

Biofilm of dental plaque and its involvement in dogs and cats oral cavity diseases

Dardzińska W., Dworecka-Kaszak B., Division of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This paper aims at the presentation of an important, bacteriological aspects of oral cavity diseases in companion animals. In dogs and cats excessive tartar formation, food residues and bacteria that collect in the space between the gum and the lower part of the tooth crown are directly associated with development of periodontal disease. Periodontal diseases have been described as inflammation of the supporting tissues of the teeth. If unchecked, the infection spreads to the root of the tooth. The inflammation leads to pocket formation in the gingival tissue, loss of attachment, local bone destruction and tooth loss. Although these are multifactorial diseases, the major cause remains the dental plaque formation and its biofilm. Dental plaque forms on the teeth surface and comprises of the community of certain species of microorganisms and the biofilm embedded in matrix of polymers of host and bacterial origin.

Keywords: biofilm, dental plaque, periodontitis, dogs, cats.

Choroby przyzębia stanowią jeden z częstszych problemów zdrowotnych zwierząt towarzyszących. Cierpi na nie ponad 80% psów i 70% kotów w wieku powyżej 2. roku życia (1, 2). Tradycyjnie wśród chorób tych rozróżnia się dwie kliniczne postaci: zapalenie dziąseł (*gingivitis*) i zapalenie przyzębia (*periodontitis*, paradontoza). Pierwsza z nich jest procesem zapalnym obejmującym tylko dziąsła. Klinicznie charakteryzuje się zaczerwienieniem i obrzękiem dziąseł. Podczas badania sondą periodontologiczną może dochodzić do krwawienia. Więzadła przyzębia i kość zębodołu nie są objęte zapaleniem i przyczep nabłonkowy nie ulega destrukcji, ani nie zmienia swojego naturalnego przebiegu przy granicy szkliwno-cementowej. Zapalenie dziąseł jest procesem odwracalnym jeśli podjęte zostanie leczenie. Nielezione zapalenie dziąseł może przekształcić się w paradontozę, w której przewlekły stan zapalny doprowadza do destrukcji więzadeł przyzębnych, utraty grzebienia zębodołu i dowerzchołkowej migracji nabłonka granicznego, a tym samym do tworzenia kieszeni dziąsłowych. Odpowiednie leczenie *periodontitis* powoduje zahamowanie stanu zapalnego, ale destrukcja tkanek jest nieodwracalna.

Progresja chorób przyzębia prowadzi do wystąpienia poważnych powikłań: miejscowych i ogólnoustrojowych. W badaniu klinicznym u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia obserwuje się krwawienie

Biofilm bakteryjny płytki nazębnej i jego znaczenie w chorobach jamy ustnej psów i kotów

Weronika Dardzińska, Bożena Dworecka-Kaszak

z Zakładu Mikrobiologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

z dziąseł, ruchomość zębów, ropnie przyzębne lub okołowierzchołkowe, wypływ z otworów nosowych, przetoki ustno-nosowe, ropnie zagałkowe, niedrożność lub stan zapalny kanalików nosowo-łzowych, *osteomyelitis*, a nawet patologiczne złamania żuchwy. Powikłania mogą obejmować także przewlekłe zapalenie migdałków, węzłów chłonnych żuchwowych, zagardłowych i przyusznych, a także neuralgię nerwów trójdzielnego i twarzowego.

U pacjentów cierpiących z powodu chorób przyzębia przejściowo może wystąpić bakteriemia. Występuje ona nie tylko podczas skalingu czy ekstrakcji, ale nawet podczas żucia pokarmu, gdy bakterie mogą dostać się do krwioobiegu na poziomie około 1000 razy wyższym niż w czasie ekstrakcji zęba (3). Bakteriemia będąca konsekwencją chorób przyzębia została uznana za przyczynę chorób ogólnoustrojowych, które obejmują bakteryjne zapalenie wsierdza i chorobę niedokrwinną mięśnia sercowego, a także bakteryjne zapalenie płuc (4). De Bowes i wsp. (5) wykazali związek pomiędzy chorobami przyzębia a zmianami histopatologicznymi w nerkach, mięśniach brodawkowatych serca i mięszu wątroby psów.

Biofilm płytki nazębnej

Tworzenie biofilmu bakteryjnego na powierzchni zębów czyli płytki nazębnej odgrywa istotną rolę w patogenezie chorób przyzębia, choć dokładna przyczyna uszkodzenia tkanek nie jest jednoznaczna (6). Choroba przyzębia jest wynikiem interakcji drobnoustrojów i innych czynników związanych z obecnością płytki bakteryjnej oraz reakcji tkanek gospodarza. Nasilenie i postęp choroby jest wypadkową współdziałania wielu czynników, takich jak: rasa zwierzęcia, wiek, predyspozycje genetyczne, specyfika żucia pokarmu, ogólny stan zdrowia, poziom odżywienia, wady zgryzu, a także obecność patogennych bakterii lub brak bakterii pożytecznych w jamie ustnej. Mechanizmy obronne, w tym procesy naprawcze, u zdrowego zwierzęcia sprawnie chronią gospodarza przed działaniem czynników uszkadzających w jamie ustnej. Do uszkodzenia przyzębia dochodzi, gdy równowaga zostaje zachwiana z powodu przewagi czynników

działających destrukcyjnie lub spadku skuteczności mechanizmów obronnych (6).

Przewlekłość chorób przyzębia, tendencja do nawrotów i mała skuteczność podejmowanej terapii farmakologicznej powodują, że zainteresowanie biofilmem płytki nazębnej nie słabnie.

Czym jest biofilm?

Zauważono, że olbrzymia większość bo ponad 95% drobnoustrojów w naturalnym środowisku występuje nie jako pojedyncze, rozproszone komórki, czyli tzw. formy planktoniczne, ale jako zorganizowane, osiadłe kultury, tworzące błonę biologiczną zwaną biofilmem (7). Biofilm stanowi swoistą niszę ekologiczną (8). Zdolność bakterii do tworzenia biofilmu ma ogromne znaczenie w patogenezie chorób zakaźnych i decyduje również o zjadliwości drobnoustrojów. Szacuje się, że zakażenia przebiegające z tworzeniem biofilmu bakteryjnego lub grzybiczego stanowią 65% wszystkich zakażeń (9).

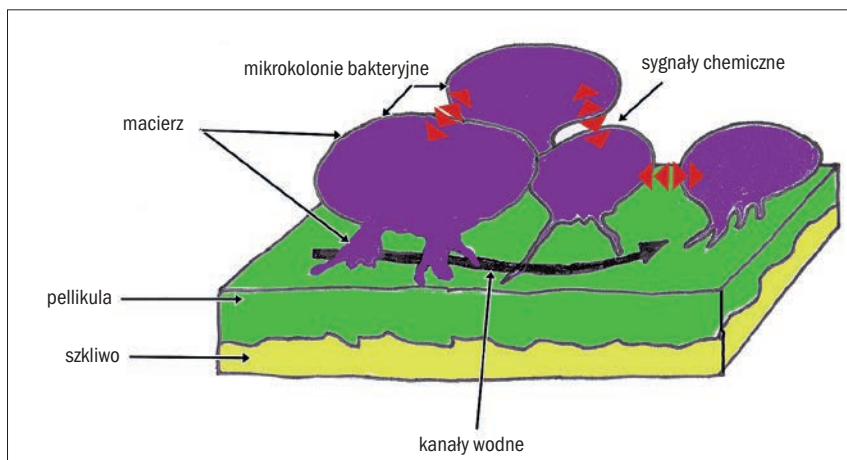
Poznanie mechanizmów funkcjonowania biofilmu bakteryjnego przyczyniło się do zrozumienia patogenyzy wielu chorób. Już w XVII wieku opisywano zdolność do tworzenia „stacjonarnych zespołów komórek zanurzonych w śluzowej substancji pozakomórkowej”, co sugerowało, że forma planktonu swobodnie przemieszczającego się w płynach ustrojowych lub w innym środowisku nie jest podstawową postacią bytowania mikroorganizmów (8). Zastosowanie laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego do obserwacji biofilmu potwierdziło, że jest to wysoce wyspecjalizowana forma życia drobnoustrojów (10).

Biofilm może być utworzony przez skupiska mikrokolonii jednego lub wielu gatunków mikroorganizmów otoczonych zewnątrzkomórkowym amorficznym polimerem (extracellular polymeric substance – EPS). Powstaje on w wyniku warstwowego wzrostu mikroorganizmów układających się w uporządkowane struktury (7, 11). Duża liczba mikrokolonii tworzących biofilm poprzedzielana jest siecią otwartych kanałów, a ciecz w nich krążąca dostarcza tlenu i substancji odżywczych oraz usuwa zbędne produkty przemiany materii. Obecność takich systemów transportu pozwala

utrzymywać wewnątrz biofilmu odpowiednie warunki fizykochemiczne dla wzrostu i przetrwania komórek bakteryjnych. Komórki żyjące w głębszych warstwach korzystają ze składników, które tą drogą zdołają dotrzeć do wnętrza biofilmu (ryc. 1). Warstwowa budowa biofilmu stwarza zróżnicowane warunki środowiskowe, co wpływa na pewną specjalizację i wytwarzanie przez drobnoustroje zróżnicowanych produktów metabolizmu, w tym toksyn. Niektóre z komórek znajdują się w stanie uśpienia-anabiozy, stanowiąc między innymi „depozyt genetyczny” (12) Płytkę nazębną jest klasycznym przykładem biofilmu (13).

Dlaczego środowisko jamy ustnej sprzyja formowaniu biofilmu?

Błona śluzowa jamy ustnej jest pokryta nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, język o brodawkowatej powierzchni



Ryc. 1. Schemat budowy bakteryjnej płytki nazębnej

oraz zęby stanowią oddzielne nisze ekologiczne, chętnie zasiedlane przez bakteryjnych rezydentów w postaci biofilmu (14). Mikrobiotę (mikrobiom), czyli ogół

mikroorganizmów zasiedlających jamę ustną, u psów stanowią drobnoustroje należące do ponad 350 gatunków (15; tab. 1).

Tabela 1. Wybrane gatunki flory bakteryjnej jamy ustnej psów (15)

Gatunek	Barwienie metodą Grama	Kształt	Wykorzystywanie tlenu
<i>Actinomyces canis</i> <i>A. bowdenii</i> <i>A. hordeovulneris</i> <i>A. coleocanis</i>	+	pałeczki i formy nitkowate	względne beztlenowce
<i>Micrococcus luteus</i>	+	ziarniaki	względne tlenowce
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	-	pałeczki	tlenowce
<i>Porphyromonas macae</i> <i>P. gulae</i> <i>P. canoris</i> <i>P. cangingivalis</i> <i>P. cansulci</i>	-	pałeczki	bezwzględne beztlenowce
<i>Campylobacter curvus</i>	-	pałeczki	bezwzględne beztlenowce
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	-	pałeczki	beztlenowce lub kapnofilne
<i>Clostridium perfringens</i>	+	laseczki	beztlenowce
<i>Corynebacterium appendicis</i>	+	pleomorficzne	względne beztlenowce
<i>Dialister invisus</i>	-	ziarniakopałeczki	względne beztlenowce
<i>Filifactor alocis</i> <i>F. villosus</i>	+	pałeczki	względne beztlenowce
<i>Gemella palaticanis</i>	+	ziarniaki	względne beztlenowce
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	-	pałeczki	tlenowce lub względne beztlenowce
<i>Lampropedia hyalina</i>	-	ziarniaki	bezwzględne tlenowce
<i>Neisseria canis</i>	-	ziarniakopałeczki	beztlenowce
<i>Pasteurella dagmatis</i>	-	pałeczki	względne beztlenowce
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	ziarniaki	beztlenowce
<i>Micromonas micros</i>	+	ziarniaki	beztlenowce
<i>Propionibacterium acnes</i>	+	pałeczki	beztlenowce
<i>Dietzia psychralcaliphila</i>	+	pałeczki	tlenowce
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	ziarniaki	względne tlenowce
<i>Streptococcus minor</i> <i>S. bovis</i>	-	ziarniaki	tlenowce
<i>Wolinella succinogenes</i>	-	pałeczki	beztlenowce

Jama ustna to środowisko stale zwilżane śliną, która odgrywa znaczącą rolę w selekcji populacji drobnoustrojów. Bakterie namnażające się na grzbiecie języka oraz na powierzchni zębów swobodnie przemieszczają się w środowisku płynnym, jakim jest ślina, podczas jedzenia i ruchów tkanek miękkich jamy ustnej. Ślina zawiera także różne czynniki działające przeciwbakteryjnie, takie jak: swoiste przeciwciała, układ peroksydazy ślinowej, wolne rodniki, lizozym, laktoferynę oraz glikoproteiny mogące wybiórczo aglutynować paciorkowce (aglutyniny). Paradoksalnie, poza aktywnością przeciwbakteryjną, ślina może przyczynić się też do tworzenia płytki bakteryjnej, ponieważ jest bogatym podłożem dla mikroorganizmów, które przystosowały się do życia w jamie ustnej. Drobnoustroje te rozpoczynają kolonizację, tworząc tzw. wczesną płytkę, wykorzystując jako składniki pokarmowe obecne w ślinie glikoproteiny, glukozę, cytryniany i mocznik (16). W środowisku jamy ustnej często dochodzi do przemieszczania się drobnoustrojów między jej poszczególnymi niszami. Zmiana składu rezydualnej bioty może stać się jedną z przyczyn chorób jamy ustnej (13).

Jak powstaje biofilm? Ekologia, dynamika i architektura płytki nazębnej

Płytkę nazębną tworzą skupiska bakterii przylegających do powierzchni zębów lub błony śluzowej dziąseł, powleczone cienką warstwą śluzu. Płytkę jest złożoną dynamiczną strukturą, w której mikroorganizmy funkcjonują jak organizm wielokomórkowy. Sąsiadujące ze sobą skupiska mikroorganizmów wytwarzają wokół siebie wspólną otoczkę, tzw. macierz, do której wydzielają różne substancje. Głównymi składnikami macierzy są polimery (najczęściej polisacharydy) i woda. Procentowy udział wody w macierzy biofilmów dochodzi nawet do 97%. Zdolność polimerów macierzy do cyklicznego gromadzenia i oddawania wody nadaje jej cechy hydrożelu. Biofilmy niezwykle trudno oderwać od podłoża. Dodatkowo hydrożelowa macierz skutecznie chroni mikroorganizmy biofilmu przed wysuszeniem. Macierz jest nie tylko spoiwem biofilmu, gdyż również umożliwia wzajemną komunikację tworzących go komórek i pomiędzy środowiskiem, zapewniając stałe warunki, chroniąc także przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi, wahaniami temperatury i pH oraz wysoką koncentracją szkodliwych substancji. Macierz powstaje z produktów gospodarza, takich jak: glikoproteiny śliny, obumarłe komórki i białka surowicy, a częściowo z produktów bakteryjnych, takich jak polisacharydy. Ilość

macierzy w płytce naddziąsłowej i poddziąsłowej jest różna, stanowi około 50% płytki naddziąsłowej, a w płytce poddziąsłowej może występować w znikomej ilości (6).

Skład populacji drobnoustrojów tworzących płytkę nazębną może być bardzo zróżnicowany, zależny też od fazy narastania płytki. Przykładowo bakterie tworzące wczesną, cienką płytkę naddziąsłową są zwykle tlenowcami lub względnie beztlenowcami i fermentują węglowodany (np. *Streptococcus* spp.). Gdy płytka staje się grubsza, pojawiają się w niej drobnoustroje o kształcie cylindrycznym i metabolizmie beztlenowym (np. *Actinomyces* spp.). Drobnoustroje tworzące płytkę poddziąsłową muszą być zdolne do przeżycia w warunkach małej dostępności tlenu, co wymusza wzrost beztlenowców (np. *Porphyrromonas* spp. i *Fusobacterium* spp.), które, aby uzyskać energię, rozkładają białka i peptydy (6).

Biota płytki nazębnej ciągle przystosowuje się do zmian środowiskowych wywołanych wpływami zewnętrznymi, takimi jak: zróżnicowana dieta, leczenie antybiotykami i wahania w zakresie reaktywności układu odpornościowego gospodarza. Podczas formowania płytka nazębna ulega też różnego rodzaju presjom środowiskowym.

Pierwszym etapem tworzenia biofilmu jest przyleganie wolno żyjących drobnoustrojów do podłoża. Biofilmy tworzą się niezależnie od rodzaju na każdej powierzchni, która stanowi granicę faz:

- na powierzchniach stałych otoczonych powietrzem lub zanurzonych w cieczy,
- na wierzchniej warstwie płynów lub na styku dwóch różnych płynów.

Biofilmy chociaż występują w bardzo różnorodnych środowiskach, zazwyczaj przybierają podobne formy. Adhezja mikroorganizmów bytujących w jamie ustnej jest procesem przebiegającym w sposób przewidywalny i powtarzalny; bezpośrednio po kontakcie z powierzchnią stałą bakterie osiadają na niej, tworząc nową mikrokolonie lub powiększając już istniejącą. Czysty hydroksypapatyt powierzchni zęba jest doskonałym podłożem – w ciągu kilku minut pokrywa się zdenaturowanymi białkami śliny, takimi jak glikoproteiny (mucyny) czy immunoglobuliny, a także komórkami nabłonka i neutrofilami obojętnochołonnymi, tworząc w ten sposób tzw. osłonkę nabytą – pellikulę (6).

Rozwój biofilmu jest procesem złożonym, zależnym zarówno od właściwości organizmów, jak i od czynników środowiska, w którym powstaje. Wczesna faza adhezji polega na odwracalnym przyleganiu drobnoustrojów dzięki prostym wiązaniom chemicznym (siłom van der Waalsa, siłom elektrostatycznym i hydrofobowym). Istotną rolę w fazie adhezji odgrywają

niektóre struktury powierzchniowe komórek bakteryjnych, a zwłaszcza fimbrie. Na fimbriach występują grupy hydrofobowe, dzięki którym bakterie łatwiej pokonują siły odpychania pomiędzy ujemnie naładowanymi komórkami gospodarza i powierzchnią drobnoustroju, co oznacza, że drobnoustroje posiadające fimbrie znacznie szybciej przylegają niż szczepy ich nie posiadające (11, 17). W wyniku specyficznych procesów chemicznych bakterie kolonizują podłoże w sposób nieodwracalny. Zachodzi wówczas interakcja typu „klucz-zamek”, polegająca na połączeniu adhezyny bakteryjnej i określonego ligandu na powierzchni. Kluczowe znaczenie w tworzeniu struktury biofilmu przypisuje się wielocukrom zewnątrzkomórkowym, zawierającym m.in. mannozę i reszty glikozydowe, które uwalniane do otoczenia wchodzi w skład śluzu. Macierz biofilmu powiększa się poprzez dodawanie zewnątrzkomórkowo dwucukrów.

Po etapie adhezji rozpoczyna się namnażanie drobnoustrojów oraz ich różnicowanie. Na podłożu pierwotnie pokrytym jedną warstwą komórek drobnoustrojów spójonych polimerem zewnątrzkomórkowym powstaje wielokomórkowa, wielowarstwowa rozbudowana struktura, do powierzchni której przylgają się nowi rezydenci.

Tworzenie warstw drobnoustrojów w biofilmie płytki nazębnej jest procesem dynamicznym. Adhezja, wzrost, usuwanie, wtórne przyleganie są procesami ciągłymi, a płytka ulega ciąglej reorganizacji. Powierzchnia dojrzałego biofilmu stanowi źródło stale uwalnianych się komórek, które mogą zapoczątkować tworzenie zróżnicowanych struktur w innych lokalizacjach lub przechodzić w krążącą w płynach ustrojowych postać planktonoidalną, co stanowi podstawę tworzenia przerzutowych ognisk zakażenia w tkankach i narządach (17).

Na oczyszczonej powierzchni zębów w ciągu kilku minut powstaje osłonka nabyta – pellikula, w której po 8 godzinach stwierdza się pojedyncze skupiska bakterii. Po 12 godzinach następuje gwałtowny wzrost liczby drobnoustrojów i w rezultacie po upływie doby powierzchnia korony zęba jest całkowicie pokryta bakteriami, głównie ziarniakami. Po upływie 48 godzin następuje kolonizacja bakteriami nitkowatymi. W pierwszych dniach wzrost płytki jest wynikiem podziału komórek bakteryjnych, a w mniejszym stopniu adsorpcji pojedynczych drobnoustrojów ze śliny. W kilkudniowej płytce w powierzchniowej warstwie wokół bakterii nitkowatych skupiają się ziarniaki. W głębszej warstwie obserwowane są Gram-dodatnie pleomorficzne bakterie, tworzące palisady (18).

Po około 9 dniach, wraz ze zwiększeniem grubości płytki, obniża się w niej

stężenie tlenu, co prowadzi do dominacji drobnoustrojów względnie beztlenowych i beztlenowych.

W ciągu kilku tygodni ustala się pewna równowaga między gatunkami drobnoustrojów tworzącymi płytkę nazębną. Jest ona określana jako „płytkę dojrzała”. W płytce dojrzałej martwe bakterie są zastępowane przez nowe (18).

Tworzenie się kamienia nazębnego

Jony wapniowe i fosforowe pochodzące ze śliny mogą zostać odłożone w grubszej warstwie płytki nazębnej. Gdy płytka nazębna się rozrasta, obumierające bakterie sprzyjają jej mineralizacji. Proces przyspieszają bakteryjne fosfatazy i proteazy, które niszczą sterynę i białka bogate w prolinę. Procesy te prowadzą do powstania nierozpuszczalnych kryształów fosforanu wapnia, które zlewając się, tworzą masę płytkową, zwaną kamieniem (ryc. 2).

Z reguły dojrzały kamień nazębny składa się w 80% ze zmineralizowanego materiału, głównie hydroksyapatytu, który stanowi rusztowanie dla składników organicznych. W zewnętrznej warstwie kamienia dominują ziarenkowce, pałeczki i bakterie nitkowate. Bakterie osadzające się w pobliżu szkliwa mają obkurzoną cytoplazmę, co może sugerować, że są metabolicznie nieaktywne. Ziarenkowce przylegają i namnażają się, tworząc strukturę podobną do kolby kukurydzy. Bakterie nitkowate ustawiają się pod kątem prostym do powierzchni szkliwa, co nadaje wygląd palisady i przypomina widok książek ułożonych na półce (4, 18). Z kolei ziarenkowce gromadzą w swojej cytoplazmie ziarna glikogenu, co stanowią zapas substancji odżywczych w niekorzystnych warunkach (4).

Kamień nazębny działa drażniąco na tkanki przyzębia. Ponadto szorstka, nierówna powierzchnia kamienia stwarza doskonałe miejsce do retencji płytki nazębnej.

Zdobywanie składników pokarmowych przez drobnoustroje płytki

Ze względu na zmienne warunki odżywcze w jamie ustnej, zależne od dostarczanych z pożywieniem składników, drobnoustroje wykazują dużą zmienność metaboliczną. Drobnoustroje płytki naddziąsłowej pozyskują najwięcej składników odżywczych ze śliny, a bakterie tworzące płytkę poddziąsłową z kolei uzyskują substancje odżywcze z płynu kieszonkowego – jest on bogaty w białka i czynniki wzrostu, np. hem.

W biofilmie płytki nazębnej występuje rozbudowany zespół zależności pokarmowych, łączących tworzące je gatunki drobnoustrojów w stały ekosystem. Stężenie różnych związków chemicznych w biofilmie zmienia się w zależności od



Ryc. 2. Obfita płytka bakteryjna i kamień nazębny u psa

oddalenia od powierzchni oraz od wzajemnego oddziaływania mikropopulacji w danym miejscu. Pomiędzy komórkami współistniejącymi w jednym biofilmie zachodzą zarówno zjawiska konkurencji o składniki pokarmowe, jak i kooperacji w przetwarzaniu składników środowiska. Niektóre gatunki o właściwościach sacharolitycznych mogą rozkładać zewnątrzkomórkowe wielocukry macierzy, stwarzając tym samym stałe źródło składników pokarmowych dla innych bakterii płytki. Składniki pokarmowe nie w pełni spożytkowane przez jeden gatunek, mogą stać się pokarmem dla innych, np. *Porphyromonas* spp. korzysta z analogów witaminy K i kwasu bursztynowego wydzielanego przez bakterie Gram-dodatnie (odżywianie krzyżowe). Efektem występowania zależności pokarmowych jest ograniczenie bezpośredniego współzawodnictwa między bakteriami do gatunków mających podobne wymagania metaboliczne. Antagonistyczne oddziaływania jednych gatunków na inne mogą być realizowane za pośrednictwem czynników zwanych bakteriocynami, które są wytwarzane zarówno przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne i mogą hamować wzrost konkurencyjnych drobnoustrojów.

Biofilm jako organizm wielokomórkowy

W strukturze dojrzałego biofilmu można wyróżnić wolne przestrzenie, kanały wodne, rusztowania i miejsca o większej gęstości macierzy. Bliska odległość komórek sprzyja wymianie informacji genetycznej poprzez przekazywanie plazmidów, które kodują m.in. oporność na chemioterapeutyki (9, 13, 17).

Dojrzewanie biofilmu wiąże się ze zmianą ekspresji poszczególnych genów

w komórkach bakteryjnych. Komórki wielu gatunków bakterii po przywarciu do podłoża wytwarzają różne białka, które nie występują u drobnoustrojów prowadzących planktonalny tryb życia. Poprzez aktywację lub hamowanie ekspresji niektórych genów przez cząsteczki sygnałowe bakterie zajmujące daną niszę mają zdolność do regulowania procesów metabolicznych w biofilmie. Wykorzystując cząsteczki tzw. poczucia większości, które pozwalają na monitorowanie gęstości populacji komórek w danym miejscu, drobnoustroje komunikują się za pomocą chemicznych sygnałów, tzw. autoinduktorów (18, 19). Bakterie Gram-dodatnie wytwarzają autoinduktory peptydowe, a Gram-ujemne acylowane lakton homoseryny (20). Komunikacja odbywa się poprzez wydzielanie substancji regulatorowych do środowiska zewnętrznego. Substancje te mają zdolność do wnikiwania do cytoplazmy komórek drobnoustrojów i wpływania w określony sposób na ich aktywność metaboliczną. Gdy stężenie cząsteczek sygnałowych przekracza wartość progową, wywołuje zmiany w ekspresji wielu genów, co skutkuje wzmożeniem lub zahamowaniem produkcji białek odpowiedzialnych za zjadliwość, wydzielanie enzymów itp. Możliwość takich oddziaływań w postaci planktonalnej jest niewielka ze względu na małe stężenie autoinduktorów w środowisku (20). Ponadto drobnoustroje biofilmu poddane czynnikiem stresowym mogą wydzielają substancje o charakterze informacyjnym – alarmy, które przygotowują inne komórki na różnego rodzaju stresy czy zagrożenia, np. atak komórek układu obronnego gospodarza (20). Zahamowana może być synteza flagelliny, białka wchodzącego w skład rzęsek bakterii Gram-ujemnych, lub zahamowaniu ulega synteza niektórych enzymów,

np. proteazy i fosfolipazy, a aktywowane są beztlenowe szlaki metaboliczne, takie jak glikoliza i fermentacja.

Innym sposobem komunikowania się drobnoustrojów tworzących biofilm jest wytwarzanie białek szoku cieplnego (heat shock proteins – HSP). W wyniku działania czynników stresowych następuje ekspresja genów odpowiedzialnych za indukowanie produkcji tych białek, które mają na celu ochronę przed negatywnymi skutkami czynników środowiskowych, np. wysoką temperaturą lub substancjami chemicznymi, np. antybiotykami. Wyróżnia się dwie klasy HSP. Pierwszą stanowią proteazy, które inicjują rozpad nieprawidłowo sfałdowanych białek, a drugą białka opiekuńcze, zapobiegające nadmiernej agregacji polipeptydów (21).

Biofilm bakteryjny płytki nazębnej a leczenie chorób jamy ustnej

Do rozwiązania problemów, jakie stwarza obecność płytki bakteryjnej w jamie ustnej u psów i kotów, konieczne jest leczenie przeciwbakteryjne. Leczenie to może obejmować mechaniczne usuwanie bakterii, stosowanie substancji przeciwbakteryjnych oraz ekstrakcję uszkodzonych zębów, aby ograniczyć powierzchnię, na których bakterie ulegają kolonizacji.

Mechaniczne usuwanie bakterii

Efektywna terapia chorób przyzębia wymaga usunięcia płytki nazębnej nad- i poddziąsłowej. Mechaniczne usunięcie płytki naddziąsłowej, tzw. skaling można przeprowadzić za pomocą ultradźwiękowego skalera i instrumentów ręcznych. Polerowanie po wykonanym skalingu jest nieodłącznym elementem zabiegu, gdyż opóźnia ponowne przyleganie bakterii, ponieważ szorstkie powierzchnie sprzyjają ich adhezji i kolonizacji. Strefa poddziąsłowa wymaga użycia specjalnych końcówek do skalerów ultradźwiękowych oraz kiret do oczyszczenia kieszeni przyzębnych. Skuteczne usunięcie płytki poddziąsłowej wymaga delikatnej i precyzyjnej manualnej pracy. Kiretaż poddziąsłowy ma na celu usunięcie zmienionego chorobowo nabłonka kieszonki oraz ziarniny z powierzchni korzenia zęba. Dodatkowo obnażone powierzchnie korzeni powinny zostać wygładzone, a kieszenie patologiczne zlikwidowane poprzez ich wycięcie lub gingioplastykę, czyli odtworzenie prawidłowego konturu dziąsła.

Osiągnięciem ostatnich lat w leczeniu zaawansowanych chorób przyzębia są zabiegi pozwalające na odtworzenie wyrostka zębodołowego czy części zębodołowej poprzez wprowadzenie do ubytku środków pobudzających regenerację tkanek,

jak również ligaturowanie lub szynowanie rozchwianych zębów.

Profilaktyka i zapobieganie nawrotom

Po przeprowadzonym zabiegu sanacji jamy ustnej niezbędne jest systematyczne usuwanie płytki nazębnej przez właściciela zwierzęcia poprzez szczotkowanie zębów oraz stosowanie zaleceń dietetycznych. Płytkę nazębną pokrywa pellikulę już po 24 godzinach od oczyszczenia, stąd wskazane jest wykonywanie dokładnego mycia zębów przynajmniej raz dziennie. Dodatkowo u pacjentów wprowadza się karmy o odpowiedniej twardości, teksturze i rozmiarze granulek. Mogą być one wzbogacone o substancje pokrywające powierzchnie granułek, które w sposób mechaniczny i chemiczny redukują ilość osadów nazębnych.

Leczenie wspomagające polega na stosowaniu w pielęgnacji jamy ustnej: preparatów przeciwbakteryjnych (0,12% diglukonian chlorheksydyny, triklosan, fluor, askorbinian cynku, powidon jodyna 10%), antybiotyków i leków przeciwzapalnych.

Oporność biofilmu na antybiotyki

Antybiotyki mogą być stosowane jako leczenie wspomagające mechaniczne usuwanie płytki nazębnej, szczególnie do ochrony przed skutkami bakteriemii występującej podczas zabiegu. Nie powinny być jednak stosowane rutynowo jako zasadnicza terapia ze względu na dużą oporność bakterii tworzących biofilm płytki nazębnej na większość antybiotyków. *In vitro* wykazano, że zwykle zastosowanie pojedynczego antybiotyku bywa niewystarczające. Stężenie leków przeciwbakteryjnych niezbędnych do eradykacji składników biofilmu musi być nawet kilkusetkrotnie wyższe niż to, które niszczy wolno żyjące bakterie (22, 23). Stosowanie leków przeciwbakteryjnych może na pewien czas zmniejszyć objawy zakażenia, powodując eliminację komórek planktonicznych lub znajdujących się na skraju biofilmu, jednak po zaprzestaniu terapii zwykle dochodzi do nawrotów i wręcz nasilenia objawów, ponieważ nienaruszony wewnątrz biofilm staje się siedliskiem patogenów opornych na antybiotyki (8).

Wyjątkowa niewrażliwość bakterii w biofilmach na substancje przeciwdrobnoustrojowe wynika z faktu, że bakterie żyjące w formie wielokomórkowych skupisk są otoczone lepkiem śluzem, który uniemożliwia dyfuzję substancji przeciwbakteryjnych w głąb biofilmu. Co więcej, metabolizm i podziały komórek bakteryjnych wewnątrz biofilmu są spowolnione, co skutkuje zmniejszeniem wrażliwości komórek na substancje przeciwbakteryjne,

które działają wyłącznie na komórki aktywne metabolicznie i dzielące się (22). Drobnoustroje, które przetrwały antybiotykoterapię potrafią wykorzystać martwe komórki jako źródło składników odżywczych, zatem biofilm może odtwarzać się do początkowych rozmiarów w ciągu kilku godzin (8, 23).

Podsumowanie

Profilaktyka i leczenie chorób przyzębia są istotne dla ogólnego stanu zdrowia i dobrego samopoczucia zwierząt. Zarówno zapobieganie, jak i leczenie chorób przyzębia polega na utrzymywaniu higieny jamy ustnej zwierzęcia oraz opiece stomatologicznej. Następstwa nieleczenia chorób przyzębia mogą być poważne i przyczyniać się do wczesnej utraty uzębienia, a nawet do powstawania ogólnych powikłań zagrażających życiu. Przewlekłe lub ostre stany zapalne dziąseł powodują zniszczenie włókien kolagenowych ozębnej oraz destrukcję wyrostka zębodołowego szczęki lub części zębodołowej zuchwy. Bakterie bytujące w kieszonkach dziąsłowych mogą rozprzestrzeniać się z krwią do tkanek oraz narządów i przyczyniać się do powstawania tzw. chorób ogniskowych. Płytkę nazębną może być rezerwuarem ponad 300 gatunków różnych bakterii, które stanowią ciągłe źródło egzo- i endotoksyn odpowiedzialnych za sekrecję prozapalnych cytokin IL-1 i TNF α oraz prostaglandyn. Drobnoustroje mogą przedostawać się do naczyń wieńcowych serca i do naczyń mózgowych, gdzie wskutek interakcji z płytkami krwi, mogą przyczyniać się do powstawania zatorów, które w efekcie prowadzić mogą do zawałów serca lub udaru mózgowego lub tworzyć tzw. wegetacje na zastawkach serca i powodować zapalenie wsierdza i niedomykalność zastawek. Rozpuszczalne antygeny mogą przedostawać się z jamy ustnej do krwiobiegu, łącząc się ze swoistymi krążącymi przeciwciałami i tworzyć kompleksy immunologiczne, które wychwytywane w kłębuszkach nerkowych, prowadzą do rozwoju różnych postaci kłębuszkowego zapalenia nerek lub są przyczyną zapalenia stawów (4).

Prewencja i leczenie chorób przyzębia jest istotnym elementem zapobiegawczym w odniesieniu do groźnych powikłań zagrażających życiu pacjenta. Najważniejszym aspektem terapii periodontologicznej jest opieka domowa. Nawet najdokładniej przeprowadzone zabiegi usuwania płytki nazębnej będą miały niewielką wartość bez kontynuacji higieny przez właścicieli zwierząt. Kieszonki przyzębne ulegają reinfekcji w ciągu 2 tygodni w przypadku zaprzestania profilaktyki, a ich głębokość w ciągu 6 tygodni osiąga stan wyjściowy, jak przed terapią periodontologiczną (24).

Głównym celem opieki domowej jest ograniczenie narastania lub redukcja ilości płytki bakteryjnej osadzającej się na zębach. Istnieją dwa typy kontrolowania przyrostu płytki nazębnej: aktywny i pasywny (24). Oba są efektywne, jeśli prowadzone są w sposób prawidłowy i regularny. Aktywna opieka domowa polega na szczotkowaniu zębów i/lub płukanie jamy ustnej, np. roztworem chlorheksydyny. Pasywne metody kontrolowania przyrostu płytki nazębnej są realizowane poprzez podawania specjalnych przysmaków lub diet. Udowodniono, iż metody aktywne są skuteczniejsze w przypadku redukcji osadów na zębach siecznych i kłach, a pasywne na zębach przedtrzonowych i trzonowych (specyfika żucia; 25,26)

Piśmiennictwo

- Hennet P.: Review of studies assessing plaque accumulation and gingival inflammation in dogs. *J. Vet. Dent.* 1999, **16**, 23–29.
- Correl C.: *Small Animal Dentistry*. Saunders, 2008, s. 30–34.
- Black A.P., Crichlow A.M., Saunders J.R.: Bacteremia during ultrasonic teeth cleaning and extraction in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1980, **16**, 611–616.
- Samaranayake L.P.: *Podstawy mikrobiologii dla stomatologów*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002, s. 246–247.
- DeBowes L.J.: The effects of dental disease on systemic disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1998, **28**, 1057–1062.
- Williams D., Hughes F., Odell E., Farthing P.: *Patologia przyzębia*, Sanmedica, 1995, s. 12–16.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B.: Living on surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 2008, **16**, 496–506.
- Donlan R.M.: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, **8**, 136–151.
- Aparna M.S., Yadav S.: Biofilms: microbes and disease. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008, **12**, 526–530.
- Strużycka L., Stepien I.: Biofilm - a new understanding of the microbiology. *Nowa Stomatologia* 2009, **9**, 85–89.
- Gibbons R.J.: Role of adhesion in microbial colonization of host tissue. *J. Dent. Res.* 1996, **75**, 866–872.
- Sbordone L., Bortolaia C.: Oral microbial biofilms and plaque related diseases, microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin. Oral Invest.* 2003, **34**, 181–188.
- Marsh P.D.: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004, **38**, 204–211.
- Scannapieco F.: Saliva bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1994, **5**, 203–209.
- Dewhirst F.E., Klein E.A., Thompson E.C., Blanton J.M., Chen T., Milella L., Buckley C.M., Davis I.J., Bennett M.L., Marshall-Jones Z.V.: The canine oral microbiome. *PLoS One.* 2012, **7**(4), e36067. doi: 10.1371/journal.pone.0036067. Epub 2012 Apr 27.
- Jańczyk Z.: *Stomatologia zachowawcza, Zarys kliniczny*. Wyd. III, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008, s. 205–212.
- Listgarten M.A.: The structure of dental plaque. *Periodontol.* 1994, **5**, 52–55.
- Irie Y., Parsek M.R.: Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008, **332**, 67–84.
- Dworecka-Kaszak B.: Are the fungi gossiping? Signaling and quorum sensing – phenomenon responsible for microorganism communication. *Mikologia Lekarska* 2008, **15**, 164–171.
- Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Bleichert D.S., Eglund P.G.: Communication among bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, **66**, 486–450.
- Schlesinger M. J.: Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 1990, **21**, 2111–2114.
- Slots J., Ting M.: Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol.* 2002, **28**, 106–176.
- Mombelli A.: Antimicrobial advances in treating periodontal diseases. *Front. Oral Biol.* 2012, **15**, 133–148.
- Niemiec B.A.: *Veterinary Periodontology*. Wiley-Blackwell, 2013, s.175–186.
- Capik I.: Periodontal health vs. different preventative means in toy-breeds - clinical study. *Proceedings of the 16th European Congress of Veterinary Dentistry* 2007, 31–34.
- Bjone S., Brown W., Harris A., Genity P.M.: Influence of chewing on dental health in dogs. *Proceedings of the 16th European Congress of Veterinary Dentistry* 2007, 45–46.