

IADR, Baltimore, 9.–12. mars 2005:

Mikrobiell økologi og dentale biofilmer

Årsmøtet til International Association for Dental Research (IADR) i 2005 fant sted i Baltimore, Maryland, USA 9.–12. mars. Dette var et fellesmøte med American Association for Dental Research og Canadian Association for Dental Research. Det var registrert vel 3 700 forskningsrapporter innbefattet symposier, og som vanlig ved disse møtene ble det avholdt en stor dentalutstilling. Forskning på mikrobiell økologi og dentale biofilmer var ett av temaene på møtet.

Undertegnede ledet sammen med professor Bernhard Guggenheim ved Universitetet i Zürich en forskningssekvens om mikrobiell økologi i dentale biofilmer. Sekvensen var godt besøkt med ca. 200 tilhørere. Her ble det presentert tre forskningsrapporter om en multispecies biofilmmodell av supragingival plakk («Zürich biofilmmodellen») som opprinnelig ble etablert i samarbeid med Det odontologiske fakultet i Bergen ved undertegnede. Denne modellen er så langt den eneste *in vitro* modellen som kan brukes til å undersøke antimikrobiell effekt av munnskyllevæsker i klinisk relevante konsentrasjoner. Resultater i modellen har vist svært god overensstemmelse med plakkhemmende effekt av munnskyllevæsker i kliniske studier, og modellen er derfor velegnet til preklinisk utprøving av antatte plakkhemmere. Modellen er dessuten blitt brukt til å studere flere andre kariologi-relaterte problemstillinger, bl. a. adhesjon og tredimensjonal fordeling av bakte-

rier, ekstracellulær matriks og masse-transport i biofilmer.

Xylitols effekt på biofilmdannelse

Selv presenterte jeg et arbeid om effekt av xylitol på biofilmdannelse. Xylitol og sorbitol er begge tannvennlige suktersubstitutter, men xylitol er også blitt tillagt anti-kariogene, altså terapeutiske, egenskaper. Denne effekten har vært omstridt helt siden de velkjente «Turku sugar studies» i 1975. Det er publisert ca. 300 publikasjoner om emnet. Xylitol metaboliseres ikke av plakkbakterier. Det er blitt hevdet at bruk av xylitol har flere kliniske fordeler fremfor bruk av sorbitol, bl. a. at xylitol reduserer adhesjon av mutansstreptokokker og syreproduksjon i plakk, bakterievekst og plakkmengde samt karies ved å stimulere salivasekresjonen. Biofilmmodellen syntes egnet til å studere en av disse påstandene, nemlig om den såkalte «futile xylitol cycle» kunne forklare den påståtte reduksjonen av mutansstreptokokker (*Streptococcus sobrinus* og *Streptococcus mutans*) i plakk. «Futile xylitol cycle» er en energikrevende prosess hvor bakteriene tar opp, akkumulerer og skiller ut xylitol uten å nyttiggjøre seg det. Målet med vår undersøkelse var å studere om gjentatte eksponeringer med xylitol ville støtte ovennevnte påstand.

Biofilmforsøkene utføres ved at en standardisert kultur av seks orale mikroorganismer, tre Grampositive bakterier (*Streptococcus oralis*, *S. sobrinus* eller *S. mutans* og *Actinomyces naeslundii*), to Gramnegative bakterier (*Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*) og en sopp (*Candida albicans*), vokser i tre døgn på hydroksyapatittskiver eller på bovine emaljeskiver som først dekkes med saliva (pellikel). I dette arbeidet fikk biofilmene «måltider» tre ganger daglig for å etterligne vekstforholdene i munnen.

Mikroorganismene vokste på hydroksyapatittskiver i saliva og ble tilført vekstmedium som inneholdt glukose og sukrose tre ganger daglig i 45 minutter. Før eller etter «måltidene» ble biofilmene eksponert for enten xylitol, sorbitol eller saltvann (negativ kontroll) i 20 minutter. Vi brukte både xylitol-sensitive mutansstreptokokker med normal «futile cycle»-aktivitet og xylitol-resistente mutansstreptokokker som har lav «futile cycle»-aktivitet. Etter hver testperiode ble biofilmene slemmet opp i saltvann og dyrket på uspesifikke og spesifikke agarmedier, hvorefter det totale antallet bakterier, streptokokker, mutansstreptokokker og *S. oralis* ble telt.

Resultatene viste at xylitol ikke reduserte antallet levende bakterier i biofilmene enten det ble tilført før eller etter «måltider». Heller ikke sorbitol før «måltidene» påvirket bakterieveksten. I noen tilfeller fant vi at sorbitol etter «måltidene» økte svakt antallet *S. sobrinus* og *S. mutans*. Dette kan forklares med at noe sorbitol var til stede i biofilmene etter tilførsel.

Våre funn støtter ikke påstanden om at xylitol reduserer eller eliminerer mutansstreptokokker i plakk ved «futile cycles». Mangel på samsvar med tidligere publiserte *in vitro* data kan lett forklares med at vi eksponerte multispecies biofilmer og ikke planktoniske bakterier (flytende i reagensrør) til xylitol under realistiske betingelser, dvs. for begrensede tidsrom og i rime-
lige konsentrasjoner.

Stivelse og kariogenisitet

Bernhard Guggenheim og Thomas Thurnheer ved Universitetet i Zürich presenterte arbeidet for å vise kariesfremmende evne av stivelse i forhold til ulike sukkerarter. Helt siden Miller lanserte den kjemo-parasittære teorien på slutten av 1800-tallet, har den kariogene evnen til stivelse vært et debattert

Forfatter

Elin Giertsen, professor, dr.odont.
Odontologisk institutt – kariologi,
Universitetet i Bergen

tema. Stivelse var mindre kariogent enn monosakkarider som glukose og fruktose eller disakkaridet sukrose. Dette forklares ved at streptokokker, spesielt mutans-streptokokker, ikke produserer ekstracellulære polysakkarider (EPS) fra stivelse. Det er postulert at stivelse fører til redusert kolonisering av mutans-streptokokker i plakk og dermed mindre syrepotensial.

I hvilken grad karbohydratene glukose, sukrose og stivelse påvirket demineralisering av emalje ble også testet. For undersøkelser av mikrofloraen vokste biofilmene på hydroksyapatittskiver i tre døgn i et medium som besto av 70 % saliva og 30 % vekstmedium som inneholdt glukose+sukrose, glukose+sukrose+stivelse eller bare stivelse (i begynnelsen kun glukose). Her var det totale karbohydratinnholdet i vekstmediet enten lavt eller høyt. Det totale antallet mikroorganismer og arter som streptokokker ble bestemt ved dyrkning. Ved lavt karbohydratinnhold og relativ høy pH i vekstmediet, ble det liten forskjell på antallet levende mikroorganismer i biofilmene ved de ulike karbohydratkilder. Høyt karbohydratinnhold og følgelig lav pH i vekstmediet påvirket imidlertid den mikrobielle sammensetningen dramatisk; antallet levende mikroorganismer var lavere, men ikke antallet *S. sobrinus* som er syretolerant og *V. dispar* som fermenterer laktat. Det var bemerkelsesverdig at antallet streptokokker og *S. sobrinus* var lavere og varierte i stor grad i biofilmer som vokste med kun stivelse som karbohydratkilde sammenlignet med de andre kombinasjonene av karbohydrater. Dette skyldes trolig redusert adhesjon eller koadhesjon i fravær av EPS produsert fra sukrose.

I demineraliseringsstudiene vokste biofilmene på bovine emaljeskiver med underliggende dentin og med høyt karbohydratinnhold i vekstmediet. Demineralisering ble målt ved bruk av Quantitative-light induced fluorescence (QLF). QLF er en sensitiv, ikke-invasiv, optisk teknikk hvor tannsubstansenes egenfluorescens brukes til å påvise endringer i mineralinnholdet. Ved utvikling av demineralisering reduseres fluorescensen. Bildeanalyser gir et kvantitativt mål av mineraltapet. Som

ventet, og i tråd med resultater fra dyreforsøk og epidemiologiske studier, ble det utviklet mest demineralisering når biofilmene vokste i glukose+sukrose, litt mindre ved glukose+sukrose+stivelse, og svært mye mindre ved kun stivelse som karbohydratkilde. Innholdet av amylase og pH i vekstmediene ble også målt. pH i vekstmediene varierte fra 4.6 til 4.8. Den svake demineraliseringen ved kun stivelse kan neppe forklares med pH i vekstmediet. Forskjellene kunne heller ikke forklares med lavt innhold av enzymet amylase.

Disse studiene bekreftet at stivelse har mindre kariogen evne enn glukose og sukrose. Guggenheim konkluderte med at «Zürich biofilmmodellen» er vel egnet til å studere ulike karbohydraters kariogene evne og innvirkning på den mikrobielle sammensetningen.

Diffusjon av molekyler i plakk

Diffusjon av molekyler i plakk er vesentlig for kariesutvikling. Betydningen av EPS for plakkets diffusjonsegenskaper diskuteres. Noen har funnet at EPS fungerer som en diffusjonsbarriere, mens andre har hevdet at økt mengde EPS i plakk øker diffusjonshastigheten og atter andre har ment at mengden EPS ikke har betydning. Vi har tidligere vist at ved å erstatte *S. mutans* med mutanter som mangler enzymer for å danne EPS, inneholdt biofilmene vesentlig mindre EPS, og molekyler diffundererte hurtigere og lenger inn. Thurnheer tok i sin presentasjon for seg hvordan stivelse i vekstmediet virket inn på biofilmenes struktur og diffusjonsegenskaper. Biofilmene vokste på hydroksyapatittskiver i tre døgn i 70 % saliva og 30 % vekstmedium som inneholdt stivelse eller glukose+sukrose (i begynnelsen bare glukose). De ble deretter tilført to fluorescerende stoffer, ett som bindes spesifikt til mikroorganismer og et annet som bindes til EPS for å skille mellom volumene av disse. I diffusjonsstudiene ble biofilmene tilført fluorescerende dextraner med ulik ladning og molekylvekt. Struktur og diffusjon ble undersøkt ved bruk av konfokal-laser-skanningmikroskopi. Teknikken tillater å studere biofilmenes egenskaper uten å forstyrre oppbygningen. Ved å erstatte glukose+sukrose

i vekstmediet med stivelse minket mengden EPS dramatisk og diffusjonshastigheten av dextraner økte. Betydningen av den økte diffusjonshastigheten for den kariogene evnen til stivelse er usikker.

Takk

Takk til Knut og Liv Gards minnefond for økonomisk bidrag.

Adresse: Odontologisk institutt – kariologi,
Årstad v. 17, 5009 Bergen.
E-post: Elin.Giertsen@odont.uib.no