznające receptory osłonki nabytej i jako pierwsze tworzą kolonie na powierzchni zęba. Kolejne warstwy biofilmu tworzą bakterie koagregujące z „pionierskimi” bakteriami, co umożliwia tworzenie kolejnych warstw płytki nazębnej przez bakterie „późnego biofilmu” (na podstawie Pasich i wsp. 2013, Post. Hig. Med. Dośw).





**Ryc. 9B. Zdjęcie płytki nazębnej.**

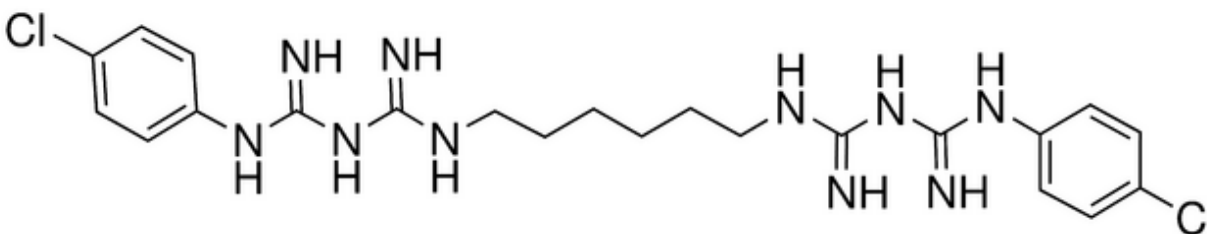
Drobnoustroje i ich produkty metabolizmu będące podstawowym składnikiem płytki nazębnej są główną przyczyną chorób przyzębia, które można podzielić na 2 podstawowe grupy: zapalenia dziąseł i choroby przyzębia.

Zapalenie dziąseł wywołane jest obecnością bakterii w płytce nazębnej, dziąsła są czerwone, obrzęknięte i łatwo krwawią, ale kości i tkanki miękkie otaczające ząb nie ulegają zniszczeniu. Objawy zapalenia dziąseł po leczeniu ulegają remisji. Nielezione zapalenie dziąseł może przeistoczyć się w zaawansowaną formę wywołując choroby przyzębia, w których dochodzi do nieodwracalnego niszczenia kości i tkanek miękkich otaczających ząb. Dziaśło odsuwa się od zęba tworząc patologiczne kieszonki, które szybko ulegają infekcji, co w konsekwencji prowadzi do niszczenia kości i tkanki łącznej utrzymujące zęby w szczęce, co ostatecznie może prowadzić do ich rozchwiania.



## 1.7 Antyseptyki stosowane w ortodoncji. Chlorheksydyna (CHX)

Chlorheksydyna (CHX) jest organicznym związkiem chemicznym, pochodną biguanidu, o chemicznym składzie: 1,6-dwu(-4-chlorofenylo-dwuguanido)-heksan o wzorze  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ .



Chlorheksydyna

Chlorheksydyna w dużych stężeniach doprowadza do rozerwania błony komórkowej i zniszczenia bakterii, w mniejszych stężeniach zwiększa przepuszczalność błony komórkowej bakterii i zaburza ich metabolizm. Używana jest głównie jak antyseptyk odkażający skórę, błony śluzowe, rany oraz narzędzia chirurgiczne. Ze względu na silne właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne oraz przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe, znalazła szerokie zastosowanie w stomatologii i ortodoncji, gdzie jest najczęściej stosowanym antyseptykiem. CHX jest "złotym środkiem" w terapii miejscowej chorób przyzębia, dzięki zdolności hamowania odkładania płytki nazębnej (profilaktyka próchnicy), poprzez znaczną redukcję liczby mikroorganizmów w jamie ustnej i hamowanie namnażania bakterii w płytce naddziąsłowej. Właściwości przeciwgrzybicze wykorzystywane są w kompleksowym leczeniu kandydozy jamy ustnej [Malicka i wsp. 2005, Pasich i wsp. 2013, Varoni i wsp. 2012]. CHX jest również stosowana w leczeniu endodontycznym do płukania kanałów zębowych jako alternatywa dla podchlorynu sodu (NaOCl) [Gomes i wsp. 2013]. CHX w porównaniu do NaOCl charakteryzuje się mniejszą cytotoksycznością dla tkanek okołowierzchołkowych. Poprzez łączenie się z tkankami zęba, z których jest później stopniowo uwalniana, polepsza efektywność leczenia kanałowego [Varoni i wsp. 2012, Gomes i wsp. 2013] oraz wywołuje mniejszy ból pozabiegowy (do 6h) w leczeniu kanałowym w porównaniu do 5,25% NaOCl [Bashetty i Hegde 2010]. W dodatku CHX nie plami ubrań i jest bezzapachowa w stosunku do NaOCl [Gomes i wsp. 2013]. Największą wadą CHX w

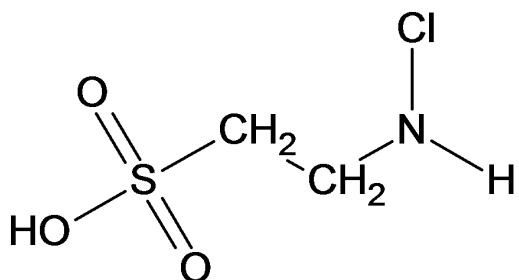
leczeniu kanałowym jest niemożność rozpuszczania organicznych, nekrotycznych tkanek zęba [Luddin 2013], przez co utrudnione jest usuwanie endotoksyn bakteryjnych z kanałów [Gomes i wsp. 2013]. Dlatego też CHX może być stosowana tylko jak dodatkowy (razem z NaOCl) lub końcowy irrygant w leczeniu kanałowym. W badaniach [Basrani i wsp. 2007] stwierdzono tworzenie się karcinogennego związku parachloroaniliny (PCA) po połączeniu się CHX z NaOCl, przy czym inni badacze [Thomas i Sem 2010, Nowicki i Sem 2011] nie stwierdzają tworzenia się PCA w wyniku takiej interakcji. Ponadto do wad CHX zaliczyć trzeba zdolność przebarwiania zębów, języka, wypełnień z materiałów złożonych i glassionomerowych oraz wywoływanie podrażnień błony śluzowej i zaburzeń smaku, które ustępują po zaprzestaniu terapii [Gent i wsp. 2002]. Zbadano również [Keni i wsp. 2012], że CHX sporadycznie może wywoływać reakcje alergiczne przy powierzchniowym stosowaniu.

CHX stosowana jest najczęściej w formie płukanek o najbardziej efektywnym stężeniu 0,2%, niemniej jednak stosowana jest i w innych postaciach, które obrazuje poniższa tabela.

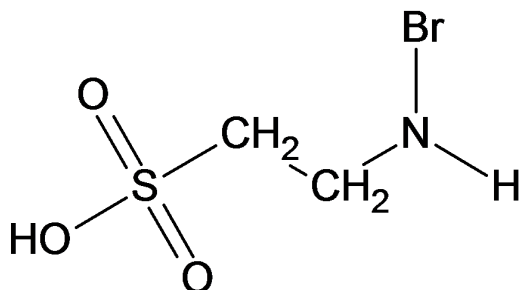
Pasty do zębów	Płukanki	Aerozol	Zełe	Lakiery	Preparaty do płukania kanałów
Elgydium (0,004% CHX)	Corsodyl (0,1% lub 0,2% CHX)	Perioaid (0,12% CHX)	Corsodyl (1% CHX)	Cervitec (1% CHX)	Gluxodent (2% CHX)
Kin Gingival (0,12% CHX)	Curasept ADS (0,05% CHX)	Periokin Spray (0,2% CHX)	Elugel (0,2%CHX)	Varnish EC40 (12%)	Gluco-CheX (2% CHX)
Lacalut	Curasept (0,12% lub 0,2% CHX)	Eluspray (0,2% CHX)	Oralgene (1% CHX)		
Curasept ADS (0,05% lub 0,12% CHX)	Eludril (0,1% CHX)	Curasept ADS (0,5%)	Parodium (0,02% CHX)		
	Kin Gingival (0,12% CHX)		Perioaid (0,12% CHX)		
	Oral B (0,12% CHX)		Periogel (0,12% CHX)		
	Paradontax (0,12% CHX)		Periokin gel (0,2% CHX)		
	Chlorhexamed (0,1% CHX)		GLUXOGEL (2% CHX)		

**Tabela 1. Preparaty dentystyczne zawierające chlorheksydynę (CHX)**

## 1.8 Chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr) - właściwości biologiczne i zastosowanie kliniczne

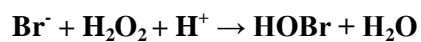
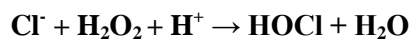


**Chloramina tauryny (TauCl)**

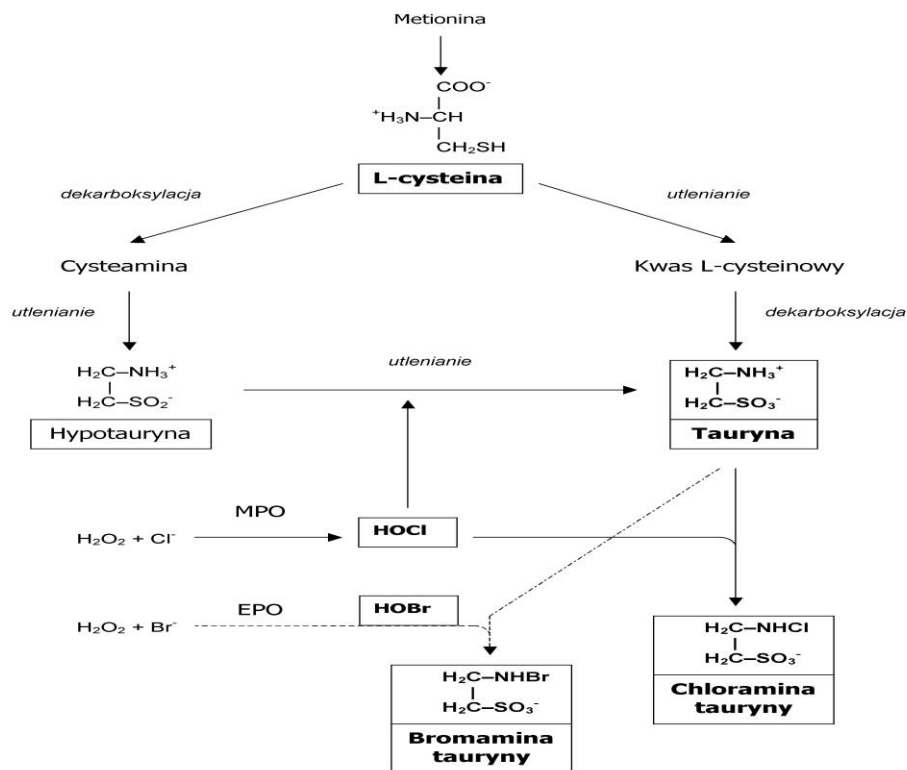


**Bromamina tauryny (TauBr)**

Haloaminy tauryny, chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr) są fizjologicznymi produktami aktywowanych neutrofilów i komórek kwasochłonnych (eozynofilów). Powstają w odczynie zapalnym jako produkt reakcji pomiędzy tauryną i odpowiednio kwasem podchlorowym (HOCl) i kwasem podbromowym (HOBr) [Thomas i wsp. 1995]. HOCl produkowany jest w neutrofilach pod wpływem mieloperoksydazy (MPO), natomiast HOBr generowany jest zarówno w neutrofilach (MPO) jak i w eozynofilach w obecności peroksydazy (EPO) [Klebanoff 2005, Thomas 1979, Henderson i wsp. 2001]



Tauryna (kwas 2-aminoetylosulfonowy) jest aminokwasem siarkowym, którego zawartość w cytozolu komórek ssaków sięga 90% wszystkich wolnych aminokwasów. Nie wchodzi w skład białek, ponieważ w miejscu grupy karboksylowej - COOH występuje ugrupowanie sulfhydrylowe - SO<sub>3</sub>H, które uniemożliwia tworzenie wiązań peptydowych. Największe stężenie tauryny ze względu na jej działania antyoksydacyjne stwierdza się w tkankach narażonych na działanie reaktywnych form tlenu. Szczególnie wysoki poziom tauryna uzyskuje w neutrofilach (głównych komórkach ostrego odczynu zapalnego), siatkówce oka, w mózgu, sercu i mięśniach szkieletowych [Learn i wsp. 1990]. Całkowity poziom tauryny zależy od zdolności organizmu do syntezy endogennej tauryny w wątrobie, ilości egzogennej tauryny dostarczanej z pożywieniem i jej resorpcji w nerkach [Marcinkiewicz i wsp. 1995, 2013].



Ryc. 10. Schemat syntezy Tau, TauCl i TauBr wg Koprowski.[2005].

### **1.8.1 Właściwości biologiczne TauCl i TauBr**

Liczne badania *in vitro* wykazały, że obie haloaminy tauryny, TauCl i TauBr, wykazują właściwości mikrobójcze [Gottardi i wsp. 2001, 2014; Gottardi i Nagl, 2002, 2010; Nagl i wsp. 1998, 2000, 2003] i przeciwzapalne [Park i wsp. 1995, 1997; Marcinkiewicz i wsp. 1995, 1998, 2005; Kontny i wsp. 2000, 2006, 2007; Kim i wsp. 2006, 2007, 2009].

#### ***Właściwości antyseptyczne:***

TauCl i TauBr posiadają w stężeniach niecytotoksycznych właściwości mikrobójcze wobec szerokiego spektrum bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów chorobotwórczych, pierwotniaków i pasożytów wielokomórkowych [Gottardi i wsp. 2010, Nagl i wsp. 1998, Marcinkiewicz i wsp. 2006, Yazdanbakhsh i wsp. 1987]. Większość tych badań została przeprowadzona wobec formy planktonicznej drobnoustrojów. Ostatnie badania nad rolą haloamin tauryny w eliminacji biofilmu bakteryjnego wskazują na odmienny efekt działania TauCl i TauBr, zależny od czasu działania antyseptyku i gatunku bakterii tworzącej macierz biofilmu [Coraça-Huber i wsp. 2014, Marcinkiewicz i wsp. 2013].

#### ***Właściwości przeciwzapalne:***

Obie haloaminy tauryny hamują produkcję cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6) [Marcinkiewicz i wsp. 1995, Park i wsp. 1997]. Wykazano ponadto, że TauCl hamuje syntezę tlenku azotu (NO), prostaglandyny E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) i obniża aktywność metaloproteinaz [Choraży i wsp. 2002, Park i wsp. 1995, Kim i wsp. 2006]. Powyższe przeciwzapalne właściwości haloamin tauryny oraz zdolność TauCl do indukowania apoptozy w aktywowanych leukocytach (neutrofilach), sugerują udział TauCl w wyciszaniu ostrego odczynu zapalnego [Marcinkiewicz i Kontny, 2012].

Bardzo istotną właściwością regulacyjną TauCl i TauBr jest ich zdolność do wygaszania generacji ROS i indukcji hemooksygenazy tlenowej (HO-1), kluczowego enzymu w utrzymaniu homeostazy ustroju [Olszanecki i Marcinkiewicz, 2004, Marcinkiewicz i wsp. 2009].

## 1.8.2 Zastosowanie kliniczne TauCl i TauBr

TauCl i TauBr dzięki swym właściwościom mikrobójczym i przeciwzapalnym przy jednoczesnym braku zdolności do wywoływania lekooporności, znalazły zastosowanie w miejscowym leczeniu stanów zapalnych o podłożu infekcyjnym, m.in. w okulistyce, laryngologii czy dermatologii.

W ostatnich latach przeprowadzono liczne badania oceniające możliwość podawania TauCl i TauBr na skórę, błony śluzowe i spojówkę oka w stężeniach terapeutycznie skutecznych bez wywołania działań niepożądanych [Nagl i wsp. 2003, Marcinkiewicz i wsp. 2008].

Miedzy innymi wykazano, że TauBr jest skuteczna w leczeniu miejscowym zmian skórnych trądzika pospolitego. Badania pilotowe wykazały, że efekt terapeutyczny TauBr jest porównywalny z efektem 1% żelu z klindamycyną, jednakże bez ryzyka wystąpienia lekooporności [Marcinkiewicz i wsp. 2006, 2008].

TauCl może również znaleźć zastosowanie w leczeniu infekcji dróg moczowych i ran przewlekłych wywołanych przez bakterie *P. aeruginosa*. Badania wykazały, że podanie TauCl w postaci wlewk przynosiło korzystny efekt leczniczy bez wywołania niepożądanych objawów miejscowych i ogólnoustrojowych [Nagl i wsp. 2003].

Istnieje coraz więcej doniesień wskazujących na skuteczne stosowanie pochodnych tauryny (TauCl, TauBr, taurolidyna TauD) jako substancji antyseptycznych w stomatologii. Dzięki swym właściwościom mikrobójczym i przeciwzapalnym pochodne tauryny mogą zostać wykorzystane w leczeniu chorób przyzębia. Liczne próby wskazują, że stosowane w postaci płukanek do ust TauCl, TauBr i TauD działają mikrobójczo na bakterie odpowiedzialne za tworzenie płytki nazębnej, próchnicy i za stan zapalny jamy ustnej [Mainnemare i wsp. 2004, Arweiler i wsp. 2012].

<b>Haloamina</b>	<b>Rodzaj zapalenia (schorzenia)</b>
TauCl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stany zapalne przyzębia</li> <li>• zapalenie spojówek</li> <li>• zapalenie ucha zewnętrznego</li> <li>• przewlekłe zapalenie cewki moczowej</li> </ul>
TauBr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• trądzik pospolity</li> <li>• przewlekłe zapalenie stawów</li> </ul>

**Tabela 2. Proponowane zastosowanie kliniczne TauCl i TauBr**



## 2. Cel pracy

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była próba odpowiedzenia na pytanie czy rodzaj materiału aparatu ortodontycznego ma wpływ na adhezję bakterii i tworzenie biofilmu ortodontycznego. Odpowiedź na to pytanie została uzyskana w oparciu o przeprowadzone badania stopnia adhezji *S. mutans* do wybranych materiałów stosowanych w ortodoncji oraz o szczegółową analizę literatury fachowej.

Drugim celem poznawczym było sprawdzenie, czy haloaminy tauryny (TauCl i TauBr) mogą mieć zastosowanie w stomatologii w zapobieganiu, kontroli i usuwaniu biofilmu ortodontycznego. Przeprowadzono analizę porównawczą właściwości antyseptycznych i przeciwzapalnych TauCl i TauBr z właściwościami chlorheksydyny (CHX), złotego standardu stosowanego w stomatologii.

Badania objęły następujące zagadnienia:

- \* Ocenę mikrobójczego działania CHX, TauCl i TauBr na wybrane drobnoustroje biofilmu ortodontycznego (*S.mutans*, *P.gingivalis*, *C. albicans*). Oznaczono MIC badanych antyseptyków wobec planktonicznej formy drobnoustrojów i wobec drobnoustrojów ukrytych w biofilmie pokrywającym materiały ortodontyczne.
- \* Ocenę właściwości cytotoksycznych oraz przeciwzapalnych CHX, TauCl i TauBr. Wpływ na produkcję cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10), reaktywnych form tlenu (ROS), tlenku azotu (NO) oraz na żywotność aktywowanych komórek odczynu zapalnego *in vitro*.

Nadrzędnym celem pracy był jej aspekt kliniczny, zwrócenie uwagi na rolę niekontrolowanego biofilmu bakteryjnego jamy ustnej (płytki nazębnej) w pojawianiu się niepożądanych skutków leczenia stałymi aparatami ortodontycznymi oraz zaproponowanie TauBr, alternatywnego antyseptyku dla chlorheksydyny (CHX), wykazującego podwójne działanie, mikrobójcze i przeciwzapalne.

### **3. Materiały i metody**

#### **3.1 Odczynniki i materiały**

Plodowa surowica bydlęca (FBS) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA); tioglikolan, MTT, standard mysiego TNF- $\alpha$  (Sigma, St. Louis, MO, USA); NaOCl, rekombinowany mysy TNF- $\alpha$ , lipopolisacharyd *E. coli* 0.111:B4 (LPS) (Aldrich, Steinham, Niemcy); heparyna (Polfa, Warszawa, Polska); podłoża: RPMI 1640, DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA); szczurze przeciwciała monoklonalne: przeciw mysiej IL-6 (MP5-20F3 i MP532C11), przeciw mysiej IL-10 (JES5-2A5 i JES5-16E3), przeciw mysiemu TNF- $\alpha$  (TN319.12), biotynylowane szczurze przeciwciało poliklonalne przeciw mysiemu TNF- $\alpha$  (Pharmingen, San Diego, CA, USA); rekombinowana mysia IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, USA); rekombinowana mysia IL-10 (Genzyme, Cambridge, UK); StreptavidinHRP (Vector, Burlingame, CA, USA); odtłuszczone mleko w proszku (Marvel, Dublin, Irlandia); tauryna, chlorheksydyna (CHX), luminol, zymosan, kwas podchlorawy (HOCl) (Sigma Aldrich); Hank's balanced salt solution (HBSS) (Lonza). Płytki Petriego o średnicy 100 mm, butelki hodowlane o pojemności 50 i 150 ml, płytki 24- i 96-dółkowe płaskodenne, probówki plastikowe o pojemności 15 i 50 ml (Costar, Cambridge, MA, USA); płytki do chemiluminescencji (Nunc, Roskilde, Dania);

#### **3.2 Przygotowanie roztworów substancji antyseptycznych**

Do badań przygotowano: 1% (10mg/ml) roztwór glukonianu chlorheksydyny (CHX) (Sigma-Aldrich), 1% (10 mg/ml) roztwór podchlorynu sodu (NaOCl) (Sigma –Aldrich), 0,2% (11 mM) roztwór bromaminy tauryny (TauBr) oraz 0.18% (10 mM) roztwór chloraminy tauryny (TauCl). Przeprowadzono również badania aktywności bakteriobójczej mieszaniny CHX z NaOCl, TauBr i TauCl. Roztwory TauCl i TauBr przygotowano według procedury stosowanej w Katedrze Immunologii UJ CM (Marcinkiewicz i wsp. 1995).

			CHX	TauBr	TauCl	NaOCl
%	mg/ml		mM			
1	10		20,9	48	55,06	149
0,5	5		10,4	24	27,54	74
0,2	2		4,19	10	11	29
0,1	1		3,16	4,8	5,5	14
0,05	0,5		1	2,4	2,75	7,4
0,02	0,2		0,41	0,97	1,01	2,9
0,01	0,1		0,209	0,48	0,55	1,49
0,005	0,05		0,104	0,24	0,27	0,74
0,002	0,02		0,041	0,09	0,11	0,29
0,001	0,01		0,0209	0,048	0,055	0,149
0,0005	0,005		0,0104	0,024	0,027	0,074
0,0002	0,002		0,0041	0,009	0,011	0,029
0,0001	0,001		0,002	0,0048	0,005	0,014

**Tabela 3. Przeliczenie stężenia wagowo-procentowego na mM badanych związków.**

Stężenia badanych związków są przedstawione w niniejszej pracy albo w wagowych stężeniach procentowych (%), albo w stężeniach milimolowych (mM). Klasyczne, wagowe stężenie procentowe to liczba gramów związku, jaka jest obecna w 100 g roztworu, jednak w przypadku rozcieńczonych roztworów wodnych zazwyczaj stężenie procentowe oznacza w praktyce liczbę gramów związku chemicznego obecnego w 100 ml roztworu, gdyż przyjmuje się tu, że w przybliżeniu roztwory takie mają gęstość zbliżoną do wody, — czyli 100 g/100 ml. Stężenie molowe jest równe stosunkowi liczby moli  $n$  substancji rozpuszczonej do objętości roztworu. W literaturze chemicznej powszechnie stosuje się mol/l, zapisywane jako (M). Do wyrażania niskich stężeń stosuje się też jednostki mM (milimol) i  $\mu$ M (mikromol). Przedstawienie wyników w różnych jednostkach wynika z faktu, że w pracach innych autorów jak i w preparatach dentystycznych koncentracja CHX jest podawana w %. Natomiast większość prac podaje stężenia TauBr i TauCl w  $\mu$ M lub mM.

### 3.3 Synteza chloraminy tauryny (TauCl)

Do badań użyto sól sodową TauCl syntetyzowaną przez Prof. Marcusa Nagla (Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu w Innsbrucku, Austria).

W celu uzyskania monochloraminy tauryny (TauCl) rozpuszczano krystaliczną Ltaurynę (Sigma, St. Louis, USA) w DPBS (pH = 7,4) do uzyskania stężenia 40 mM. Analogicznie przygotowywano 35-40 mM roztwór NaOCl (Aldrich, Steinham, Niemcy) w DPBS (pH = 10,0 – 11,0). Następnie 5 ml roztworu NaOCl dodawano po kropli do 5 ml roztworu tauryny, ciągle mieszając. Wielkość stężenia TauCl w produkcie końcowym oraz obecność ewentualnych zanieczyszczeń (głównie TauCl<sub>2</sub>) określona została spektrofotometrycznie za pomocą spektrofotometru „Power Wave X”. Molowy współczynnik absorpcji dla TauCl - 429 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> przy A<sub>252</sub>.

### 3.4 Synteza bromaminy tauryny (TauBr)

TauBr syntetyzowano w dwuetapowej procedurze. W pierwszym etapie zsyntetyzowano NaOBr w reakcji równomolowych ilości bromku sodu NaBr oraz NaOCl w buforze fosforanowym (DPBS). W takich warunkach wszystkie obecne jony OCl<sup>-</sup>, reagują z jonami Br<sup>-</sup>. Obecność i stężenie NaOBr sprawdzano spektrofotometrycznie w zakresie fal =200 to 400nm, molowy współczynnik absorpcji dla NaOBr -332 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> przy A<sub>329</sub>. W drugim etapie mieszano równe ilości NaOBr i tauryny przez nakropienie roztworu 20mM NaOBr do roztworu 400mM tauryny. Wielkość stężenia TauBr w produkcie końcowym oraz obecność ewentualnych zanieczyszczeń (głównie TauBr<sub>2</sub>) określona została spektrofotometrycznie za pomocą spektrofotometru „Power Wave X”. Molowy współczynnik absorpcji dla TauBr - 430 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> przy A<sub>285</sub>.

### 3.5 Przygotowanie szczepów bakteryjnych (wg. Pasich i wsp. 2013)

Do badań użyto szczepy z kolekcji szczepów wzorcowych *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (*S. mutans*), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (*P. gingivalis*), *Candida albicans* ATCC 90029 (*C. albicans*).

Szczepy bakteryjne przechowywano w stanie zamrożenia w  $-70^{\circ}\text{C}$  w mikrobankach, przed przystąpieniem do badań posiewano na podłoża stałe i inkubowano w odpowiednich warunkach. *S. mutans* posiewano na podłoże Tryptic Soy Agar zawierającego 5% krwi baraniej i inkubowano w warunkach tlenowych (w obecności 5%  $\text{CO}_2$ ), w temp  $37^{\circ}\text{C}$ , przez 72 godziny. *P. gingivalis* posiewano na podłoże Scheadler Agar z dodatkiem heminy i witaminy K3 i inkubowano w warunkach beztlenowych przez 7 dni. *C. albicans* posiewano na podłoże Sabourauda Agar i inkubowano w temp  $37^{\circ}\text{C}$  przez 48 godzin.

### **3.6 Materiały ortodontyczne**

Do badań przygotowano płytki o identycznej grubości (1mm) i wymiarach 5x5 mm z następujących materiałów:

- A.** Akrylu – stosowanego do wykonania większości ruchomych aparatów ortodontycznych (lecniczych, profilaktycznych i retencyjnych). (Villacryl H Plus, Zhermapol, Polska)
- B.** Stali chromo-niklowej – stosowanej do produkcji zamków, pierścieni i drutów ortodontycznych. (Remanium CSe, Dentaurum, Niemcy)
- C.** Stopu chromo-kobaltowego – używanego do produkcji zamków ortodontycznych (alternatywa dla osób uczulonych na nikiel) (Remanium GM 800+, Dentaurum, Niemcy)
- D.** Kompozytu – budulca zamków kompozytowych oraz materiał adhezyjny służący do cementowania. (Heliosit Orthodontic, Ivoclar, Lichtenstein)

### **3.7 Przygotowanie płytek do badania adhezji wybranych drobnoustrojów**

Płytki zostały dokładnie wyjałowione w autoklawie w temp.  $121^{\circ}\text{C}$ , ciśnienie 1 atm., przez 15 min. W celu zwiększenia adhezji mikroorganizmów jałowe płytki inkubowano w roztworze mucyny (2,5 mg mucyny/ml DPBS) przez 24 godziny, w temp.  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8 Ocena adhezji *Streptococcus mutans* i *Candida albicans* i tworzenia biofilmu na powierzchni wybranego materiału ortodontycznego. Określenie ilości przylegających drobnoustrojów (CFU/płytkę) i obrazowanie biofilmu – mikroskop skaningowy**

Bezpośrednio przed rozpoczęciem badania z hodowli na podłożach stałych przygotowywano zawiesinę *S. mutans* w stężeniach  $10^5$  CFU/ml. 100 µl zawiesiny dodano do studzienek zawierających 1 ml płynnej pożywki TSB (Tryptic soy Broth, firmy Becton Dickinson and Company). Pokryte mucyną płytki inkubowano w studzienkach przez 24 lub 2 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji płytki dokładnie przepłukano 0,9% NaCl w celu usunięcia niezwiązanych i martwych bakterii. Następnie, w celu określenia ilości żywych, adherentnych bakterii, płytki odcisnięto na podłożu kontaktowym Contact Agar Tryptic Soy (firmy Heipna). Hodowle inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C, w warunkach zwiększonego stężenia CO<sub>2</sub> (5%). Po zakończeniu inkubacji liczono kolonie wyrosłe na podłożu stałym.

Powyższą procedurę wykonano również z zastosowaniem *Candida albicans* wykorzystując do inkubacji zamiast bulionu TSB płynne podłoże Sabourouda liquid medium (firmy Biomericeux). Hodowlę *C. albicans* prowadzono przez 48 godzin w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C.

Proces adhezji drobnoustrojów i tworzenia biofilmu na powierzchni materiałów ortodontycznych potwierdzono metodą mikroskopii skaningowej poprzez wizualizację tworzącego się biofilmu na powierzchni badanych płytek.

### **3.9 Przygotowanie płytek do mikroskopu skaningowego**

Płytki zanurzono w 4% formalinie i przechowywano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie przeprowadzono proces odwadniania zanurzając płytki w kolejno wzrastających stężeniach alkoholu etylowego (30, 50, 75 i 96%), a następnie w alkoholu absolutnym, w każdym po 15 minut. Płytki suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Płytki przyklejono do podstawy srebrnym klejem a następnie napyłono złotem w napyłarce próżniowej [Głowacki i wsp. 2014]

### **3.10 Metoda tworzenie wielogatunkowego biofilmu (*Candida albicans* i *Streptococcus mutans*) na powierzchni płytek wybranych materiałów ortodontycznych**

Płytki pokryte mucyną inkubowano w 1 ml płynnej pożywki Sabourouda liquid medium zawierającej 100 µl zawiesiny *C. albicans* o gęstości  $10^5$  CFU/ml. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C. Po inkubacji płytki dokładnie przepłukano 0,9% NaCl i przeniesiono do 1 ml płynnej pożywki zawierającej 100 µl zawiesiny *S. mutans* o gęstości  $10^5$  CFU/ml. Inkubacje prowadzono przez 24 h w temp. 37°C, po inkubacji płytki ponownie dokładnie przepłukano i odcisnięto na stałym podłożu kontaktowym TSA zawierającym ketokonazol (2µg/ml, firmy Sigma) czynnik hamujący wzrost *C. albicans*. Hodowle inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37°C, w warunkach podwyższonego stężenia CO<sub>2</sub> (5%). Po zakończeniu inkubacji liczono kolonie *S. mutans* wyrosłe na podłożu stałym.

### **3.11 Określenie mikrobójczego działania CHX, TauBr, TauCl i NaOCl na formę planktoniczną badanych drobnoustrojów.**

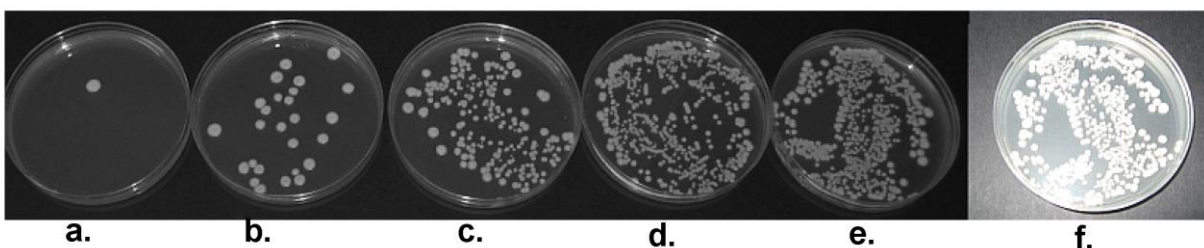
Bezpośrednio przed rozpoczęciem badania z hodowli na podłożach stałych przygotowywano zawiesinę drobnoustrojów w stężeniach  $10^5$  CFU/ml i  $10^8$  CFU/ml. Objętość zawiesiny wynosiła 100 µl. Szczepy *S. mutans*, *P. gingivalis* i *C. albicans* inkubowano w zamkniętych próbkach z różnymi stężeniami substancji badanych. Zakres stężeń badanych związków wynosił: 0.00002-1% dla CHX, 0.001–10mM dla TauBr i TauCl oraz 0.0001- 1% dla NaOCl.

Do badań wykorzystywano rozcieńczenia połówkowe (w postępie arytmetycznym) badanych substancji w 0,9% NaCl lub w obecności 25% surowicy ludzkiej w 0,9% NaCl. Inkubację prowadzono w temp 37°C przez 1 godzinę, po zakończeniu inkubacji bakterie posiewano na podłoża stałe, pobierając z każdej próbki po dokładnym wymieszaniu 100 µl zawiesiny. Dla szczepu *S. mutans* stosowano podłoże Tryptic Soy Agar + 5% odwłóknionej krwi

baraniej, hodowle inkubowano przez 48 godzin w temp 37°C, w warunkach zwiększonego stężenia CO<sub>2</sub> (5%). Dla *P. gingivalis* stosowano podłoże Sheadler Agar + 5% krwi baraniej, inkubacje prowadzono przez 5 dni w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C. Dla *C. albicans* stosowano podłoże Sabourauda Agar, inkubacje prowadzono przez 48 godzin w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C.

Po zakończeniu inkubacji liczono ilość kolonii, uwzględniając rozcieńczenie i porównując z kontrolą. Przygotowując kontrole wzrostu postępowano jak w przypadku próbek badanych, nie dodając substancji przeciwbakteryjnej. Badania w układzie kontrolnym i badawczym przeprowadzono 3-krotnie dla każdego modelu badawczego.

Działanie mikrobójcze badanych substancji określono jako MIC (*ang.* minimal inhibitory concentration), najmniejsze stężenie środka bakteriobójczego całkowicie hamujące wzrost drobnoustrojów, wyrażone w wagowym stężeniu procentowym (1% = 1g substancji/100 ml roztworu).



**Ryc. 11. Oznaczenie MIC dla CHX wobec szczepu *Candida albicans* ATCC 90029[a-e]** – wzrost CFU po inkubacji *C. albicans* w roztworze CHX o stężeniu 0.00002-1% [f] – kontrola wzrostu

### **3.12 Określenie mikrobójczego działania TauBr i CHX na drobnoustroje ukryte w biofilmie ortodontycznym**

Do przeprowadzenia badań wybrano kompozyt, materiał ortodontyczny wykazujący w naszych warunkach doświadczalnych największą zdolność do adhezji bakterii i tworzenia biofilmu. Po uzyskaniu jednogatunkowego biofilmu (*Candida albicans* lub *Streptococcus mutans*) płytkę kompozytową zanurzano w probówkach zawierających różne stężenia substancji badanych. Inkubacje prowadzono przez **30 min** w temp. 37°C. Zakres stężeń badanych



związków wynosił: 0.007 - 1% CHX i 1- 10 mM dla TauBr. Po inkubacji płytkę dokładnie przepłukano 0,9% NaCl i odcisnięto na podłożu kontaktowym Contact Agar Tryptic Soy (firmy Heipna) w celu policzenia żywych drobnoustrojów. Hodowle *S. mutans* prowadzono przez 48 godziny w temp 37°C, w obecności 5% CO<sub>2</sub>. *C. albicans* hodowano przez 48 godzin w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C. Po zakończeniu inkubacji liczono ilość kolonii wysianych z bakterii przylegających do płytek. Przygotowując kontrole wzrostu postępowano tak jak powyżej z pominięciem etapu inkubacji płytki z substancją przeciwbakteryjną.

Dodatkowo zbadano wpływ przedłużonego działania badanych substancji antyseptycznych na 24-godzinny biofilm *S. mutans* i *C. albicans*. W tym celu po uzyskaniużądanego biofilmu na płytce kompozytowej, materiał inkubowano w probówkach zawierających odpowiednio 1% CHX, 3mM TauBr oraz mieszaniną CHX i TauBr (1:1). Inkubacje prowadzono w temp. 37°C przez 30 min i **3 godz.** Dalsze etapy badania przeprowadzono jak opisano powyżej.

### **3.13 Zwierzęta doświadczalne**

Do doświadczeń użyto myszy szczepu CBA/J w wieku 6-8 tygodni. Zwierzęta pochodziły z hodowli Katedry Immunologii UJ CM. Myszy hodowano w ilości 4-5 na klatkę w standardowych warunkach z dostępem do pożywienia i wody bez ograniczeń. Katedra Immunologii posiada pozwolenie Lokalnej Komisji Etycznej na użycie myszy do eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem komórek wysięku otrzewnowego (uchwała nr 91/2011 z dnia 21 września 2011 r.)

### **3.14 Komórki**

W badaniach *in vitro* wykorzystano komórki linii makrofagów mysich J774.A1 oraz neutrofile i makrofagi wysięku otrzewnowego myszy CBA/J. W celu uzyskania komórek wysięku otrzewnowego myszom podawano dootrzewnowo 1 ml thioglikolanu. Neutrofile uzyskano z płynu otrzewnowego zabitych myszy po 18 godzinach, a makrofagi po 72 godzinach, przepłukując jamę otrzewnową 5 ml DPBS z dodatkiem heparyny (5 U/ml; Polfa, Warszawa). Następnie zawiesinę komórek wirowano, a komórki zawieszano ponownie w DPBS. Obecność

makrofagów (85-90%) potwierdzano metodą cytochemiczną – poprzez wykazanie obecności komórek jednojądrzastych zawierających esterazę.

### **3.15 Ocena żywotności komórek – test MTT**

Żywotność komórek hodowanych *in vitro* oceniano przy pomocy testu redukcji soli tetrazolowej (MTT) do formazanu przez dehydrogenazy mitochondrialne żywych komórek. Makrofagi (lina makrofagów J774.A1 oraz komórki wysięku otrzewnowego) hodowano na płycie 96 dołkowej w gęstości  $5 \times 10^4$  na dołek. W pierwszym etapie do medium hodowlanego (DMEM) bez surowicy (FBS) dodawano badane substancje: TauBr w stężeniach od 0,001 do 2mM oraz CHX w stężeniach od 0,001 do 1%. Po 1,5 godzinie zmieniano medium na DMEM z 5% FBS oraz LPS 100 ng/ml. Po 24 godzinach hodowli badano żywotność komórek testem MTT. W tym celu usuwano nadsącz komórkowy i nakładano świeże medium z dodatkiem MTT. Po dalszych 30 minutach inkubacji usuwano medium z MTT i następnie w celu rozpuszczenia wytrąconych kryształków formazanu zalewano komórki DMSO (100  $\mu$ l na dołek). Stężenie produktu końcowego (formazanu) oceniano mierząc absorpcję dla  $\lambda = 490$  nm. Ilość powstałego formazanu jest proporcjonalna do ilości żywych komórek. Grupę kontrolną stanowiły komórki stymulowane LPS, ale nieinkubowane z badanymi związkami.

### **3.16 Ocena wpływu CHX i TauBr na produkcję cytokin i tlenku azotu przez makrofagi**

Makrofagi linii J774.A1 wysiano na 24 dołkowe płytki w gęstości  $5 \times 10^5$  na dołek, po 60 minutach inkubacji w DMEM z dodatkiem 5% surowicy (FBS) i uzyskaniu warstwy adherentnych komórek, medium wymieniano na DMEM bez dodatku surowicy. Następnie dodano do hodowli badane substancje: CHX (0,0001-0,025%), TauBr (100 i 300 $\mu$ M). Po 90 minutach inkubacji medium wymieniano na DMEM z dodatkiem 5% FBS i LPS 100 ng/ml. Po 24-godzinnej hodowli ściągnięto nadsącza komórkowe, w których oznaczono poziom cytokin oraz NO.

### 3.17 Oznaczenie poziomu cytokin

Poziom cytokin w nadsączach z hodowli komórkowych oznaczano testem ELISA. Płytkę 96-dółkową pokrywano szczurzym przeciwciałem monoklonalnym przeciwko wybranej cytokinie (inkubacja 24 h). Po zablokowaniu płytki 4% roztworem albumin (2 h) lub 3% mlekiem nakładano badane nadsącze lub roztwory standardowe i pozostawiano na noc do inkubacji. Następnie nakładano biotynylowane przeciwciało przeciwko tej samej cytokinie. Po 1 godzinie inkubacji dodawano peroksydazę sprzężoną ze streptawidyną (Vector, Burlingame, USA), a następnie substraty reakcji barwnej:  $H_2O_2$  i ofenylo-diaminę (Sigma, Steinham, Niemcy). Po 30 min zatrzymywano reakcję poprzez dodanie 3M  $H_2SO_4$ . Stężenie produktu końcowego oceniano poprzez pomiar absorpcji przy  $\lambda = 492$  nm i porównanie z roztworem standardowym.

**TNF- $\alpha$**  - stosowano przeciwciała: monoklonalne TN3-19.12 (2  $\mu$ g/ml) oraz biotynylowane przeciwciało poliklonalne (1,6  $\mu$ g/ml) (Pharmingen, San Diego, USA). Jako standardu używano mysiego rekombinowanego TNF- $\alpha$  (Sigma, Steinham, Niemcy). Próg wykrywalności cytokiny wynosił około 30 pg/ml.

**IL-6** - stosowano przeciwciała: MP5-20F3 (2  $\mu$ g/ml) oraz biotynylowane MP532C11 (0,5  $\mu$ g/ml) (Pharmingen, San Diego, USA). Jako standardu używano mysiej rekombinowanej IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, USA). Próg wykrywalności cytokiny wynosił około 15 pg/ml.

**IL-10** - stosowano przeciwciała: JES5-2A5 (5  $\mu$ g/ml) oraz biotynylowane JES516E3 (2  $\mu$ g/ml) (Pharmingen, San Diego, USA). Jako standardu używano mysiej rekombinowanej IL-10 (Genzyme, Cambridge, UK). Próg wykrywalności cytokiny wynosił około 30 pg/ml.

### 3.18 Oznaczenie poziomu tlenku azotu (NO)

Stężenie NO w nadsączach oznaczano pośrednio, poprzez pomiar stężenia azotynów ( $NO_2$ ) metodą Griessa. Do 100  $\mu$ l nadsącza dodawano 100  $\mu$ l 1% sulfanilamidu w 5% kwasie ortofosforowym, a następnie 100  $\mu$ l 0,1% NDD. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze 23°C mierzono absorpcję przy  $\lambda=550$  nm i wyznaczano stężenie azotynów z krzywej standardowej (skonstruowanej w oparciu o wzorcowe roztwory  $NaNO_2$ ).

### **3.19 Ocena wpływu CHX i TauBr na produkcję ROS przez aktywowane neutrofile metodą chemiluminescencji zależnej od luminolu (LCL)**

Przygotowanie luminolu - Luminol rozpuszczono w roztworze HBSS. Otrzymany roztwór o stężeniu 8 mg/10 ml przechowywano w temperaturze 4°C chroniąc od światła. W celu wykonania testu chemiluminescencji neutrofile (18-godzinne komórki wysięku otrzewnowego) zawieszano w roztworze HBSS zmieszonym z luminolem (0,8 mg/ml) w proporcji objętościowej 1:1 i wysiewano po 100  $\mu$ l na 96-dołkową płytkę do chemiluminescencji w ilości  $5 \times 10^5$  komórek na dołek. Płytkę umieszczano w ciemnym pojemniku na okres 30 minut, w temperaturze 37°C. Następnie do dołków dodano TauBr (100, 300M) lub CHX (0,001% do 0,00025%) i inkubowano przez 10 minut w temp. 37°C. Po czym komórki stymulowano dodając 20  $\mu$ l/dołek zawiesiny opsonizowanego zymosan z *Saccharomyces cerevisiae* (OZ) (0,2 mg/ml), zabitych bakterii *S. mutans* (SM) lub grzybów *C. albicans* (CA). Zabite komórki SM i CA nakładano w takiej ilości na dołek aby na jedną komórkę fagocytarną (neutrofile) przypadało około 10 komórek bakteryjnych. Płytkę niezwłocznie umieszczano w czytniku oznaczającym intensywność luminescencji (Anthos Lucy). Pomiaru dokonywano przez 75 minut w 3 minutowych interwałach. Wielkość chemiluminescencji jest wyrażona w jednostkach RUL (RUL oznacza jednostki względnej intensywności luminescencji).

### **3.20 Statystyka**

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy funkcji statystycznych używanego arkusza kalkulacyjnego (Microsoft Excel). O ile nie podano inaczej, wyniki przedstawiono jako średnią +/- SD. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami badano przy pomocy analizy ANOVA oraz testu Studenta. Za istotną przyjmowano wartość  $p < 0.05$ .

### **3.21 Miejsce wykonania badań**

Testy mikrobiologiczne wykonano w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie. Testy immunologiczne przeprowadzono w Katedrze Immunologii UJ CM. Obrazowanie przy pomocy mikroskopii skaningowej wykonano w pracowni Mikroskopii Skaningowej Katedry Otolaryngologii CMUJ przez Katarzynę Zagórską-Świeży.

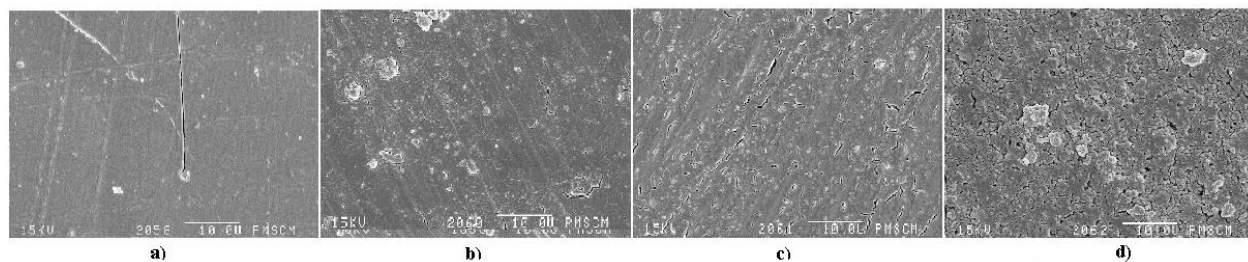
## 4. Wyniki

### 4.1 Ocena adhezji *Streptococcus mutans* do powierzchni wybranych materiałów ortodontycznych

W piśmiennictwie dostępne są liczne opracowania dotyczące adhezji *Streptococcus mutans*, głównej bakterii inicjującej tworzenie płytki nazębnej, do zamków ortodontycznych. Analizowano przyleganie *S. mutans* do zamków wykonanych z różnych materiałów, oceniano wpływ pokrycia powierzchni materiału śliną (składnikami śliny) oraz czas inkubacji bakterii z powierzchnią materiału ortodontycznego [Baczyk-Łopuch i Loster, 2010].

W niniejszej pracy badano przykładowe 4 typy materiałów stosowanych w ortodoncji: akrylu – stosowanego m.in. do wykonywania większości ruchomych aparatów ortodontycznych; stali chromo-niklowej – stosowanej do produkcji zamków, pierścieni i drutów ortodontycznych; stopu chromo-kobaltowego – używanego do produkcji m.in zamków ortodontycznych, drutu czworokątnego Elgiloy oraz kompozytu – budulca zamków kompozytowych oraz materiałów adhezyjnych do cementowania.

Analiza powierzchni badanych materiałów ortodontycznych na podstawie zdjęć z mikroskopu skaningowego wykazała najwyższą szorstkość powierzchni płytek kompozytowych (Ryc. 12).



**Ryc. 12. Zdjęcia materiałów ortodontycznych wykorzystywanych w badaniach** a). płytka akrylowa, b) płytka kobaltowa;c). płytka niklowa,; d) płytka kompozytowa, powiększenie 2200x

Obserwacja ta sugeruje, że płytki kompozytowe zapewniają dobre warunki do adhezji bakterii. Inkubacja płytek kompozytowych z bakteriami *S. mutans* przez okres 24 godzin prowadziła do pokrycia powierzchni całej płytki licznymi koloniami tworzącymi obraz biofilmu bakteryjnego (Ryc. 13). Oceniono również wpływ mucyny, wybranego składnika śliny, na

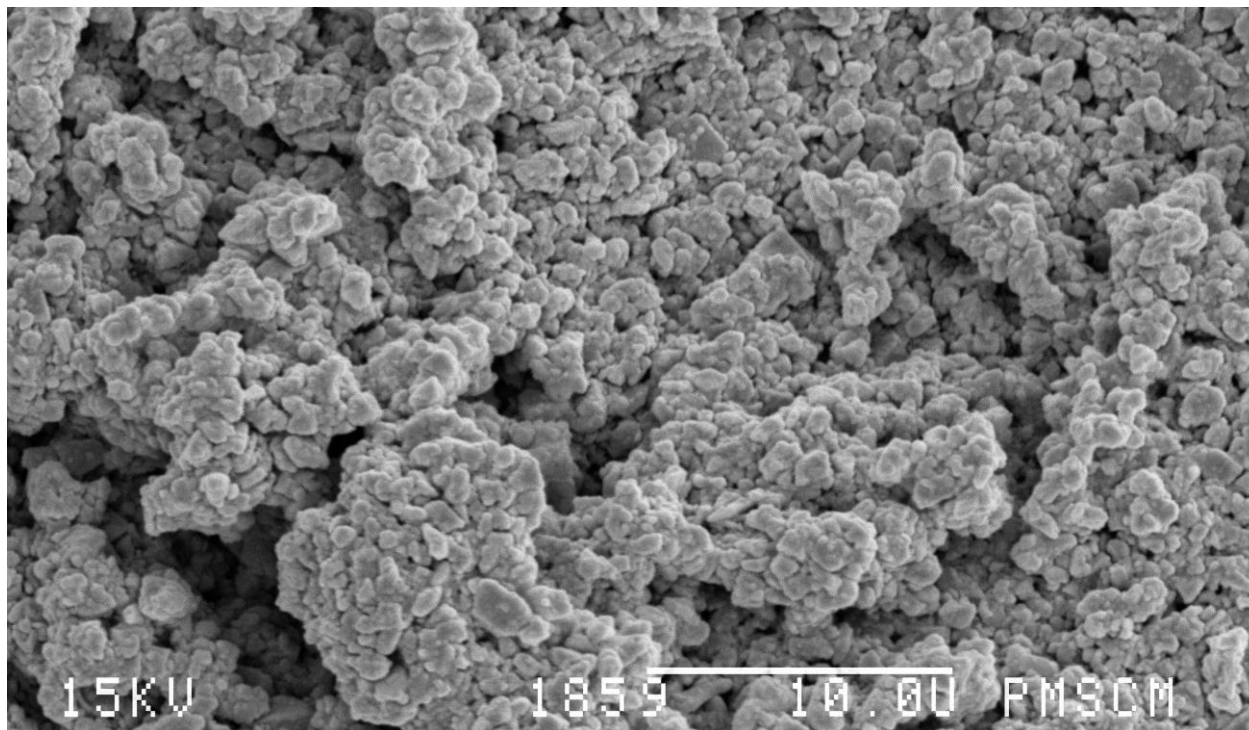
adhezję bakterii. W naszych warunkach doświadczalnych mucyna zwiększyła ponad 3-krotnie ilość bakterii przylegających do płytki kompozytowej (Tabela 4). Kolejne badania adhezji *S. mutans* do płytki kompozytowej pokrytej mucyną wykazały, że maksymalna ilość żywych bakterii odzyskanych po 24-godzinnej inkubacji (tworzących biofilm) wynosiła 300 – 400 CFU/płytkę. W dalszych badaniach >300 CFU/płytkę przyjęto arbitralnie jako kontrolę pozytywną, maksymalnej adhezji bakterii do badanego materiału ortodontycznego.

Posiew	Ilość CFU/ płytkę	
	Płytko kompozytowa bez inkubacji z mucyną*	Płytko kompozytowa po inkubacji z mucyną**
	57	270
	96	300
	100	>300
<b>Średnia</b>	84	290

**Tabela 4. Wpływ mucyny na adhezję *S. mutans* do płytki kompozytowej**

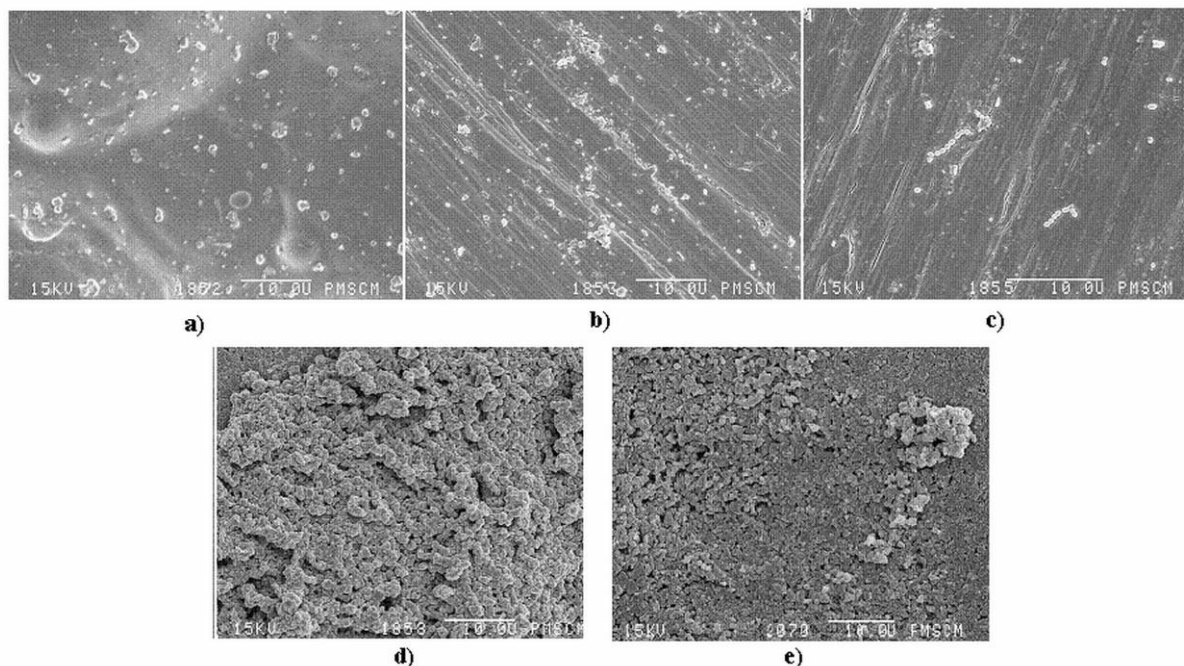
\* Inkubacja płytki kompozytowej (nie pokrytej mucyną) w podłożu płynnym TSB (Tryptic Soy Broth) zawierającym 100 µl *Streptococcus mutans* o stężeniu 10<sup>5</sup>CFU/ml, w temp. 37°C przez 24 h.

\*\* Inkubacja płytki kompozytowej (pokrytej mucyną) w podłożu płynnym TSB (Tryptic Soy Broth) zawierającym 100 µl *Streptococcus mutans* o stężeniu 10<sup>5</sup>CFU/ml, w temp. 37°C przez 24 h.



**Ryc. 13. Biofilm *S. mutans* po 24 h inkubacji na płytce kompozytowej pokrytej mucyną. (Mikroskop Skaningowy - powiększenie 3000x)**

W kolejnym etapie badań porównano zdolność adhezji *S. mutans* i *C. albicans* do wybranych materiałów ortodontycznych pokrytych mucyną (Ryc. 14). Badania wykazały adhezję *S. mutans* tylko do płytki kompozytowej (Tabela 5). Istotny był czas ekspozycji płytki na bakterie. Skrócona, 2-godzinna inkubacja zmniejszyła statystycznie znamienne ilość komórek *S. mutans* izolowanych z płytki kompozytowej (146 $\pm$  5 vs. >300).



**Ryc.14. Ocena adhezji szczepu *Streptococcus mutans* ATCC 25175 na powierzchni wybranych materiałów ortodontycznych.** Materiały ortodontyczne po 24h inkubacji z zawiesiną *S. mutans*  $10^5$ CFU/ml): a) płytka akrylowa, powiększenie 2200x; b) płytka kobaltowa, powiększenie 2200x; c) płytka niklowa, powiększenie 2200x; d) płytka kompozytowa, powiększenie 2200x po 2 h inkubacją z zawiesiną *S. mutans*  $10^5$  CFU/ml.

rodzaj materiału \ czas inkubacji	Ilość CFU/płytkę (25 mm <sup>2</sup> )	
	2h	24h
Akryl	0	0
Kobalt*	0	0
Nikiel**	0	0
Kompozyt	146 ± 5	>300

**Tabela 5. Adhezja *Streptococcus mutans* do powierzchni materiałów ortodontycznych.**

Płytki inkubowano w zawiesinie *S. mutans*  $10^4$  CFU/płytkę przez okres 2 i 24 godzin. Wyniki przedstawiają ilość żywych bakterii wyizolowanych z płytek (CFU/ płytkę). Zebrane wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń. (\*kobalt = stop chromo-kobaltowy; \*\*nikiel= stal chromo-niklowa)



*C. albicans*, w odróżnieniu od *S. mutans*, wykazał zdolność maksymalnej adhezji do wszystkich badanych materiałów ortodontycznych po 24-godzinnej inkubacji. Również po skróconym czasie inkubacji stwierdzono przyleganie komórek *C. albicans* do badanych płytek bez różnic istotnych statystycznie (Tabela 6).

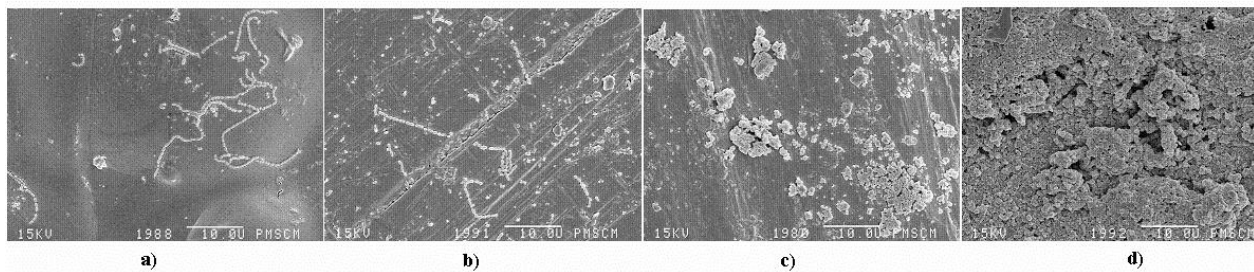
		Ilość CFU/płytkę (25 mm <sup>2</sup> )	
		2h	24h
rodzaj materiału	czas inkubacji		
	Akryl	164 ± 52	>300
	Kobalt	209 ± 87	>300
	Nikiel	108 ± 80	> 300
Kompozyt	179 ± 60	> 300	

**Tabela 6. Adhezja *Candida albicans* do powierzchni materiałów ortodontycznych.** Płytki inkubowano w zawiesinie *C. albicans* 10<sup>4</sup> CFU/płytkę przez okres 2 i 24 godzin. Wyniki przedstawiają ilość żywych bakterii wyizolowanych z płytek (CFU/płytkę). Zebrane wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.

Interesujące wyniki uzyskano badając adhezję *S. mutans* do powierzchni materiałów ortodontycznych po uprzedniej 24-godzinnej inkubacji z *C. albicans*. Ponownie odnotowano największe przyleganie *S. mutans* do płytek kompozytowych. Jednakże *C. albicans* umożliwił adhezję *S. mutans* do wszystkich pozostałych materiałów ortodontycznych, bez różnic pomiędzy akrylem, stalą chromo-niklową i stopem chromo-kobaltowym (Tabela 7; Ryc. 15).

		Ilość CFU/płytkę (25 mm <sup>2</sup> )
rodzaj materiału	czas inkubacji	24 h
		<b>Akryl</b>
	<b>Kobalt</b>	65 ± 10
	<b>Nikiel</b>	53 ± 29
	<b>Kompozyt</b>	> 300

**Tabela 7. Adhezja *Streptococcus mutans* do powierzchni materiałów ortodontycznych po uprzedniej inkubacji z *Candida albicans*.** Płytki inkubowano w zawiesinie *C. albicans* 10<sup>4</sup> CFU/płytkę przez 24 godziny a następnie w zawiesinie *S. mutans* 10<sup>4</sup> CFU/płytkę przez kolejne 24 godziny. Wyniki przedstawiają ilość żywych bakterii wyizolowanych z płytek (CFU/ płytke). Zebrane wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.



**Ryc. 15. Obraz z mikroskopu skaningowego adhezji szczepu *Streptococcus mutans* na powierzchni wybranych materiałów ortodontycznych po inkubacji za szczepem *Candida albicans*: a) płytka akrylowa; b) płytka kobaltowa; c) płytka niklowa; d) płytka kompozytowa, (powiększenie 2200x)**

## 4.2 Porównanie mikrobójczych właściwości TauCl, TauBr, NaOCl i CHX wobec formy planktonicznej *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Candida albicans*.

(Wyniki te przedstawiono w konspekcie Pracy Doktorskiej i opublikowano w MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2013, 65: 187-196)

W przeprowadzonych badaniach porównano *in vitro* efekt mikrobójczego działania chlorheksydyny (CHX) z działaniem chloraminy tauryny (TauCl) i bromaminy tauryny (TauBr) wobec planktonicznej formy 3 drobnoustrojów mikrobiomu jamy ustnej, występujących *in vivo* w płytce nazębnej i błonie śluzowej jamy ustnej (*S. mutans*, *P. gingivalis* i *C. albicans*). Porównano MIC badanych związków wobec niskiego ( $10^5$  bakterii/ml) i wysokiego ( $10^8$  bakterii/ml) stężenia drobnoustrojów.

Czynnik	Gęstość drobnoustrojów (komórek/ml)	MIC (%)		
		<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
CHX	$10^5$	0,0015	0,00015	0,000007
	$10^8$	0,007	0,0007	0,0003
TauBr	$10^5$	0,05	0,00014	0,000012
	$10^8$	Powyżej 0,2	0,014	0,0001
TauCl	$10^5$	0,18	0,022	0,0027
	$10^8$	Powyżej 0,18	0,1	0,0108
mieszanka TauBr i TauCl	$10^5$	0,05	0,00024	0,000012
	$10^8$	Powyżej 0,2	0,003	0,0002

**Tabela 8. Aktywność mikrobójcza CHX, TauBr i TauCl wobec planktonicznej formy wybranych drobnoustrojów jamy ustnej.** CHX (0.00002 – 1.0%), TauBr i TauCl (0.0001 – 0.2%) inkubowano z badanymi drobnoustrojami zawieszonymi w NaCl przez okres 1 godziny. MIC oznaczono jak opisano w w rozdziale Materiały i Metody.

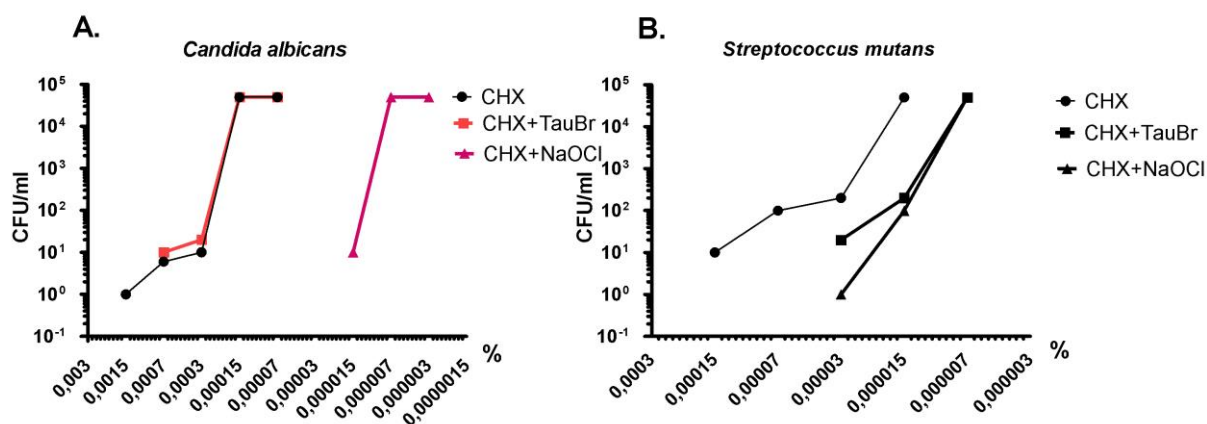
CHX, jak pokazano w Tabeli 8, wykazuje bardzo silne działanie mikrobójcze wobec wszystkich badanych drobnoustrojów. MIC chlorheksydyny, wyrażone w wagowym stężeniu procentowym, dla *S. mutans* ( $10^5$ /ml) wynosi 0.00015%, a dla wysokiego stężenia tych bakterii wynosi 0.007%. CHX równie skutecznie hamuje wzrost *C. albicans*. Jednakże, w obecności 25% surowicy aktywność mikrobójcza CHX wobec *C. albicans* i *S. mutans* spada 10-krotnie, a wobec *P. gingivalis* 100-krotnie (Tabela 9).

TauBr hamuje skutecznie wzrost obu badanych bakterii, *S. mutans* (MIC = 0.00015%) i *P. gingivalis* (MIC = 0.000007%) (Tabela 8). Natomiast efekt hamującego działania TauBr na wzrost *C. albicans* wykazano tylko w stężeniu powyżej 0.05%. W obecności surowicy mikrobójcze działanie TauBr, podobnie jak CHX, było znacząco słabsze (Tabela 9). TauCl, w przeciwieństwie do CHX i TauBr, w przeprowadzonym modelu doświadczalnym, wykazała bardzo słabą aktywność antybakteryjną i nie hamowała wzrostu grzybów *C. albicans* (Tabela 8).

Badany związek	MIC (%)			
	<i>Candida albicans</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	NaCl	surowica	NaCl	surowica
CHX	0,0015%	*0,015%	0,00015%	0,00015%
TauBr	0,05%	0,11%	0,00014%	*0,055%
TauCl	0,18%	0,18%	0,022%	0,045%

**Tabela 9. Wpływ surowicy na aktywność mikrobójczą CHX, TauBr i TauCl wobec planktonicznej formy *C. albicans* i *S. mutans*.** CHX (0,00002 - 1,0%), TauBr and TauCl (0,00001- 0,2%) inkubowano przez 1h z badanymi drobnoustrojami w samym 0,9% NaCl oraz w 0,9% NaCl z 25% surowicą. Wyniki obrazują średnią MIC dla trzech niezależnych eksperymentów. \* utrata zdolności mikrobójczych >10x. Tabela została przygotowana na podstawie wcześniejszych publikacji [Pasich i wsp. 2013].

W dalszym etapie badań sprawdzono mikrobójcze właściwości CHX w obecności TauBr i podchlorynu sodu (NaOCl), głównego antyseptyku stosowanego w endodoncji. Do badań wytypowaliśmy *S. mutans* (główna bakteria tworząca płytkę nazębną) oraz *C. albicans* (główny czynnik etiologiczny kandydozy jamy ustnej). Badania nasze wykazały, że obecność NaOCl wzmacnia kilkakrotnie właściwości antyseptyczne CHX (Ryc.16). TauBr, w odróżnieniu od NaOCl, nie wchodzi w reakcję z CHX i nie zmienia jej właściwości mikrobójczych wobec *C. albicans*. TauBr działa natomiast synergistycznie z CHX wobec *S. mutans* (Ryc. 16).

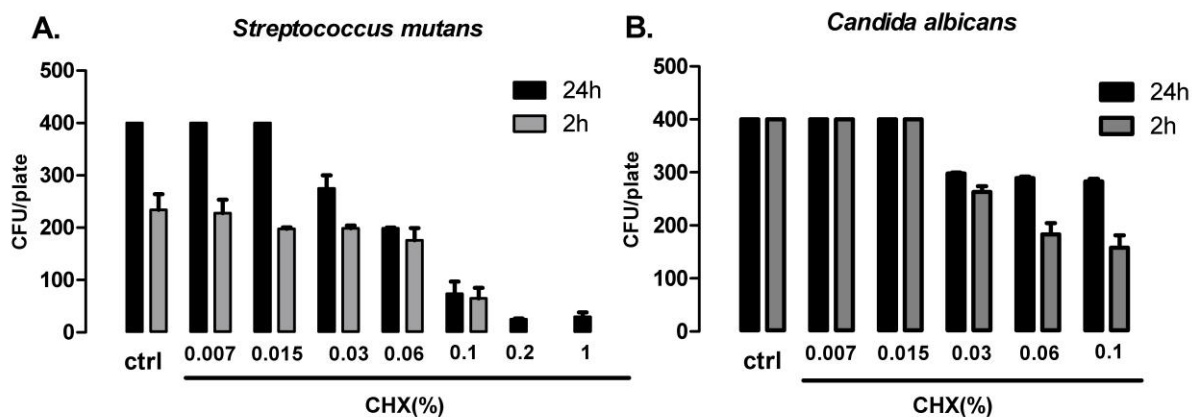


Ryc. 16. Wpływ podchlorynu sodu (NaOCl) oraz bromaminy tauryny (TauBr) na aktywność mikrobójczą chlorheksydyny (CHX)

#### 4.3 Porównanie mikrobójczych właściwości TauBr i CHX wobec *Streptococcus mutans* i *Candida albicans* rosnących w biofilmie na powierzchni płytki kompozytowej.

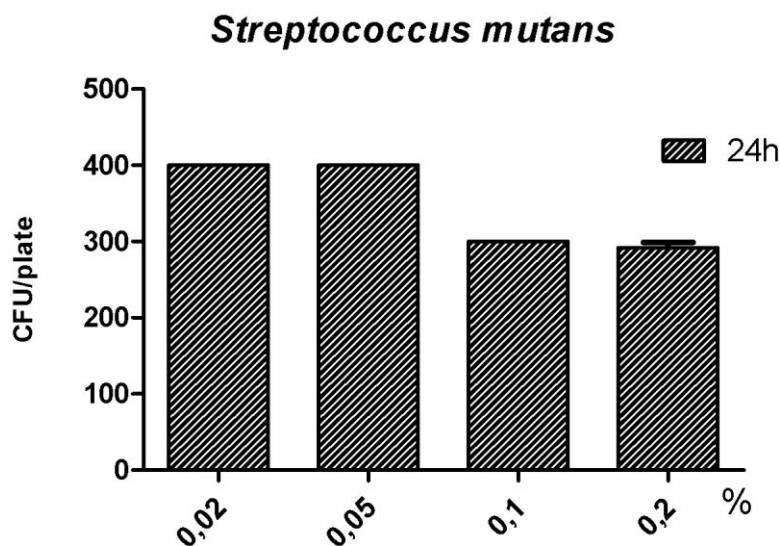
Porównanie właściwości mikrobójczych TauCl i TauBr wobec planktonicznej formy badanych drobnoustrojów mikrobiomu jamy ustnej jednoznacznie wskazują, że TauBr jest lepszym antyseptykiem. W kolejnym etapie pracy doktorskiej wpływ TauBr i CHX na żywotność *S. mutans* i *C. albicans* ukrytych w biofilmie powstałym na płytce kompozytowej został zbadany.

Wyniki przedstawione na rycinie 17 potwierdzają zdolność CHX do zabijania drobnoustrojów ukrytych w biofilmie. CHX, w stężeniu powyżej 0.1%, po upływie 30 minut zabija 100% bakterii *S. mutans* rosnących na płytce kompozytowej. W tych samych warunkach CHX zabija ~50% grzybów *C. albicans*.



**Ryc. 17. Wpływ CHX na żywotność *S. mutans* i *C. albicans* w biofilmie.** Płytkę kompozytową po 2- lub 24- godzinnej hodowli z *S. mutans* (A) oraz *C. albicans* (B), inkubowano z CHX przez 30 min. Zakres stężeń CHX wynosił od 0,007 do 1%. Wyniki przedstawiają ilość żywych bakterii wyizolowanych z płytek (CFU/ płytkę). Rycina obrazuje wyniki z 3 niezależnych doświadczeń. Kontrola pozytywna - ~400 CFU/płytkę.

TauBr (<1mM), w odróżnieniu od CHX, nie zahamowała wzrostu i nie wpłynęła na żywotność *S. mutans* w opisanych warunkach doświadczalnych (30min ekspozycji) (Ryc. 18).



**Ryc.18. Wpływ TauBr na żywotność *S. mutans* w biofilmie.** Płytkę kompozytową pokrytą 24-godzinnym biofilmem *S. mutans* inkubowano w roztworze TauBr ( 0,02–0,2%) przez 30 min. Wyniki przedstawiają ilość żywych bakterii wyizolowanych z płytek (CFU/ płytkę). Rycina obrazuje wyniki z 3 niezależnych doświadczeń.

W dalszym etapie badań sprawdzono zdolność CHX i TauBr do zabijania *S. mutans* na płytce kompozytowej po wydłużonym okresie inkubacji do 3 godzin. Na zasadność wydłużenia czasu działania antyseptyków na biofilm wskazują prace Nagła i wsp. [2013]. Autorzy ci wykazali właściwości mikrobójcze i hamujące rozwój biofilmu przez TauCl po 3 godzinach ekspozycji na płytki metalowe pokryte biofilmem *S. aureus*.

W zmienionym modelu doświadczalnym (3 godzinna inkubacja) wykazano, że 3 mM TauBr skutecznie zabija bakterie *S. mutans* ukryte w dojrzałym, 24-godzinnym biofilmie powstałym na płytce kompozytowej pokrytej mucyną (Tabela 10).

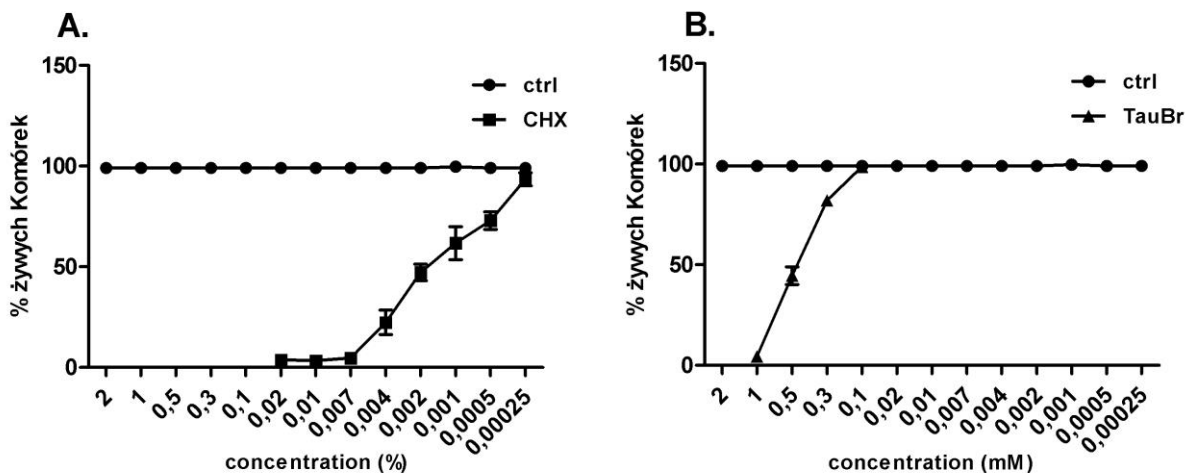
rodzaj materiału \ czas inkubacji	Ilość CFU/płytkę (25 mm <sup>2</sup> )	
	30 min	3h
<b>CHX</b>	28± 8	4 ±1
<b>TauBr</b>	>300	30 ± 4
<b>CHX+ TauBr</b>	27 ± 3	7 ± 3
<b>KW</b>	>300	> 300

**Tabela 10. Wpływ TauBr i CHX na żywotność *S. mutans* w biofilmie.** Płytkę kompozytową z 24h biofilmem *S. mutans* inkubowano w 1% CHX; 0,06 % TauBr oraz mieszaninie CHX i TauBr (1:1) przez 30 minut lub 3 godziny. Wyniki przedstawiają ilość bakterii wyizolowanych z płytek (CFU/ płytkę). Kontrola wzrostu (KW) przygotowano tak jak próby badane z pominięciem etapu inkubacji płytki z substancją przeciwbakteryjną. Tabela obrazuje wyniki z 3 niezależnych doświadczeń

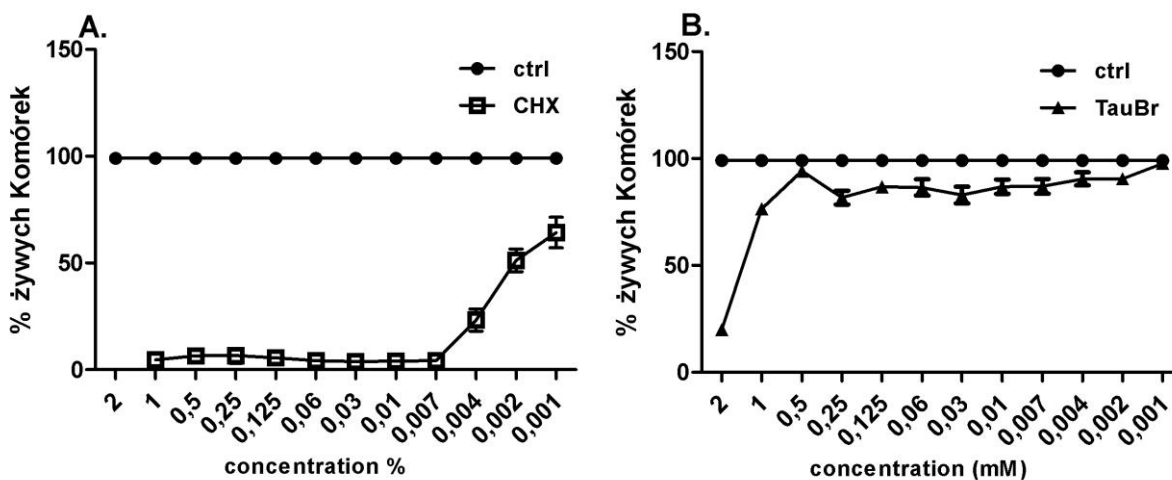
#### 4.4 Wpływ TauBr i CHX na żywotność makrofagów *in vitro*

Cytotoksyczność badanych związków w hodowlach komórkowych makrofagów wysięku otrzewnowego (ryc. 19) oraz makrofagów linii J774.A1 (ryc. 20) mierzono przy pomocy testu MTT. Wykazano, że dla hodowanych *ex vivo* mysich makrofagów otrzewnowych stężenie cytotoksyczne TauBr wynosi powyżej 500 μM, a dla CHX 0.001%. Dla komórek linii J774.A1 znamienne cytotoksyczność występuje przy stężeniu powyżej 300 μM TauBr i 0.001% CHX.





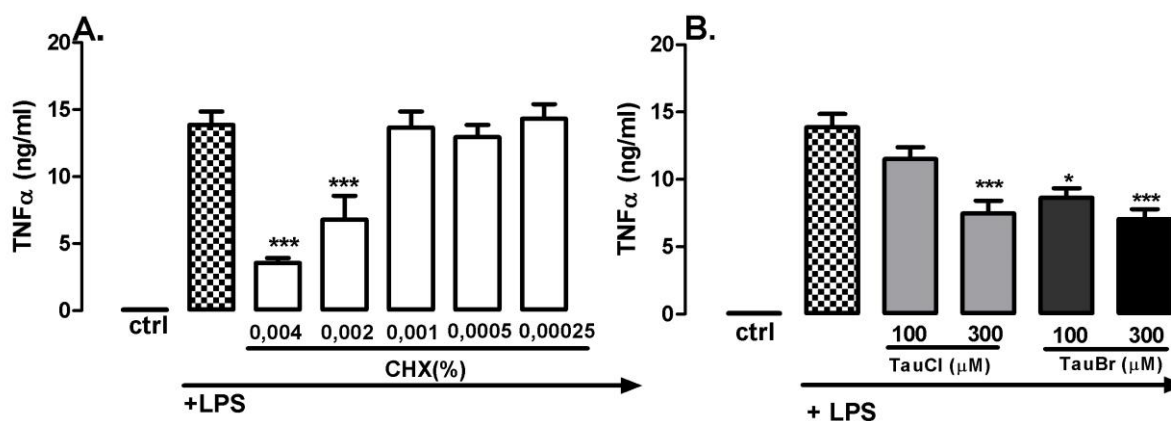
**Ryc. 19. Wpływ CHX i TauBr na żywotność makrofagów wysięku otrzewnowego.** Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 1godz. Po wymianie medium komórki hodowano przez 24 godz. i oznaczano ich żywotność testem MTT (Materiały i Metody). Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.



**Ryc. 20. Wpływ CHX i TauBr na żywotność komórek linii J774.A1.** Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 1godz. Po wymianie medium komórki hodowano przez 24 godz. i oznaczano ich żywotność testem MTT (Materiały i Metody). Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.

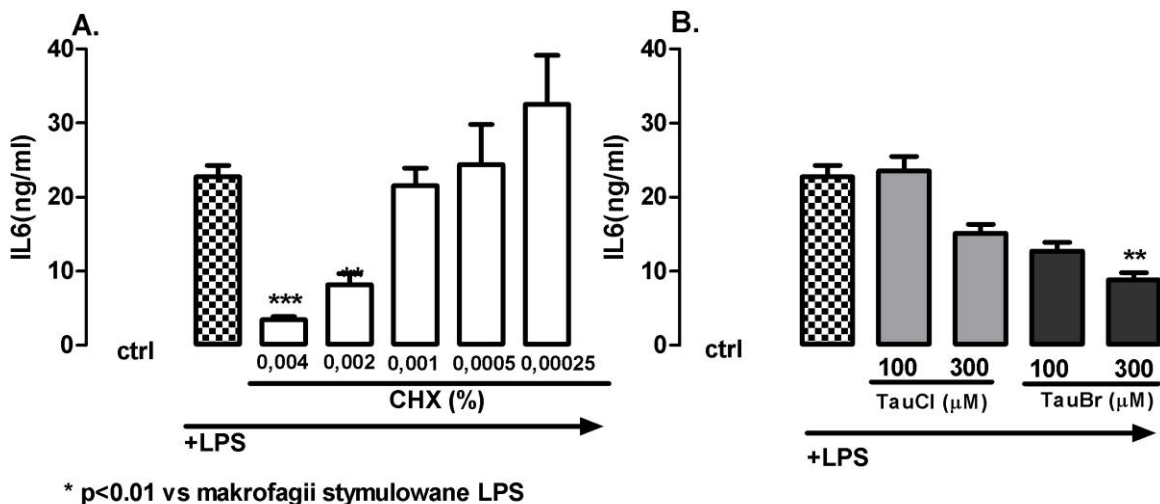
## 4.5 Ocena wpływu TauCl, TauBr i CHX na aktywność sekrecyjną makrofagów

Badanie wpływu TauCl i TauBr na aktywność sekrecyjną komórek odczynu zapalnego przeprowadzono *in vitro* na linii makrofagowej J774.A1 aktywowanej LPS.

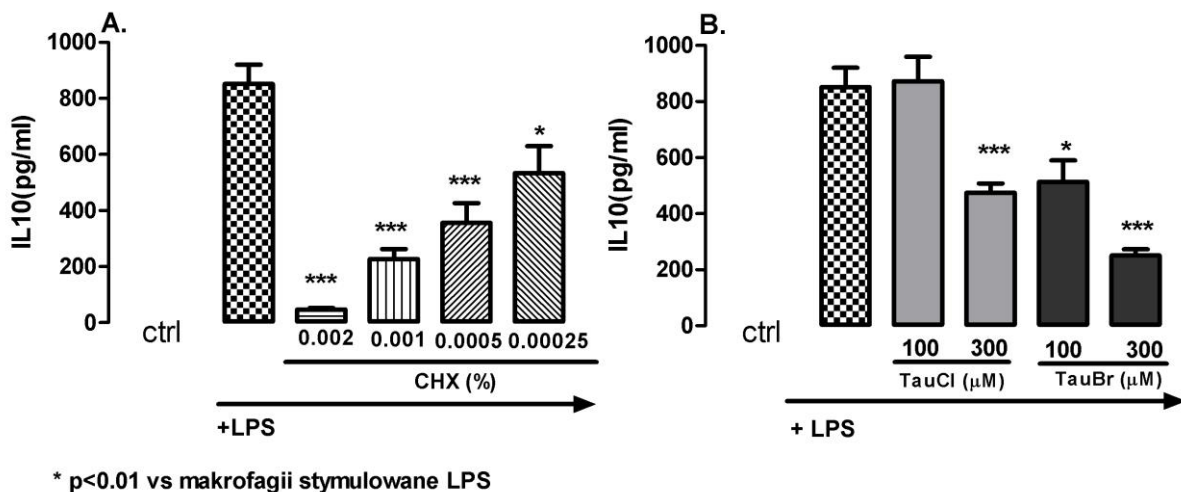


\*  $p < 0.01$  vs makrofagi stymulowane LPS

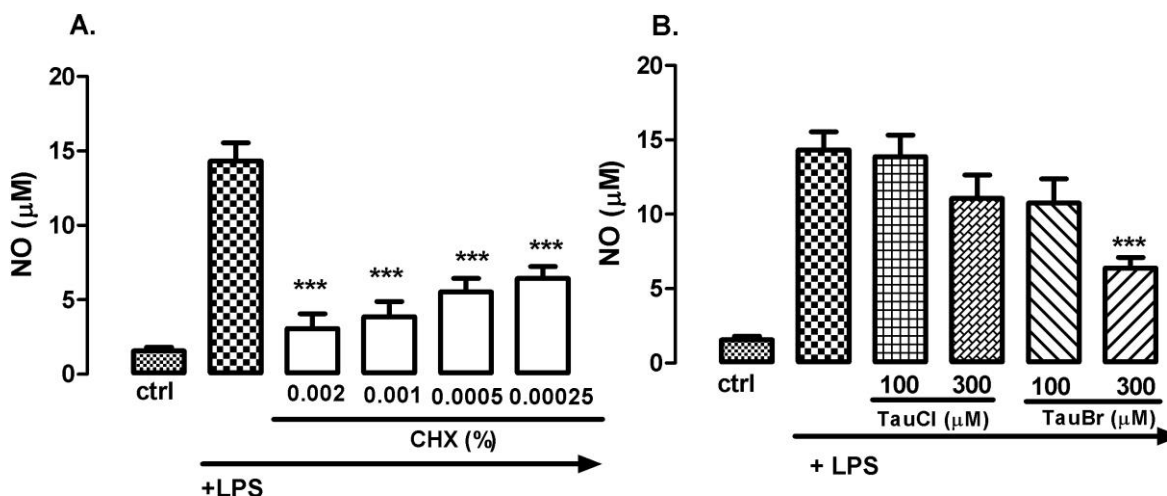
**Ryc. 21. Wpływ CHX, TauBr i TauCl na produkcję TNF $\alpha$  przez komórki linii J774.A1.** Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 90min. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS 100ng/ml i hodowano przez 24 godz. Poziom TNF $\alpha$  w nadsączu komórkowym oznaczono metodą ELISA. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.



**Ryc. 22. Wpływ CHX, TauBr i TauCl na produkcję IL-6 przez komórki linii J774.A1.** Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 90minut. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS 100ng/ml i hodowano przez 24 godziny. Poziom IL-6 w nadsączu komórkowym oznaczono metodą ELISA. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.



**Ryc. 23. Wpływ CHX, TauBr i TauCl na produkcję IL-10 przez komórki linii J774.A1.** Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 90minut. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS 100ng/ml i hodowano przez 24 godzinach. Poziom IL-10w nadsączu komórkowym oznaczono metodą ELISA. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.



\*  $p < 0.01$  vs makrofagii stymulowane LPS

**Ryc. 24. Wpływ CHX, TauBr i TauCl na produkcję NO przez komórki linii J774.A1.** Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 90minut. Po wymianie medium komórki stymulowano LPS 100ng/ml i hodowano przez 24 godziny. Poziom NO (azotynów) w nadsączu komórkowym oznaczono metodą Griessa. Wyniki reprezentują średnią z 3 niezależnych doświadczeń.

TauBr w podobny, zależny od dawki sposób hamuje uwalnianie wszystkich badanych cytokin (TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10) oraz sekrecję NO. Działanie TauBr hamujące aktywność sekrecyjną makrofagów było silniejsze od działania TauCl.

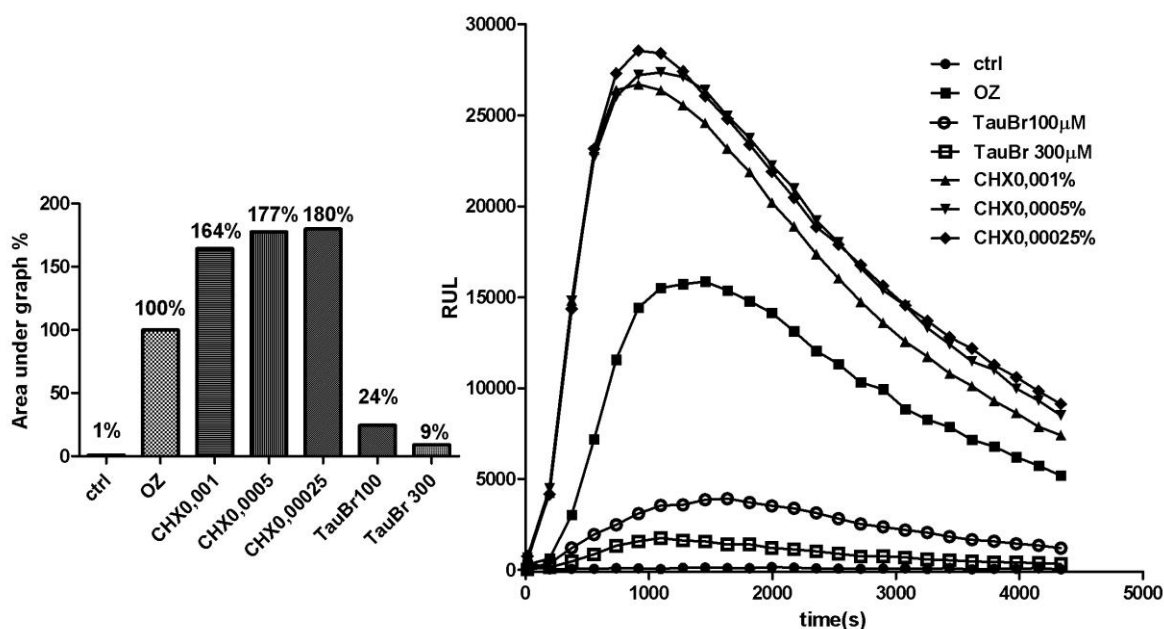
Wykazano, że TauCl w stężeniach niecytotoksycznych (<0.3 mM) hamuje uwalnianie TNF- $\alpha$  i IL-10 pozostając bez wpływu na sekrecję IL-6 oraz tlenku azotu (badanego poprzez pomiar stężenia azotynów – trwałego metabolitu NO).

Efekt działania CHX na sekrecję aktywowanych makrofagów był odmienny od efektu działania obu haloamin tauryny. CHX, w stężeniach niecytotoksycznych (<0.001%), hamowała statystycznie znamienne sekrecję NO i IL-10, będąc bez wpływu na uwalnianie TNF- $\alpha$ . Jednocześnie wykazano zwiększone uwalnianie IL-6 pod wpływem niskich stężeń CHX (0.00025%).

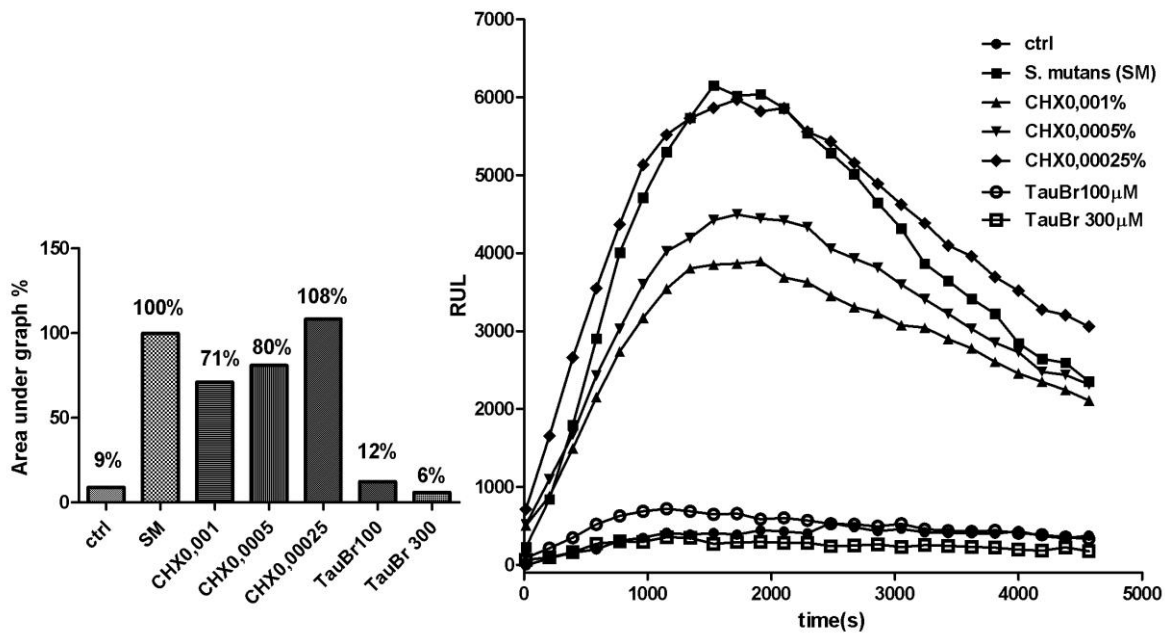
## 4.6 Ocena wpływu TauBr i CHX na tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS) przez aktywowane neutrofile

Badania przeprowadzono w oparciu o chemiluminescencję zależną od luminolu (LCL) indukowaną nieswoiście przez różne ROS wybuchu tlenowego, ale głównie przez produkty systemu MPO neutrofilów uwalniane w trakcie fagocytozy.

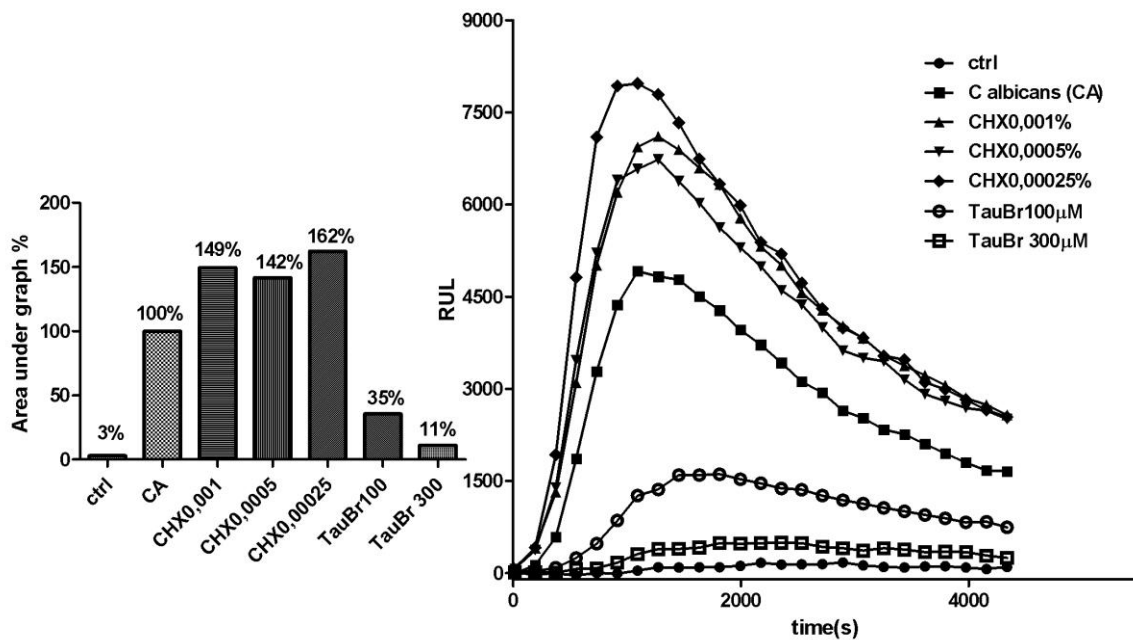
Wykazano, że TauBr niezależnie od użytego stymulatora (opsonizowany zymosan – Ryc. 25; *S. mutans* – Ryc. 26; *C. albicans* – Ryc. 27) silnie hamuje uwalnianie ROS. Zahamowanie LCL przy stężeniu 0.3 mM TauBr wynosiło 89 – 94%. Interesujące wyniki uzyskano badając wpływ CHX na uwalnianie ROS. W odróżnieniu od TauBr, CHX w stężeniach niecytotoksycznych (<0.0001%), nie hamuje, ale nawet w wypadku stymulacji neutrofilów zymosanem podnosi znacząco chemiluminescencję (>160%) (Ryc. 25).



**Ryc. 25. Wpływ CHX i TauBr na produkcję ROS przez neutrofile myszy CBA.** [18-godzinne komórki wysięku otrzewnowego stymulowane opsonizowanym zymosanem (OZ)]. Chemiluminescencja zależna od luminolu (Metody). Ctrl – kontrola negatywna, komórki niestymulowane. Rycina przedstawia wyniki 1 z 5 przeprowadzonych doświadczeń.



**Ryc. 26. Wpływ CHX i TauBr na produkcję ROS przez neutrofile myszy CBA.** [18-godzinne komórki wysięku otrzewnego stymulowane zabitymi komórkami *S.mutans*]. Chemiluminescencja zależna od luminolu (Metody). Ctrl – kontrola negatywna, komórki niestymulowane. Rycina przedstawia wyniki 1 z 5 przeprowadzonych doświadczeń.



**Ryc. 27. Wpływ CHX i TauBr na produkcję ROS przez neutrofile myszy CBA.** [18-godzinne komórki wysięku otrzewnowego stymulowane zabitymi komórkami *C. albicans* (CA)]. Chemiluminescencja zależna od luminolu (Metody). Ctrl – kontrola negatywna, komórki niestymulowane. Rycina przedstawia wyniki 1 z 5 przeprowadzonych doświadczeń.

## 5. Dyskusja

Głównym celem pracy było przeprowadzenie analizy danych z piśmiennictwa światowego dotyczącego adhezji bakterii do aparatów ortodontycznych z własnymi wynikami dotyczącymi adhezji *S. mutans* do czterech wybranych materiałów ortodontycznych (akrylu, stopu chromo-kobaltowego, stali chromo-niklowej i kompozytu).

Analizę literatury fachowej opublikowaliśmy w trakcie prowadzonych badań do pracy doktorskiej [Ewa Pasich i wsp. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2013 - Załącznik Nr.1].

W artykule tym napisaliśmy:

*„W literaturze fachowej w ostatnich latach pojawiło się wiele artykułów poświęconych zdolności bakterii do adhezji na powierzchni różnych materiałów stosowanych w ortodoncji. Szczególną uwagę zwrócono na stosowanie aparatów stałych, stwarzających większe ryzyko odkładania się bakterii w porównaniu z aparatami zdejmowanymi. Brano pod uwagę materiały służące do wykonania zamków, ligatur i łuków aparatów ortodontycznych oraz materiały adhezyjne. W badaniach tych określano procent powierzchni pokrytej biofilmem na elementach aparatów ortodontycznych (ceramiczne, metalowe, akrylowe). Wyniki nie są jednoznaczne, obserwacje i wnioski uzyskane z badań przeprowadzonych in vitro nie zawsze mają potwierdzenie w badaniach ex vivo.*

*Na przykład in vitro wykazano, że adhezja *S. mutans* do powierzchni akrylowych zamków ortodontycznych jest większa niż do wykonanych ze stali nierdzewnej i do zamków ceramicznych. Te ostatnie wykazały najniższą zdolność do adhezji bakterii z rodzaju *lactobacillus* i *streptococcus*. Autorzy tych prac podkreślają znaczenie szorstkości powierzchni stosowanego materiału w adhezji bakterii i potwierdzają konieczność pokrycia powierzchni każdego z testowanych materiałów elementami śliny w celu uzyskania osłonki nabytej.*

*Jednakże badania in vivo nie potwierdziły jednoznacznie różnic w tworzeniu biofilmu na zamkach akrylowych i metalowych. Natomiast zamki ceramiczne wykazały najslabsze powinowactwo do takich bakterii jak *S. mutans*, *P. ginigivalis*). Wykonano wiele badań ex vivo sprawdzając skład i ilość bakterii przylegających do różnych elementów aparatów ortodontycznych i materiałów adhezyjnych. Wyniki tych badań i obserwacji klinicznych można podsumować następująco:*



- *Aparaty ortodontyczne (wszystkie ich elementy) sprzyjają formowaniu się biofilmu w jamie ustnej zarówno na ich powierzchni jak i na powierzchni zębów (tworzenie płytki nazębnej).*
- *Właściwości powierzchni biomateriału oraz czas stosowania aparatu ortodontycznego są głównymi czynnikami mającymi wpływ na wielkość i skład biofilmu ortodontycznego. Powierzchnie szorstkie aparatu (wszelkie bruzdy, pęknięcia) oraz szczeliny powstające pomiędzy szkliwem a przylegającym zamkiem czy też łukiem aparatu ułatwiają przyleganie bakterii, zwiększają retencje resztek pokarmowych a równocześnie ograniczają przepływ śliny i utrudniają higienę jamy ustnej.*
- *Wybór materiału, z punktu widzenia podatności na przyleganie bakterii nie jest jednoznaczny. Porównując właściwości adhezyjne aparatów ortodontycznych wykonanych ze stali nierdzewnej, z poliwęglanu oraz ceramiczne, wydaje się, że użytkownicy aparatów ze stali nierdzewnej są najbardziej narażeni na tworzenie biofilmu i ryzyko towarzyszącej próchnicy. Dodatkową trudność w interpretacji uzyskanych wyników sprawia gatunkowo zależna zdolność bakterii do adhezji. Wykazano niższe powinowactwo *S. mutans* do powierzchni metalowych, natomiast brak wpływu rodzaju materiału ortodontycznego na adhezję i tworzenie biofilmu *P. gingivalis*.*
- *Dodatkowo, te same materiały mogą wykazywać odmienną podatność do tworzenia biofilmu ze względu na pojawienie się nowych związków chemicznych na ich powierzchni. Na przykład autoklawowanie stopów tytanu (składniki drutów ortodontycznych) ułatwia osadzanie się bakterii ze względu na pojawienie się tlenków metali na powierzchni elementów aparatu ortodontycznego.*
- *Nadmiar materiału cementującego zamek jak i niewłaściwy wybór łączenia drutu ortodontycznego z zamkiem zwiększa ryzyko skutków ubocznych wywołanych tworzeniem biofilmu. Z piśmiennictwa wynika, że połączenia elastyczne są obciążone większym ryzykiem niż połączenia stalowe.*
- *Nieprawidłowa higiena jamy ustnej oraz palenie tytoniu są najważniejszymi zewnętrznymi czynnikami zwiększającymi adhezję bakterii i powstawanie biofilmu ortodontycznego”*

W piśmiennictwie dostępne są opracowania dotyczące adhezji do zamków ortodontycznych różnych bakterii mikrobiomu jamy ustnej, ale najczęściej badano *Streptococcus mutans*. Analizowane było przyleganie *S. mutans* do zamków wykonanych z różnych materiałów, oceniano również wpływ pokrycia powierzchni materiału śliną oraz wydłużenie czasu inkubacji w zawieszynie zawierającej badany szczep bakteryjny. Poddano analizie także wpływ obecności innych mikroorganizmów, np. *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* czy *Candida*

*albicans* na przyleganie *Streptococcus mutans* do badanych zamków [van Gestel i wsp. 2009, Papaioannou i wsp. 2012].

Wyniki badań własnych, prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej w istotny sposób uzupełniają wiedzę o ryzyku tworzenia biofilmu na materiałach ortodontycznych. Badania jednoznacznie wykazały, że największe ryzyko adhezji *S. mutans* dotyczy kompozytu. Również w badaniach innych autorów [Fournier i wsp. 1998] odnotowano największy wzrost kolonii *S. mutans* na zamkach kompozytowych, następnie na ceramicznych, a najmniejszy na metalowych. Autorzy ci sugerują, że powierzchnia zamków kompozytowych jest najbardziej porowata i mało gładka, co pokrywałoby się z wynikami naszej pracy, a ich sugestie potwierdzają badania Quirynena [Quirynen i Bollen 1995] który potwierdza, że szorstka powierzchnia materiałów oraz wysoka powierzchniowa energia sprzyja tworzeniu się płytki bakteryjnej. Natomiast inni badacze [Papaioannou i wsp. 2007] wykazali, iż nie ma znaczących różnic w przyleganiu *S. mutans* do zamków metalowych, ceramicznych czy plastikowych, a jedynie zauważyli różnice, iż obecność śliny obniża przyleganie bakterii z rodzaju *S. mutans* do wszystkich zamków z badanej grupy. W naszym modelu badawczym ślina została zastąpiona mucyną, która jest stosowana w badaniach *in vitro* w celu stworzenia sztucznej „osłonki nabytej” [Ahn i wsp. 2002, 2007]. Wyniki naszych badań wykazały istotnie zwiększone przyleganie *S. mutans* do wszystkich badanych materiałów ortodontycznych pokrytych mucyną. W świetle naszych badań dyskusyjny wydaje się być wpływ śliny na adhezję drobnoustrojów do powierzchni materiałów ortodontycznych. Jedni badacze [Papaioannou i wsp. 2007, Ahn i wsp. 2002, Quirynen i Bollen 1995] uważają, iż obecność błonki nabytej na powierzchni zamków pokrytych śliną, znacząco obniża przyleganie *Streptococcus mutans* do badanych elementów, natomiast inne prace [Lee i wsp. 2009] zaprzeczają tym informacją, nie widząc wpływu śliny na stopień przylegania bakterii do zamków.

Bardzo istotne z punktu widzenia klinicznego jest wykazanie nie tylko wpływu *C. albicans* na wzrost adhezji *S. mutans* do kompozytu, ale również umożliwienie adhezji *S. mutans* do materiałów ortodontycznych opornych na jego przyleganie i tworzenie biofilmu (stal chromo-niklowa, stop chromo-kobaltowy). Na wpływ innych patogenów na przyleganie *S. mutans* do powierzchni zamków zwrócili również uwagę inni badacze [Brusca i wsp. 2007], którzy nie zauważyli większych różnic w adhezji *S. mutans* do powierzchni różnych zamków, ale w obecności *Candida albicans* odnotowano największy wzrost kolonii *S. mutans* na zamkach

kompozytowych, następnie na ceramicznych, a najmniejszy na metalowych. Badania te potwierdzają nasze wyniki.

Drugim celem poznawczym niniejszej pracy doktorskiej było porównanie właściwości antyseptycznych i przeciwzapalnych TauCl i TauBr z właściwościami chlorheksydyny (CHX), złotego standardu stosowanego w stomatologii. Badania miały odpowiedzieć na pytanie, czy haloaminy tauryny (TauCl i TauBr) mogą mieć zastosowanie w stomatologii w zapobieganiu, kontroli i usuwaniu biofilmu ortodontycznego oraz w leczeniu towarzyszących stanów zapalnych jamy ustnej.

W pierwszym etapie badań oznaczono aktywność mikrobójczą badanych związków wobec planktonicznej formy drobnoustrojów. Badania przeprowadzono *in vitro* na reprezentatywnych drobnoustrojach mikrobiomu jamy ustnej, potencjalnych elementach wielogatunkowego biofilmu ortodontycznego (*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*) [Pasich i wsp. 2013]. Uzyskane wyniki potwierdziły obserwacje innych autorów wskazujące na dużą skuteczność mikrobójczą CHX zarówno wobec bakterii (*S. mutans*, *P. gingivalis*), jak i grzybów *C. albicans* [Williams i Lewis, 2010]. Z pośród badanych drobnoustrojów zahamowanie wzrostu *C. albicans* ( $10^8$ /ml) wymagało najwyższego stężenia CHX. Mimo tego, mikrobójcze stężenie CHX dla *C. albicans* (MIC = 0.007%) jest wielokrotnie niższe od stężeń CHX w preparatach stomatologicznych (Tabela 1).

W związku z zastosowaniem CHX w leczeniu chorób przyzębia, polegającym na podziąsłowym podaniu leku [Malicka i wsp. 2005], sprawdzono jej aktywność mikrobójczą w obecności surowicy. W takich warunkach, zbliżonych do warunków panujących w kieszonce dziąsłowej, CHX znamienne traci zdolność do zabijania *C. albicans* (do 90%), bez istotnych różnic w aktywności antybakteryjnej, zwłaszcza wobec *P. gingivalis*.

CHX jest powszechnie stosowana jako antyseptyk w leczeniu próchnicy, chorób przyzębia, kandydozy jamy ustnej. CHX jest również stosowana w leczeniu kanałowym [Brenda i wsp. 2013]. Jednakże, ze względu na niezgodność farmaceutyczną pomiędzy CHX a podchlorynem sodu, głównym antyseptykiem stosowanym w endodoncji, sprawdziliśmy czy NaOCl można zastąpić haloaminami tauryny. Obiecujące wyniki uzyskano zastępując NaOCl

bromaminą tauryny. Mieszanka TauBr i NaOCl nie tworzyła brązowego precipitatu (powstanie parachloroaniliny) i wykazywała silne właściwości mikrobójcze [Pasich i wsp. 2013].

Badania właściwości antyseptycznych haloamin tauryny wykazały istotne różnice pomiędzy TauCl i TauBr. TauCl, w porównaniu z CHX, słabo hamowała wzrost bakterii *S.mutans* i *P.gingivalis*. Ponadto, TauCl, w zakresie stosowanych stężeń, nie działała mikrobójczo na grzyby *C. albicans*. Wyniki te są sprzeczne z badaniami Nagla i wsp. [1998]. Jednakże w ich badaniach stosowano wielokrotnie wyższe stężenia TauCl, a czas inkubacji wydłużono do kilku godzin. W odróżnieniu od TauCl, TauBr wykazała skuteczne działanie mikrobójcze wobec wszystkich badanych drobnoustrojów. Wyniki powyższe zadecydowały, że do dalszych badań mających na celu wykazanie właściwości antyseptycznych wobec biofilmu jamy ustnej (biofilmu ortodontycznego) wybrano TauBr i jako kontrolę CHX. TauBr wybrano również dzięki obiecującym badaniom prowadzonym w Katedrze Immunologii nad wpływem TauBr na tworzenie i eliminację biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* [Marcinkiewicz i wsp. 2013; Walczewska i wsp. 2013]. Wykazano, że TauBr hamuje *in vitro* tworzenie biofilmu *P. aeruginosa* ale nie niszczy dojrzałego biofilmu. Wyniki te sugerują brak wpływu TauBr na struktury macierzy biofilmu (EPS) lub na neutralizację TauBr przez substancje uwalniane przez bakterie biofilmu. Aby poprawić dyfuzję TauBr do struktur biofilmu przeprowadzono wstępne badania polegające na podawaniu jednoczasowym antyseptyku (TauBr) i DNazy w celu zniszczenia DNA macierzy [Walczewska i wsp. 2013]. Uzyskano obiecujące wstępne wyniki ale wymagające potwierdzenia w badaniach wobec biofilmu tworzonego przez inne drobnoustroje i o innym składzie macierzy [Marcinkiewicz i wsp. 2013]. W niniejszej pracy doktorskiej celem badawczym było sprawdzenie czy TauBr działa mikrobójczo na bakterie ukryte w biofilmie ortodontycznym. Wykazano, że TauBr zabija bakterie *S. mutans* w biofilmie utworzonym na płytce kompozytowej, gdy czas ekspozycji wydłużono z 30 minut do 3 godzin. CHX działała mikrobójczo na biofilm w krótszym okresie czasu (30 minut) hamując wzrost *S. mutans* (>0.1%) i *C. albicans* (>1%). Wyniki te sugerują, że preparaty stomatologiczne (patrz Tabela 1) zawierające CHX o stężeniu poniżej 1% są skuteczne w profilaktyce i leczeniu schorzeń jamy ustnej o etiologii bakteryjnej. Leczenie kandydozy jamy ustnej i eliminacja biofilmu wielogatunkowego wymaga wyższych stężeń antyseptyku (CHX, TauBr) i długiego czasu ich uwalniania. Wspomniane warunki spełniają obecnie tylko lakiery dentystyczne i preparaty do leczenia kanałowego.

Kolejnym problemem badawczym było porównanie właściwości przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych TauBr i CHX jako kandydatów do leczenia przewlekłych stanów zapalnych jamy ustnej, niepożądanych skutków ortodontycznego biofilmu.

W licznych badaniach *in vitro* i *ex vivo* wykazano supresyjny wpływ haloamin tauryny na aktywność sekrecyjną komórek odczynu zapalnego: aktywowanych makrofagów w zakresie uwalniania NO i TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL-8, PGE<sub>2</sub> [Park i wsp. 1995, 1997; Marcinkiewicz i wsp. 1995, 1998, 2005] i neutrofilów w zakresie uwalniania ROS, NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> [Marcinkiewicz i wsp. 1998]. W niniejszej pracy przeprowadzono porównanie działania TauCl, TauBr i CHX na wydzielanie cytokin i ROS przez aktywowane komórki linii makrofagowej (J774.A1) oraz aktywowane mysie makrofagi otrzewnowe. Stwierdzono, że oba związki, TauCl i TauBr, w stężeniu 100-300  $\mu$ M (stężenia niecytotoksyczne dla makrofagów) powodują istotne, zależne od dawki zahamowanie syntezy NO oraz wybranych cytokin prozapalnych. CHX wykazała słabsze działanie przeciwzapalne ze względu na jednoczesne hamowanie cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych (IL-10). Interesujących wyników dostarczyły badania wpływu CHX i TauBr na generację i uwalnianie ROS przez neutrofile aktywowane opsonizowanym zymosanem oraz zabitymi drobnoustrojami biofilmu jamy ustnej (*S. mutans*, *C. albicans*). TauBr wykazała silne właściwości antyoksydacyjne hamując całkowicie (>90%) uwalnianie ROS pod wpływem wszystkich badanych stymulantów. Natomiast CHX, w stężeniach poniżej 0.1%, albo nie wpływała na poziom chemiluminescencji (pomiar ROS), albo podnosiła poziom ROS. Wyniki te wskazują na pro-oksydacyjne działanie CHX i są zgodne z badaniami Yeunga i wsp. [2007], którzy wykazali zmienne pro- i anty-oksydacyjne właściwości CHX w zależności od obecności związków wapnia Ca(OH)<sub>2</sub>.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że CHX jest doskonałym antyseptykiem, lepszym od haloamin tauryny w usuwaniu nadmiernego biofilmu jamy ustnej (płytki nazębnej). Jednakże, w wypadku stwierdzenia skutków niepożądanych, CHX może być zastąpiona przez TauBr podawaną w preparatach umożliwiających powolne uwalnianie leku (lakiery, mini tabletki poddziąsłowe) [Silla i wsp. 2008]. Ponadto, przeciwzapalne i antyoksydacyjne właściwości TauBr, sprawdzone w leczeniu miejscowym trądzika pospolitego [Marcinkiewicz i wsp. 2008], wskazują na korzystne wspólne podawanie TauBr z innym chemioterapeutycznym (antyseptykiem). Na przykład z Clindamycyną w leczeniu stanów zapalnych skóry i z CHX w leczeniu przewlekłych schorzeń przyzębia i zapaleń jamy ustnej.

## 6. Wnioski

- Najwyższą adhezję *S. mutans* i *C. albicans* do materiałów ortodontycznych wykazano wobec kompozytu, a najniższą wobec stali chromo-niklowej. Pokrycie materiałów ortodontycznych mucyną zwiększa adhezję drobnoustrojów.
- Obecność *C. albicans* ułatwia adhezję *S. mutans* do materiałów ortodontycznych i tworzenie wielogatunkowego biofilmu.
- Chlorheksydyna (CHX) hamuje *in vitro* wzrost formy planktonicznej drobnoustrojów mikrobiomu jamy ustnej (*S. mutans*, *P. gingivalis*, *C. albicans*) w stężeniach znamienne niższych od stężeń stosowanych w stomatologii.
- TauBr, w stężeniach niecytotoksycznych, podobnie jak CHX hamuje wzrost formy planktonicznej *S. mutans* i *P. gingivalis*, ale słabo działa na wzrost *C. albicans*.
- CHX hamuje skutecznie wzrost *S. mutans* i *C. albicans* w biofilmie ortodontycznym. Do zniszczenia biofilmu wielogatunkowego konieczne jest użycie preparatów zawierających CHX o stężeniu powyżej 1%.
- Skuteczne działanie mikrobójcze TauBr wobec bakterii w biofilmie ortodontycznym wymaga wydłużonego czasu ekspozycji (3 godziny).
- W obecności surowicy zarówno CHX jak i TauBr traci znacząco właściwości mikrobójcze.
- TauBr wykazuje silne właściwości przeciwzapalne. TauBr hamuje syntezę cytokin prozapalnych i działa antyoksydacyjnie.
- CHX jest silniejszym antyseptykiem od TauBr, ale w mniejszym stopniu hamuje mediatory zapalenia i syntezę reaktywnych form tlenu (ROS).
- Uzyskane wyniki sugerują, że wspólne stosowanie CHX i TauBr w preparatach stomatologicznych o wydłużonym czasie uwalniania może skutecznie chronić jamę ustną przed rozwojem biofilmu na aparatach ortodontycznych oraz działać leczniczo w stanach zapalnych jamy ustnej.

## 7. Streszczenie

**Wstęp:** Biofilm jest definiowany jako wielogatunkowa społeczność drobnoustrojów i ich zewnątrzkomórkowych polimerów (macierz biofilmu), które są przymocowane do powierzchni tkanek lub biomateriałów. Płytkę nazębną jest przykładem biofilmu mikroflory ustroju. Niekontrolowany wzrost bakterii w płytce nazębnej (np. *Streptococcus species*) powoduje tworzenie się w jamie ustnej biofilmu znajdującego się na powierzchni zębów i poddziąsłowych powierzchniach. To może wywoływać miejscowe zapalenia (dziąseł), z późniejszym rozwojem próchnicy i chorób przyzębia. *Streptococcus mutans* został opisany jako główna bakteria odpowiedzialna za powstawanie próchnicy, podczas gdy *Porphyromonas gingivalis* jest odpowiedzialny za choroby przyzębia. Często infekcje bakteryjne powiązane są z grzybicą jamy ustnej, w której *Candida albicans* wykrywana jest obok bakterii *S. mutans*.

Mimo zaawansowanych technologii w nowoczesnej stomatologii, leczenie ortodontyczne za pomocą stałych aparatów wywołuje niepożądane objawy kliniczne, ze względu na obecność dodatkowych miejsc dla retencji biofilmu i utrudnionego mechanicznego usuwania płytki nazębnej. Zostało udowodnione w wielu pracach, że aparaty ortodontyczne zwiększają przyleganie bakterii i przyspieszają tworzenie się biofilmu jamy ustnej. Wciąż jednak pozostaje do ustalenia, które materiały stosowane w ortodoncji (stal nierdzewna, ceramika, akryl, kompozyt) wykazują najdogodniejsze właściwości sprzyjające przyleganiu bakterii do ich powierzchni i tworzeniu biofilmu. Brakuje też skutecznego i całkowicie bezpiecznego antyseptyku, który mógłby zapobiegać infekcjom jamy ustnej wywołanych nadmiernym tworzeniem się biofilmu, i leczyć je.

Obecnie najczęściej stosowanym w stomatologii antyseptykiem jest chlorheksydyna (CHX). Jednakże z uwagi na jej liczne objawy niepożądane, poszukiwane i testowane są inne, nowe antyseptyki. Wśród nich znajdują się pochodne tauryny, takie, jak tauolidyna, chloramina tauryny (TauCl) i bromamina tauryny (TauBr). TauCl i TauBr są fizjologicznymi produktami aktywowanych neutrofilów i powstają w odczynie zapalnym jako produkt reakcji pomiędzy tauryną i odpowiednio kwasem podchlorowym (HOCl) i kwasem podbromowym (HOBr). Wykazano uprzednio w badaniach *in vitro*, że TauCl i TauBr wykazują właściwości przeciwbakteryjne wobec różnych patogennych bakterii. Ponadto badania kliniczne wykazały, że obie haloaminy są skuteczne w leczeniu miejscowych zapaleń skóry i błon śluzowych, w tym

także zakażeń powiązanych z biofilmem. Niemniej jednak nie zostało jeszcze dokładnie zbadane czy są one w stanie zabić bakterie ukryte w biofilmie płytki nazębnej lub zniszczyć jego strukturę.

**Cel pracy:** Głównym celem pracy było porównanie zdolności przylegania *S. mutans* i *C. albicans* do wybranych materiałów ortodontycznych. Drugim celem było zbadanie i porównanie właściwości antyseptycznych CHX, TauBr i TauCl wobec planktonicznej formy drobnoustrojów i wobec drobnoustrojów ukrytych w biofilmie pokrywającym materiały ortodontyczne. Ponadto porównano właściwości przeciwwzapalne i przeciwutleniające wspomnianych antyseptyków.

**Eksperymentalny model adhezji bakterii jamy ustnej i tworzenia biofilmu do wybranych materiałów ortodontycznych** (akrylu, stali chromo-niklowej, stali chromo -kobaltowej i płytek kompozytowych). Płytki pokryte mucyną były inkubowane razem ze szczepami *S. mutans* i *C. albicans*. Po 2 i 24 godzinach płytki ponownie przepłukano w celu usunięcia niezwiązanych komórek bakteryjnych, i odcisnięto na stałym podłożu kontaktowym i inkubowano przez kolejne 48 godzin. Po zakończeniu inkubacji liczone kolonie bakterii (CFU/ płytkę), które wyrosły na podłożu. Adhezję drobnoustrojów i tworzenie biofilmu na płytkach wizualizowano za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego.

**Określenie mikrobójczego działania CHX, TauBr i TauCl na formę planktoniczną i na drobnoustroje ukryte w biofilmie.** W pierwszym etapie określono MIC badanych antyseptyków wobec zawiesiny wyznaczonych drobnoustrojów (forma planktoniczna) mikrobiomu jamy ustnej (*S. mutans*, *P. gingivalis* oraz *C. albicans*). W następnym etapie *S. mutans* i *C. albicans* tworzące biofilm na płytkach kompozytowych traktowano różnymi stężeniami badanych związków. Po wskazanym czasie inkubacji płytki przepłukano i odcisnięto na podłożu kontaktowym w celu policzenia żywych drobnoustrojów. Po następnych 48godzinach kolonie *S. mutans* i *C. albicans* policzono i wyrażano jako CFU/ płytkę.

#### **Wyniki i wnioski:**

- Płytki kompozytowe pokryte mucyną charakteryzowały się największą przyczepnością i wzrostem *S. mutans* i *C. albicans*, w porównaniu do innych testowanych materiałów



ortodontycznych. Obecność *C. albicans* ułatwiała adhezję *S. mutans* do wszystkich badanych materiałów ortodontycznych.

- CHX w porównaniu z TauBr i TauCl, wykazywała najsilniejsze właściwości mikrobójcze, zarówno przeciwko formie planktonicznej jak i ukrytych w biofilmie wszystkich testowanych patogenów. Natomiast TauCl wykazała najslabsze działanie mikrobójcze, pozostając bez wpływu na wzrost *C. albicans*.
- TauBr wykazała silniejsze właściwości antyseptyczne niż TauCl. Znacząco hamowała wzrost planktonicznej formy *S. mutans* z umiarkowanym wpływem na wzrost *C. albicans*. TauBr zabija bakterie ukryte w biofilmie, lecz dopiero po długim czasie inkubacji (3 godziny). Wyniki te sugerują, że stosowanie TauBr przy infekcjach jamy ustnej związanych z biofilmem wymaga stabilności TauBr, wysokiego jej stężenia i długiego czasu ekspozycji (częste stosowanie lub powolne uwolnienie).
- Porównanie właściwości antyseptycznych CHX i TauBr potwierdza wybór CHX w eliminacji biofilmu. Jednakże TauBr wykazywała silniejsze właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające.

Podsumowując, użycie materiału kompozytowego wykazuje wysokie ryzyko adhezji i tworzenia biofilmu na aparatach ortodontycznych. Ponadto, badania nasze potwierdziły wyjątkowy potencjał CHX jako podstawowego środka antyseptycznego w stomatologii. Jednakże wyniki sugerują również, że TauBr, ze względu na jej silne właściwości antybakteryjne, przeciwutleniające i przeciwzapalne może być stosowana alternatywnie lub w połączeniu z CHX w leczeniu zakażeń powiązanych z biofilmem jamy ustnej, zwłaszcza w tych przypadkach, w których występuje miejscowy stres oksydacyjny.

## 8. Summary

**Introduction:** Dental plaque is an example of a biofilm which is defined as a multi-species community of bacteria and their extracellular polymers (biofilm matrix) that are attached to biomaterials or tissue surfaces. Uncontrolled growth of bacteria of dental plaque (e.g. *Streptococcus species*) generates formation of oral biofilm located on teeth and subgingival surfaces. It may induce local inflammation (gingivitis) with further development of dental caries and periodontal diseases. *Streptococcus mutans* was described as the most important bacterium related to the etiology of dental caries, while *Porphyromonas gingivalis* is associated with periodontal diseases. Very often bacterial infections are associated with candidiasis of oral cavity and *Candida albicans* is frequently detected along with *S. mutans* in dental plaque-related infection.

Despite advanced technology in modern stomatology, orthodontic therapy using fixed appliances induces clinical side effects due to the presence of more biofilm-retentive niches and impaired mechanical plaque removal. It has been documented in a number of studies that orthodontic appliances facilitate bacteria adhesion and accelerate oral biofilm formation. However, it remains controversial which particular material (stainless steel, ceramic, acryl, composite) has favorable surface characteristics for bacteria adhesion and biofilm formation. Moreover, prevention and treatment of oral infections associated with excessive biofilm formation using effective and safe antiseptic is still unsolved problem.

To date, chlorhexidine (CHX) is the most commonly used antiseptic in dentistry. However, due to its adverse effects, other new antiseptics are still tested. Among them are taurine derivatives, such as, taurolidine, taurine chloramine (TauCl) and taurine bromamine (TauBr). TauCl and TauBr are physiological products of activated neutrophils, resulting from the reaction between taurine and either hypochlorous acid (HOCl) or hypobromous acid (HOBr), respectively. It has been previously shown that TauCl and TauBr exert *in vitro* antimicrobial properties against various pathogenic bacteria. Moreover, clinical studies have shown that both haloamines are effective in the local treatment of skin and mucosa infections, including biofilm-related infections. Nevertheless, it has been not tested yet whether they can kill bacteria hidden in a dental plaque biofilm or disrupt biofilm structure.

**Aims:** The primary aim of this study was to compare adhesive properties of *S. mutans* and *C. albicans* to the selected orthodontic materials. The second aim was to investigate and compare anti-microbial effectiveness of CHX, TauBr and TauCl against planktonic and biofilm form of the selected oral biofilm-associated microorganisms, *S. mutans* and *C. albicans*. Moreover, their anti-inflammatory and anti-oxidant properties have been compared.

### **Experimental model of oral bacteria adhesion and biofilm formation to orthodontic materials (*acryl, chromo-nickel steel, chromo-cobalt steel and composite plates*)**

Mucine covered plates were incubated with *S. mutans* or *C. albicans*. After 2 or 24 hours plates were washed to eliminate unbound bacterial cells, and then the plates were blotted onto a contact solid medium and cultured for additional 48 hours. After incubation the number of surviving bacteria was counted (CFU/plates). Adhesion of microorganisms and biofilm formation on the plates was visualized using Scanning Electron Microscopy.

### **Measurement of microbicidal activity of TauBr, TauCl and CHX against planktonic form of *S. mutans*, *P. gingivalis* and *C. albicans***

MIC was determined by the pour plate method. The agents, used at different concentrations, were incubated with tested microbes suspended in NaCl for 30 min. Then aliquots of these dilutions were spread on growing agar plates and CFU were counted after 48h.

### **Measurement of microbicidal activity of TauBr and CHX against *S. mutans* and *C. albicans* hidden in a biofilm**

*S. mutans* or *C. albicans* growing on the composite plates were treated with different concentrations of the tested compounds. After the indicated incubation time plates were washed and blotted on a solid contact medium to grow surviving microbes. After the next 48h colonies of *S. mutans* or *C. albicans* were counted and expressed as CFU/plate.

## **Results and Conclusions**

- Mucine covered composite plates showed the highest adhesion and accumulation of *S. mutans* and *C. albicans*, as compared to other tested orthodontic materials. Importantly, the presence of *C. albicans* biofilm promoted the formation of *S. mutans* biofilm on plates of all tested materials.

- CHX showed the strongest antimicrobial activity against planktonic and biofilm form of all tested pathogens.
- On the contrary, TauCl showed the weakest antimicrobial activity, with no effect on the growth of planktonic form of *C. albicans*.
- TauBr was a stronger antiseptic agent than TauCl. It markedly inhibited the growth of planktonic *S. mutans*, with the moderate effect on *C. albicans*. TauBr killed bacteria hidden in a biofilm, but only after the long-time incubation (3h). It suggests that application of TauBr in oral biofilm-associated infections requires stability of the agent, high concentration and long-time exposition (frequent application or slow liberation)
- In contrast to superior anti-microbial and anti-biofilm properties of CHX compared to TauBr, the latter showed the stronger anti-inflammatory and anti-oxidant properties.

Finally, the results strongly indicate that composite material exhibits high risk of pathogen adhesion and formation of a biofilm. Moreover, the study confirmed exceptional potential of CHX as the primary antiseptic in dentistry. However, the results also suggest that TauBr, due to its strong antibacterial, anti-oxidant and anti-inflammatory properties, may be used alternatively or in combination with CHX in a treatment of oral biofilm-associated infections, especially in those accompanied with local oxidative stress.

## 9. Piśmiennictwo:

**[Zebrane piśmiennictwo obejmuje artykuły cytowane w tekście oraz artykuły ściśle związane z tematyką pracy doktorskiej i zalecane do przeczytania]**

- Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. (2002) Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *J. Dent. Res.* 81(6):411-5.
- Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. (2007) Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 132(6):815-21.
- Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. (2002) Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle. Orthod.* 72(4):338-43.
- Arweiler NB, Ausschill TM, Sculean A. (2012) Antibacterial effect of taurolidine (2%) on established dental plaque biofilm. *Clin. Oral. Investig.* 16(2):489-494.
- Babior BM. (1978) Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. *Engl. J. Med.* 298:659-668.
- Baboni FB, Guariza Filho O, Moreno AN, Rosa EA. (2010) Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 138(4):427-34.
- Baczyk-Łopuch O, Loster BW. (2010) Adhezja bakterii z rodzaju *Streptococcus mutans* do zamków ortodontycznych oraz ryzyko demineralizacji szkliwa u pacjentów leczonych stałymi aparatami cienkołukowymi. *Poradnik Stomatologiczny.* X,3; 88-91.
- Barua M, Liu Y, Quinn MR. (2001) Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. *J Immunol.* 167(4):2275-81.
- Bashetty K, Hegde J. (2010) Comparison of 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite irrigating solutions on postoperative pain: a randomized clinical trial. *Indian J Dent Res.* 21(4):523-7.
- Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. (2007) Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 33(8):966-9.
- Benson PE, i wsp. (2005) Fluorides, orthodontics and demineralization: a systemic review. *J. Orthod.* 32: 102-114.

- Bonez PC, Dos Santos Alves CF, Dalmolin TV, Agertt VA, Mizdal CR, Flores Vda C, Marques JB, Santos RC, Anraku de Campos MM. (2013) Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control*. 41(12):119-22.
- Brusca MI, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa AC. (2007) Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod*. 77(2):331-6.
- Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. (2008) Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod*. 34(2):181-5.
- Busscher HJ, i wsp. (1984) Measurements of the surface free energy of bacterial surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol*. 48:980-983.
- Carr AC, JJ van der Berg, and Winterbourn CC. (1998) Differential reactivities of hypochlorous and hypobromous acids with purified Escherichia coli phospholipids: formation of haloamines and halohydrins. *Biochim. Biophys. Acta*. 15: 254-264.
- Chin MYH. (2007) *Biofilms in Orthodontics*. Haren, Netherlands Drukkerij G. Van Ark
- Chin MY, Busscher HJ, Evans R, Noar J, Pratten J. (2006) Early biofilm formation and the effects of antimicrobial agents on orthodontic bonding materials in a parallel plate flow chamber. *Eur. J. Orthod*. 28(1):1-7.
- Choraży M, Kontny E, Marcinkiewicz J, Maślinski W. (2002) Taurine chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Amino Acids*. 23: 407-413.
- Coraça-Huber DC1, Ammann CG, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Nagl M. (2014) Bactericidal activity of N-chlorotaurine against biofilm-forming bacteria grown on metal disks. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(4):2235-9.
- Cugini C, Klepac-Ceral V, Rackaityte E i inni. (2013) Porphyromonas gingivalis: keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol*. 5.
- Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR i inni. (2013) Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular Candida albicans. *Int J Oral Sci*. 5(1): 32-6.
- Demling A, Elter C, Heidenblut T, Bach FW, Hahn A, Schwestka-Polly R, Stiesch M, Heuer W. (2010) Reduction of biofilm on orthodontic brackets with the use of a polytetrafluoroethylene coating. *Eur. J. Orthod*. 32(4):414-8.

- Demling A, Heuer W, Elter C., Heidenblut T, Bach FW, Schwestka-Polly R, Stiesch-Scholz M. (2009) Analysis of supra- and subgingival long-term biofilm formation on orthodontic bands. *Eur J Orthod.* 31(2):202-6.
- Diedrich P. (2004) *Stomatologia praktyczna. Ortodoncja II.* Wyd. Med. Urban&Partner. Wrocław.
- Eick S, Radakovic S, Pfister W, Nietzsche S, Sculean A. (2012) Efficacy of taurolidine against periodontopathic species--an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 16(3):735-43.
- Eliades T, Eliades G, Brantley WA. (1995) Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 108(4):350-60.
- Fournier A, Payant L, Bouclin R (1998) Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* (4):414.
- Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS i wsp. (2011) Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 140(4):193-8.
- Gaut JP, Yeh GC, Tran HD, Byun J, Henderson JP, Richter GM, Brennan ML, Lulis AJ, Belaouaj A, Hotchkiss RS, Heinecke JW. (2001) Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 11961-11966.
- Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. (2002) Taste confusions following Chlorhexidine treatment. *Cem. Senses.* 27: 73-80.
- Głowacki R, Tomaszewski KA, Stręk P, Tomaszewska IM, Zgórska-Świerzy K, Markiewicz B, Składzień J. (2014) The influence of bacterial biofilm on the clinical outcome of chronic rhinosinusitis: a prospective, double-blind, scanning electron microscopy study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 271(5):1015-21.
- Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. (2013) Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 24(2):89-102.
- Gottardi W, Hagleitner M, Nagl M. (2001) The influence of plasma on the disinfecting activity of the new antimicrobial agent N-chlorotaurine-sodium in comparison with chloramine T. *J. Pharmacy Pharmacol.* 53: 689-97.

- Gottardi W, Klotz S, Nagl M. (2014) Superior bactericidal activity of N-bromine compounds compared to their N-chlorine analogues can be reversed under protein load. *J Appl Microbiol.* 116(6):1427-37.
- Gottardi W, Nagl M. (2010) N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 399-409.
- Gottardi W, Nagl M. (2002) Chemical properties of N-chlorotaurine sodium, a key compound in the human defence system. *Arch Pharm.* 335(9): 411-21.
- Guggenheim B, Meier A. (2011) In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* 121(5):432-41.
- Hadler-Olsen S, Sandvik K, El-Agroudi M.A, Øgaard B. (2012) The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen--a prospective study. *Eur J Orthod.* 34(5):633-9.
- Hahnel S, Ettl T, Gosau M, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. (2008) Influence of saliva substitute films on the initial adhesion of *Candida albicans* to dental substrata prior to and after artificial ageing. *Arch Oral Biol.* 55(5):391-6.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 92: 3007-3017.
- He XS, Shi WY. (2009) Oral microbiology: past, present and future. *Int. J. Oral. Sci.* 1(2):46-58.
- Henderson JP, Byun J, Williams MV, i wsp. (2001) Production of brominating intermediates by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 11: 7867-7875.
- Heczko PB. (2007) *Mikrobiologia.* PZWŁ.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. (2009) Bacterial interactions in dental biofilm development. *J. Dent. Res.* 88(11):982-90.
- Huang R, Li M, Gregory RL. (2011) Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2(5):435-43.
- Ize-Iyamu IN, Ogbogu P. (2011) Nickel chromium brackets and its effect on the oral microflora. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 40(4):367-71.
- Jabłońska-Zrobek J, Śmiech-Słomkowska G. (2005) Ryzyko próchnicy podczas leczenia ortodontycznego aparatem stałym. *Czas Stomatol LVIII.* 7: 514-519.



- Jańczuk Z. (2004)[A] Stomatologia Zachowawcza. PZWL, Warszawa .
- Jańczuk Z. (2004)[B] Praktyczna Periodontologia Kliniczna. Kwintesencja.
- Kanayama A, Inoue J, Sugita-Konishi Y, Shimizu M, and Miyamoto Y. (2002) Oxidation of Ikappa Balpha at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* 277:24049-24056.
- Karale R, Thakore A, Shetty V. (2011) An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency altering current and 2% chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 14(1): 2-5.
- Karłowska I, (2009) Zarys współczesnej ortodoncji, PZWL, 2009.
- Keni NN, Aras MA, Chitre V. (2012) Chlorhexidine allergy due to topical application. *Indian J Dent Res.* 23(5):674-6.
- Kim C, Cha YN. (2009) Production of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes is regulated by taurine chloramine. *Adv Exp Med Biol.* 643:463-72.
- Kim C, Choi HS, Kim JW. (2006) Taurine chloramine inhibits the production of nitric oxide and superoxide anion by modulating specific mitogen-activated protein kinases. *Adv Exp Med Biol.* 583:493-8.
- Kim KS, Park EK, Ju SM, Jung HS, Bang JS, Kim C, Lee YA, Hong SJ, Lee SH, Yang HI, Yoo MC. (2007) Taurine chloramine differentially inhibits matrix metalloproteinase 1 and 13 synthesis in interleukin-1beta stimulated fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 9: R80.
- Klebanoff SJ. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 77:598-625.
- Klebanoff SJ, Hamon CB. (1992) Role of myeloperoxidase mediated antimicrobial system in intact leukocytes. *J. Reticuloendthel. Soc.* 12: 170-175.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. (2002) Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3):476-495.
- Komorowska A. (2009) Materiały i techniki ortodontyczne. PTO.

- Kontny E, Szczepańska K, Kowalczewski J, Kurowska M, Janicka I, Marcinkiewicz J, Maśliński W. (2000) The mechanism of taurine chloramine inhibition of cytokine (interleukin-6, interleukin-8) production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 43: 2169-2177.
- Kontny E, Chorąży-Massalska M, Rudnicka W, Marcinkiewicz J, Maśliński W. (2006) Cytotoxicity of taurine metabolites depends on the cell type. *Adv. Exp. Med. Biol.* 583: 157-171.
- Kontny E, Chorąży-Massalska M, Rudnicka W, Marcinkiewicz J, Maśliński W. (2007) Comparison of taurine chloramine and taurine bromamine effects on rheumatoid arthritis synoviocytes. *Amino Acids.* 32: 447-452.
- Koprowski M. (2005) Rola pochodnych tauryny w ostrej reakcji zapalnej. *Rozprawa doktorska.*
- Kravitz ND, Kusnoto B. (2007) Risks and complications of orthodontic miniscrews. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 131(4 Suppl):S43-50.
- Learn DB, Fried VA, Thomas EL. (1990) Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 48, 174-182.
- Lee SP, Lee SJ, Lim BS i wsp. (2009) Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. *Angle Orthod.* Mar. 79(2):353-60.
- Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. (2010) Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci.* 18(1):50-8.
- Law V, Seow WK. (2007) A longitudinal study of 0.2% chlorhexidine gel for removal of mutans streptococci infection in preschool children. *Aust Dent J.* 52(1): 26-32.
- Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. (2010) Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci.* 18(1):50-8.
- Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. (2008 ) Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 133(6):882-8.
- Lindel ID, Elter C, Heuer W, Heidenblut T, Stiesch M., Schwestka-Polly R., Demling AP. (2011) Comparative analysis of long-term biofilm formation on metal and ceramic brackets. *Angle Orthod.* 81(5):907-14.

- Luddin N, Ahmed HM. (2013) The antibacterial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: A review on agar diffusion and direct contact methods. *J Conserv Dent*. 2013; 16(1): 9-16.
- Mainnemare A, Mégarbane B, Soueidan A, Daniel A, Chapple IL. (2004) Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. *J Dent Res*. 83(11):823-31.
- Malicka B, Ziętek M, Grzebieluch W. (2005) Zastosowanie chlorheksydyny w stomatologii. *Dent Med Probl*. 42: 3: 497-505.
- Marcinkiewicz J. (2009) Taurine bromamine: a new therapeutic option in inflammatory skin diseases. *Polish Arch Internal Med*. 119: 673-675.
- Marcinkiewicz J. (1997) Neutrophils chloramines – missing link between innate and acquired immunity. *Immunol. Today*. 18: 677-580.
- Marcinkiewicz J. (1997) Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacology*. 37: 35-41.
- Marcinkiewicz J, Biedroń R, Białecka A, Kasprowicz A, Mak M, Targosz M. (2006) Susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* to killing by MPO-halide system products. Implication for taurine bromamine as a new candidate for topical therapy in treating acne vulgaris. *Arch. Immunol Ther Exp (Warsz)*. 54(1):61-8.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Bryniarski K, Nowak B. (1998) Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. *Immunopharmacology*. 40(1):27-38.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. (1995) Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 58(6):667-74.
- Marcinkiewicz J, Kontny E. (2012) Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids*. Jul 19. [Epub ahead of print].
- Marcinkiewicz J, Kurnyta M, Biedroń R, Bobek M, Kontny E, Maśliński W. (2006) Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol*. 583:471-92.

- Marcinkiewicz J, Mak M, Bobek M, Biedroń R, Białecka A, Koprowski M, Kontny E, Maśliński W. (2005) Is there a role of taurine bromamine in inflammation? Interactive effects with nitrite and hydrogen peroxide. *Inflamm. Res.* 54(1):42-9.
- Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E. (2013) Antibiotic resistance: a "dark side" of biofilm-associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn.* 123(6):309-13.
- Marcinkiewicz J, Strus M, Walczewska M, Machul A, Mikołajczyk D. (2013) Influence of taurine haloamines (TauCl and TauBr) on the development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm - A preliminary study. *Adv. Exp. Med. Biol.* 775:269-83.
- Marcinkiewicz J, Walczewska M, Olszanecki R, Bobek M, Biedroń R, Dulak J, Józkowicz A, Kontny E, Maśliński W. (2009) Taurine haloamines and heme oxygenase-1 cooperate in the regulation of inflammation and attenuation of oxidative stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 643:439-49.
- Marcinkiewicz J, Wojas-Pelc A, Walczewska M, Lipko-Godlewska S, Jachowicz R, Maciejewska A, Białecka A, Kasprówicz A. (2008) Topical taurine bromamine, a new candidate in the treatment of moderate inflammatory acne vulgaris: a pilot study. *Eur. J. Dermatol.* 18(4):433-9.
- Marsh P, Martin M. (1994) *Mikrobiologia jamy ustnej*. PWN.
- Marsh PD, Moter A, Devine DA. (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol.* 2000. 55(1):16-35.
- Mazur M. i wsp. (2008) Powikłania leczenia ortodontycznego aparatami stałymi i ruchomymi u pacjentów w wieku rozwojowym. *Implantoprotetyka.* IX, 4: 34-38.
- Minguez-Serra MP, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ. (2009) Chlorhexidine in the prevention of dry socket: effectiveness of different dosage forms and regimens. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 1;14(9):445-9.
- Nagl M, Hess MW, Pfaller K, Hengster P, Gottardi W. (2000) Bactericidal activity of micromolar N-chlorotaurine: evidence for its antimicrobial function in the human defense system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(9):2507-2513.
- Nagl M, Miller B, Daxecker F, Ulmer H, Gottardi W. (1998) Tolerance of N-chlorotaurine, an endogenous antimicrobial agent, in the rabbit and human eye--a phase I clinical study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 14(3):283-90.

- Nagl M, Nguyen VA, Gottardi W, Ulmer H, Höpfl R. (2003) Tolerability and efficacy of N-chlorotaurine in comparison with chloramine T for the treatment of chronic leg ulcers with a purulent coating: a randomized phase II study. *Br J Dermatol.* 148(3):590-7.
- Naranjo AA, Triviño ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. (2006) Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 130(3):275:17-22.
- Nowicki J B, Sem DS. (2011) An *in vitro* spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixtin sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 37; 983-988.
- Olszanecki R, Marcinkiewicz J. (2004) Taurine chloramines and Taurine bromamine induce heme-oxygenase-1 in resting and LPS-stimulated J774.2 macrophages. *Amino Acids.* 27, 29-35.
- Panuszka J, Stós W, Wites M. (2003) Pierścienie, zamki i materiały adhezyjne stosowane we współczesnej ortodonecji w leczeniu aparatami stałymi. *Poradnik Stomatologiczny.* 8: 5-10.
- Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. (2007) Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 77(6):1090-5.
- Papaioannou W, Panagopoulos A, Koletsi-Kounari H, Kontou E, Makou M. (2012) Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and Biofilm Formation on Different Types of Orthodontic Brackets. *Int J Dent.* 461380.
- Park EG, Schuller-Levis JH, Jia, Quinn MR. (1997) Preactivation exposure of RAW 264.7 cells to taurine chloramines attenuates subsequent production of nitric oxide and expression of iNOS mRNA. *J. Leukoc. Biol.* 61: 161-166.
- Park E, Schuller-Levis G, Quinn MR. (1995) Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and TNF-alpha in activated RAW 264.7 cells by mechanisms that involve transcriptional and translational events. *J Immunol.* 154:4778-84.
- Pasich E, Bialecka A, Marcinkiewicz J. (2013) Efficacy of taurine haloamines and chlorhexidine against selected oral microbiome species. *Med Dosw Mikrobiol.* 65(3):187-96.
- Pasich E, Walczewska M, Pasich A, Marcinkiewicz J. (2013) Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 67:736-41. Review. Polish.

- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. (2006) The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* .2000. 42:80-7.
- Pathak AK, Sharma DS. (2013) Biofilm associated microorganisms on removable oral orthodontic appliances in children in the mixed dentition. *J Clin Pediatr Dent*. 37(3):335-9.
- Peixoto IT, Enoki C, Ito IY i wsp. (2011) Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: A randomized clinical investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 140(1):51-7.
- Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell DA Jr, Maier T, Machida CA. (2009) Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop*.135(4):426:1-9; discussion 426-7.
- Proffit WR, Fields HW Jr, Sarver DM. (2010) *Ortodoncja współczesna. Tom drugi*. Wyd. Elsevier Urban&Partner. 67-101.
- Quirynen M, Bollen CM. (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 22(1):1-14.
- Puig Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. (2008) Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 13(4):257-60.
- Resmiye-Ebru T, Haluk B, Gülden E. (2012) In vitro antimicrobial activity of Sodium hypochlorite, Chlorhexidine gluconate and Octenidine Dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 17(3): 517-522.
- Rerhrhaye W, Ouaki B, Zaoui F, Aalloula E. (2011) [The effect of autoclave sterilization on the surface properties of orthodontic brackets after fitting in the mouth]. *Odontostomatol. Trop*. 34(136):29-34.
- Rossi-Fedele G, Dođramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. (2013) Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod*. 38(4):426-31.
- Salyers A, Whitt D. (2001) *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*. PWN.
- Samaranayake LP. (2002) *Podstawy mikrobiologii dla stomatologów*. PZWL.

- Sari E, Birinci I. (2007) Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients. *Angle Orthod.* 77(5):881-4.
- Sbordone L, Bortolaia C. (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig.* 7(4):181-8.
- Shimotoyodome A, Koudate T, Kobayashi H, Nakamura J, Tokimitsu I, Hase T, Inoue T, Matsukubo T, Takaesu Y. (2007) Reduction of *Streptococcus mutans* adherence and dental biofilm formation by surface treatment with phosphorylated polyethylene glycol. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50(10):3634-41.
- Silla MP, Company JMM, Silla JMA. (2008) Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 13(4): 257-60.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56:187-209.
- Strużycka I. (2010) Biofilm – współczesne spojrzenie na etiologie próchnicy *Dental forum* (1) 38: 73-79.
- Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. (2001) Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod.* 23(5):465-84.
- Śmiech-Słomkowska G, Jablonska-Zrobek J. (2003) Higiena jamy ustnej pacjentów leczonych stałymi aparatami ortodontycznymi. *Mag Stomatol.* 9: 19-20.
- Śmiech Słomkowska G, Strzecki A. Wpływ leczenia aparatami stałymi na formowanie biofilmu w jamie ustnej. (2009) *Orthodontic forum.* (5): 104-117.
- Thomas EL. (1979) Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: effect of exogenous system on antibacterial action against *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 25:110-114.
- Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM. i wsp. (1995) Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 2906-2913.
- Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. (1986) Preparation and characterization of chloramines. *Meth Enzymol.* 132: 569-571.
- Thomas JE, Sem DS. (2010) An *in vitro* spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 36; 315-317.

- Tokunaga S, Kanayama A, Miyamoto Y. (2007) Modification of I $\kappa$ B $\alpha$  by taurine bromamine inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *Inflamm. res.* 56: 479-486.
- Türkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. (2005) Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod.* 75(2):231-6.
- van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. (2011) Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal parameters after removal of fixed orthodontic appliances. *Eur J Orthod.* 33(1):15-21.
- van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Pauwels M., Coucke W, Carels C. (2009) Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *Angle Orthod.* 79(5):915-21.
- van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. (2007) Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *J Clin Periodontol.* 34(5):423-31.
- Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. (2012) Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.* 61(9):399-419.
- Walczewska M, Bialecka A, Gacon A, Pasich E, Kasprowicz A, Marcinkiewicz J. (2013) Effect of selected biofilm inhibitors, N-acetylcysteine and DNase, on some biological properties of taurine haloamines (TauCl and TauBr) . *Centr Eur J Immunol.* 38 (4): 434-442.
- Walczewska M, Marcinkiewicz J. (2011) Taurine chloramine and its potential therapeutical application. *Przegl Lek.* 68(6):334-8.
- Weiss SJ, Klein R, Slivka A, i wsp. (1982) Chlorination of taurine by human neutrophils: evidence for hypochlorous acid generation. *J. Clin. Invest.* 70:598-603.
- Whiteman M, Hooper DC, Scott GS, Koprowski H, Halliwell B. (2002) Inhibition of hypochlorous acid-induced cellular toxicity by nitrite. *J Clin Invest.* 99:12061-12066.
- Williams D, Lewis M. (2011) Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol.* doi: 10.3402/jom.v3i0.5771.
- Wites M, Panuszka J, Dyras M. (2003) Evaluation of oral and orthodontic appliance hygiene in orthodontically treated patients. *Przegl Lek.* 60:6:126-8.



Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Hayashi M, Ebisu S. (2013) Porphyromonas gingivalis biofilms persist after chlorhexidine treatment. Eur J Oral Sci. 121(3 Pt 1):162-8.

Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D. (1987) Killing of schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37, 106-110.

Yeung SY, Huang CS, Chan CP, Lin CP, Lin HN, Lee PH, Jia HW, Huang SK, Jeng JH, Chang MC. (2007) Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. Int Endod J. 40(11):837-44.

## **10. Załączniki**

### **Nr 1**

„Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej” Ewa Pasich, Maria Walczewska, Adam Pasich, Janusz Marcinkiewicz. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2013; 67: 736-741.

### **Nr 2**

Oświadczenie autorów