

Marta Wróblewska^{1,2}, Izabela Strużycka³, Elżbieta Mierzwińska-Nastalska⁴

ZNACZENIE BIOFILMÓW W STOMATOLOGII

¹ Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Zakład Mikrobiologii SP CSK w Warszawie

³ Zakład Stomatologii Zintegrowanej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

⁴ Katedra Protetyki Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

STRESZCZENIE

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w zakresie wiedzy o biofilmach. Są to wielowarstwowe skupiska bakterii lub grzybów, otoczonych wielocukrami wytwarzanymi przez te drobnoustroje, jak również substancjami pochodzącymi ze śliny lub płynu dziąsłowego. Nowoczesne metody badawcze wykazały duże zróżnicowanie środowiska w obrębie biofilmu oraz istnienie metod komunikowania się drobnoustrojów między sobą („quorum sensing”), co sprzyja ich przetrwaniu.

Obecnie uważa się, że większość zakażeń, zwłaszcza o przebiegu przewlekłym z zaostrzeniami, spowodowanych jest wytworzeniem się biofilmu, zwłaszcza w obecności biomateriałów. Należy podkreślić, że przenikanie antybiotyków i innych leków przeciwdrobnoustrojowych do głębszych warstw biofilmu jest znikome, co powoduje trudności terapeutyczne w leczeniu tych zakażeń i niekiedy konieczność usunięcia implantu lub protezy.

Biofilmy mają coraz większe znaczenie w stomatologii, ze względu na coraz szersze stosowanie w praktyce dentystycznej tworzyw sztucznych i materiałów wszczepialnych. Biofilmy wytwarzane są przez drobnoustroje na powierzchni zębów w postaci płytki nazębnej, w zatokach przynosowych, na protezach, implantach dentystycznych, a także w przewodach wodnych w unitach dentystycznych, stanowiąc szczególne zagrożenie dla pacjentów z głębokimi zaburzeniami odporności. W trakcie opracowania są nowe metody leczenia zakażeń związanych z biofilmami.

Słowa kluczowe: *biofilm, stomatologia, protezy zębowe, implanty, przewody wodne w unicie stomatologicznym*

WSTĘP

Drobnoustroje bytujące na powierzchni lub wewnątrz organizmu człowieka określa się mianem mikrobiomu. Szacuje się, że organizm człowieka składa się z około 10^{13} komórek, podczas gdy liczba komórek mikrobiomu jest 10 razy wyższa i liczy 10^{14} komórek, które ważą około 1 – 2 kg (1).

Flora fizjologiczna – oprócz wielu innych funkcji – ma duże znaczenie w ochronie gospodarza przed drobnoustrojami patogennymi, niekiedy jednak sama może powodować trudne do leczenia zakażenia, zwłaszcza jeśli wytworzył się biofilm (2). Powstawaniu biofilmu w organizmie gospodarza (np. człowieka) sprzyja obecność ciał obcych. W stomatologii dotyczy to m.in. protez dentystycznych, obturatorów lub implantów zębowych.

Zbyt mało uwagi zwraca się na biofilmy tworzące się w przewodach wodnych w unicie stomatologicznym jako na przyczynę zakażeń w obrębie jamy ustnej i ogólnoustrojowych, szczególnie u osób z zaburzeniami odporności.

STRUKTURA I FUNKCJE BIOFILMÓW

Biofilmy są to wielowarstwowe skupiska bakterii lub grzybów, złożone z jednego lub wielu gatunków drobnoustrojów (3, 4). Struktury te występują powszechnie w środowisku zewnętrznym (np. zbiorniki wodne, rury kanalizacyjne, krany), lecz również w obrębie makroorganizmów. Obecnie obowiązująca definicja biofilmu określa go jako populację osiadłych komórek drobnoustroju, nieodwracalnie związanych z podłożem

i zanurzonych w matryksie pozakomórkowych substancji polimerowych (wytworzonych przez te komórki), wykazujących zmieniony fenotyp w odniesieniu do tempa rozmnażania się bakterii i transkrypcji ich genów (4).

W procesie powstawania biofilmu wstępnym etapem jest przyleganie (adhezja) komórek drobnoustroju do powierzchni, np. zębów lub protez wskutek interakcji powierzchniowych substancji drobnoustroju ze składnikami śliny znajdującymi się w niezbędnej do procesu adhezji osłonce nabytej, pokrywającej powierzchnię szkliwa zębów, lub substancjami zawartymi w płynie dziąsłowym (5-8). Początkowo dochodzi do odwracalnego nieswoistego przylegania drobnoustrojów do materiału abiotycznego lub żywej tkanki wskutek działania sił van der Waalsa, elektrostatycznych i hydrofobowych.

W dalszym etapie dochodzi do specyficznej reakcji między adhezynami bakterii a powierzchnią osłonki nabytej. Ścisłe przyleganie komórek drobnoustroju do podłoża przez odpowiednio długi okres czasu powoduje, że to połączenie staje się nieodwracalne (4). Stopień przylegania zależy w większości przypadków od gatunku drobnoustroju i liczby komórek, szybkości przepływu cieczy oraz fizykochemicznych cech danej powierzchni. Następnie dochodzi do wytwarzania przez drobnoustroje zewnątrzkomórkowych wielocukrowych polimerów (ang. extracellular polymer substances – EPS) (3).

Po nieodwracalnym związaniu się komórek z podłożem i wytworzeniu pozakomórkowych polisacharydów, tempo i zakres zwiększania się liczby warstw komórek tworzących biofilm zależy nie tylko od szybkości przepływu cieczy, ale również od zawartości czynników odżywczych w podłożu, dostępności żelaza, pH, osmolarności, zawartości tlenu, stężenia leków przeciwbakteryjnych oraz temperatury otoczenia (8). W miarę trwania tego procesu następuje wytwarzanie mikrokolonii oraz dojrzewanie biofilmu (ryc. 1). Utworzony biofilm może wywołać proces patologiczny nawet w miejscach odległych anatomicznie – wskutek odrywania się jego fragmentów zawierających agregaty komórek bakteryjnych, wytwarzania endotoksyn, unikania układu immunologicznego gospodarza, jak również wskutek powstania niszy do rozmnażania się komórek drobnoustrojów opornych na leki przeciwdrobnoustrojowe.

Obecnie wiadomo, że struktura i funkcje drobnoustrojów w biofilmie mogą przypominać organizmy wielokomórkowe dzięki interakcjom i komunikacji między komórkami, nawet należącymi do różnych gatunków. W obrębie matryksu biofilmu funkcjonują one jako konsorcjum, współpracując w stosunkowo skomplikowany i skoordynowany sposób (4). Badania struktury biofilmu wskazują na jej złożoność – istnieje w nim system kanałów, który umożliwia komunikację komórkom drobnoustrojów oraz dostarcza im substancje od-

żywcze i tlen, usuwając jednocześnie zbędne produkty przemiany materii (9). W obrębie biofilmu obserwuje się zróżnicowanie metaboliczne drobnoustrojów – komórki głębiej leżące są mniej aktywne niż znajdujące się w warstwach bliżej powierzchni biofilmu (10). System komunikowania się drobnoustrojów między sobą („quorum sensing”) w obrębie biofilmu sprzyja ich przetrwaniu (6, 9). Międzykomórkowa komunikacja w obrębie biofilmu, a także obecność substancji pozakomórkowych, mogą warunkować tempo wzrostu bakterii, wpływać na ekspresję genów, współpracę metaboliczną i współzawodnictwo komórek, ich kontakt fizyczny oraz wytwarzanie egzoproduktów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (4, 7). W obrębie konglomeratu może dochodzić do zmiany ekspresji setek genów. Badania wykazały również, że zależnie od gęstości komórek w biofilmie obserwuje się koordynację aktywacji określonych genów, co może prowadzić do dalszego zwiększenia jego objętości (11).

Zakażenia przebiegające z tworzeniem się biofilmów rzadko są eliminowane przez układ immunologiczny gospodarza. Mimo iż bakterie tworzące biofilm uwalniają antygeny i stymulują produkcję przeciwciał, jednak komórki w obrębie biofilmu są chronione przed działaniem mechanizmów obronnych gospodarza. Struktura biofilmu hamuje bowiem dostęp przeciwciał, lizozymu, laktoferyny i granulocytów do tworzących go drobnoustrojów, co sprzyja ich przetrwaniu. Co więcej, ta odpowiedź immunologiczna może wręcz doprowadzić do uszkodzenia sąsiednich tkanek, sprzyjając utrzymywaniu się procesu zapalnego (4, 12).

Obecnie uważa się, że większość bakterii i grzybów – jeśli nie wszystkie – mogą tworzyć biofilm, jednak badania naukowe w tym zakresie wskazują na szczególne znaczenie niektórych gatunków, takich jak ziarenkowiec Gram-dodatni *Staphylococcus epidermidis*, pałeczka Gram-ujemna *Pseudomonas aeruginosa* oraz drożdżak *Candida parapsilosis* (9, 13, 14). Przyleganie do powierzchni abiotycznych oraz wytwarzanie biofilmu przez bakterie i grzyby jest obecnie oceniane jako ważne czynniki wirulencji tych patogenów.

Niektóre antybiotyki działają na drobnoustroje dzielące się, toteż komórki w głębszych warstwach biofilmu – mniej aktywne metabolicznie – mogą być bardziej odporne na leki przeciwdrobnoustrojowe, a także detergenty i środki dezynfekcyjne lub antyseptyczne, niż komórki znajdujące się bliżej powierzchni biofilmu lub wolno żyjące (15). Wiadomo też, że przenikanie antybiotyków do biofilmu jest ograniczone lub znikome, co powoduje trudności terapeutyczne w leczeniu tych zakażeń. Jak wynika z wielu doniesień naukowych wrażliwość komórek w biofilmie na antybiotyki jest do 1000 razy mniejsza niż poza tą strukturą (4, 16). Niekiedy powoduje to konieczność usunięcia implantu lub protezy. Inne mechanizmy odpowiedzialne za oporność bakterii na leki przeciwbakteryjne w obrębie biofilmu

to inaktywacja antybiotyków przez polimery pozakomórkowe lub enzymy modyfikujące antybiotyki (4, 10).

Aktualnie uważa się, że antybiotyki mogą modyfikować funkcjonowanie biofilmu. Ważną rolę w inaktywacji komórek bakteryjnych w biofilmach mogą odgrywać makrolidy, ze względu na ich zdolność do hamowania „quorum sensing”, jak również dzięki immunomodulacyjnemu działaniu tej grupy leków, co znalazło już zastosowanie terapeutyczne (17).

ZNACZENIE KLINICZNE BIOFILMÓW

Obecnie szacuje się, że przyczyną ponad 60% wszystkich zakażeń bakteryjnych, zwłaszcza o przebiegu przewlekłym, jest biofilm (6). Obejmują one zakażenia związane z coraz powszechniejszym stosowaniem w medycynie tworzyw sztucznych w postaci centralnych i obwodowych cewników naczyniowych, cewników moczowych, układu zastawkowego do drenażu komorowego, stentów czy implantów (4, 8). Biofilmy wytwarzane są przez drobnoustroje również na powierzchni lub w obrębie takich struktur, jak soczewki kontaktowe, bezigłowe łączniki, rurki dotchawicze, wkładki wewnątrzmaciczne, sztuczne zastawki serca, rozruszniki, cewniki do dializy otrzewnowej, protezy stawowe, dreniki tympanostomijne czy protezy głosowe krtani. Zakażenia zaliczane obecnie do infekcji związanych z wytwarzaniem biofilmów obejmują także zapalenie natywnych zastawek wsierdza, przewlekłe bakteryjne zapalenie gruczołu krokowego lub infekcje związane z mukowiscydozą.

Ze względu na bliskość anatomiczną duże znaczenie w stomatologii może mieć biofilm znajdujący się w zatokach przynosowych. Jego obecność stwierdza się na powierzchni błon śluzowych 75-100% osób z przewlekłym zapaleniem zatok (18, 19). Mladina i wsp. stwierdzili obecność biofilmu w 62/65 (95,4%) próbek „zdrowej” błony śluzowej zatok przynosowych (20).

Infekcje związane z tworzeniem biofilmów charakteryzują się nawracaniem objawów chorobowych, nawet po wielokrotnych kuracjach antybiotykowych. Standardowa terapia antybiotykowa eliminuje bowiem tylko komórki planktonowe (swobodnie pływające), podczas gdy komórki przylegające do podłoża są zdolne do rozmnażania się w obrębie biofilmu i mogą nadal rozsiewać się po ukończeniu leczenia antybiotykami (8).

BIOFILM ZĘBOWY

Płytką nazębną jest najwcześniej i jak dotąd najlepiej opisanym biofilmem w organizmie człowieka. Najnowsze badania molekularne wskazują, że zawiera ona do 1000 gatunków bakterii (21, 22).

Istnieje zróżnicowanie flory bakteryjnej na powierzchni zębów w płytce naddziąsłowej w porównaniu do płytki poddziąsłowej (tab. 1). W płytce naddziąsłowej dominują bakterie Gram-dodatnie, a w poddziąsłowej – w dużej mierze Gram-ujemne. Biofilm w obrębie płytki naddziąsłowej ma znaczenie w etiologii próchnicy korony i korzenia zęba (tzw. próchnica cementu korzeniowego) oraz próchnicy przy wypełnieniach (tzw. próchnica wtórna). Biofilm występuje także w zainfekowanych kanałach korzeniowych.

Drobnoustroje wchodzące w skład płytki, takie jak *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*, uznaje się za pierwotne patogeny w etiologii próchnicy szkliwa oraz cementu korzeniowego, natomiast pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* są odpowiedzialne za postęp choroby (23). Inne bakterie, w tym *Streptococcus oralis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus salivarius*, jak również *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* i *Actinomyces viscosus* prawdopodobnie również mogą, w sprzyjających warunkach, wywoływać próchnicę (24). Ostatnio ukazała się obszerna praca poglądowa na ten temat (25).

Bakterie tworzące biofilm płytki poddziąsłowej są przyczyną trudności w leczeniu zapaleń dziąseł i przyzębia. W zapaleniach dziąseł czynnik zapaleniotwórczy stanowi niespecyficzna flora bakteryjna, natomiast w zapaleniach przyzębia w szczelinie dziąsłowej występują głównie takie bakterie, jak *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* oraz *Fusobacterium nucleatum* (26).

PŁYTKA PROTEZ

W praktyce dentystycznej dużym problemem klinicznym jest biofilm zwany płytką protez (ang. *denture plaque*) w związku z powszechnym ich stosowaniem w populacji (27). Rozległe uzupełnienia protetyczne są najczęściej wykonywane z tworzywa akrylowego, które stwarza korzystne warunki do odkładania się płytki protez. Wykazano łatwe przywieranie komórek grzybów do powierzchni akrylu. W badaniach mikroskopowych stwierdza się niejednorodną strukturę i liczne porowatości tworzywa akrylowego oraz wnikającą we wszystkie zagłębienia płytkę protez wraz z komórkami *Candida albicans* (28). Szczególnie silną adhezję do akrylu wykazuje postać mycelialna grzybów, poprzez wnikanie strzępek i pseudostrzępek do mikroporów. Duża wilgotność i podwyższona temperatura oraz brak możliwości samooczyszczania przez ślinę, występujące zwłaszcza pod płytą protezy górnej, a także zaniedbania w higienie protez, ułatwiają gromadzenie się płytki i rozmnażanie bakterii i grzybów.

Protezy stanowią podłoże sprzyjające wytwarzaniu biofilmu przez bakterie lub grzyby, których gęstość może wynosić do 10^{11} komórek/mg płytki protez (29). Tworzą go najczęściej drożdżaki *Candida* spp., a także bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Prevotella* oraz *Actinomyces* (30, 31). Stomatopatie protetyczne związane są najczęściej z zakażeniami grzybiczymi o etiologii *Candida* spp. oraz z infekcjami bakteryjnymi. Obecność biofilmów bakteryjnych i grzybiczych stwierdza się również na powierzchni obturatorów (32).

W profilaktyce zakażeń niezmiernie istotne jest więc dbanie przez użytkowników uzupełnień protetycznych o higienę jamy ustnej i protez. Należy podkreślić, że biofilmy te mogą być przyczyną nie tylko zakażenia w obrębie jamy ustnej, lecz także groźnych infekcji układowych i ogólnoustrojowych (33).

IMPLANTY

Ogromnym postępowaniem w stomatologii jest możliwość stosowania implantów zębowych (7). Ma to coraz większe znaczenie w stomatologii estetycznej, urazowej oraz w chirurgii szczękowo-twarzowej. Istnieje jednak problem powstawania biofilmu na ich powierzchni i związanych z tym zakażeń, które mogą prowadzić nawet do konieczności usunięcia implantu. W kieszonek okołimplantowych objętych stanem zapalnym wykazano obecność Gram-ujemnych pałeczek charakterystycznych dla zapaleń przyzębia. Na uwagę zasługuje również obecność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* i z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz grzybów z rodzaju *Candida*, które nie mają pierwotnego związku z *periodontitis*. Czynnikiem ryzyka powstania biofilmu związanego z implantem zębowym jest m. in. rodzaj powierzchni wszczepu oraz obecność białek adhezyjnych wytwarzanych przez dany drobnoustrój, a także inne czynniki miejscowe lub ogólnoustrojowe (34). W implantologii znajdują zastosowanie materiały charakteryzujące się jak najmniejszą zdolnością przylegania drobnoustrojów i tworzenia się biofilmu (np. tytan i stopy tytanu) (35).

BIOFILMY W PRZEWODACH WODNYCH UNITU STOMATOLOGICZNEGO

Przewody wodne unitu stomatologicznego stanowią przyjazne środowisko dla drobnoustrojów tworzących biofilm, zwłaszcza w przypadku zastoju wody wskutek jej rzadkiego stosowania (w czasie przerwy w działaniu gabinetu dentystycznego). Zawartość bakterii w mililitrze wody unitu stomatologicznego sięga 10^4 – 10^6 jednostek tworzących kolonie (jtk/ml), podczas gdy

zalecana norma zawartości bakterii w wodzie podczas niechirurgicznych zabiegów stomatologicznych wynosi ≤ 500 jtk/ml (36). Według zaleceń ADA (American Dental Association) woda z unitu stomatologicznego powinna zawierać nie więcej niż 200 jtk/ml (37).

Ryzyko zakażenia związanego z tą florą jest szczególnie duże u pacjentów wymagających leczenia stomatologicznego w okresie immunosupresji. W wodzie znajdującej się w przewodach unitu stomatologicznego szczególnie często występują niefermentujące pałeczki Gram-ujemne, takie jak *Pseudomonas aeruginosa* lub *Acinetobacter baumannii*, często odpowiedzialne za zakażenia oportunistyczne w tej grupie pacjentów (38). Wykryto też prątki (*Mycobacterium* spp.) oraz drożdżaki z rodzaju *Candida*. Opisano również związane z leczeniem stomatologicznym zakażenie wywołane przez pałeczkę *Legionella pneumophila* (39). Bzdęga i wsp. zalecają badanie mikrobiologiczne wody z przewodów wodnych unitu dwa razy w roku, w tym w kierunku *Legionella* spp. (40). Wykazano, że częstość występowania *Legionella pneumophila* w wodzie z unitu stomatologicznego może sięgać 25 – 36% urządzeń (41, 42).

W profilaktyce zakażeń związanych z wodą w liniach wodnych unitu stomatologicznego stosuje się filtry, chemiczną dezynfekcję przewodów (według zaleceń producenta) oraz zastawki zapobiegające cofaniu się wody (43). Dentystom zaleca się też przepłukanie przewodów wodnych unitu stomatologicznego przez 2 – 5 minut przed rozpoczęciem pracy w danym dniu oraz przez 30 sekund przed użyciem u kolejnego pacjenta. Hamowaniu wytwarzania biofilmu w liniach wodnych unitu stomatologicznego może sprzyjać też impregnowanie tych przewodów substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, np. fluorkiem poliwinylidenu (PVDF) (44).

PERSPEKTYWY LECZENIA ZAKAŻEŃ ZWIĄZANYCH Z BIOFILMAMI

Obecnie trwają intensywne badania naukowe mające na celu określenie nowych możliwości terapii zakażeń związanych z biofilmami poprzez dobór odpowiedniego antybiotyku (np. makrolidu) lub zastosowanie nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych wykazujących działanie w obrębie biofilmu. Należą do nich białka kationowe, kationowe monomery, leki hamujące „quorum sensing” (ang. quorum sensing inhibitors – QSIs) lub „rozpuszczające” biofilmy (45-47). Szczególne nadzieje związane są z opracowaniem substancji o szerokim spektrum działania, które mogłyby być stosowane u pacjentów – w trakcie badań klinicznych jest m. in. związek NVC-422 (N-chlorotauryna). Najnowsze badania wskazują na perspektywy leczenia zakażeń związanych z biofilmem z wykorzystaniem synergistycznego działa-

nia połączeń antybiotyków z innymi substancjami, np. N-acetylcysteiną o działaniu mukolitycznym, etanolem lub EDTA (48). Co więcej, biofilmy wytworzone przez *Candida albicans* mogą być zwalczane skojarzoną terapią leku przeciwgrzybiczego (np. amfoterycyna B, kaspofungina lub flukonazol) z antybiotykiem działającym na drobnoustroje Gram-dodatnie, takim jak doksycyklina lub tigeocyklina (48, 49).

W implantologii stomatologicznej dąży się obecnie do stosowania materiałów o podwójnej funkcji – hamujących adhezję drobnoustrojów, a jednocześnie stymulujących integrację implantu z tkankami, np. dzięki zawartości aminokwasów, takich jak arginina, glicyna i kwas asparaginowy (50).

Otrzymano: 13.10.2015 r.

Zaakceptowano do publikacji: 9.11.2015 r.

Adres do korespondencji:

Marta Wróblewska

Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Banacha 1a

02-097 Warszawa

Tel.: (22) 599-17-77, fax: (22) 599-17-78

Adres e-mail: zms1@wum.edu.pl

